

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3082

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.02.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 25.02.1999 29.03.1999 07.05.1999 07.05.1999
07.08.1999 07.08.1999 07.09.1999 07.09.1999
29.10.1999 23.11.1999

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/9904405 1999/9907151 1999/9910537 1999/9910538
1999/9918594 1999/9918603 1999/9921046 1999/9921047
1999/9925619 1999/9927698

(33) Země priority: **GB GB GB GB GB GB GB GB GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.02.2002**
(Věstník č. 2/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/01455**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/50460**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/00
C 07 K 16/42
A 61 K 39/00
A 61 K 39/385
A 61 K 39/395
G 01 N 33/577
G 01 N 33/68
A 61 P 37/08

(71) Přihlašovatel:

PEPTIDE THERAPEUTICS LIMITED, Cambridge,
GB;
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:

Dyson Michael, Cambridge, GB;
Friede Martin, Brentford, GB;
Greenwood Judith, Cambridge, GB;
Hewitt Ellen, Cambridge, GB;
Lamont Alan, Cambridge, GB;
Mason Sean, Cambridge, GB;
Randall Roger, Cambridge, GB;
Turnell William Gordon, Cambridge, GB;
Van Mechelen Marcelle Paulette, Rixensart, BE;
Vinalys de Bassols Carlota, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Peptid

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká poskytnutí nových farmaceutických prostředků pro léčení, prevenci nebo zmírňování alergického onemocnění. Novými prostředky jsou zvláště izolované peptidy obsahující epitopy nebo mimotopy povrchově exponovaných oblastí domény C₂ IgE. Autoři zjistili, že tyto nové oblasti mohou být cílové oblasti pro jak pasivní, tak i aktivní imunoprophylaxi nebo imunoterapii. Řešení se dále týká způsobů výroby farmaceutických prostředků a jejich použití v lékařství. Provedení také tvoří ligandy, zvláště monoklonální protilátky, které jsou schopny vázat se na povrchově exponované oblasti IgE podle předkládaného řešení a jejich použití v lékařství jako pasivní imunoterapie, nebo při imunoprophylaxi.

Peptid

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká poskytnutí nových léků pro léčení, prevenci nebo zmírnění alergického onemocnění. Novými léky jsou
5 konkrétně izolované peptidy obsahující epitopy nebo mimotopy povrchových oblastí domény C ϵ 2 IgE. Autoři vynálezu zjistili, že tyto nové oblasti mohou být cílové jak pro pasivní, tak i aktivní imunoprophylaxi nebo imunoterapii. Vynález se dále týká způsobů výroby těchto léků, farmaceutických prostředků s jejich obsahem
10 a jejich použití v lékařství. Jedno provedení předkládaného vynálezu se také týká ligandů, zvláště monoklonálních protilátek, které jsou schopny vazby na povrchové oblasti IgE podle předkládaného vynálezu, a jejich použití v lékařství pro pasivní imunoterapii nebo při imunoprophylaxi. Jedním provedením předkládaného vynálezu jsou také
15 nepeptidové mimotopy.

Dosavadní stav techniky

Při alergické odpovědi jsou příznaky běžně spojované s alergií způsobeny uvolňováním alergických mediátorů, jako je histamin,
20 z imunitních buněk do obklopujících tkání a cévních struktur. Histamin se normálně uchovává v žírných buňkách a basofilech, do té doby, než se interakcí s IgE specifickým pro alergen spustí jeho uvolňování. Úloha IgE při vyvolávání alergických odpovědí jako je astma, alergie na potraviny, atopické dermatitidy, hypersenzitivita typu-I a alergická
25 rýma, je dobře známa. Při styku s antigenem jako je pyl nebo prach obsahující alergeny roztočů provádějí B-buňky syntézu IgE specifických pro alergen. IgE specifický pro alergen se potom váže na receptor Fc ϵ RI (receptor pro IgE s vysokou afinitou) na basofilech

a žírných buňkách. Jakékoli další setkání s alergenem vede ke spuštění uvolňování histaminu ze žírných buněk nebo basofilů přemostěním sousedících komplexů IgE/Fc ϵ RI (Sutton a Gould, Nature, 1993, 366: 421 - 428; EP 0 477 231 B1).

5 IgE jako všechny imunoglobuliny obsahuje dva těžké a dva lehké řetězce. Těžký řetězec ϵ se skládá z pěti domén: jedné variabilní domény (VH) a čtyř konstantních domén (C ϵ 1 až C ϵ 4). Molekulová hmotnost IgE je přibližně 190 000 Da (190 000), těžký řetězec má délku přibližně 550 aminokyselin. Struktura IgE je diskutována v
10 článku Padlan a Davis (Mol. Immunol., 23, 1063 - 75, 1986) a Helm a další (struktura modelu 2IgE uložena 2/10/90 u PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://pdb-browsers.ebi.ac.uk>)). Druhá doména, C ϵ 2, obsahuje přibližně aminokyseliny 226 - 328 IgE (Flanagan J. G. a Rabbitts, T. H., 1982, EMBO J., 1, 655 - 660; Kenten a další, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci.,
15 USA, 79, 6661 - 6665), ale může zahrnovat další aminokyseliny. Porovnáním známé struktury IgG1 lze odvodit, že počáteční místo domény C ϵ 3 je Ser337.

V minulosti byl se střídavými úspěchy prováděn velký počet
20 pasivních nebo aktivních imunoterapeutických přístupů navržených pro intervefenci s mechanismem uvolňování histaminu zprostředkovaným IgE. Tyto přístupy zahrnují interferenci s IgE nebo komplexu alergen/IgE, které se vážou na Fc ϵ RI nebo Fc ϵ RII (receptor IgE s nízkou afinitou), buď s pasivně podávanými protilátkami, nebo
25 pasivně podávanými peptidy odvozenými z IgE, pro kompetitivní vazbu na receptory. Navíc někteří autoři popsali použití specifických peptidů odvozených od IgE při aktivní imunizaci pro stimulaci imunitních odpovědí inhibujících uvolňování histaminu.

Bylo uváděno, že domény IgE, které se účastní vazby IgE na
30 receptor pro IgE, jsou C ϵ 3 a C ϵ 4 (Sutton, B. J. a Gould, H. J., Nature,

1993, 366: 421 - 428; WO 97/31948), a dosavadní strategie při léčení se tedy soustředily na části těchto dvou domén.

V průběhu těchto výzkumů se pracovníci v tomto oboru setkali s řadou podmínek a potíží, které je nutno brát v úvahu při navrhování nových antialergických terapií. Jeden z nejnebezpečnějších problémů se týká účasti přemostění IgE v signálu uvolňujícím histamin. Nejčastěji se stává, že protilátky anti-IgE vytvořené při aktivní vakcinaci jsou schopny spustit uvolňování histaminu samy o sobě, zesílením sousedících komplexů IgE-receptor v nepřítomnosti alergenu. Tento jev se nazývá anafylaktogenicita. Mnoho komerčně dostupných monoklonálních protilátek anti-IgE, které se normálně používají pro detekci IgE, jsou ovšem anafylaktogenní, a jsou tedy nepoužitelné a potenciálně nebezpečné při podávání pacientovi.

Zda protilátka anafylaktogenní je nebo není, závisí na umístění cílového epitopu na molekule IgE. Na základě současného stavu znalostí v této oblasti a přes enormní vědecký zájem a úsilí však je pouze malá nebo vůbec žádná možnost předpovědět, jaké vlastnosti může mít nějaká protilátka nebo epitop, a zda by mohly mít kladný nebo záporný klinický účinek na pacienta.

Proto se musí z důvodu bezpečnosti a účinnosti vázat pasivně podávané nebo vakcínami indukované protilátky v oblasti IgE, která je schopna interferovat s biochemickou cestou spouštění histaminu, aniž by byly samy o sobě anafylaktické. Předkládaný vynález dosahuje všech těchto cílů a poskytuje farmaceutické prostředky, které jsou schopny vyvolat tvorbu neanafylaktických protilátek, které inhibují uvolňování histaminu. Tyto farmaceutické prostředky mohou tvořit základ aktivní vakcíny nebo mohou být použity pro vyvolání tvorby příslušných protilátek pro pasivní imunoterapii, nebo mohou být samotné pasivně podávány pro terapeutický účinek.

Odborníci v oboru již provedli mnoho práce pro identifikaci specifických protilátek anti-IgE, které mají nějaké prospěšné účinky

proti alergické reakci zprostředkované IgE (WO 90/15878, WO 89/04834, WO 93/05810). Byly také prováděny pokusy o identifikaci epitopů rozpoznávaných těmito použitelnými protilátkami pro vytvoření peptidových mimotopů těchto epitopů a pro jejich použití jako imunogenů pro produkci protilátek anti-IgE.

WO 97/31948 popisuje příklad tohoto typu práce a dále poskytuje peptidy IgE z domén C ϵ 3 a C ϵ 4 konjugovaných na nosné molekuly pro účely aktivní vakcinace. Tyto imunogeny mohou být použity při studiích vakcinace a uvádí se, že jsou schopny vytvořit protilátky, které následně inhibují uvolňování histaminu *in vivo*. Při této práci byla popsána monoklonální protilátka (BSW17), o které se uvádělo, že je schopna vázat se na peptidy IgE obsažené uvnitř domény C ϵ 3, které jsou použitelné pro účely aktivní vakcinace.

EP 0 477 231 B1 popisuje imunogeny odvozené od domény C ϵ 4 IgE (zbytky 497 - 506, známé také jako Stanworthův dekapeptid), konjugované k látce Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) používané při aktivní vakcinační imunoprofylaxi. WO 96/14333 pokračuje v práci popisované v EP 0 477 231 B1.

Další přístupy jsou založeny na identifikaci peptidů, které samy soutěží o vazbu IgE na receptory s vysokou nebo nízkou afinitou na basofilech nebo žírných buňkách (WO 93/04173, WO 98/24808, EP 0 303 625 B1, EP 0 341 290).

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález identifikuje nové epitopy exponované na povrchu domény C ϵ 2 IgE, které mohou být použity jako cíl pro aktivní nebo pasivní imunoprofylaxi nebo terapii alergických stavů onemocnění. Předkládaný vynález poskytuje peptidy zahrnující izolované epitopy jako takové, a dále poskytuje mimotopy těchto nově identifikovaných epitopů, které mohou být jako takové použity při

léčení alergie, nebo mohou být použity v imunogenech při aktivní
vakcinační imunoprophylaxi nebo terapii. Izolované epitopy nebo
mimodopy podle předkládaného vynálezu se s výhodou používají
v imunogenech pro aktivní vakcinační protokoly pro indukci vlastních
5 protilátek anti-IgE, které samy omezují, snižují nebo odstraňují
alergické odpovědi nebo příznaky u vakcinovaných pacientů.
Alternativně mohou být mimotopy imunogenů podle předkládaného
vynálezu pasivně podávány pacientovi pro omezení, snížení nebo
odstranění alergických odpovědí nebo příznaků u vakcinovaných
10 subjektů.

Peptidy, které obsahují izolované epitopy podle předkládaného
vynálezu jsou imunogenní, jestliže se vhodně podávají (například na
nosiči), a jsou schopny indukovat vlastní protilátky anti-IgE, které jsou
neanafylaktogenní a fungují při zmírňování alergických odpovědí *in*
15 *vivo*. Epitopy nebo mimotopy podle předkládaného vynálezu jsou
s výhodou odvozeny výlučně z domény C ϵ 2, tím, že nejsou odvozeny
z jiné domény, tj. nenacházejí se v doménách C ϵ 1, C ϵ 3 nebo C ϵ 4. Ve
výhodném provedení jsou odvozeny zvláště od domény kódované
zbytky Ser222-Ala329 lidského IgE.

20 Specifické epitopy domény C ϵ 2, u kterých se zjistilo, že jsou
zvláště vhodné pro použití v mimotopech nebo imunogenech podle
předkládaného vynálezu, jsou ty epitopy, u kterých autoři
předkládaného vynálezu zjistili, že jsou exponovány na povrchu.
Expozice oblasti IgE na povrchu může být určena z modelové struktury
25 (Padlan a Davies, Mol. Immunol., 23, 1063 - 75, 1986; Helm a další,
modelová struktura 2IgE uložena 2/10/90 u PDB (Protein Data Bank,
Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)). Autoři
předkládaného vynálezu zjistili, že epitopy použitelné v rámci
předkládaného vynálezu jsou také vysoce exponovány na povrchu.
30 Z tohoto pozorování autoři vynálezu navrhli způsob poskytnutí dalších
vhodných epitopů, tedy epitopů s vysoce dostupnými oblastmi

vypočtenými na základě posouvajícího se okénka pěti zbytků. Autoři vynálezu zjistili, že výhodné oblasti domény C ϵ 2 mají přístupný povrch vypočtený pomocí posuvného okénka pěti zbytků, s použitím softwaru Molecular Simulations Software (MSI), větší než 50 Å², a s výhodou větší než 80 Å² (0,5, popřípadě 0,8 nm²).

Příklady těchto C ϵ 2 IgE epitopů exponovaných na povrchu jsou:

Název peptidu	Sekvence	Umístění sekvence a domény IgE	SEQ ID No.
P1	EDGQVMDVD	C ϵ 2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	C ϵ 2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	C ϵ 2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	C ϵ 2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	C ϵ 2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	C ϵ 2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	C ϵ 2 (Phe231-Thr235)	7

Peptidy obsahující tyto epitopy tvoří výhodné provedení předkládaného vynálezu. Část předkládaného vynálezu tvoří také mimotopy, které mají stejné vlastnosti jako epitopy, a imunogeny obsahující tyto mimotopy, které vytvářejí imunitní odpověď křížově reagující s epitopem IgE C ϵ 2 v souvislosti s molekulou IgE.

Předkládaný vynález proto zahrnuje izolované peptidy obsahující nativní IgE epitopy jako takové, a jakýkoli jejich mimotop. Význam slova mimotop je definován jako jednotka, která je dostatečně podobná nativnímu epitopu IgE, takže je schopná být rozpoznána protilátkami, které rozpoznávají nativní epitop IgE; (Gheysen, H. M., a další, 1986, Synthetic Peptides as antigens. Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, str. 130 - 149; Gheysen, H. M., 1986, Molecular Immunology, 23, 7, 709 - 715); nebo jsou schopné vyvolávat

tvorbu protilátek, jestliže jsou navázány na vhodný nosič, kde tyto protilátky křížově reagují s nativním epitopem IgE.

Mimotopy podle předkládaného vynálezu mohou být peptidické nebo nepeptidické. Peptidický mimotop epitopů IgE exponovaných na povrchu definovaných výše může mít sekvenci, která se liší od nativního epitopu, ale může mít také úplně stejnou sekvenci jako nativní epitop. Taková molekula se popisuje jako mimotop epitopu, protože i když tyto dvě molekuly sdílejí stejnou sekvenci, mimotop nebude prezentován v souvislosti s úplnou strukturou domény C_ε2, a mimotop jako takový může mít mírně odlišnou konformaci od konformace nativního epitopu IgE. Odborníkoví v oboru bude také zřejmé, že výše identifikované přímé sekvence (P1 až P7), jestliže mají terciární strukturu IgE, leží v sousedství jiných oblastí, které mohou být vzdálené od primární sekvence IgE. Například mimotop peptidu P1 může být jako takový kontinuální nebo diskontinuální, v tom, že obsahuje úseky napodobující P1 a úseky vytvořené z těchto vzdálených aminokyselinových zbytků.

Výhodné oblasti exponované na povrchu, které mohou být použity v předkládaném vynálezu obsahují oblasti, které jsou spojené smyčkovou strukturou. Peptidy nebo mimotopy podle předkládaného vynálezu mohou proto obsahovat smyčku s N- nebo C-koncovými prodlouženími, které mohou být přirozené zbytky aminokyselin ze sousedících β-listů. Příklady tohoto jevu jsou peptid P1 obsahující smyčku C-D, P2 obsahující smyčku D-E, P3 obsahující smyčku E-F, P4 obsahující smyčku F-G, P5 obsahující smyčku A-B a P6 obsahující smyčku B-C domény C_ε2 IgE. Mimotopy těchto smyček tedy tvoří provedení předkládaného vynálezu.

Zvláště výhodné farmaceutické prostředky jsou založeny na epitopu P1 a jeho mimotopech. Peptidy obsahující tento epitop a jeho mimotopy jsou po navázání na nosič schopné indukovat silné imunitní odpovědi anti-IgE, které jsou schopné inhibovat uvolňování histaminu

z lidských basofilů. Navíc jsou tyto imunitní odpovědi neanafylaktogenní. Mimotopy P1 se primárně popisují jako jakákoli jednotka, která byla formulována za vytvoření imunogenu, je schopna indukovat imunitní odpověď, kde tato odpověď je schopná rozpoznávat P1, jestliže je v souvislosti domény C ϵ 2 IgE.

Peptid P1 odpovídá smyčce C-D domény C ϵ 2. Struktura smyčky C-D záhybů imunoglobulinu odpovídá propojovacímu řetězci mezi koncem beta-řetězce C a počátkem beta-řetězce D (Introduction to protein Structure, str. 304, 2. vydání, Branden a Tooze, Garland Publishing, New York, ISBN 0 8153 2305-0), odpovídajícímu přibližně zbytkům aminokyselin Trp268-Ser280 molekuly IgE. Mimotopy smyčky C-D IgE C ϵ 2 a ligandy jsou tedy schopny vázat se na smyčku C-D IgE C ϵ 2 a tvoří také výhodné provedení předkládaného vynálezu.

Peptidové mimotopy výše uvedených epitopů IgE mohou být navrženy pro konkrétní účel adicí, delecí nebo substitucí vybraných aminokyselin. Peptidy podle předkládaného vynálezu mohou být tedy modifikovány pro účely usnadnění konjugace na proteinový nosič. Pro některé metody chemické konjugace může být například vhodné, jestliže obsahují na epitopu IgE koncový cystein. Navíc může být vhodné, aby peptidy konjugované na proteinový nosič obsahovaly hydrofobní konec vzdálený od konjugovaného konce peptidu tak, že volný nekonjugovaný konec peptidu zůstává spojený s povrchem nosného proteinu. To snižuje stupeň konformační volnosti peptidu a tím zvyšuje pravděpodobnost, že bude peptid předkládán v takové konformaci, která nejbližší napodobí konformaci peptidu IgE, tak jako se nalézá v souvislosti s celou molekulou IgE. Peptidy mohou být například změněny tak, aby obsahovaly N-koncový cystein a C-koncový hydrofobní amidovaný konec. alternativně může být provedena adice nebo substituce D-stereoismerní formy jedné nebo více aminokyselin pro vytvoření výhodného derivátu, například pro zvýšení stability peptidu. Odborníci v oboru zjistí, že takto

modifikované peptidy nebo mimotopy by mohly být úplně nebo z části nepeptidové mimotopy, jestliže zbytky, které je tvoří, nejsou nutně omezeny na dvacet aminokyselin vyskytujících se v přírodě. Navíc mohou být tyto látky cyklizovány metodami známými v oboru pro
 5 přivedení peptidu do konformace, která blízce napodobuje tvar peptidové sekvence v souvislosti s úplnou molekulou IgE. Příklady výhodných cyklických peptidů, které obsahují pár cysteinových zbytků pro umožnění vytvoření disulfidické vazby jsou PT1079 (SEQ ID No. 14), PT1079GS (SEQ ID No. 15), PT1078 (SEQ ID No. 16) a P15q
 10 (SEQ ID No. 11).

Navíc bude odborníkům v oboru zřejmé, že mimotopy nebo imunogeny podle předkládaného vynálezu mohou být delší než izolované epitopy a mohou obsahovat tam popisované sekvence. Mimotopy podle předkládaného vynálezu mohou tedy obsahovat adice
 15 N a/nebo C-koncových prodloužení z celé řady dalších přírodních zbytků na jednom nebo na obou koncích. Peptidové mimotopy mohou také být retrosekvence přírodních sekvencí IgE, tj. sekvence s opačnou orientací; nebo mohou být alternativně tyto sekvence úplně nebo z části tvořeny D-stereoisomerními aminokyselinami (sekvence
 20 inverso). Peptidové sekvence mohou být také povahy retro-inverso tím, že je opačná orientace sekvence a aminokyseliny jsou formy D-stereoisomeru. Tyto retro nebo retro-inverso peptidy mají výhodu v tom, že nejsou organismu vlastní a mohou tedy předcházet problémům tolerance vlastního imunitního systému (například P 15r,
 25 viz níže).

Peptidové mimotopy mohou být alternativně identifikovány použitím protilátek, které jsou schopny samostatné vazby na epitopy IgE podle předkládaného vynálezu použitím technik jako je „phage display technology“ (EP 0 552 267 B1). Tato technika vytváří velký
 30 počet peptidových sekvencí, které napodobují strukturu přirozených peptidů a jsou proto schopny vázat se na anti-nativní peptidové protilátky, ale nemusí nezbytně samy sdílet významnou sekvenční

homologii s nativním peptidem IgE. Tento přístup může mít významné výhody v tom, že dovolí možnost identifikace peptidu se zlepšenými imunogenními vlastnostmi (jako jsou vazebné vlastnosti s vyšší afinitou na receptory IgE nebo protilátky anti-IgE nebo schopnost indukce polyklonální imunitní odpovědi, která poskytuje vazbu na IgE s vyšší afinitou), nebo může předcházet problémům s tolerancí k vlastním antigenům, které mohou být spojeny s použitím přírodních peptidových sekvencí. Tato technologie navíc umožní identifikaci rozpoznávacího schématu pro každý nativní peptid z hlediska jeho sdílených chemických vlastností mezi sekvencemi rozpoznávaných mimotopů.

Mezi výhodné příklady modifikovaných peptidových mimotopů a příklady mimotopů odvozených od bakteriofágů patří:

Peptid	Sekvence	Popis	SEQ ID No.
P15	CLEDGQVMDVDLL-NH ₂	P1 mimotop	8
P15r	LLDVDMVQGDELC-NH ₂	P1 retro mimotop	9
P15p	WLEDGQVMDVDLC	P1 mimotop	10
P15q	CLEDGQVMDVDLC	P1 mimotop	11
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 mimotop	12
C67	CFMNKQLADLELCPRE	P1 mimotop	13
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGDK	P1 mimotop	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 mimotop	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P 1 mimotop	16
P15s	QVMDVDL	P1 mimotop	17
EEC39-I	KCREVWLGESETIMDECE	P1 mimotop	18
EEC39-J	ACREVWLGESETIMDCD	P1 mimotop	19
EEC39-10	SCREVWLGESEETVMDCG	P1 mimotop	20

EEC40-9	NCQDLMLREDAGCWSKM	P1 mimotop	21
EEC47-3	DCEEPMCSPLVLLQQLKL	P1 mimotop	22
P15t	LEDGQVMDVD	P1 mimotop	23
P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 mimotop	24
P2sh	TTQEGE	P2 mimotop	25
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 mimotop	26
P4ex	TYQGHTFEDSTKKCADSNPRGV	P4 mimotop	27
P5sh	GGHFPP	P5 mimotop	28
P5long1	CSSCDGGGHFPPTIQC	P5 mimotop	192
P5long2	CLQSSCDGGGHFPPTIQLLC	P5 mimotop	193

- V dalších mimotopech mohou být aminokyselinové zbytky P1, P2, P3, P4, P4, P5, P6 nebo P7 každý nezávisle nahrazeny aminokyselinou, která nejlépe napodobuje tuto aminokyselinu.
- 5 Například A může být nahrazeno V, L nebo I, tak jak se popisuje v následující tabulce.

Původní zbytek	Příklad substitucí	Výhodná substituce
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L

L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

Ligandy, které jsou schopny vázat se na epitopy C ϵ 2 IgE exponované na povrchu a farmaceutické prostředky s jejich obsahem tvoří také provedení předkládaného vynálezu. Tyto ligandy jsou

5 použitelné při pasivní profylaxi nebo terapii podáváním ligandů pacientovi, pro zmírnění alergického onemocnění. Příklady těchto použitelných ligandů zahrnují monoklonální nebo polyklonální protilátky. Například protilátky indukované v jednom živočichovi mohou být purifikovány a pasivně podávány jinému živočichovi pro prevenci

10 nebo léčení alergie. Peptidy podle předkládaného vynálezu mohou být také použity pro vytvoření hybridomů monoklonální protilátky (s použitím známých technik, např. Köhler a Milstein, Nature, 1975, 256, str. 495), humanizovaných monoklonálních protilátek nebo CDR roubovaných monoklonálních protilátek, metodami známými v oboru.

15 Souvisejícím aspektem předkládaného vynálezu jsou tedy ligandy schopné vazby na epitopy exponované na povrchu domény C ϵ 2 IgE. Příklady těchto ligandů jsou protilátky (nebo Fab fragmenty). Tyto protilátky mohou být použity při pasivní imunoprofylaxi nebo imunoterapii nebo mohou být jako takové použity při identifikaci

20 peptidových mimotopů IgE.

Termín „protilátka“, jak se zde používá, označuje molekulu s použitelnou specificitou vazby na antigen. Odborníkům v oboru bude jasně zřejmé, že tento termín může také zahrnovat polypeptidy, které jsou fragmenty nebo deriváty protilátek, avšak přesto mohou poskytnout stejnou nebo blíže podobnou funkčnost. Tyto fragmenty protilátek nebo deriváty jsou rovněž zahrnuty pod pojem protilátky, tak jak se zde používá.

Výhodnými ligandy jsou monoklonální protilátky. Zvláště výhodné ligandy jsou ligandy P1, a s výhodou monoklonální protilátky. Například PTmAb0011 je referenční název pro myší monoklonální protilátku typu IgG1 uloženou v souladu s pravidly Budapešťské úmluvy v ECACC (European Collection of Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, UK) 8. března 1999 pod depozitním číslem 99030805.

Například PTmAb0011 rozpoznává smyčku C-D C ϵ 2 a sama o sobě je schopna rozpoznat IgE, jestliže je navázán na svůj vysoce afinitní receptor na lidských basofilech, aniž by způsobila degranulaci, a navíc je schopna blokovat pasivní senzitivizaci nealergických basofilů prevencí vazby IgE na Fc ϵ R1 α , a inhibovat uvolňování histaminu spouštěné LolP1 v alergických basofilech. Další monoklonální protilátka, která rozpoznává smyčku C-D C ϵ 2, je PTmAb0005 (dostupná u firmy Sigma Chemicals katalogové číslo I6510, číslo klonu GE-1). Předkládaný vynález poskytuje tuto monoklonální protilátku ve farmaceutickém prostředku.

Ligandy P1 byly používány v technologiích „bacteriophage panning“ pro identifikaci nových mimotopů P1. Například monoklonální protilátka, která je schopná rozpoznávat P1, se váže na bakteriofágy exprimující následující sekvence:

SEQ ID	Sekvence															
29	C	F	I	N	K	Q	M	A	D	L	E	L	C			
30	C	F	M	N	K	Q	L	A	D	L	E	L	C			
31	K	C	R	E	V	W	L	G	E	S	E	T	I	M	D	C

Další peptidové mimotopy smyčky C-D C ϵ 2 IgE byly identifikovány technologií bacteriophage panning s protilátkami PTmAb0011 a PTmAb0005. Příklady těchto mimotopů zahrnují:

5

<i>Mimotop peptidu P1 (PTmAb0011 phage panning)</i>	SEQ NO.
HCQQVFFPQDYLCQRG	SEQ ID No.32
SCREVLGGSEMIMDCE	SEQ ID No.33
ECNQNLGSLRHVDLNC	SEQ ID No.34
DCEEPM CSPVLLQKLKP	SEQ ID No.35
SCREVLGGSEMIMDCE	SEQ ID No.36
RCDQQLPRDSYTFMMS	SEQ ID No.37
SCPAFPREGDLCAPPTV	SEQ ID No.38
FCPEPICSPPLSRMTLS	SEQ ID No.39
VCDECVSRELAL	SEQ ID No.40
WCLEPECAPGLL	SEQ ID No.41
VCDECVSRELAL	SEQ ID No.42
DCLSKGQMADLC	SEQ ID No.43
SCQGREVRRECW	SEQ ID No.44
WCREVLGSEETIMDCE	SEQ ID No.45
ACREVLGSEETIMDCD -	SEQ ID No.46
GCAEPKCWQALHQKLKP -	SEQ ID No.47
<i>Mimotop peptidu P1 (PTmAb0005 phage panning)</i>	SEQ NO.

ECRGPNMQMVDHCPTTD	SEQ ID No.48
QCNAVLEGLQMVDHCWN	SEQ No. 49
CCVADPETQMTPSSEMF	SEQ ID No.50
HCKNEFKKGQWTYSCSD	SEQ ID No.51
QCRQFVMNQSEKEFGQC	SEQ ID No.52
NCFMNKQLADLELCPRE	SEQ ID No.53
SCAYTAQRQCSDVPNPG	SEQ ID No.54
GCFMNKQMADLELCPRTAA	SEQ ID No.55
ACFMNKQMADLELCPRVAA	SEQ ID No.56
GCFINKQLADLELCPRVAA	SEQ ID No.57
GCFMNKQLADWELCPRAAA	SEQ ID No.58
ECFMNKQLADSELCPRVAA	SEQ ID No.59
GCFMNKQLADPELCPREAE	SEQ ID No.60
GCFMNKQLVDLELCPRGAA	SEQ ID No.61
GCFMNKQLADLELCPREAA	SEQ ID No.62
GCFMNKQQADLELCPRGAA	SEQ ID No.63
GCFINKQMADLELCPREAA	SEQ ID No.64

Proto tvoří další důležité provedení vynálezu mimotopy IgE Cε2, které jsou schopné vázat se na PTmAb0005 nebo PTmAb0011, a imunogeny obsahující tyto mimotopy.

5 Bez omezení na širší definici mimotopů P1 bylo z těchto a dalších fágových sekvencí identifikováno uspořádání jádra pro podmnožinu peptidů podobných P1. Toto uspořádání je podmnožinou mimotopů P1 a popisuje jeho mimotopy z hlediska chemických vlastností aminokyselin v každé polote, které jsou požadovány pro
 10 rozpoznání konkrétní monoklonální protilátkou anti-P1:

y h x d h h a n a n x y

kde:

- | | |
|-----------|---|
| y... .. y | může být cyklizováno |
| h | hydrofobní (cys; pro; gly; ala; val; ile; leu; trp; met; phe) |
| 5 d | donory iontové vazby (arg; lys; his; gln; asn; trp; tyr; thr; ser) |
| a | kyselé (asp; glu) |
| n | iontově neutrální/nepolární (všechny <u>kromě</u> asp, glu, lys, arg) |
| 10 x | jakákoli aminokyselina (n = 0 - 3) |

V jednom provedení mohou být tedy mimotopy P1 popsány obecným uspořádáním jádra *y h x d h h a n a n x y* uvedeným výše. Peptid P1 nebo jeho mimotop mohou být popřípadě obklopeny na obou koncích dalšími aminokyselinami, aby byla usnadněna konjugace nebo pro jiný účel.

Zvláště výhodný mimotop P1 je P15s (SEQ ID No. 17), jehož zbytky Q, M a první D byly ukázány jako kritické pro vazebnou aktivitu PTmAb0011 a PTmAb0005 (viz příklady). Proto by byl vzorec mimotopu pro P15s, ve kterém byly zbytky, které nejsou nezbytné, nahrazeny podobnými aminokyselinami (jak je uvedeno výše) následující:

Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃,

kde X₁ je zvoleno z V, I, L, M, F nebo A; X₂ je zvoleno z D nebo E; a X₃ je zvoleno z L, I, V, M, A nebo F.

Důležité provedení předkládaného vynálezu je také použití PTmAb0005 a PTmAb0011 při identifikaci nových mimotopů IgE pro další použití při léčení alergie. Protože protilátka PTmAb0005 je

komerčně dostupná, tento ligand netvoří prostředek podle předkládaného vynálezu, ale dvě důležitá provedení předkládaného vynálezu tvoří farmaceutické prostředky obsahující PTmAb0005 a jeho použití při identifikaci mimotopů P1.

5 Důležité provedení předkládaného vynálezu také tvoří mimotopy P2, P3, P4 a P5. Například P16 a P17 jsou mimotopy P2, popřípadě P3. Tyto peptidy, jestliže jsou vhodně předkládány na nosičích, jsou oba schopny indukovat silné protilátkové odpovědi anti-IgE, které nejsou anafylaktogenní.

10 Ve výhodném provedení budou mít peptidy obsahující výše identifikované epitopy nebo peptidické nebo nepeptidické mimotopy podle předkládaného vynálezu malou velikost, takže napodobují oblast zvolenou z celé domény Cε2. Je zřejmé, že peptidové mimotopy by měly proto mít délku menší než 100 aminokyselin, s výhodou by měly
15 být kratší než 75 aminokyselin, výhodněji menší než 50 aminokyselin a nejlépe v rozmezí délky 4 až 25 aminokyselin. specifické příklady výhodných peptidových mimotopů jsou PT1079 a P15q, které jsou dlouhé 21, popřípadě 13 aminokyselin. Předpokládá se, že nepeptidové mimotopy budou mít podobnou velikost z hlediska objemu
20 molekuly, jako jejich peptidové protějšky.

 Odborníkům v oboru bude zřejmé, že mohou být použity metody pro potvrzení statutu konkrétního konstruktů jako mimotopu. Mezi tyto techniky patří následující: domnělý mimotop může být testován pro zjištění imunogenicity konstruktů tím, že antiséra vytvořená tímto
25 domnělým mimotopem křížově reagují s nativní molekulou IgE, a jsou také funkční při blokování uvolňování alergického mediátoru z alergických efektorových buněk. Specificita těchto odpovědí může být potvrzena kompetitivními experimenty blokováním aktivity antiséra samotným mimotopem nebo nativním IgE, a/nebo specifickými
30 monoklonálními protilátkami, o kterých je známo, že se vážou na epitop exponovaný na povrchu v rámci Cε2 IgE. Mezi specifické

příklady těchto monoklonálních protilátek pro použití v kompetitivních testech patří například PTmAb0005 a PTmAb0011, které by potvrdily status domnělého mimotopu jako mimotopu smyčky C-D domény C ϵ 2 IgE.

5 V jednom provedení předkládaného vynálezu se váže alespoň jeden peptid definovaný výše, který obsahuje epitop nebo mimotop IgE, na nosné molekuly za vytvoření imunogenů pro vakcinační protokoly. Nosné molekuly nejsou s výhodou příbuzné s nativní molekulou IgE. Peptidy nebo mimotopy mohou být navázány chemicky
10 kovalentním spojením nebo expresí fúzních partnerů získaných metodami genetického inženýrství, popřípadě prostřednictvím propojovací sekvence.

Kovalentní vazba peptidu na imunogenní nosič může být prováděna způsobem dobře známým v oboru. Tak například pro
15 přímou kovalentní vazbu je možné používat karbodiimid, glutaraldehyd nebo (N-[γ -maleimidobutyryloxy])sukcinimidester, použitím běžných komerčně dostupných heterobifunkčních propojovacích skupin jako je CDAP a SPDP (viz doporučení výrobce). Po vazebné reakci může být imunogen snadno izolován a čištěn pomocí dialýzy, gelové filtrace,
20 frakcionace atd.

Typy nosičů používané u imunogenů podle předkládaného vynálezu budou známé odborníkům v oboru. Funkcí nosiče je poskytnout pomoc cytokinu při indukci imunitní odpovědi proti peptidu IgE. Nevyčerpávající seznam nosičů, které mohou být použity v rámci
25 předkládaného vynálezu zahrnuje: Keyhole limpet Haemocyanin (KLH), sérové albuminy jako je bovinní sérový albumin (BSA), inaktivoané bakteriální toxiny, jako jsou toxiny tetanu nebo záškrty (TT a DT), nebo jejich rekombinantní fragmenty (např. doména 1 fragmentu C TT nebo translokační doména DT), nebo purifikovaný
30 proteinový derivát tuberkulinu (PPD). Alternativně mohou být mimotopy nebo epitopy přímo konjugovány k liposomovým nosičům,

5 které mohou dále obsahovat imunogeny schopné poskytnout pomoc T-buňkám. S výhodou je poměr peptidů k nosiči řádově 1 : 1 až 20 : 1 a s výhodou by každý nosič měl nést mezi 3 až 15 peptidy.

5 Ve výhodném provedení podle vynálezu je nosič protein D Haemophilus influenzae (EP 0 594 610 B1). Protein D je protein, který se váže na IgD pocházející z Haemophilus influenzae, který byl patentován Forsgrenem (WO 91/18926, udělený EP 0 594 610 B1). V některých případech, například v rekombinantních systémech pro
10 expresi imunogenů může být žádoucí používat fragmenty proteinu D, například Protein D 1/3rd (obsahující 100 až 110 N-koncových aminokyselin proteinu D (GB 9717953.5)).

15 Další výhodný způsob předkládání peptidů IgE podle předkládaného vynálezu je v kontextu s rekombinantní fúzní molekulou. Například EP 0 421 635 B popisuje použití částic antigenu chimérického jádra hepadnaviru pro prezentaci cizích peptidových sekvencí v částici podobné viru. Jako takové mohou imunogeny podle předkládaného vynálezu obsahovat peptidy IgE prezentované v chimérických částicích složených z antigenu jádra hepatitidy B. Navíc
20 mohou rekombinantní fúzní proteiny obsahovat mimotopy podle předkládaného vynálezu a nosný protein jako je NS1 viru chřipky. Pro jakýkoli rekombinantně exprimovaný protein, který je částí předkládaného vynálezu, tvoří provedení předkládaného vynálezu také nukleová kyselina kódující uvedený imunogen.

25 Peptidy použité v předkládaném vynálezu je možno snadno syntetizovat postupy na pevné fázi, které jsou v oboru dobře známy. Vhodné syntézy mohou být prováděny s použitím postupů „T-boc“ nebo „F-moc“. Cyklické peptidy mohou být syntetizovány na pevné fázi použitím známého postupu „F-moc“ a polyamidové pryskyřice na plně automatickém zařízení. Alternativně bude odborníkům v oboru známo,
30 které nezbytné postupy je třeba použít pro provádění způsobu manuálně. Technologie a postupy pro syntézu na pevné fázi se

popisují v publikaci „Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach“ autorů E. Atherton a R. C. Sheppard, publikováno IRL v Oxford University Press (1989). Alternativně je možno peptidy vyrábět rekombinantními metodami s použitím molekul nukleových kyselin vhodných pro expresi kódujících mimotopy v bakteriální nebo savčí buněčné linii s následným čištěním exprimovaného mimotopu. Technologie pro rekombinantní expresi peptidů a proteinů jsou v oboru známé a popisují se v knize Maniatis, T., Fritsch, E. F. a Sambrook a další, Molecular cloning, a laboratory manual, 2. vydání; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Imunogeny podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat peptidy jak bylo popsáno výše, včetně mimotopů, nebo mohou být jejich reaktivními deriváty nebo fragmenty. Část předkládaného vynálezu tvoří také části nukleové kyseliny, které kódují imunogeny podle předkládaného vynálezu nebo peptidy, mimotopy nebo jejich deriváty. Navíc mohou imunogeny podle předkládaného vynálezu obsahovat více než jeden typ epitopu, tj. P1 a P2, ve stejném imunogenu, nebo může samotný mimotop obsahovat více než jeden typ epitopu.

Předkládaný vynález proto poskytuje použití nových peptidů zahrnující epitopy nebo mimotopy podle předkládaného vynálezu (jak bylo definováno výše), při výrobě farmaceutických prostředků pro prevenci nebo léčení alergií. Imunogeny obsahující mimotopy nebo peptidy podle předkládaného vynálezu a nosné molekuly jsou rovněž poskytovány pro použití ve vakcínách pro imunoprofylaxi nebo terapii alergií. Mimotopy, peptidy nebo imunogeny podle předkládaného vynálezu se tedy poskytují pro použití v lékařství a při léčení nebo prevenci alergického onemocnění. Poskytuje se tedy způsob léčení alergie zahrnující podávání pacientovi trpícímu nebo vnímavému k alergii vakcíny nebo farmaceutického prostředku podle předkládaného vynálezu.

Vakcíny podle předkládaného vynálezu mohou také s výhodou obsahovat adjuvans. vhodná adjuvans pro vakcíny podle předkládaného vynálezu zahrnují ta adjuvans, která jsou schopná zvyšovat odpovědi protilátek proti imunogenu peptidu IgE. Adjuvans jsou v oboru dobře známá (Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, díl 6, ed. Powell, M. F., a Newman, M. J., Plenum Press, New York a London, ISBN 0-306-44867-X). Výhodná adjuvans pro použití s imunogeny podle předkládaného vynálezu zahrnují hlinité nebo vápenaté soli (například hydroxidy nebo fosfátové soli). Mezi další adjuvans patří saponinová adjuvans jako je QS21 (US 5,057,540) a 3D-MPL (GB 2220 211).

Vakcíny podle předkládaného vynálezu se budou obecně podávat jak pro aktivační, tak i zesilující (boosting) dávky. Očekává se, že zesilující dávky budou přiměřeně vzdálené nebo se budou podávat ročně nebo v takových časech, kdy hladina cirkulující protilátky klesne pod požadovanou úroveň. Zesilující dávky se mohou skládat z peptidu bez přítomnosti původní nosné molekuly. Tyto zesilující konstrukty mohou obsahovat alternativní nosič nebo nemusí být nosič vůbec přítomen.

V dalším provedení předkládaného vynálezu se poskytuje vakcína jak bylo popsáno výše pro použití v lékařství.

Vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu může být použit pro ochranu nebo léčení savce vnímavého k nebo trpícího alergií prostřednictvím podávání uvedené vakcíny systémově nebo přes sliznice. Tato podávání mohou zahrnovat intramuskulární, intraperitoneální, intradermální nebo subkutánní injekce, nebo podávání přes sliznice do orálního/alimentárního, respiračního nebo urogenitálního traktu. Výhodný způsob podávání je transdermálně, například náplastmi na kůži.

Množství proteinu v každé dávce vakcíny se volí jako množství, které indukuje imunoprotektivní odpověď bez výrazných nepříznivých

vedlejších účinků v typických vakcínách. Toto množství se bude lišit v závislosti na konkrétním použitém imunogenu a na jeho předkládání. Obecně se předpokládá, že každá dávka bude obsahovat 1 až 1000 μg proteinu, s výhodou 1 až 500 μg , s výhodou 1 až 100 μg , přičemž 1 až 50 μg je nejvýhodnější rozmezí. Optimální množství pro určitou vakcínu je možno zjistit standardními studiemi zahrnujícími pozorování příslušných imunitních odpovědí u pacientů. Po počáteční vakcinaci mohou dostat pacienti ve vhodných časových intervalech jednu nebo několik zesilujících imunizačních dávek.

10 Farmaceutické prostředky obsahující ligandy popisované výše tvoří také provedení předkládaného vynálezu. Poskytují se také použití ligandů v lékařství a při výrobě farmaceutických prostředků pro léčení alergií.

Některá provedení předkládaného vynálezu mohou být také využita v diagnostických testech. Například panely ligandů, které rozpoznávají různé peptidy podle předkládaného vynálezu, mohou být použity při zjišťování titerů anti-IgE přítomné v séru pacientů. Navíc mohou být peptidy samy o sobě použity pro typizaci cirkulujících anti-IgE. Za některých okolností může být vhodné zjišťovat hladiny anti-IgE v oběhu, například u atopických pacientů, a peptidy a poly/monoklonální protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být tedy použity při diagnóze atopie. Navíc mohou být peptidy použity pro afinitní odstraňování cirkulujících anti-IgE z krve pacientů před reinfuzí zpět do krve pacienta.

25 Část předkládaného vynálezu také tvoří způsob identifikace peptidových imunogenů pro imunoprophylaxi nebo terapii alergie zahrnující použití počítačového modelu struktury IgE a identifikaci těch peptidů v IgE, které jsou exponovány na povrchu. Tyto oblasti mohou potom být formulovány do imunogenů a použity v lékařství. Další součást předkládaného vynálezu tedy tvoří použití PTmAb0005 a

PTmAb0011 při identifikaci peptidů pro použití při imunoprofylaxi nebo terapii alergií.

Příprava vakcín se obecně popisuje v publikaci New Trends and Developments in Vaccines, ed. Voller a další, University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Konjugace proteinů k makromolekulám se popisuje v Likhite, US patent 4,372,945 a Armor a další, US patent 4,474,757.

Pro zbytky aminokyselin IgE se často používá systém číslování popsany v Dorrington, K. J. a Bennich, H. (1978), Immunol. Rev. 41, 3 - 25; a také v Bennich, H. a Bahr-Lindstrom, H. von (1978), Prog. Immunol. 11, 49 - 58. Další určování sekvence genu a cDNA lidského IgE však ukázalo (Max, E. E. a další, 1982, Cell 29, 691 - 699; Flanagan, J. G. a Rabbitts, T. H., 1982, výše; Kenten, J. H. a další, 1982, výše) další leucin v poloze 273 (Kabatovo číslování) v C_ε2, který nebyl v dřívějších dokumentech uváděn. Schéma číslování používané u autorů předkládaného vynálezu se proto může odlišovat od číslování použitého v Dorrington, K. J. a Bennich.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1, povrchová expozice aminokyselin IgE stanovená použitím modelu Padlana a Daviese 1986.

Obr. 2, reakční schéma 1, syntéza peptidu na pevné fázi.

Obr. 3, reakční schéma 2 a schéma 3, příprava modifikovaného nosiče.

Obr. 4, reakční schéma 4, konjugace peptid/nosič.

Obr. 5, údaje pro anti-IgE C67-8. (A) Reaktivita proti IgE navázanému na destičky séra myši Balb C imunizovaných 25 μg BSA-IgE C67-8 (konjugováno použitím chemické reakce PTL) nebo 3 μg konstruktu jádra HepB-IgE C67-8. (B) Reaktivita proti IgE navázanému

na receptor séra myší Balb C imunizovaných 25 μ g BSA-IgE C67-8 (konjugováno použitím chemické reakce PTL) nebo 3 μ g konstruktu jádra HepB-IgE C67-8.

Obr. 6, kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem IgE C67-8. Séra myší imunizovaných BSA-IgE C67-8 nebo HBC-IgE C67-8 byla předinkubována rozpustným IgE (10 μ g/ml) nebo peptidem IgE C67-8 (25 M) nebo irelevantním peptidem PT326 (25 μ M) a přidána k destičkám ELISA potaženým IgE. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M (n = 10).

Obr. 7, údaje anti-IgE pro PT1079. (A) Reaktivita proti IgE navázanému na destičky ze séra myší Balb C imunizovaných 25 μ g BSA-PT1079 (konjugováno použitím chemické reakce PTL) nebo 3 μ g konstruktu jádro HepB-1079. (B) Reaktivita proti IgE navázanému na receptor séra myší Balb C imunizovaných 25 μ g BSA-1079 (konjugováno použitím chemické reakce PTL) nebo 3 μ g konstruktu jádro HepB-1079.

Obr. 8, kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1079. Séra myší imunizovaných BSA-1079 nebo HBC-1079 byla předinkubována s rozpustným IgE (10 μ g/ml) nebo peptidem PT1079 (25 μ M) nebo irelevantním peptidem PT326 (25 μ M) a přidána k destičkám ELISA potaženým IgE. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M (n = 10).

Obr. 9, údaje anti-IgE pro PT1078. (A) Reaktivita proti IgE navázanému na destičky séra z myší Balb C imunizovaných 25 μ g BSA-PT1078 (konjugováno s použitím chemické reakce PTL). (B) Reaktivita proti IgE navázanému na receptor séra myší Balb C imunizovaných 25 μ g BSA-1078 (konjugováno s použitím chemické reakce PTL).

Obr. 10, kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1078. Séra myší imunizovaných BSA-1078 byla předinkubována s rozpustným IgE (10 μ g/ml) nebo peptidem PT1078 (25 μ M) nebo

irelevantním peptidem PT326 (25 μ M) a přidána do destiček ELISA potažených IgE. Data jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M (n = 10).

Obr. 11, údaje anti-IgE pro PT1079gs. (A) Reaktivita proti IgE navázanému na destičky ze séra myši Balb C imunizovaných 3 μ g HBC-1079gs, (B) Reaktivita proti IgE navázanému na receptor ze séra myši Balb C imunizovaných 3 μ g HBC-1079gs.

Obr. 12, kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1079. Séra myši imunizovaných HBC-1079gs byla předinkubována s rozpustným IgE (10 μ g/ml) nebo peptidem PT1079 (25 μ M) nebo irelevantním peptidem PT326 (25 μ M) a přidána do destiček ELISA potažených IgE. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M (n = 10).

Obr. 13, inhibiční aktivita antiséra myši indukovaného BSA-C67-8. Buňky z dárce citlivého na LolP1 byly smíchány s myším sérem (ředění 1/50) a potom spuštěny LolP1 pro uvolnění histaminu. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M. (n = 10).

Obr. 14, inhibiční aktivita myšího antiséra indukovaného BSA-1078 a BSA 1079. Buňky dárce citlivého na LolP1 byly smíchány s myším sérem (BSA a BSA1078 antiséra zředěná 1/50; BSA-1079 antisérum zředěné 1/1250) a potom rozpuštěny LolP1 pro uvolnění histaminu. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M. (n = 10).

Obr. 15, inhibiční aktivita myšího antiséra indukovaného HBC-C67-8, HBC-1078, HBC-1079 a HBC-1079gs. Buňky dárce citlivého na LolP1 byly smíseny s myším sérem (HBC standardního typu (wild type, wt)) a HBC-IgEC67-8 antiséra zředěná 1/50; HBC1079 a HBC-1079gs antiséra ředěná 1/1250) a potom bylo spuštěno uvolňování histaminu pomocí LolP1. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M. (n = 10).

Obr. 16 ukazuje vazbu závislou na koncentraci protilátky PTmAb0005 a PTmAb0011 na IgE.

Obr. 17 ukazuje inhibici závislou na koncentraci vazby IgE na konstrukt FcεR1α/IgG protilátkou PTmAb0005 a PTmAb0011 ve srovnání s kontrolou.

5 Obr. 18 ukazuje koncentračně závislou inhibici vazby IgE na ektodoménu FcεR1α navázanou přímo na plastové destičky protilátkou PTmAb0005 ve srovnání s kontrolou.

Obr. 19 ukazuje vazbu IgE na FcεRII (CD23) protilátkou PTmAb0005 (GE-1) a PTmAb0011.

10 Obr. 20 ukazuje koncentračně závislé blokování uvolňování histaminu z krevních basofilů alergického člověka protilátkou PTmAb0005 a PTmAb0011 ve srovnání s kontrolou.

Obr. 21, inhibice uvolňování histaminu spouštěného LolP1 v basofilech alergického člověka PTmAb0005 i PTmAb0011.

15 Obr. 22, vazba PTmAb0011 na různé IgE; (A) vazba PTmAb0011 na chiméřní IgE; (B) vazba PTmAb0011 na myelomový IgE; (C) vazba PTmAb0011 na IgE orientovaný antigenem; (D) vazba PTmAb0011 na IgE denaturovaný teplem.

Obr. 23, inhibice vazby IgE na FcεR1α způsobená PTmAb0011.

Obr. 24, vazba PTmAb0011 na IgE navázaný na receptor.

20 Obr. 25, (A) vliv PTmAb0011 na vazbu IgE na FcεRII na buňkách RPMI 8866. Buňky RPMI 8866 (1×10^6 /ml) byly inkubovány 1 hod na ledu s chiméřním IgE (1 µg/ml) a anti-IgE mAb (10 až 0 µg/ml). IgE a anti-IgE byly předinkubovány 1 hod při laboratorní teplotě před přidáním k buňkám. Navázaný IgE byl detekován FITC-
25 kozím antisérem proti lidskému IgE. Výsledky ukazují střední fluorescenci v kanálu (mean channel fluorescence, MCF) u zdvojených vzorků při stanovení analýzou průtokovou cytometrií pro 10 000 signálů sepnutých pro živé buňky. (B) Protilátka PTmAb0017 nespecifická pro P1.

Obr. 26, vliv PTmAb0011 na vazbu IgE na FcεRII na primárních lidských B-buňkách. Mononukleární buňky periferní krve (1×10^6 /ml) byly inkubovány 1 hod na ledu s chimérním IgE (1 µg/ml) a anti-IgE mAb (10 až 0 µg/ml; otevřená) nebo ekvivalentními koncentracemi isotypově shodné kontrolní mAb (pevná látka). IgE a anti-IgE byly předinkubovány 1 hod při laboratorní teplotě před přidáním k buňkám. Navázaný IgE byl detekován FITC-kozím antisérem proti lidskému IgE a primární B-buňky byly zviditelněny PE-konjugovanou anti-CD 19. Výsledky ukazují střední fluorescenci kanálu (MCF) zdvojených vzorků při stanovení analýzou průtokovou cytometrií 5000 signálů sepnutých pro živé buňky.

Obr. 27, vlivy PTmAb0011 na sekreci IgE z primárních lidských B-buněk. Mononukleární buňky z periferní lidské krve (2×10^5 /jamka) byly kultivovány v médiu doplněném IL-4 (10 ng/ml) a protilátkou anti-CD40 (1 µg/ml). Po dobu 14 dnů byly přidávány PTmAb0011 nebo isotypově shodné kontrolní mAb (1 µg/ml) a buněčné supernatanty byly odebírány a analyzovány na celkový obsah IgE metodou ELISA. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento množství IgE sekrenovaného v nepřítomnosti jakékoli protilátky.

Obr. 28, anafylaktogenicita monoklonálních protilátek proti lidskému IgE v basofilech alergického (A) a nealergického (B) člověka. PBMC od alergických dárců nebo nealergických dárců pasivně senzitivované 1 µg/ml chimérního IgE byly smíchány s protilátkami mAbs na 30 min při 37 °C. Uvolňování histaminu bylo stanoveno specifickou EIA. Data jsou střední hodnoty ze tří nezávislých experimentů, každý s odlišnými dárci.

Obr. 29, anafylaktogenicita protilátek proti lidskému IgE v senzitivovaných (A) a nesenzitivovaných (B) žírných buňkách lidských plic. Senzitivované nebo nesenzitivované surové suspenze lidských plicních žírných buněk byly inkubovány s protilátkami 45 min při 37 °C. Uvolňování tryptázy v supernatantech bylo určováno

kolorimetry. Údaje jsou střední hodnoty zdvojených stanovení z jediného reprezentativního experimentu.

Obr. 30, anafylaktogenita protilátek proti lidskému IgE v buňkách RBL J41 vyvolaná lidským Fc ϵ RI (A) a myším Fc ϵ RI (B).
5 Buňky RBL J41 byly senzitivovány buď lidským chimérickým IgE nebo myším IgE a inkubovány s protilátkami 30 min při 37 °C. Uvolňování β -hexosaminidázy bylo zjišťováno v supernatantech kolorimetrickým testem. Údaje jsou střední hodnoty trojnásobných stanovení z jediného reprezentativního experimentu.

10 Obr. 31, inhibice uvolňování histaminu spouštěného alergenem v lidských basofilech protilátkou PTmAb0011. PBMC byly inkubovány s PTmAb0011 buď přímo (alergický test (A)) nebo spolu s IgE (test blokování (B)) 30 min při 37 °C. Buňky byly potom spuštěny antigenem 30 min při 37 °C a uvolňování histaminu bylo určováno specifickou
15 EIA. Údaje jsou ve formě střední hodnota \pm S.E.M. ze tří rozdílných experimentů od různých dárců.

Obr. 32, inhibice pasivní kožní anafylaxe v kůži opice protilátkami PTmAb0011 a PTmAb0005. Monoklonální protilátka Dec7B (deka-peptid Stanworth) byla použita jako kontrola.

20 Předkládaný vynález je ilustrován následujícími neomezuujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

Část 1 Mimetopy a imunogeny podle předkládaného vynálezu

Příklad 1

1.1 Identifikace, chemická konjugace a sérologické metody u epitopu exponovaného na povrchu

Epitopy vystavené na povrch domény C ϵ 2 IgE byly identifikovány použitím modelové struktury IgE popsané autory Padlan a Davies (Mol. Immunol., 23, 1063 - 75, 1986). Byly identifikovány peptidy, které byly jak spojité, tak i vystavené rozpouštědlu. Toho bylo dosaženo použitím softwaru Molecular Simulations software (MSI) pro výpočet dostupnosti pro každou aminokyselinu IgE, dostupný povrch byl zprůměrován v rámci posuvného okénka pěti zbytků a tím byly identifikovány oblasti peptidů IgE, které měly průměr pro tento 5-mer vyšší než 80 Å² (0,8 nm²). Výsledky testu jsou ukázány na obr 1.

Výsledky

Z obr. 1 a také z opakování stejných postupů použitím modelu z roku 1990, Helm a další (model 2IgE struktury uložený 2/10/90 v PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)), vyplývá celá řada nativních peptidů, které mohou být použity jako imunogeny pro vyvolání protilátek proti IgE.

Tabulka 1: Nativní peptidy IgE vystavené na povrchu a spojitě

Název peptidu	Sekvence	Umístění sekvence a doména IgE	SEQ ID No.
P1	EDGQVMDVD	C ϵ 2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	C ϵ 2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	C ϵ 2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	C ϵ 2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	C ϵ 2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	C ϵ 2 (Pro262-Ile267)	6

P7	FTPPT	Cs2 (Phe231-Thr235)	7
----	-------	---------------------	---

Tyto peptidy nebo jejich mimotypy byly syntetizovány a buď konjugovány s nosnými proteiny, nebo vloženy do konstruktů jaderného antigenu hepatitidy za vytvoření částic podobných viru, exprimujících rekombinantní peptid.

5

1.2 Syntéza konjugátů peptid IgE /protein D s použitím sukcinimidového-maleimidového zesítujícího činidla

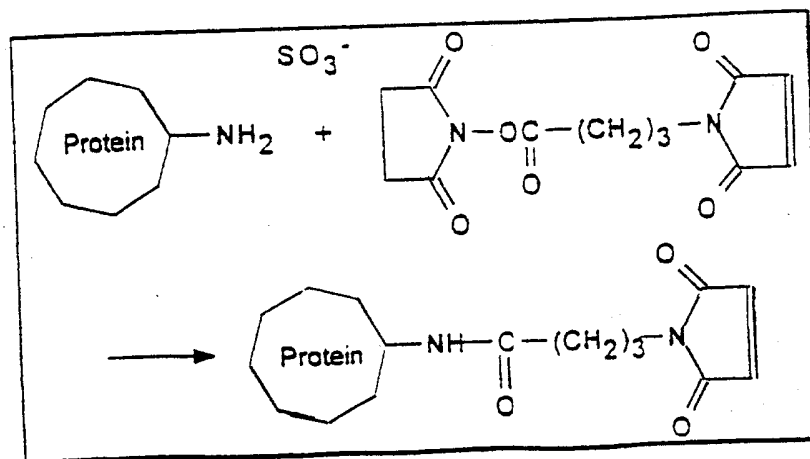
Protein D může být konjugován přímo k peptidům IgE za vytvoření antigenů podle předkládaného vynálezu použitím maleimid-sukcinimidového zesítujícího činidla. Tato chemická reakce umožní řízenou aktivaci skupin NH₂ nosných zbytků fixací sukcinimidové skupiny. Maleimidová skupina je vazbné místo pro cystein. Proto vyžadují pro účely následujících příkladů peptidy IgE pro konjugaci přídavek N-koncového cysteinu.

Vazebné činidlo je selektivní heterobifunkční zesítující činidlo, na jednom konci sloučeniny aktivující aminoskupinu proteinového nosiče sukcinimidylesterem a na druhém konci vázající sulfhydrylovou skupinu peptidu maleimidovou skupinou. Schéma reakce je následující:

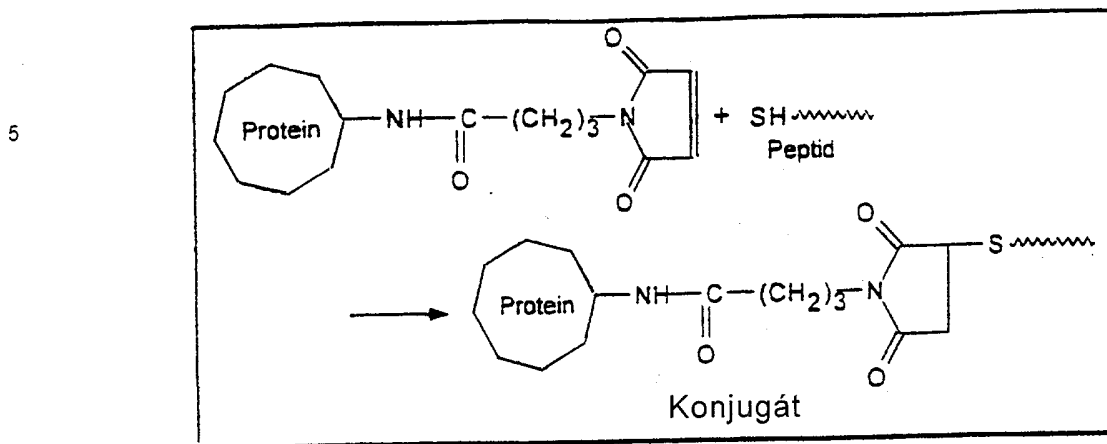
20

a. Aktivace proteinu reakcí mezi lysinem a sukcinimidylesterem:

25



- b. Vazba mezi aktivovaným proteinem a cysteinem peptidu reakcí s maleimidovou skupinou:



10

1.3 Příprava konjugátu peptid IgE-protein D

Protein D se rozpustí ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrem při pH 7,2 na koncentraci 2,5 mg/ml. K roztoku proteinu se přidá vazebné činidlo, (N-[γ -maleimidobutyryloxy]sukcinimidester GMBS) rozpuštěné v koncentraci 102,5 mg/ml v DMSO. Použije se 1,025 mg GMBS na 1 mg proteinu D. Reakční roztok se inkubuje 1 hod při laboratorní teplotě. Vedlejší produkty se odstraní odsolením na permeačním gelu Sephacryl 200HR. Jako eluent se použije roztok Tweenu 80 s koncentrací 0,1% ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrem pH 6,8. Aktivovaný protein se oddělí a jednotlivé podíly se spojí. Peptidy (identifikované v tabulce 1 nebo jejich deriváty nebo mimotopy) se rozpustí na koncentraci 4 mg/ml v 0,1 M kyselině octové, aby se zabránilo tvorbě disulfidické vazby. Pro vazbu se použije molární poměr mezi 2 až 20 peptidy na 1 molekulu aktivovaného proteinu D. Roztok peptidu se pomalu přidává k proteinu a směs se inkubuje 1 hod při 25 °C. pH se udržuje v průběhu vazebné fáze na hodnotě 6,6. Krok ukončení reakce se provede přidáním cysteinu (0,1 mg cysteinu na mg aktivovaného PD rozpuštěného na koncentraci 4 mg/ml v kyselině octové 0,1 M) na 30 min při 25 °C a pH 6,5. Pro

odstranění nadbytečného cysteinu nebo peptidu se provede dialýza proti roztoku NaCl 150 mM, Tween 80 0,1 %.

Poslední krok je sterilizace filtrací na membráně 0,22 μ m. Hotový produkt je čirý filtrovatelný roztok zakonzervovaný při 4 °C.
5 Konečný poměr peptid/PD může být zjištěn analýzou aminokyselin.

Analogickým způsobem mohou být peptidy podle předkládaného vynálezu konjugovány s jinými nosiči včetně BSA.

Byl syntetizován mimotop peptidu P1, CLEDGQVMDVDLL (SEQ ID No. 8), který byl konjugován jak s proteinem D, tak i BSA, použitím
10 výše popsaného způsobu.

1.4 Metody ELISA

ELISA antipeptidu nebo antipeptidového nosiče

Imunitní odpovědi antipeptidu a antinosiče byly vyšetřovány
15 s použitím metody ELISA popsané dále. Mikrotitrační destičky (Nunc) se potáhnou specifickým antigenem v PBS (4 °C přes noc) s následujícími látkami: Streptavidinem v koncentraci 2 μ g/ml (s následnou inkubací s biotinylovaným peptidem (1 μ M) 1 hod při 37 °C), následné promytí 3 x PBS-Tween 20 0,1%. Destičky se nasatí
20 PBS-BSA 1% - Tween 20 0,1% (pufr Sat) 1 hod při 37 °C. Přidá se 1. protilátka = séra v dvoustupňovém ředění (v pufru Sat), a provede se inkubace 1 hod 30 min při 37 °C a trojnásobné promytí. 2. přidá se antimyší Ig (nebo antimyší isotyp specifické monoklonální protilátky)
25 navázaný na HRP. Inkubuje se 1 hod při 37 °C. Provede se pětinasobné promytí. Vyvolání se provede TMB (BioRad) 10 min při teplotě místnosti v temnu. Reakce se blokuje 0,4N H₂SO₄.

Způsob detekce reaktivity antilidského IgE v myším séru (ELISA s IgE navázaným na destičku)

Destičky ELISA se potáhnou lidským chimérním IgE v koncentraci 1 µg/ml v potahovacím pufru karbonát/bikarbonát s pH 9,6 1 hod při 37 °C nebo přes noc při 4 °C. Nespecifická vazebná místa se blokují PBS/0,05% Tween-20 s obsahem 5 % hmotnost/objem sušeného mléka Marvel 1 hod při 37 °C. Provedou se sériová ředění myšího séra v PBS/0,05% Tween-20/1% hmotnost/objem BSA/4% fetální telecí sérum a roztoky se přidávají na 1 hod při 37 °C. Vazba polyklonálního séra se detekuje kozím antimyším IgG-Biotinem (1/2000) a potom se přidá Streptavidin-HRP (1/1000). Konjugovaná protilátka se detekuje substrátem TMB při 450 nm. Na každou destičku se přidá standardní křivka pro PTmAb0011 tak, že reaktivitu anti-IgE ve vzorcích séra je možno vypočíst v µg/ml.

15

Způsob detekce reaktivity antilidský receptor - navázaný IgE v myším séru

Destičky ELISA se potáhnou rekombinantním lidským FcεR1α při 0,5 µg/ml v karbonátovém/bikarbonátovém potahovacím pufru pH 9,6 1 hod při 37 °C nebo přes noc při 4 °C. Nespecifická vazebná místa se blokují PBS/0,05% Tween-20 s obsahem 5% hmotnost/objem nízkotučného sušeného mléka Marvel 1 hod při 37 °C. Potom se přidá lidský IgE v koncentraci 1 µg/ml na 1 hod při 37 °C. Potom se přidávají sériová ředění myšího séra v PBS/0,05% Tween-20/1% hmotnost/objem BSA/4% fetální telecí sérum na 1 hod při 37 °C. Vazba polyklonálního séra se detekuje kozím antimyším IgG-Biotinem (1/2000) a potom se přidá Streptavidin-HRP (1/1000). Konjugovaná protilátka se detekuje substrátem TMB při 450 nm. Na každou destičku se přidá standardní křivka PTmAb0011, takže reaktivitu anti-IgE ve vzorcích séra je možno vypočíst v µg/ml.

30

Soutěžení o vazbu IgE mimotopovými peptidy, rozpustným IgE nebo PTmAb0011

Jediná ředění polyklonálního myšního séra se smíchají s jedinými
5 koncentracemi buď mimotopového peptidu nebo lidského IgE
v předem blokované polypropylenové 96-jamkové destičce. Směsi se
inkubují 1 hod při 37 °C a potom se přidají na destičky ELISA
potažené IgE na 1 hod při 37 °C. Vazba polyklonálního séra se
10 detekuje kozím antimyším IgG Biotinem (1/2000) a potom se přidá
Streptavidin-HRP (1/1000). Konjugovaná protilátka se detekuje
substrátem TMB při 450 nm. Pro soutěžení mezi sérem a PTmAb0011
o vazbu IgE se přidávají směsi séra a PTmAb0011-biotin na destičky
ELISA potažené IgE. Vazba PTmAb0011 se detekuje Streptavidinem-
HRP (1/1000).

15

1.5 Testy lidských basofilů

S lidskými basofily (HBA) se provádí dva typy testů, jeden pro
stanovení anafylaktogenicity monoklonálních protilátek, který spočívá
v přidání protilátek k izolovaným PBMC; a druhý pro měření inhibice
20 *Lol P I* (silný alergen) spouštěného uvolňování histaminu
s předinkubací HBA s monoklonálními protilátkami.

Z žíly alergických dárců se odebírá krev do zkumavek
obsahujících 0,1 objemu 2,7% EDTA, pH 7,0. Potom se provede
ředění 1/2 stejným objemem média HBH s obsahem 0,1% lidského
25 sérového albuminu (HBH/HSA). Získaná buněčná suspenze se
převrství na 50 % obj. Ficoll-Paque a centrifuguje se při 400 g 30 min
při teplotě místnosti. Vrstva na rozhraní mononukleárních buněk
(PBMC) periferní krve se oddělí a usazené buňky se vylijí do odpadu.
Buňky se jednou promyjí v HBH/HSA, počítají se a resuspendují
30 v HBH/HSA s buněčnou densitou $2,0 \times 10^6$ na ml. Do jamek 96-

jamkové destičky se dnem ve tvaru V obsahujících 100 µl zředěného testovaného vzorku nebo monoklonální protilátky se přidá 100 µl buněčné suspenze. Každý testovaný vzorek se testuje v několika ředěních s šesti jamkami pro každé ředění. Obsahy jamek se krátce promíchají použitím třepačky na destičky před inkubací při 37 °C 30 min při třepání 120 ot/min.

Pro každé ředění séra se provede spuštění ve třech jamkách přidáním 10 µl extraktu *LoI* p I (konečné ředění 1/10 000) a do tří jamek se přidá 10 µl HBH/HSA pro testování anafylaktogenicity. Obsahy jamek se znovu krátce promíchají na třepačce na destičky před inkubací při 37 °C dalších 30 min za třepání při 120 ot/min. Inkubace se zakončí centrifugací při 500 g 5 min. Supernatanty se oddělí pro testování histaminu použitím běžně dostupného kitu EIA pro měření histaminu (Immunotech). Běžně se přidávají kontrolní jamky obsahující buňky bez testovaného vzorku pro zjištění spontánního a spouštěného uvolňování. Přidávají se také jamky obsahující buňky + 0,05% detergent Igepal pro zjištění celkového obsahu histaminu v buňkách.

Výsledky jsou vyjádřeny následujícím způsobem:

20

Test anafylaktogenicity

Uvolňování histaminu způsobené testovanými vzorky = % uvolňování histaminu z buněk s přidáním testovaným vzorkem - % spontánního uvolňování histaminu.

25

Test blokování

Stupeň inhibice uvolňování histaminu může být vypočten podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ inhibice} = 1 - \frac{(\text{uvolňování histaminu z buněk testovaným vzorkem}^*)}{(\text{uvolňování histaminu z buněk stimulovaných antigenem}^*)} \times 100$$

- 5 Hodnoty jsou korigovány na spontánní uvolňování.

Příklad 2

Imunizace myší konjugáty P15 (P15-BSA nebo P15-PD) indukuje produkci protilátek proti lidskému IgE

- 10 Konjugáty obsahující mimotop P15 (25 µg proteinu/dávku) popsané v části 1.4, byly podávány skupinám deseti myší BalbC, přičemž jako adjuvans byla použita emulze olej ve vodě obsahující QS21 a 3D-MPL podle popisu ve WO 95/17210. Zesilující dávka byla podána v den 21 a 42 a séra byla odebírána v den 42 a 56. Imunitní
15 odpověď proti peptidu a IgE navázanému na destičky byla sledována metodami popsanými v příkladu 1.

Výsledky

- 20 Výsledky odpovědí proti peptidu a IgE měření 14 dní po třetí vakcinaci jsou ukázány v tabulce 2.

Taülka 2 Výsledky imunogenicity P 15

Mimotopový konjugát	Odpovědi proti peptidu (títr středního bodu)			Odpovědi proti IgE (µg/ml (PTmAb0011))		
	průměr	stand. odch.	geom. střed	průměr	stand. odch.	geom. střed
P15-PD (n=16)	41391	26858	36154	1,6	4,5	0,3
P15-BSA (n=10)	49591	9259	48719	2,2	2,5	1,0

Příklad 3

Anti-IgE indukované u myší po imunizaci konjugátem nejsou anafylaktogenní

5 Několik ředění kompletního séra nebo IgG vyčištěný z konjugátu imunizovaných myší je možno testovat v přítomnosti basofilů z čerstvě odebrané periferní krve alergických pacientů.

Anafylaktogenicita může být vyhodnocována měřením uvolňování histaminu indukovaného testovanými protilátkami podle
10 následujícího popisu:

Z periferní krve se odstraní erythrocyty na gradientu glukóza-dextran.

Buňky se promyjí a vysejí spolu s testovanými vzorky (například alergen, protilátky, alergen + protilátky, ...).

15 Po inkubaci se oddělí supernatanty a uvolňování histaminu se měří podle doporučení výrobce (Immunotech, imunologický kit pro stanovení histaminu).

Bylo ukázáno, že žádné ze sér vytvořených pomocí P15-BSA nebo P15-PD není anafylaktogenní.

20

Příklad 4

Anti-IgE indukované u myší po imunizaci konjugátem jsou schopné blokovat uvolňování histaminu zprostředkované IgE indukované spuštěním lergenem v basofilech alergického pacienta

25 Uvolňování histaminu je možno měřit ve vzorcích basofilů spouštěných různými koncentracemi alergenu v přítomnosti nebo nepřítomnosti několika ředění úplného séra nebo IgG vyčištěného z myší imunizovaných konjugátem. Blokující aktivita protilátek anti-P15 v antiséru byla vyhodnocována měřením inhibice uvolňování histaminu

indukovaného alergenem. Uvolňování histaminu a inhibice byly měřeny podle popisu v příkladu 3. Protože P15 je mimotop P1, jako kontrola byla použita protilátka PTmAb0011, protože je známo, že se váže na stejný epitop (P1). Výsledky jsou ukázány v tabulce 3.

5

Tabulka 3 Inhibice uvolňování histaminu z basofilů alergických pacientů

Antisérum	Ředění	% inhibice uvolňování histaminu
P15-PD (myš 4.12)	1/30	79
P15-PD (myš 4.5)	1/30	57
P15-BSA (myš 7.3)	1/30	67
P15-BSA (myš 7.5)	1/30	57
PTmAb0011	0,1 µg/ml	56
PTmAb0011	1 µg/ml	90
anti-BSA sérum	1/30	40
anti-PD sérum	1/30	40

Příklad 5

10 Imunogenicita mimotopů P2 a P3

Následující mimotopy byly konjugovány s BSA s použitím technik popsaných v příkladu 1.2, a myši byly imunizovány těmito konjugáty s použitím stejných směsí a stejného postupu jak bylo popsáno v příkladu 2.

15

P 16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 mimotop	SEQ ID No.24
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 mimotop	SEQ ID No.26

Myším byla po poslední imunizaci odebrána krev a byly prováděny testy na reaktivitu anti-IgE metodou ELISA IgE navázaného na destičky. V následující tabulce jsou shrnuty jednotlivé výsledky, průměry (Av), geometrické střední hodnoty (GM); (SD = standardní odchylka).

Tabulka 4 Výsledky imunogenicity P 16 a P 17

Imunitní odpovědi proti peptidům u myši (14 dnů po třetí vakcinaci), titry středních bodů													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Av	SD	GM
P 16	1891	649	1299	2349	591	1474	4605	918	4177	865	1882	1436	1478
P 17	100	4349	2850	3434	6133	2231	5085	2991	13070	8874	5446	3515	4656

Příklad 6

10 Produkce mimotopů P1 a jejich aktivita z hlediska imunogenicity/funkce

6.1 Produkce imunogenů

Mimotopy P1 byly odvozovány buď technologií phage display nebo teoretickým návrhem molekulárním modelováním smyčky C-D domény C ϵ 2 IgE. Byly syntetizovány následující peptidy, které byly formulovány jak do konjugátů BSA-peptid, tak i do rekombinantních konstruktů antigenu jádra HepB.

Název peptidu	Sekvence	SEQ ID No.	
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 mimotop	12
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	P1 mimotop	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 mimotop	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 mimotop	16

Konstrukty peptidy/proteinový nosič byly produkovány následovně. Acylhydrazinové deriváty peptidů byly připraveny na pevné fázi jak je ukázáno ve schématu 1 (obr 2). Tyto deriváty peptidů
5 mohou být snadno připraveny s použitím známého postupu „Fmoc“ využívajícího buď polyamidové nebo polyethylenglykolpolystyrenové (PEG-PS) nosiče v úplně automatickém zařízení pomocí postupů dobře známých v oboru (způsoby a postupy pro syntézu na pevné fázi se popisují v publikaci 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical
10 Approach', E. Atherton a R. C. Sheppard, publ. IRL, Oxford University Press (1989). Odštěpení kyselinou poskytlo přímý modifikovaný peptid zbavený ochranných skupin. Ten by mohl být snadno oxidován a čištěn za získání epitopu modifikovaného disulfidickými můstky použitím metod uvedených v „Methods in Molecular Biology, díl 35:
15 Peptide Synthesis Protocols“ (ed. M. W. Pennington a B. M. Dunn), kapitola 7, str. 91 - 171, D. Andreau a další.

Takto syntetizované peptidy mohou být potom konjugovány k nosným proteinům (v tomto případě bovinní sérový albumin, BSA) použitím následujícího postupu:

20

6.2 Syntéza modifikovaného nosiče

K zavádění arylaldehydové funkční skupiny bylo použito sukcinimidového aktivního esteru (BAL-OSu) připraveného jak je ukázáno na schématu 2 (obr. 3, viz WO 98/17628, kde jsou uvedeny
25 další podrobnosti). Substituce aminových funkčních skupin BSA (bovinní sérový albumin) z přibližně 50 % rutinně poskytovala rozpustný modifikovaný protein. Vyšší substituce BSA vedla k nerozpustným konstruktům. BSA a BAL-OSu byly smíseny v ekvimolární koncentraci v pufru s DMSO (viz schéma 3, obr. 3).
30 2 hod. Tento protokol založený na experimentech poskytl přibližně



50% substituci BSA, jak bylo zjištěno fluorescaminovým testem na volné aminové skupiny.

6.3 Konstrukt peptid-BSA

5 Jednoduché kombinace modifikovaného peptidu a derivatizovaného BSA poskytly konstrukty peptid-BSA, které byly snadno izolovány dialýzou (schéma 4, obr. 4). Pro potvrzení zvýšení molekulové hmotnosti byla použita SDS-PAGE.

10 6.4 Konstrukty antigenu jádra hepatitidy

Rekombinantní konstrukty antigenu jádra hepatitidy (HBC) byly také připraveny s použitím postupů molekulární biologie popsanych v EP 0 421 635 B. V těchto experimentech HBC byl PT1079 modifikován pro odstranění koncového lysinu.

Peptid	Sekvence	SEQ NO.
PT1078HBC	CLEDGQVMDVDCPREAAEGD	65
PT1079HBC	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	66

15

Expres P1-mimotopových peptidů byla potvrzena experimenty BIAjádra s PTmAb0005 a PTmAb0011. Byly vytvořeny výsledky pro imunogenicitu s použitím dávek pouze 3 µg/dávku HBC.

20 6.5 Studie imunogenicity

Konstrukty mimotop/HBC a mimotop/BSA byly čištěny a formulovány do fackín, kde jako adjuvans byla použita emulze olej ve vodě obsahující QS21 a 3D-MPL popsaná ve WO 95/17210 (dávka konjugátu BSA 25 µg). Tyto vakcíny byly podávány skupinám deseti
25 myši BalbC a zesilující dávky byly podány v den 14 a 28 a séra byla odebírána v den 42. Imunitní odpovědi proti IgE navázanému na

destičky a receptorově orientovanému IgE byly sledovány použitím technik popsaných v příkladu 1.4. Byla také měřena aktivita antiséra při inhibici uvolňování histaminu z alergických basofilů způsobem popsaným v 1.5.

5

6.6 Výsledky

Všechny konstrukty BSA a HBC indukovaly vysoké titry protilátek anti-IgE, jestliže byl IgE navázán přímo na destičku ELISA, a jestliže byl orientován na receptor s vysokou afinitou. Navíc se potvrdilo, že všechny tyto odpovědi byly specifické tím způsobem, že bylo sledováno soutěžení volného IgE a jeho mimotopů a nikoli nespecifických peptidů. Protilátky proti IgE indukované těmito imunogeny byly schopny inhibovat uvolňování histaminu z lidských basofilů odvozených z alergického dárce (jílek vytrvalý, LOLP1).

Výsledky pro C67-8 je možno nalézt na obr. 5, 6, 13 a 15. Pro výsledky pro PT1078 viz obr. 9, 10, 14 a 15. Pro výsledky pro PT1079 viz obr. 7, 8, 14 a 15. Pro výsledky pro PT1079GS viz obr. 11, 12 a 15.

15

Navíc nebyly imunitní odpovědi vyvolané těmito peptidovými mimotopy anafylaktogenní.

20

Tabulka 5

Anafylaktogenicita P1 mimotopových antisér

Imunogen	Ředění séra	% uvolňování histaminu
Spontánní uvolňování		0,25 ± 0,06
Prosté sérum	1/50	1,9 ± 0,4
BSA	1/50	2,15 ± 0,65
BSA-IgE C67-8	1/50	2,9 ± 1,1
BSA-1078	1/50	5,00 ± 1,40

BSA-1079	1/1250	0,43 ± 0,04
HBCwt	1/50	3,5 ± 1,0
HBC-1079	1/1250	0,12 ± 0,04
HBC-1079gs	1/1250	0,02 ± 0,02
HBC-IgE C67-8	1/50	2,14 ± 0,26

Poznámka k tabulce: Buňky dárce citlivého na LoIP1 byly smíchána se zředěným myším sérem na 30 min. Uvolňování histaminu bylo zjišťováno komerčně dostupným EIA specifickým pro histamin. Údaje jsou ve formě střední hodnota ± S.E.M. (n = 10).

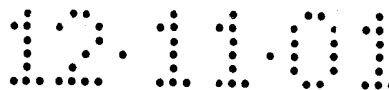
5

Část 2 Ligandy, které se vážou na epitopy a mimotopy podle předkládaného vynálezu

V části 1 jsou popsány peptidové imunogeny, které po podání savci ve formě vakcíny indukují imunitní odpovědi které (a) rozpoznávají IgE, a (b) jsou schopny inhibovat uvolňování histaminu in vitro. Část 2 popisuje ligandy, které jsou schopné vázat se na epitopy nebo mimotopy podle předkládaného vynálezu a popisuje jejich funkci. Byly identifikovány dvě monoklonální protilátky, PTmAb0005 a PTmAb0011, které rozpoznávají smyčku c-d Cε2 IgE. Bylo zjištěno, že mimotopy tohoto peptidu jsou, jak je ukázáno v části 1, imunogenní a funkční při aktivní vakcinaci. Tato část popisuje charakterizaci těchto monoklonálních protilátek a poskytuje důkaz jejich využitelnosti při pasivní vakcinaci.

Cílový epitop těchto protilátek byl identifikován použitím technologie fágového panningu (phage panning), tedy sekvenčního uspořádání většího počtu bakteriofágových cílů a následné vyčištění a potvrzení mapováním domén a místně specifickou mutagenezí. Funkční aktivita protilátek byla potvrzována nejen in vitro testováním rozpoznávání anti-IgE a inhibicí uvolňování alergických mediátorů, ale

20



také in vivo na studiích pasivní kožní anafylaxe (Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA) u opice.

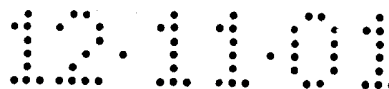
Příklad 7

5 7.1 Mapování cíle pro monoklonální protilátku pomocí fágu

Pro mapování vazebných míst monoklonálních protilátek byly použity knihovny získané metodou phage display, při použití tří rozdílných fágových knihoven, které zviditelňují buď peptidové sekvence XCX₁₅, XCX₁₀ nebo XAX₁₀ (kde X je jakákoli aminokyselina) na N-konci fága gVIIIp. Tabulky 6 a 7 ukazují výsledky selekce peptidových ligandů monoklonálními protilátkami PTmAb0005 proti lidskému IgE a . Podobnosti rozložení aminokyselin mezi peptidy a lidským IgE odhalily silnou homologii se smyčkou c-d v doméně Cε2 IgE. Rozložení homologie získané z fága bylo: Q h h a h a h (kde h = hydrofobní aminokyselina a a = kyselá aminokyselina), což bylo 15 souhlasné uspořádání se sekvencí QVMDVDL (SEQ ID No.17) ve smyčce C-D domény Cε2 lidského IgE.

Bylo také provedeno epitopové mapování IgEC67, což je peptid odvozený z experimentů metodou phage panning, který měl nejvyšší 20 aktivitu k PTmAb0005. To bylo provedeno zavedením náhodných mutací mutagenezí PCR a subklonováním do vektoru Fuse 5 pro zobrazení menšího vláknitého fágového proteinu gIIIp. Mutanty IgEC67 byly hodnoceny z hlediska vazby na PTmAb0005 jak je ukázáno v tabulce 8. Tyto a jiné výsledky potvrdily důležitost 25 aminokyselin uvnitř IgEC67, které souhlasily s epitopem Cε2. Například mutanty L8P, D10G, L11M, E12G a L13R všechny snižovaly vazbu PTmAb0005 na anti-IgE (údaje nejsou ukázány). Mutace na jiných místech měly na afinitu k PTmAb0005 malý vliv.

30 Z PTmAb0005 s nejvyšší afinitou byly vytvořeny náhodné vedlejší knihovny a technikou fágového zobrazení odvozené peptidy



PTmAb0011 pro zvýšení afinity peptidu k protilátkám úpravou výše popsaných metod (Yu, J. a Smith, G. P. (1996), „Affinity maturation of phage-displayed peptide ligands“. *Methods in Enzymology*, 267, 3 - 27). Metoda zahrnovala přenos subklonováním DNA z vláknitého fágového zobrazovacího vektoru hlavního povlakového proteinu (gVIIIp) do vektoru pro zobrazení vedlejšího fágového povlakového proteinu (gIIIp) náhodným krokem PCR. Z několika fágových sekvencí byly vytvořeny vedlejší knihovny včetně ligandů PTmAb0005 s nejvyšší afinitou IgEC67 a IgE C67-8. Afinity zralých sekvencí pro C67 a C67-8 jsou ukázány v tabulkách 8 a 9. V tabulkách jsou uvedeny hodnocení pořadí a také afinity k jádru BIA tam, kde byly dostupné. Jako imunogen byl použit IgEC67-8 schopný indukovat odpověď proti lidskému IgE u myši, jestliže byl jako imunogen použit fág exprimující peptid.

15

7.2 Potvrzení cíle mapováním domén

Byla vytvořena řada konstruktů s cílem mapovat vazebně specifické části PTmAb0005 a PTmAb0011 s ohledem na konstantní domény IgE. Byly vytvořeny následující konstrukty: C ϵ 2⁺-4, C ϵ 2-3, C ϵ 3-4, C ϵ 3-4L (C ϵ 3-4 plus propojovací sekvence mezi doménami C ϵ 2 a C ϵ 3) a samotný C ϵ 2.

Fragmenty obsahující různé domény lidského IgE Fc byly klonovány s použitím cDNA odvozené z hybridomové linie JW8/5/13, které exprimují chimérní lidský IgE (Neuberger, M. S. a další (1985), *Nature* 314 268 - 270; Bruggemann, M. a další (1987), *J. Exp. Med.* 166, 1351 - 61). Fragmenty IgE Fc byly amplifikovány použitím vhodných párů primerů a JW8/5/3 cDNA jako templátu. Fragment c ϵ 2-4 kóduje aminokyseliny (aa) S225-K547. Fragment c ϵ 3-4 kóduje aminokyseliny G335-547. Fragment c ϵ -3-4L (domény 3-4 plus propojovací sekvence, která spojuje c ϵ 2 s c ϵ 3) kóduje aminokyseliny E322-K547. Fragment c ϵ 2-3 kóduje aminokyseliny S225-G436.

30

Fragment $\text{C}\epsilon 2$ kóduje aminokyseliny S225-S324. Všechny konstrukty obsahují na konci COOH hexahistidinové zakončení pro detekci a purifikaci. Tyto fragmenty byly klonovány do eukaryotického expresního vektoru v rámci s úvodní kódující sekvencí odvozenou z CD33 pro přímou sekreci exprimovaného fragmentu. To umožnilo
5 expresi v savčích buněčných liniích. Vektor byl odvozen z pcDNA3.1 + (Invitrogen). Pro expresi klonovaných fragmentů byly vhodné klony transfekovány do buněk COS-7 a získané kondicionované médium bylo sklizeno 48 až 60 hod po transfekci.

10 Vazba PTmAb0005 a PTmAb0011 na exprimované domény IgE byla sledována testem ELISA, vazbou konstruktů na destičku ELISA s následnou inkubací s monoklonálními protilátkami a vyvíjením anti-myšími protilátkami. Známou technologií westernového přenosu byla také testována vazba na denaturované konstrukty.

15 Výsledky pro PTmAb0005 ukázaly silnou vazbu na $\text{C}\epsilon 2$ -4, $\text{C}\epsilon 2$ -3 a $\text{C}\epsilon 2$ v jejich nativních formách a také vazbu na $\text{C}\epsilon 2$ -4 a $\text{C}\epsilon 2$ po denaturaci metodou westernového přenosu. Při tomto testu nebyla pozorována vazba na $\text{C}\epsilon 3$ -4 nebo $\text{C}\epsilon 3$ -4L.

20 PTmAb0011 se také váže na $\text{C}\epsilon 2$ -4, $\text{C}\epsilon 2$ -3 a $\text{C}\epsilon 2$ v jejich nativních formách; a váže se také na $\text{C}\epsilon 2$ -4 a $\text{C}\epsilon 2$ a $\text{C}\epsilon 2$ v jejich denaturovaných formách.

Je proto jasné, že obě protilátky rozpoznávaly cílový epitop přítomný v doméně $\text{C}\epsilon 2$ IgE.

25 7.3 Potvrzení cíle místně specifickou mutagenezí

Studie mapování domén ukázala, že obě mAb byly schopny vazby na samotnou doménu $\text{C}\epsilon 2$. Analýza sekvencí získaná metodou biopanningu peptidových knihoven zobrazených fágem ukázala, že sekvence odvozené od PTmAb0005 ukázaly významnou podobnost
30 k P1. Tato oblast vytváří smyčku mezi řetězcí C-D β domény $\text{C}\epsilon 2$ ve

struktury modelu IgE. Místně specifická mutagenese byla prováděna pro ověření, že tato sekvence je epitopem pro PTmAb0005 a PTmAb0011.

Analýza fágem zpřístupněných sekvencí a porovnání struktury modelu IgE (Helm, a další 1990, výše) se známou strukturou Fc lidského IgG1 (Deisenhoffer, J., 1981, Biochemistry, 20, 2361 - 2370) vedla k identifikaci tří zbytků, které se pravděpodobně účastnily rozpoznávání protilátky. Těmito zbytky jsou glutamin (Q) 273, methionin (M) 275 a aspartát (D) 276. Každý z těchto zbytků byl změněn na alanin (A) a alespoň jeden další zbytek aminokyseliny jak je ukázáno níže.

Q273: A a E (glutamát)

M275: A; Q a K (lysin)

D276: A a N (asparagin)

Mutace alaninu změnila jak strukturu, tak i chemickou povahu cílového zbytku, zatímco jiné mutace zachovaly strukturu (pokud možno co nejlíže), ale změnilly náboj, například Q273E. Glutamát měl v tomto případě v podstatě stejnou strukturu jako glutamin, ale je negativně nabitý místo neutrálního náboje.

Každá mutace byla vytvořena nezávisle v konstruktu C ϵ 2-4. Každý mutantní polypeptid byl exprimován na podobnou hladinu jako standardní typ (WT) C ϵ 2-4 a každý byl schopen vazby na rekombinantní ektodoménu Fc ϵ R1 α stejně účinně jako standardní typ produktu c ϵ 2-4, přičemž pro stanovení byly používány testy na bázi ELISA. Tyto údaje tedy v souhrnu ukázaly, že mutace neměly žádný vliv na produkci/sekreci polypeptidů v expresním systému a neovlivňovaly ve větší míře strukturu fragmentu c ϵ 2-4.

Všechny mutace v podstatě zrušily vazbu jak na PTmAb0005, tak i PTmAb0011 kromě D276N, který snížil vazbu na PTmAb0005 pouze o přibližně 50 % (tabulka 10). Jako kontrola k těmto

experimentům byla provedena mutace alternativního glutaminového zbytku uvnitř C ϵ 2, Q317. Byly vytvořeny mutanty Q317E a Q317K a bylo zjištěno, že vůbec neovlivňují schopnost PTmAb0005 a PTmAb0011 rozpoznávat C ϵ 2-4. Podobně nebylo ovlivněno rozpoznávání Fc ϵ R1 α .

Vazebné aktivity PTmAb0005 a PTmAb0011 jsou tedy specificky ovlivňovány mutacemi uvnitř smyčky C-D domény C ϵ 2.

Sekvence P1 tedy obsahuje hlavní vazebnou determinantu jak pro PTmAb0005, tak i pro PTmAb0011.

10

Tabulka 10 Rozpoznávání konstruktů domény IgE protilátkami PTmAb0005 a PTmAb0011

Mutace	Rozpoznávání PTmAb0005	Rozpoznávání PTmAb0011	Rozpoznávání ektodomény Fc ϵ R1 α
Wt ϵ 2-4	++++	++++	++++
Q273A	-	-	++++
Q273E	-	-	++++
M275A	±	±	++++
M275Q	±	±	++++
M275K	±	±	++++
D276A	-	-	++++
D276N	++	-	++++
Q317E	++++	++++	++++
Q317K	++++	++++	++++

7.4 Zpřesněné modelování smyčky C-D domény C ϵ 2 IgE

Protože dosud nebyla zjištěna přesná struktura lidského IgE (ačkoli je dostupný model), pravděpodobně se v této modelové struktuře při jejím podrobném zkoumání vyskytnou chyby. Autoři předkládaného vynálezu proto zpřesňovali tento model v oblasti smyčky C ϵ 2 IgE mapováním této smyčky do ekvivalentní oblasti C γ 2 lidského IgG1(Deisenhoffer, J., 1981 výše).

Na základě této nové informace o omezeních týkajících se strukturních vlastností byl navržen cyklizovaný peptid, který by při syntéze měl přijmout konformaci, která těsně napodobuje konformaci smyčky C-D domény C ϵ 2 v kontextu s úplnou molekulou IgE. Tento peptid, Ac-CLEDGVQMDVDLCPREAAEGDK(Ac)-NH₂, byl pojmenován PT1079 (SEQ ID No.14).

Afinita PT1079 k PTmAb0005 a PTmAb0011 byla měřena použitím technologie BIAcore a bylo zjištěno, že jsou velmi silně rozpoznávány obě tyto monoklonální protilátky (rozpoznávané oběma protilátkami PTmAb0005 a PTmAb0011 se zdánlivými afinitami ~20nM, popřípadě ~250nM). Kontrolní deriváty peptidu PT1079, kde bylo místo cyklizace posunuto pouze o jediný zbytek aminokyseliny, čímž došlo ke snížení délky peptidu mezi místy cyklizace o jeden zbytek aminokyseliny (PT1078) snížily vazbu peptidu jak na PTmAb0005, tak na PTmAb0011. PT1078 byl modifikován tak, že byl přidán další zbytek takovým způsobem, že oblast smyčky měla stejný počet zbytků jako PT1079, ale tato modifikace nedokázala obnovit vazbu na PTmAb0005 nebo PTmAb0011. To ukazuje důležitost správného předkládání peptidů podle předkládaného vynálezu, aby přijaly tvar, který blízce napodobuje přirozený cíl v souvislosti s úplnou molekulou IgE.

Příklad 8

8.1 Materiály a metody

8.1.1 Test vazby FcεR1α (destičky s proteinem A)

V tomto testu se používá rekombinantní forma ektodomény alfa-
5 řetězce receptoru s vysokou afinitou pro IgE (alfa-ektodoména) pro
vazbu chimérického IgE. Karboxylový konec alfa-ektodomény se fúzuje
k lidské sekvenci Fc IgG1. To umožňuje vazbu rekombinantní molekuly
na mikrotitrační destičky potažené proteinem A prostřednictvím oblasti
Fc. Většina molekul alfa-ektodomény by tedy měla být dostupná pro
10 vazbu ligandu a poskytuje se tak systém pro analýzu interakcí IgE-
receptor. Dále popsané experimenty mají za úkol detekovat bloku-
jící aktivitu protilátek anti-IgE na (vysoce afinitní) receptor.

8.1.2 Protokol ELISA pro detekci vazby IgE na ektodoménu alfa- 15 řetězce vysoce afinitního receptoru

Destičky se potáhnou proteinem A a přidá se 100 µl/jamku
fúzního proteinu α-ecto-Ig zředěného na 0,25 µg/ml v blokovacím
puftru (PBS/5% BSA/0,05% Tween-20). Provede se inkubace 1 hod při
37 °C. Chimérický IgE se zředí na koncentraci 0,03125 µg/ml v 10%
20 prasečím séru. Protilátka anti-IgE se zředí na vhodné koncentrace
tohoto roztoku IgE pro test. Inkubuje se 1 hod při teplotě místnosti.
Destičky se třikrát promyjí PBS/0,05% Tween-20 s použitím zařízení
na promývání destiček. Přidá se 100 µl/jamku roztoku IgE : anti-IgE
(čtyřnásobné paralelní stanovení každé koncentrace anti-IgE). Směs
25 se inkubuje 1 hod při 37 °C. Destičky se třikrát promyjí PBS/0,05%
Tween-20 s použitím zařízení na promývání destiček. Přidá se
100 µl/jamku konjugované kozí protilátky proti myšimu lambda-řetězci
HRPO v ředění 1 : 6000 v blokovacím puftru. Směs se inkubuje 1 hod
při 37 °C. Destičky se třikrát promyjí PBS/0,05% Tween-20 s použitím
30 zařízení na promývání destiček. Přidá se 200 µl/jamku substrátu OPD

a inkubuje se při laboratorní teplotě v temnu 2 až 10 min. Reakce se ukončí přidáním 25 μ l 25% H₂SO₄. Zastavené reakční směsi se míchají na třepačce na destičky při pomalé rychlosti. Odečítání OD se provádí při 490 nm.

- 5 Je možno vypočítat procenta inhibice vazby IgE na jeho receptor. Maximální hodnota vazby pro IgE se vypočte z průměru souboru jamek, které obsahovaly IgE v samotném 10% prasečím séru (tj. bez přídatku anti-IgE).

Hodnota procenta inhibice se vypočte:

- 10
$$\frac{(\text{maximální hodnota IgE} - \text{průměr paralelních stanovení anti-IgE})}{\text{maximální hodnota IgE}} \times 100$$

8.1.3 Test vazby Fc ϵ R1 α (sestřižená ektodoména)

- 15 Tento test je v podstatě stejný jako předcházející test s tím rozdílem, že na konstrukt ektodoména Fc ϵ R1 α /IgG se působí proteolytickým enzymem faktor X pro rozštěpení těchto dvou částí. Část IgG Fc se odstraní použitím kuliček s proteinem A a faktor X se odstraní pomocí straptavidinových kuliček, takže se získá v podstatě čistý alfa-řetězec vyrobené ektodomény.

20

8.1.4 Vazebný test CD23 (Fc ϵ RII, receptor s nízkou afinitou)

- 25 Tento test byl prováděn jak na buňkách RPMI 8866, tak i na primárních lidských B-buňkách; mohou být použity dva formáty, jeden pro detekci protilátek, které se vážou na IgE asociovaný s Fc ϵ RII, a druhý pro analýzu, zda mAb interferovaly s asociací IgE s FcRII. Pro první test byl na buňky nanesen chimérický IgE (1 μ g/ml) na 1 hod na ledu v PBS, 1% FBS, 0,1% NaN₃. Nadbytečný IgE byl odstraněn a byla přidána anti-IgE mAb. Navázaná mAb byla zviditelněna krysí protilátkou proti myššímu IgG₁ s konjugovaným FITC. Pro druhý test byl

chimerní IgE (1 µg/ml) předinkubován s IgE mAb 1 hod při teplotě místnosti za mírného míchání, před přidáním k buňkám. Tato směs byla inkubována s buňkami 1 hod na ledu a potom promyta pro odstranění nenavázaného IgE. Navázaný IgE byl detekován konjugátem FITC - kozí antimyší IgE nebo navázaná mAb byla detekována konjugátem krysí protilátky proti myšimu IgG₁ konjugované s FITC. Když byly studie prováděny na buňkách PBMC, B-buňky byly identifikovány protilátkou proti CD19 konjugovanou s PE. Vzorky byly identifikovány průtokovou cytometrií.

10

8.2 Výsledky

Výsledky pro PTmAb0005 a PTmAb0011 jsou ukázány v obr. 16 až 21. Obr. 16 ukazuje koncentračně závislou vazbu monoklonální protilátky na IgE navázaný na destičky. Obr. 17 ukazuje koncentračně závislou inhibici vazby IgE na konstrukt FcεR1α/IgG protilátkami PTmAb0005 a PTmAb0011. Obr. 18 ukazuje inhibici vazby IgE na sestříženou ektodoménu FcεR1α navázanou přímo na plastické destičky protilátkami PTmAb0005 a PTmAb0011. Obr. 19 ukazuje nepřítomnost inhibice vazby IgE na FcεRII (CD23) protilátkou PTmAb0005 (klon GE-1) a PTmAb0011. Obr. 20 a 21 ukazují koncentračně závislé blokování uvolňování histaminu z krevních basofilů alergického člověka protilátkami PTmAb0005 a PTmAb0011.

PTmAb0011 je myší monoklonální protilátka se specificitou pro lidský IgE, která nevykazuje žádnou zkříženou reaktivitu s jinými isotypy lidského IgE nebo krysího/myšího IgE. PTmAb0011 se váže jak k nativnímu, tak i teplem zpracovanému IgE, jestliže se váže na destičkách ELISA v náhodné orientaci, což ukazuje, že její rozpoznávací místo na IgE není tepelně labilní. PTmAb0011 také rozpoznává IgE, jestliže je navázaný přes antigen na destičku ELISA. Je důležité, že tato mAb může úplně blokovat interakci mezi lidským IgE a alfa-řetězcem vazebné složky vysoce afinitního receptoru IgE

30

(Fc ϵ RI). Tato mAb však stále rozpoznává IgE, jestliže byla předem navázána na Fc ϵ RI, což ukazuje, že vazebné místo pro mAb se po navázání receptoru neztrácí.

5 Příklad 9

9.1 Analýza vazebných vlastostí IgE pro protilátku PTmAb0011 normální ELISA a ELISA s orientovaným antigenem

Jak je popsáno v příkladu 1, byla prováděna metoda ELISA s normální vazbou IgE potažením destiček lidským chiméřním IgE, myelomovým IgE, isotypy lidských Ig nebo IgE hlodavců (1 μ g/ml 10 v karbonátovém/bikarbonátovém potahovacím pufru pH 9,6). Pro ELISA s orientovaným antigenem bylo před přidáním chiméřního IgE (1 μ g/ml) použito potažení NP-BSA v saturační koncentraci. Alternativně bylo provedeno potažení rozpustným lidským alfa-
15 řetězcem Fc ϵ RI (0,25 μ g/ml) s následným potažením chiméřním IgE. Metoda ELISA byla dále prováděna jak bylo popsáno v experimentu 1 (protokol ELISA pro detekci myších protilátek proti lidskému IgE).

9.2 Výsledky

20 Obr. 22 ukazuje, že PTmAb0011 se váže jak na lidský/myší chiméřní IgE, tak i na lidský myelomový IgE, jestliže jsou navázány na destičku ELISA v náhodné orientaci. Podobně vazba na IgE s orientovaným antigenem (tj. IgE navázaný na destičku s navázaným NP-BSA) je závislá na dávce. PTmAb0011 byla také analyzována na
25 schopnost rozpoznávat chiméřní IgE po tepelném působení při 56 °C v různých časových obdobích. Obr. 22 také ukazuje, že vazebná schopnost PTmAb0011 pro IgE není ovlivněna působením tepla.

Charakterizace mAb byla dále rozšířena pro zjištění, zda byla PTmAb0011 schopna inhibovat interakci IgE se složkou alfa-řetězce
30 receptoru IgE s vysokou afinitou (obr. 23). Předinkubace IgE

s PTmAb0011 před přidavkem k alfa-řetězci Fc ϵ RI navázanému na destičky vedla k inhibici interakce IgE s alfa-řetězcem Fc ϵ RI závislé na dávce. PTmAb0011 také rozpoznává (obr. 24) IgE asociovaný s alfa-řetězcem Fc ϵ RI v závislosti na dávce.

5

Příklad 10

10.1 Analýza sekrece IgE z primárních lidských B-buněk

Buňky PBMC byly vysety v koncentraci 2×10^5 buněk/jamku v 96-jamkových destičkách s jamkami ve tvaru U, v médiu doplněném jak IL-4, tak anti-CD40. Byly přidány PTmAb0011 nebo isotypově shodná kontrolní mAb a buňky byly inkubovány 14 dnů před sklizením supernatantů pro analýzu IgE. Celkové hladiny IgE byly měřeny potažením destiček ELISA králičí protilátkou proti lidskému IgE (10 μ g/ml) v 0,5M karbonátovém/bikarbonátovém pufru (pH 9,6). Promyté destičky byly blokovány PBS, 0,05% Tween 20, 5% BSA. Buněčné supernatanty i standardy IgE byly inkubovány se saturačními množstvími PTmAb0011 (10 μ g/ml) 1 hod při laboratorní teplotě před přidáním na destičky ELISA, kde se mohou vytvořit komplexy IgE/anti-IgE. Po inkubaci a promývacích krocích byl navázaný IgE detekován HRP - ovčí protilátka proti lidskému IgE a potom substrátem OPD. Hladiny IgE v buněčných supernatantech potom byly odhadnuty na základě standardní křivky.

15

20

10.2 Výsledky

IgE byl předinkubován s PTmAb0011 v rozmezí dávek od 10 μ g/ml do 0,5 μ g/ml a vyšetřován na vliv na následnou vazbu IgE na Fc ϵ R2 na linii lidských B-buněk RPMI8866. Obr. 25 ilustruje, že předinkubace IgE s PTmAb0011 zvyšuje vazbu IgE na Fc ϵ R2. Monoklonální protilátka, která není specifická pro P1 (PTmAb0017)

25

vazbu IgE na receptor FcεRII nezvyšovala. PTmAb0011 také zvyšuje vazbu IgE na FcεRII na primárních B-buňkách (obr. 26).

10.3 Účinky PTmAb0011 na sekreci IgE z primárních lidských B-buněk

5 Mononukleární buňky periferní krve byly kultivovány s PTmAb0011 v přítomnosti dalšího IL-4 a protilátky anti-CD40, aby se podpořilo přepnutí isotypu B-buněk na sekreci IgE. Byl vyvinut test ELISA, který umožnil měření celkových hladin IgE, tj. volného IgE
10 a komplexu PTmAb0011 a IgE. Pro zjištění tohoto množství byl sekrenovaný IgE předinkubován se saturačními hladinami PTmAb0011 pro umožnění převedení veškerého IgE do komplexu. Celkový IgE v supernatantu tkáňové kultury byl kvantifikován na základě standardní křivky pro IgE, který byl rovněž v komplexu se saturačními hladinami
15 PTmAb0011. Obr. 27 ilustruje, že u tří různých dárců vedla inkubace primárních B-buněk s PTmAb0011 (1 µg/ml) k podstatnému snížení celkových hladin sekrenovaného IgE. Žádná taková inhibice nebyla pozorována s isotypově shodnou kontrolní protilátkou.

20 10.4 Stanovení uvolňování histaminu z lidských basofilů

 Byly použity dva formáty testu. PBMC od nealergických dárců byly pasivně senzitivovány 1 µg/ml chimérického IgE 30 min při 37 °C, promyty a smíchány s monoklonálními protilátkami na 30 min při 37 °C. alternativně bylo na PBMC od dárců citlivých na LolP1 přímo
25 smícháno s monoklonálními protilátkami na 30 min při 37 °C. Reakce byly zakončeny centrifugací. Uvolňování histaminu v buněčných supernatantech bylo zjišťováno specifickým imunologickým testem (Immunotech 2562). Celkový obsah buněčného histaminu byl stanoven v buňkách lysovaných 0,5% detergentem Igepal.

10.5 Test blokování basofilů

Schopnost protilátek anti-IgE blokovat vazbu chimérodního IgE na FcεRI na lidských basofilech byla zjišťována inkubací PBMC od nealergických dárců s chimérodním IgE v přítomnosti monoklonálních protilátek a IL-3 po dobu 30 min při 37 °C. Buňky byly promyty a uvolňování histaminu bylo spuštěno NP-BSA na dalších 30 min při 37 °C. Reakce byly zakončeny centrifugací a uvolňování histaminu bylo měřeno výše popsaným způsobem.

10.6 Test inhibice alergických basofilů

Schopnost protilátek anti-IgE inhibovat degranulaci spouštěnou alergenem byla zjišťována předinkubací PBMC od dárců citlivých na LolP1 s monoklonálními protilátkami po dobu 30 min při 37 °C před spuštěním pomocí LolP1.

10.7 Zjišťování uvolňování tryptázy z lidských plicních žírných buněk

Surové suspenze žírných buněk byly připraveny z lidské plicní tkáně enzymatickým trávením směsí obsahující hyaluronidázu, pronázu a DNAázu. Buňky byly buď použity přímo nebo byly předem aktivovány chimérodním IgE před smícháním s protilátkami anti-IgE. Degranulace žírných buněk byla zjišťována kolorimetrickým testem granulačního enzymu tryptázy.

10.8 Stanovení uvolňování β-hexosaminidázy z buněk RBL

transfekovaných lidským FcεR1α

Transfekovaná buněčná linie RBL J41 byla získána od Dr B. Helma, University of Sheffield. Buňky byly pasivně senzitivovány buď myším monoklonálním IgE anti-DNP nebo lidským chimérodním IgE anti-

NP a spuštěny protilátkami proti lidskému IgE. Degranulace byla měřena kolorimetrickým testem uvolňování β -hexosaminidázy.

10.9 Výsledky

5 10.9.1 Anafylaktogenicita monoklonálních protilátek anti-IgE v lidských basofílech

Řada různých monoklonálních protilátek proti IgE byla testována na svou schopnost spouštět uvolňování histaminu jak z alergických, tak i nealergických basofilů (obr. 28). Na rozdíl od ostatních protilátek 10 nebyla PTmAb0011 opakovaně schopna vyvolat významné uvolňování histaminu.

10.9.2 Anafylaktogenicita monoklonálních protilátek proti IgE v lidských plicních žírných buňkách

15 Protilátka PTmAb0011 nebyla rovněž schopna uvolňovat významná množství tryptázy jak v senzitizedovaných, tak i nesenzitizedovaných lidských plicních žírných buňkách (obr. 29). Polyklonální protilátka proti lidskému IgE poskytla v těchto buňkách uvolňování 60 až 70 %.

20

10.9.3 Anafylaktogenicita monoklonálních protilátek proti IgE v buňkách RBL transfekovaných lidským $Fc\epsilon R1\alpha$

Buňky RBL J41, pasivně senzitizedované chiméřním lidským IgE anti-NP, by mohly být spouštěny antigenem NP-BSA a polyklonální 25 protilátkou proti lidskému IgE, ale nikoli PTmAb0011 (obr. 30). Naopak, jestliže jsou buňky senzitizedovány myším IgE anti-DNP, byly bez účinku obě protilátky proti lidskému IgE. Tyto buňky mohly být stále spouštěny antigenem DNP-BSA.

10.9.4 Test blokování basofilů

Protilátka PTmAb0011 byla schopna blokovat vazbu IgE na FcεRI v nealergických basofilech a tak inhibovat následné spouštění antigenem NP-BSA. Hodnota IC₅₀ této aktivity byla přibližně 60 ng/ml (obr. 31). PTmAb0011 byla také schopna účinně inhibovat uvolňování histaminu spouštěné LolP1 z alergických basofilů s hodnotou IC₅₀ 40 ng/ml (obr. 31).

Příklad 11

10 Studie pasivní kožní anafylaxe u opice

Protilátky PTmAb0005 a PTmAb0011 byly také testovány na aktivitu in vivo. Stručně řečeno, místní kožní žírné buňky opice kočkodana bělozeleného (*Cercopithecus aethiops*) byly oholeny a senzitivovány intradermálním podáním 100 ng IgE proti haptenu NP (lidský IgE anti-nitrofenylacetyl(NP) firmy Serotech) do obou paží. Po 24 hod bylo do stejného místa na jedné paži vstříknuto rozmezí množství monoklonálních protilátek, které byly testovány. Do kontrolních míst na druhé paži stejných zvířat byl vstříknut buď fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (PBS) nebo nespecifický lidský IgE (specifický pro lidský cytomegalovirus ((CMV) nebo virus lidského imunodeficitu (HIV)). Po 5 hod bylo intravenózní injekcí podáno 10 mg konjugátu BSA-NP (firmy Biosearch Laboratories). Po 15 až 30 min se u kontrolních zvířat vyvinul snadno pozorovatelný přibližně kruhový otok z anafylaxe, který je možno měřit v milimetrech. Výsledky jsou vyjádřeny buď jako střední průměr otoku skupin tří opic nebo jako procento inhibice ve srovnání s kontrolami PBS. Dec7B byla použita jako pozitivní kontrola a je popsána v EP 0 477 231 B a rozpoznává peptid 496-506 v doméně Cε4 lidského IgE.

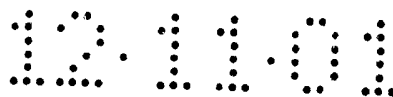
Množství testovaného vzorku (μ g)	Střední průměr otoku (mm)				
	mAb0005	mAb0011	Dec7B	IgE α -CMV kontrola	IgE α -HIV kontrola
20	0	0	0	19,5	21
10	0	0	20	20,7	22
1	4	4,5	25	22,7	23
0,1	14,8	15,7	20	21,8	22,5
0,05	17,8	18,7	22,5	21,5	22,8
PBS	23,2	28,2	26	24,5	22,5

Procenta inhibice anafylaxe jsou ukázána na obr 32.

Tabulka 6 - Ligandy peptidu PTmAb0005 identifikované metodou primárního biopanningu fágového zobrazení

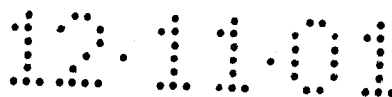
Cε2 lidského IgE EDGQVMDVD - SEQ ID No. 1

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K _D ^{Rel} jádra PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
IgEC67	XCX15	243	0,1	4,8	13
IgEC26	XCX15	43	3	53,4	67
IgEC29	XCX15	40	>600	>600	68
IgEC42	XCX15	15	19,4	>500	69
IgEC69	XCX15	11	6,6	6,4	70
IgEC9	XCX15	10	-	-	71
IgEC13	XCX15	5	>1000	>1000	72
IgEC56	XCX15	0	60	>1000	73
IgEC43	XCX15	0	-	-	74
IgEC81	XCX15	0	78	6,3	75
IgEC83	XCX15	0	-	-	76
IgEC70	XCX15	0	-	-	77



Tabulka 6 - pokračování

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K _D ^{Rel} jádra PTmAB BIA (µM)		SEQ ID No.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
IgEC64	XCX15	0	-	-	78
IgEC73	XCX15	0	>600	>600	79
IgEC72	XCX15	0	-	-	80
IgEC66	XCX15	0	>600	>600	71
IgEC75	XCX15	0	-	-	82
ESC18	XCX15	0	-	-	83
ESC45	XCX15	0	-	-	84
ESC12	XCX15	0	-	-	85
ESC43	XCX15	0	-	-	86
ESC1	XCX15	0	-	-	87
ESC4	XCX15	0	-	-	88
ESC46	XCX15	0	-	-	89
ESC20	XCX15	0	-	-	90
ESD36	XCX10	0	-	-	92



Tabulka 6 - pokračování

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)		K_D^{Rel} jádra PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
ESD14	XCX10	CCVMDIEVRGSA	0	-	-	93
ESD38	XCX10	COQRDVELVFGS	0	-	-	94
ESD15	XCX10	CCRADFEVGNNG	0	-	-	95
ESD6/10/40	XCX10	CCVSDPEAGVRD	0	-	-	96
ESB4/35	XAX10	GAGWQEKDKELR	0	70	700	96
ESB25	XAX10	GAMTAGQLSDLP	0	60	>1000	97
ESB10/38	XAX10	VAGGQVVDRELK	0	139	>1000	98
ESB8	XAX10	KAGEQAMDMELR	0	257	>1000	99
ESB29/36	XAX10	RGRNQIMDLEI	0	-	-	100
ESB15	XAX10	QIDRQIDTLL	0	-	-	101
ESB26	XAX10	REQQISDVPRV	0	-	-	102
ESB12	XAX10	CQAMDAEILNQV	0	-	-	103
ESB1/6etc	XAX10	GQMMDTELLNR	0	-	-	104
ESB7	XAX10	SMEGQVRDIQV	0	-	-	105

Tabulka 6 - pokračování

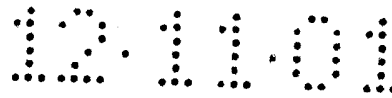
Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K _D ^{Rel} jádra PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
ESB18	XAX10	0	-	-	106
ESB9	XAX10	0	-	-	107
ESB40	XAX10	0	-	-	108
SB21/33/31	XAX10	0	-	-	109
ESB32	XAX10	0	-	-	110
ESB4/35	XAX10	0	-	-	111
ESB24	XAX10	0	-	-	112
ESB13	XAX10	0	-	-	113

104

Tabulka 7 - Ligandy peptidu PTmAb0011 identifikované metodou primárního biopanningu fágového zobrazení

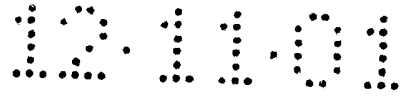
Oblast Cε2 lidského IgE EDGQVMDVD (SEQ ID No. 1)

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K _D ^{Rel} PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
EEC39/50/129	XCX15	1611	2,4	>1000	114
EEC131	XCX15	910	42	>1000	115
EEC147	XCX15	883	-	-	116
EEC40	XCX15	547	-	-	117
EEC115/3/48	XCX15	438	-	-	118
EEC36	XCX15	158	-	-	119
EEC17/47/25	XCX15	147	-	-	120
EEC40A	XCX15	80	-	-	121
EEC51/48/53	XCX15	75	-	-	122
EEC2/23/44/132	XCX15	33	7	>600	123
EEC41	XCX15	31	-	-	124
EEC135	XCX15	19	-	-	125



Tabulka 7 - pokračování

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K ₀ ^{Rel} PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
			PTmAb00005	PTmAb00011	
EEC116	XCX15	4	-	-	126
EEC21/19	XCX15	3	27,8	14,9	127
EEC55	XCX15	0	-	-	128
EEC5	XCX15	0	-	-	129
EEB33	XAX10	15	117	>600	130
EED183	XCX10	596	-	-	131
EED35/53/164	XCX10	330	-	-	132
EED38	XCX10	330	-	-	133
EED147/173	XCX10	281	-	-	134
EED35/53/164	XCX10	118	-	-	135
EED36	XCX10	52	-	-	136
EED131/138/102	XCX10	32	-	137	
EED18/47/48	XCX10	31	-	-	138
EED132	XCX10	28	-	-	139



Tabulka 7 - pokračování

Název	Knihovna	Hodnocení (ECL)	K _D ^{Ref} PTmAB BIA (μM)		SEQ ID No.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
EED139	XCX10	26	-	-	140
EED134	XCX10	14	-	-	141
EED33	XCX10	7	-	-	142
EED50	XCX10	6	-	-	143
EED34/104	XCX10	3	-	-	144
EED41/56	XCX10	0	-	-	145
EED51	XCX10	0	-	-	146
EED57	XCX10	0	-	-	147

Tabulka 8 - Mutanty IgEC67 se zvýšenou afinitou pro PTmAb0005 a PTmAb0011

Mutanty z původní sekvence jsou ukázány modře.

Oblast Cε2 lidského IgE EDGQVMDVD (SEQ ID No.1)

Název	Hodnocení	PTmAb	K _D ^{Rel} jádra BIA (μM)		SEQ ID No.
			0005	0011	
IgEC67	-	-	0,1	4,8	13
IgEC67-8	4,36	2,4	0,0094	0,066	12
IgEC67-10	4,2	2,3	-	-	148
IgEC67-1	4,1	2,2	-	-	149
IgEC67-2	3,2	1,8	-	-	150
IgEC67-3	3	1,7	-	-	151
IgEC67-12	3	1,9	-	-	152
IgEC67-9	2,7	2,4	-	-	153
IgEC67-4	2,4	1,3	-	-	154
IgEC67-5	1,9	1,6	-	-	155
IgEC67-6	1,9	1,6	-	-	156

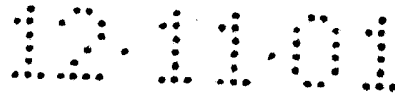
Tabulka 8 - pokračování

Název	ADGAGCFMINKQMADWEMCPRAAAEA	Hodnocení PTmAb		K _D ^{Rel} jádra BIA (μM)		SEQ ID No.
		0005	0011	0005	0011	
IgEC67-11	ADGAGCFMINKQMADWEMCPRAAAEA	1,8	1,9	-	-	157
IgEC67-14	ADGAGCFMINKQQADLELCPRGAAEA	1,2	0,9	-	-	158
IgEC67-13	ADGAECFMNKQLADSELCPRAAAEA	1,1	0,8	-	-	159
IgEC67-7	ADGAGCFMINKQLADLELCPREAAEA	1	1	-	-	160

Tabulka 9 Mutanty IgEC67-8 se zvýšenou afinitou pro P₁mAb0005

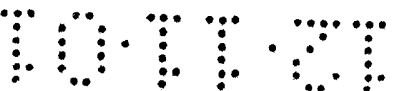
Oblast Cε2 lidského IgE EDGQVMDVD (SEQ ID No. 1)

Klon		Hodnocení A	Hodnocení B	SEQ ID NO.
IgEC67-8	GCFINKQMADLELCPRE	1,00	1,00	12
Mutanty se zvýšenou afinitou pro P ₁ mAb0005				
1-3	ADGAGCFINQMADQELCPRAAAEA	1,73	1,31	161
2-13	ADGAGCFINKQMSDFELCPREAGEA	1,56	2,14	162
3-11	ADGAGCFINKQMADLELCTREAAEA	1,54	2,02	163
3-1, 3-9, 3-10	ADGAGCFINKQMADLELCPRQAAEA	1,54	1,85	164
1-11	ADGAGCFINQMADLELCPRGGAEA	1,45	1,32	165
2-15	ADGAGCFINKQMADWELCPREGAEA	1,44	1,57	166
4-9	ADGAGCFINKQMADLELCPSSQAAEA	1,38	1,70	167
1-4, 1-2, 1-12	ADGAGCFINKQMADLELCPREGAEA	1,37	1,39	168
5-16	ADGAGCFINKQMADSELCPREPAEA	1,29	1,83	169
4-1	ADGAGCFINKQMADLELCPREAWEA	1,24	1,52	170
2-12	ADGAGCFINKQMADRELCPREAVEAEA	1,22	1,50	171



Tabulka 9 - pokračování

Klon		Hodnocení A	Hodnocení B	SEQ ID NO.
IgEC67-8	GCFINKQMADLELCPRE	1,00	1,00	12
1-9, 2-5	ADGAGCFINDKQMADLELCPRAAAEA	1,21	1,41	172
2-9, 2-6	ADGAGCFINKQMADLELCRREAGEA	1,19	1,54	173
1-16	ADGAGCFKMKQMVDSELCARQAAEA	1,14	1,17	174
1-5	ADGAGCFQNKQMADLELCPREAAEA	1,13	1,73	175
4-2, 4-3	ADGAECFINKQRADLELCPEAAEA	1,11	1,60	176
1-10	ADGAGCFINKQMADSELCPAAAAEA	1,10	1,08	177
Mutanty s podobnou afinitou pro PTmAb0005				
5-11	ADGAGCFINRQMAPPELCPREAAEA	1,09	1,97	178
1-8	ADGAGCFIEKQMAPMELCQARAAEA	1,08	1,32	179
5-10	ADGAGCFINKQMADWELCPREAAEA	1,05	1,83	180
5-2	ADGAGCFINNQMADLELCPREAAEA	1,04	1,24	181
1-1	ADGAGCFIEKQMAPMELCQRETAEA	1,04	1,29	182
2-3	ADGAGCFINKQMADMELCPREAAEA	1,03	1,31	183
2-8, 1-13, 4-11, 1-14	ADGAGCFINKQMADLELCPREAAEA	1,00	1,00	184



Tabulka 9 - pokračování

Klon		Hodnocení A	Hodnocení B	SEQ ID NO.
IgEC67-8	GCFINKQMADLELCPRE	1,00	1,00	12
1-6	ADGAGCFRNKQMADLELCPREAAEA	0,95	1,16	185
1-7	ADGAGCFINKQMADLELCPARAAEA	0,91	1,25	186
2-11,2-4,2-10,2-7	ADGAGCFINRQLADMELCSRGAAEA	0,79	1,39	187
4-4	ADGAECFINRQMADLELCGREAAEA	0,69	1,03	188
Mutanty s afinitou pro streptavidin				
6-9,5-1,6-2,6-8, 6-4	ADGAGCFISPQLADWKRCMREAAEA	1,53	1,19	189
6-12, 5-8	ADGAGCSIHTQMADWERCLREGAEA	0,93	0,67	190
6-10	ADGAGCSIHRQMADWERCLREGAEA	0,91	0,69	191



Údaje o uloženém mikroorganismu nebo jiném biologickém materiálu

	A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>11</u> . line <u>12-17</u>	
	B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet: <input type="checkbox"/>	
5	Name of depository institution <p style="text-align: center;">European Collection of Cell Cultures</p>	
	Address of depository institution (including postal code and country) <p style="text-align: center;">Vaccine Research and Production Laboratory Public Health Laboratory Service Centre For Applied Microbiology Research Porton Down, Salisbury Wiltshire SP4 OJG, GB</p>	
	Date of deposit <p style="text-align: center;">08 March 1999 (08/03/99)</p>	Accession Number <p style="text-align: center;">99030805</p>
10	C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet: <input type="checkbox"/>	
	In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample.	
15	D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
	(This section is currently blank)	
20	E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
	The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
	For receiving Office use only	For International Bureau use only
	<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the international Bureau on:
	Authorized officer	Authorized officer

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Peptid obsahující izolovaný povrchově exponovaný epitop domény C ϵ 2 IgE, nebo jeho mimotop.
2. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P1 (SEQ ID No. 1) nebo jeho mimotop.
- 10 3. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P2 (SEQ ID No. 2) nebo jeho mimotop.
4. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P3 (SEQ ID No. 3) nebo jeho mimotop.
- 15 5. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P4 (SEQ ID No. 4) nebo jeho mimotop.
6. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P5 (SEQ ID No. 5) nebo jeho mimotop.
- 20 7. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P6 (SEQ ID No. 6) nebo jeho mimotop.
- 25 8. Peptid podle nároku 1, kde povrchově exponovaným epitopem C ϵ 2 je P7 (SEQ ID No. 7) nebo jeho mimotop.

9. Mimotop podle některého z nároků 1 až 8, kde tímto mimotopem je peptid.
- 5 10. Peptid podle nároku 1, kde izolovaný epitop je odvozený ze struktury smyčky domény C ϵ 2 IgE.
11. Peptid podle nároku 10, kde struktura smyčky domény C ϵ 2 IgE je smyčka A-B nebo smyčka C-D.
- 10 12. Peptid podle nároku 2, kde mimotopem P1 je peptid obecného vzorce: h x d h h a n a n x y ;
kde h je zbytek hydrofobní aminokyseliny; d je zbytek aminokyseliny schopné poskytnout iontovou vazbu; a je zbytek kyselé aminokyseliny; n je zbytek iontově neutrální/nepolární aminokyseliny; a x je nějaká aminokyselina.
- 15 13. Peptid podle nároku 2, kde mimotopem P1 je peptid obecného vzorce:
20 Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃
kde X₁ je zvoleno z V, I, L, M, F nebo A; X₂ je zvoleno z D nebo E; a X₃ je zvoleno z L, I, V, M, A nebo F.
- 25 14. Peptid podle nároku 2, kde mimotop P1 je zvolen ze skupiny P15q (SEQ ID No. 11), PT1079 (SEQ ID No. 13), PT1079GS (SEQ ID No. 15), PT1078 (SEQ ID No. 16), PT15 (SEQ ID No. 8).

15. Peptid podle nároku 3, kde mimotopem P2 je P16 (SEQ ID No. 24).
- 5 16. Peptid podle nároku 4, kde mimotopem P3 je P17 (SEQ ID No. 26).
- 10 17. Imunogen pro léčení alergie, který obsahuje peptid nebo mimotop podle některého z nároků 1 až 16 a navíc obsahuje nosnou molekulu.
- 15 18. Imunogen podle nároku 17, kde nosná molekula je zvolená z proteinu D nebo jaderného antigenu hepatitidy B.
- 20 19. Imunogen podle nároku 17 nebo 18, kde imunogen je chemický konjugát peptidu nebo mimotopu podle některého z nároků 1 až 16, nebo kde imunogen je exprimován jako fúzní protein.
- 25 20. Imunogen podle některého z nároků 17 až 19, kde peptid nebo mimotop peptidu je přítomen uvnitř primární sekvence nosiče.
21. Vakcína pro léčení alergie, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje imunogen podle některého z nároků 17 až 20
a dále obsahuje adjuvans.
22. Ligand schopný rozpoznávat povrchově exponovaný epitop
domény Cε2 IgE, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e
tímto ligandem není PTmAb0005.

23. Ligand podle nároku 22, kterým je ligand PTmAb0011 uložený podle Budapeštské úmluvy u ECACC 8. března 1999 pod depozitním číslem No. 99030805.
- 5
24. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje ligand schopný rozpoznávat povrchově exponovaný epitop domény Cε2 IgE.
- 10
25. Farmaceutický prostředek podle nároku 24, vyznačující se tím, že ligand je schopný rozpoznávat smyčku C-D domény Cε2 IgE.
- 15
26. Farmaceutický prostředek podle nároku 25, vyznačující se tím, že ligand je monoklonální protilátka zvolená z PTmAb0005 nebo PTmAb0011.
27. Peptid podle některého z nároků 1 až 16 pro použití v lékařství.
- 20
28. Vakcína podle nároku 21 pro použití v lékařství.
29. Imunogen podle některého z nároků 17 až 20 pro použití v lékařství.
- 25
30. Použití peptidu podle některého z nároků 1 až 16 při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení nebo prevenci alergie.

31. Ligand schopný rozpoznávat povrchově exponovaný epitop domény C ϵ 2 IgE pro použití v lékařství.
- 5 32. Použití ligandu schopného rozpoznávat povrchově exponovaný epitop domény C ϵ 2 IgE při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení alergie.
33. Použití ligandu podle některého z nároků 31 nebo 32, kde ligandem je PTmAb0005 nebo PTmAb0011.
- 10 34. Použití PTmAb0005 nebo PTmAb0011 při identifikaci mimotopů P1.
35. Peptid rozpoznatelný PTmAb0005 nebo PTmAb0011.
- 15 36. Imunogen obsahující peptid podle nároku 35.
37. Použití peptidu podle některého z nároků 1 až 16 při diagnóze nebo při afinitní purifikaci cirkulujících protilátek anti-IgE z krve.
- 20 38. Způsob výroby vakcíny, vyznačující se tím, že zahrnuje výrobu imunogenu podle některého z nároků 17 až 20 a formulaci imunogenu s adjuvans.
- 25 39. Způsob léčení pacienta trpícího nebo vnímavého k alergii, který zahrnuje podávání peptidu podle některého z nároků 1 až 16 pacientovi.

40. Způsob léčení pacienta trpícího nebo vnímavého k alergii, který zahrnuje podávání vakcíny podle nároku 21 pacientovi.

5 41. Způsob léčení pacienta trpícího nebo vnímavého k alergii, který zahrnuje podávání farmaceutického prostředku podle některého z nároků 24 až 26 pacientovi.

10

Zastupuje:

Pro Gly Thr Ile Asn Ile
1 5

5 <210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10 <400> 7
Phe Thr Pro Pro Thr
1 5

15 <210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20 <400> 8
Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Leu
1 5 10

25 <210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30 <400> 9
Leu Leu Asp Val Asp Met Val Gln Gly Asp Glu Leu Cys
1 5 10

35 <210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40 <400> 10
Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
1 5 10

45 <210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50 <400> 11
Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
1 5 10

55 <210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60 <400> 12
Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
1 5 10 15

65 <210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 13
Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
1 5 10 15

<210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 5
 <400> 14
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Gly Asp Lys
 10 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 15
 <400> 15
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 20 Ser Gly Gly Pro
 20
 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 25
 <400> 16
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 30 Ala Glu Gly Asp Lys
 20
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 35
 <400> 17
 40 Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 1 5
 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 45
 <400> 18
 50 Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu
 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 55
 <400> 19
 60 Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp
 65 <210> 20
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 20
 5 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Val Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Gly

10 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 21
 Asn Cys Gln Asp Leu Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 Met

20 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 22
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu

30 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 23
 Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
 1 5 10

40 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 24
 Cys Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala
 1 5 10

50 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 25
 Thr Thr Gln Glu Gly Glu
 1 5

60 <210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

65 <400> 26
 Cys Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> Human and artificial sequences

 <400> 27
 Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp
 1 5 10 15
 10 Ser Asn Pro Arg Gly Val
 20

 <210> 28
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 28
 Gly Gly His Phe Pro Pro
 20 1 5

 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Human and artificial sequences

 <400> 29
 Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys
 30 1 5 10

 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> Human and artificial sequences

 <400> 30
 Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys
 40 1 5 10

 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Human and artificial sequences

 <400> 31
 Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 50 1 5 10 15

 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 55 <213> Human and artificial sequences

 <400> 32
 His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
 60 1 5 10 15
 Gly

 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 65 <213> Human and artificial sequences

 <400> 33
 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys

1
Ser

5

10

15

5 <210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10 <400> 40
Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

15 <210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20 <400> 41
Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
1 5 10

25 <210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30 <400> 42
Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

35 <210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40 <400> 43
Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
1 5 10

45 <210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50 <400> 44
Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
1 5 10

55 <210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60 <400> 45
Trp Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Glu

65 <210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 46

10101

Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Asp

5
<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10
<400> 47
Gly Cys Ala Glu Pro Lys Cys Trp Gln Ala Leu His Gln Lys Leu Lys
1 5 10 15
Pro

15
<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20
<400> 48
Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
1 5 10 15
Asp

25
<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30
<400> 49
Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
1 5 10 15
Asn

35
<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40
<400> 50
Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
1 5 10 15
Phe

45
<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50
<400> 51
His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
1 5 10 15
Asp

55
<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60
<400> 52

10101

Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
1 5 10 15
Cys

5

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10

<400> 53
Asn Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Glu

15

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20

<400> 54
Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
1 5 10 15
Gly

25

<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30

<400> 55
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Thr Ala Ala

35

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40

<400> 56
Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

45

<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50

<400> 57
Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

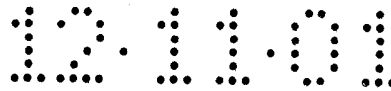
55

<210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60

<400> 58

65



Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Trp Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Ala Ala Ala

5

<210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10

<400> 59
Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

15

<210> 60
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20

<400> 60
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Glu Ala Glu

25

<210> 61
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30

<400> 61
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Gly Ala Ala

35

<210> 62
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40

<400> 62
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Glu Ala Ala

45

<210> 63
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50

<400> 63
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Gly Ala Ala

55

<210> 64
<211> 19
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60

<400> 64

65

0101

Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Glu Ala Ala

5

<210> 65
<211> 20
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10

<400> 65
Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
1 5 10 15
Ala Glu Gly Asp
20

15

<210> 66
<211> 21
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20

<400> 66
Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
1 5 10 15
Ala Ala Glu Gly Asp
20

25

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30

<400> 67
Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
1 5 10 15
Asn

35

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40

<400> 68
Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
1 5 10 15
Phe

45

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50

<400> 69
Glu Cys Leu Lys Ile Glu Gln Gln Cys Ala Asp Ile Val Glu Ile Pro
1 5 10 15
Arg

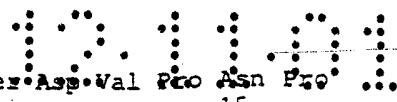
55

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60

<400> 70

65



Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10

<400> 71

Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
 1 5 10 15

Asp

15

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20

<400> 72

Glu Cys Leu Val Tyr Gly Gln Met Ala Asp Cys Ala Ala Gly Gly Trp
 1 5 10 15

Pro

25

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30

<400> 73

Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
 1 5 10 15

Cys

35

<210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40

<400> 74

His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
 1 5 10 15

Asp

45

<210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50

<400> 75

Cys Cys Val Thr Asp Val Gln Thr Thr Asn Met Asp Val Pro Ala Gly
 1 5 10 15

Gln

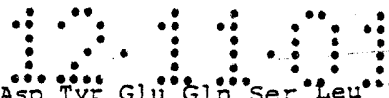
55

<210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60

<400> 76

65



Thr Cys Cys Val Thr Asp Ile Pro Pro Pro Asp Tyr Glu Gln Ser Leu
1 5 10 15
Gly

5
<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10
<400> 77
Cys Cys Glu Ser Asp Ile Pro Leu Asn Glu Leu His Ala Leu Ala Asp
1 5 10 15
Pro

15
<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20
<400> 78
Cys Cys Lys Ser Asp Ile Pro Ser Pro Val Thr Gln Phe Asn Thr Met
1 5 10 15
Lys

25
<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30
<400> 79
Cys Cys Gln Ser Asp Val Pro His Gln Pro Gly Ile Asn Asp Leu His
1 5 10 15
Val

35
<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

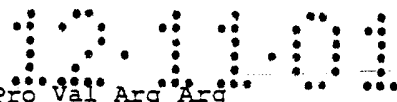
40
<400> 80
Cys Cys Met Ser Asp Thr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Pro Val Pro Asp
1 5 10 15
Ser

45
<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50
<400> 81
Cys Cys Met Ser Asp Ser Pro Ala Asp Pro Asn Arg Gly Leu Pro Ile
1 5 10 15
Trp

55
<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60
<400> 82



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

5 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 83
 Cys Cys Ile Thr Asp Val Pro Gln Gly Val Met Tyr Lys Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Asp

15 <210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 84
 Glu Cys Lys Val Asp Gly Gln Leu Ser Asp Ser Pro Leu Leu Arg Asn
 1 5 10 15
 Asn

25 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 85
 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Asp Pro Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg

35 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 86
 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Tyr Thr Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg

45 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50 <400> 87
 Cys Cys Val Asp Asp Thr Pro Asn Ser Gly Leu Ala Met Arg Val Ser
 1 5 10 15
 Lys

55 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 88
 Cys Cys Glu Val Asp Asp Phe Pro Thr His His Pro Gly Trp Thr Leu
 1 5 10 15

Arg

- 5 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 10 <400> 89
 Ser Cys Asn Leu Asn His Gln Ser Cys Asp Ile Pro Pro Val Lys Gln
 1 5 10 15
 Ile
- 15 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 20 <400> 90
 Cys Cys Met Ala Asp Gln Glu Leu Asp Leu Gly His Asn Ala Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala
- 25 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 30 <400> 91
 Cys Cys Val Met Asp Leu Glu Leu Ala Ser Gly Phe
 1 5 10
- 35 <210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 40 <400> 92
 Cys Cys Val Met Asp Ile Glu Val Arg Gly Ser Ala
 1 5 10
- 45 <210> 93
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 50 <400> 93
 Cys Cys Gln Arg Asp Val Glu Leu Val Phe Gly Ser
 1 5 10
- 55 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
- 60 <400> 94
 Cys Cys Arg Ala Asp Phe Glu Val Gly Asn Gly Gly
 1 5 10
- 65 <210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 95
 Cys Cys Val Ser Asp Glu Pro Ala Gly Val Arg Asp
 1 5 10

5 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 96
 Gly Ala Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
 1 5 10

15 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 97
 Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln Leu Ser Asp Leu Pro
 1 5 10

25 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 98
 Val Ala Gly Gly Gln Val Val Asp Arg Glu Leu Lys
 1 5 10

35 <210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 99
 Lys Ala Gly Glu Gln Ala Met Asp Met Glu Leu Arg
 1 5 10

45 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50 <400> 100
 Arg Gly Arg Asn Gln Ile Met Asp Leu Glu Ile
 1 5 10

55 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 101
 Gln Ile Asp Arg Gln Ile Thr Asp Thr Leu Leu
 1 5 10

65 <210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 102
 Arg Glu Gln Gln Ile Ser Asp Val Pro Arg Val
 1 5 10

5 <210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 103
 Cys Gln Ala Met Asp Ala Glu Ile Leu Asn Gln Val
 1 5 10

10 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 104
 Gly Gln Met Met Asp Thr Glu Leu Leu Asn Arg
 1 5 10

20 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 105
 Ser Met Glu Gly Gln Val Arg Asp Ile Gln Val
 1 5 10

30 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 106
 Tyr Gln Gln Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ala Glu
 1 5 10

40 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 107
 Ser Met Gly Gln Lys Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10

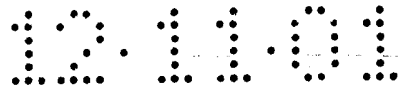
50 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 108
 Ser Met Gly Gln Glu Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 109
 Ala Glu Asn Asp Gln Met Val Asp Trp Glu Ile
 1 5 10

65 <210> 110
 <211> 11



<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 110
5 Gly Gly Trp Gln Glu Ser Asp Ile Pro Gly Arg
1 5 10

<210> 111
<211> 11
10 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 111
15 Gly Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 112
<211> 12
20 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 112
25 His Cys Cys Arg Ile Asp Arg Glu Val Ser Gly Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 12
30 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 113
35 Cys Ala Pro Gly Met Gly Cys Trp Glu Ser Val Lys
1 5 10

<210> 114
<211> 17
40 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 114
45 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Glu

<210> 115
<211> 17
50 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 115
55 Ser Cys Pro Ala Phe Pro Arg Glu Gly Asp Leu Cys Ala Pro Pro Thr
1 5 10 15
Val

<210> 116
<211> 17
60 <212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 116
65 Phe Cys Pro Glu Pro Ile Cys Ser Pro Pro Leu Ser Arg Met Thr Leu
1 5 10 15
Ser

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Human and artificial sequences

 <400> 117
 Glu Cys Asn Gln Asn Leu Ser Gly Ser Leu Arg His Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 10 Cys

 <210> 118
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 118
 Arg Cys Asp Gln Gln Leu Pro Arg Asp Ser Tyr Thr Phe Cys Met Met
 1 5 10 15
 20 Ser

 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 119
 His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
 1 5 10 15
 30 Gly

 <210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 120
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 40 Pro

 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 121
 Asn Cys Gln Asp Gln Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 50 Ile

 <210> 122
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 122
 His Cys Glu Glu Pro Glu Tyr Ser Pro Ala Thr Arg Val Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 65 Arg

5 <210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 123
 Asp Cys Asp Trp Ile Asn Pro Pro Asp Pro Pro His Phe Trp Lys Asp
 1 5 10 15
 10 Thr

 <210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 124
 Ala Cys Phe Ser Arg Asn Gly Gln Val Thr Asp Val Pro His Ser Cys
 1 5 10 15
 20 Tyr

 <210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 125
 Lys Cys Pro Thr Tyr Pro Lys Pro Asn Asp Arg Cys Leu Trp Pro Val
 1 5 10 15
 25 Pro

 <210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 126
 Tyr Cys Pro Lys Tyr Pro Leu Glu Gly Asp Cys Leu Leu Asp Asn Asp
 1 5 10 15
 30 Tyr

 <210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 127
 Arg Cys Glu Glu Trp Leu Cys Ile Pro Pro Ala Pro Ala Phe Ala Pro
 1 5 10 15
 35 Pro

 <210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 128
 Thr Cys Gly Gln Ser Glu Leu Arg Cys Ala Ser Leu Glu Thr His His
 1 5 10 15
 40 Val

 <210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 129
 ...
 1 5 10 15
 45 ...

 <210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 130
 ...
 1 5 10 15
 50 ...

 <210> 131
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 131
 ...
 1 5 10 15
 55 ...

 <210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 132
 ...
 1 5 10 15
 60 ...

 <210> 133
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 133
 ...
 1 5 10 15
 65 ...

5 <210> 129
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 129
 Asn Cys Asn Asp Asn Pro Met Leu Asp Cys Met Pro Ala Trp Ser Ser
 1 5 10 15
 10 <210> 130
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 15 <400> 130
 Asp Ala Leu Asp Glu Arg Ala Trp Arg Ala Arg Ala
 1 5 10
 20 <210> 131
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 25 <400> 131
 Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
 1 5 10
 30 <210> 132
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 35 <400> 132
 Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
 1 5 10
 40 <210> 133
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 45 <400> 133
 Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
 1 5 10
 50 <210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 55 <400> 134
 Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
 1 5 10
 60 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 65 <400> 135
 Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
 1 5 10
 <210> 136
 <211> 12

10101

<400> 143
Thr Cys Leu Val Asp Arg Gln Glu Ser Asp Val Cys
1 5 10

5 <210> 144
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10 <400> 144
Asp Cys Val Val Asp Gly Asp Arg Leu Val Cys Leu
1 5 10

15 <210> 145
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20 <400> 145
Arg Cys Glu Gln Gly Ala Leu Arg Cys Val Gly Glu
1 5 10

25 <210> 146
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30 <400> 146
Val Cys Pro Pro Gly Trp Lys Asn Leu Gly Cys Asn
1 5 10

35 <210> 147
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40 <400> 147
Met Cys Gln Gly Trp Glu Ile Val Ser Glu Cys Trp
1 5 10

45 <210> 148
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50 <400> 148
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

55 <210> 149
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60 <400> 149
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Thr Ala Ala Glu Ala
20 25

65 <210> 150
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

5 <400> 150
 Ala Asp Gly Ala Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20 25

10 <210> 151
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 151
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20 25

20 <210> 152
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 152
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

30 <210> 153
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 153
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Met Cys Pro Arg Asp Asp Ala Glu Ala
 20 25

40 <210> 154
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 154
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Glu Glu Ala
 20 25

50 <210> 155
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 155
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

60 <210> 156
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

5 <400> 156
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Asn Gln Leu Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

10 <210> 157
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 157
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 Met Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

20 <210> 158
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 158
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

30 <210> 159
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 159
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20 25

40 <210> 160
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 160
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

50 <210> 161
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 161
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Met Gln Met Ala Asp Gln Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

60 <210> 162
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 162
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ser Asp Phe Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20 25

 <210> 163
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 163
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Thr Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 164
 <211> 25
 20 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 164
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Pro Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 165
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 165
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Pro Arg Gly Gly Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 166
 <211> 25
 40 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 166
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 45 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 167
 <211> 25
 50 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 167
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 55 Leu Cys Pro Ser Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 168
 <211> 25
 60 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <210> 168
 <211> 25
 65 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 168
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 169
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 169
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Pro Arg Glu Pro Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 170
 <211> 25
 20 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 170
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Lys Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Trp Glu Ala
 20 25

 <210> 171
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 171
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Ala Arg Glu Val Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 172
 <211> 25
 40 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 172
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asp Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 173
 <211> 25
 55 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 173
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 60 Leu Cys Arg Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20 25

 <210> 174
 <211> 25
 65 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

5 <400> 174
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Lys Asn Lys Gln Met Val Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Ala Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

10 <210> 175
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 175
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Gln Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

20 <210> 176
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 176
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Arg Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Gly Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

30 <210> 177
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 177
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Ala Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

40 <210> 178
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 178
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

50 <210> 179
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 179
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Gln Ala Arg Ala Ala Glu Ala
 20 25

60 <210> 180
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

65 <210> 180
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 180
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 181
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 181
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 182
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 182
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Gln Arg Glu Thr Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 183
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 183
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 184
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 184
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 45 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 185
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 185
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Arg Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 186
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

5 <400> 186
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Ala Arg Ala Ala Glu Ala
 20 25

10 <210> 187
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

15 <400> 187
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Leu Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Ser Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

20 <210> 188
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

25 <400> 188
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

30 <210> 189
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

35 <400> 189
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Ser Pro Gln Leu Ala Asp Trp Lys
 1 5 10 15
 Arg Cys Met Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

40 <210> 190
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

45 <400> 190
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Thr Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

50 <210> 191
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 191
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Arg Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

60 <210> 192
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10.11.01

<400> 192
Cys Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Lys Pro Pro Thr Ile Gln Cys
1 5 10 15

5

<210> 193
<211> 20
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10

<400> 193
Cys Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile
1 5 10 15
Gln Leu Leu Cys
20

15

12.11.01

1/32

PV 2001-3082

Obr. 1

Povrchová expozice aminokyselin IgE stanovená použitím modelu

8408

Padlana a Daviese 1986.

Zbytek Plocha povrchu

		Průměr/5	>50	>80	
ARG_1	270.322723				
ASP_2	139.374542				
PHE_3	64.298927	117.361489	1	1	
THR_4	46.170193	64.494911	1	0	
PRO_5	66.64106	39.0209532	0	0	
PRO_6	5.989833	29.3644934	0	0	
THR_7	12.004753	21.4426604	0	0	
VAL_8	16.016628	8.6200336	0	0	
LYS_9	6.561028	10.2708042	0	0	
ILE_10	2.527926	9.5044914	0	0	
LEU_11	14.243686	13.375776	0	0	
GLN_12	8.173189	19.2992118	0	0	
SER_13	35.373051	29.1890154	0	0	
SER_14	36.178207	32.6313328	0	0	
CYS_15	51.976944	39.0100884	0	0	
ASP_16	31.455273	45.6135238	0	0	
GLY_17	40.066967	50.0871888	1	0	
GLY_18	68.390228	46.9957994	0	0	
GLY_19	58.546532	59.6253914	1	0	P5
HIS_20	36.519997	63.4215874	1	0	P5
PHE_21	94.603233	68.1998406	1	0	P5
PRO_22	59.047947	65.8523506	1	0	P5
PRO_23	92.281494	62.0824146	1	0	P5
THR_24	46.809082	50.1635586	1	0	P5
ILE_25	17.670317	38.6392736	0	0	
GLN_26	35.008953	21.6261078	0	0	
LEU_27	1.426522	12.5259452	0	0	
LEU_28	7.215665	10.5518628	0	0	
CYS_29	1.308269	3.5500722	0	0	
LEU_30	7.799905	4.8164434	0	0	
VAL_31	0	4.0672202	0	0	
SER_32	7.758378	3.8055664	0	0	
GLY_33	3.469549	9.5755666	0	0	
TYR_34	0	20.7786542	0	0	
THR_35	36.649906	28.9967052	0	0	
PRO_36	56.015438	50.2230378	1	0	P6
GLY_37	48.848633	57.590085	1	0	P6
THR_38	109.601212	73.50021	1	0	P6
ILE_39	36.835236	70.1846368	1	0	P6
ASN_40	116.200531	73.2560022	1	0	P6
ILE_41	39.437572	51.7217026	1	0	P6
THR_42	64.20546	49.2710734	0	0	
TRP_43	1.929714	35.2314448	0	0	
LEU_44	24.58209	49.7665942	0	0	
GLU_45	46.002388	50.9119188	1	0	
ASP_46	112.113319	74.3084848	1	0	
GLY_47	69.932083	91.0816862	1	1	
GLN_48	118.912544	85.9516244	1	1	P1
VAL_49	108.448097	91.6210626	1	1	

MET_50	20.352079	89.4386316	1	1
ASP_51	140.46051	77.095856	1	0
VAL_52	59.019928	65.664336	1	0
ASP_53	57.198666	72.8180802	1	0
LEU_54	51.290497	45.9930286	0	0
SER_55	56.1208	49.3437382	0	0
THR_56	6.335252	47.723164	0	0
ALA_57	75.773476	43.8934994	0	0
SER_58	49.095795	51.656078	1	0
THR_59	32.142174	59.4056414	1	0
THR_60	94.933693	72.6291262	1	0
GLN_61	45.083069	73.3905916	1	0 P2
GLU_62	141.8909	99.7907822	1	1
GLY_63	52.903122	90.626043	1	1
GLU_64	164.143127	83.4067496	1	1
LEU_65	49.109997	57.2201384	1	0
ALA_66	8.986602	47.5504318	0	0
SER_67	10.957844	17.0083172	0	0
THR_68	4.554589	7.3021006	0	0
GLN_69	11.432554	7.2534874	0	0
SER_70	0.578914	5.0619186	0	0
GLU_71	8.743536	8.9567614	0	0
LEU_72	0	10.8120506	0	0
THR_73	24.028803	23.2812776	0	0
LEU_74	20.709	37.264713	0	0
SER_75	62.925049	69.375269	1	0
GLN_76	78.660713	79.6644746	1	0
LYS_77	160.55278	78.1594206	1	0
HIS_78	75.474831	77.9196576	1	0
TRP_79	13.18373	76.6092892	1	0 P3
LEU_80	61.726234	70.354977	1	0
SER_81	72.108871	73.244224	1	0
ASP_82	129.281219	81.9731098	1	1
ARG_83	89.921066	69.9061278	1	0
THR_84	56.828159	58.6259284	1	0
TYR_85	1.391324	32.7696846	0	0
THR_86	15.707874	23.8688072	0	0
CYS_87	0	12.5031754	0	0
GLN_88	45.416679	24.6922706	0	0
VAL_89	0	22.314276	0	0
THR_90	62.3368	48.4045714	0	0
TYR_91	3.817901	45.5941352	0	0
GLN_92	130.451477	47.9061642	0	0
GLY_93	31.364498	62.7324992	1	0
HIS_94	11.560145	91.805003	1	1
THR_95	136.468475	85.5324108	1	1
PHE_96	149.18042	87.190961	1	1
GLU_97	99.088516	90.6138422	1	1
ASP_98	39.657249	75.8683994	1	0
SER_99	28.674551	62.1985202	1	0
THR_100	62.741261	62.538042	1	0
LYS_101	80.831024	61.892236	1	0
LYS_102	100.786125	65.3434144	1	0 P4
CYS_103	36.428219	66.2248162	1	0
ALA_104	45.930443	63.0386422	1	0
ASP_105	67.14827	64.611715	1	0

12.11.01

3/32

SER_106

64.900154

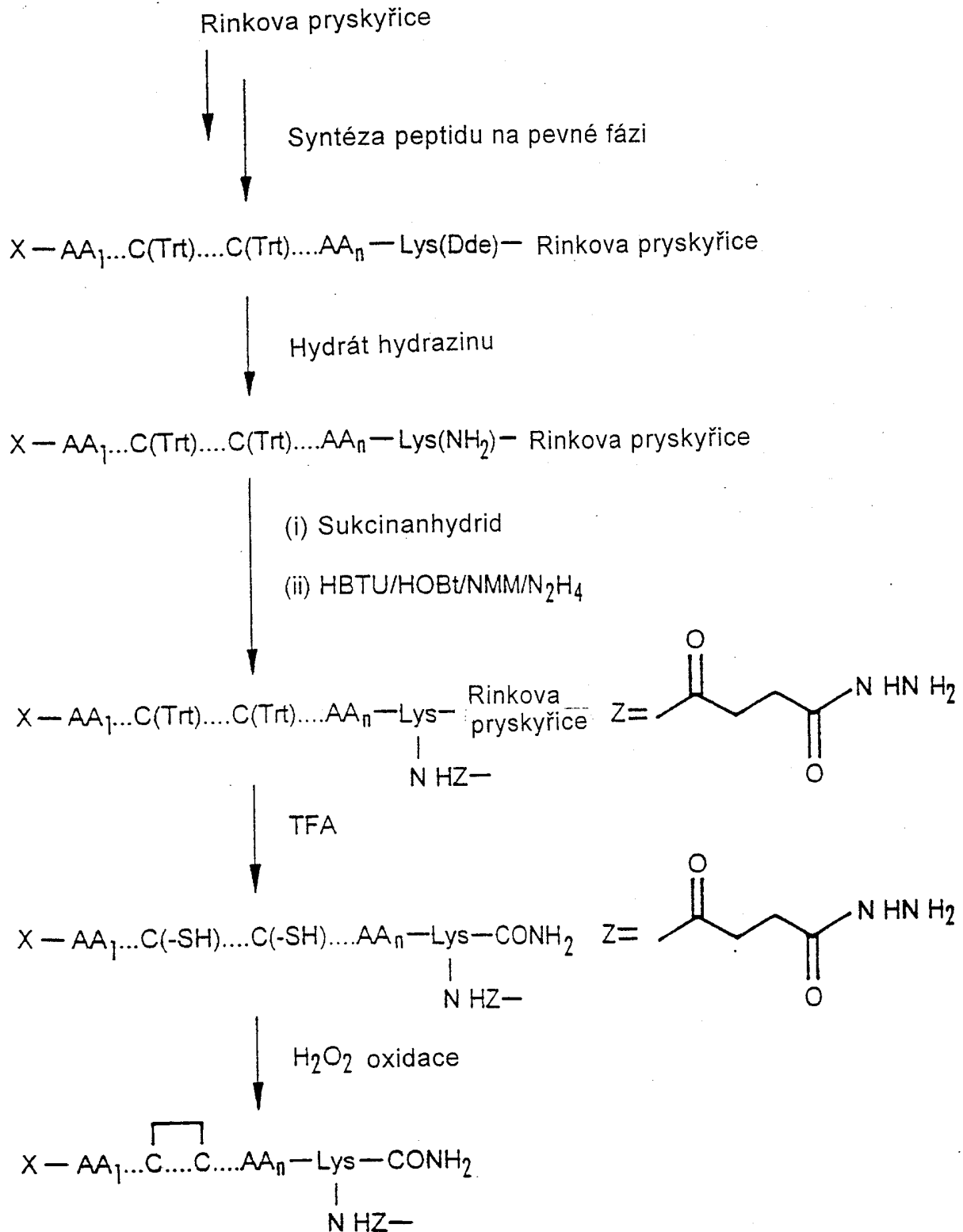
71.4769134

1

0

Obr. 2

Reakční schéma 1, syntéza peptidu na pevné fázi

Schéma 1

Obr. 3

Příprava modifikovaného nosiče

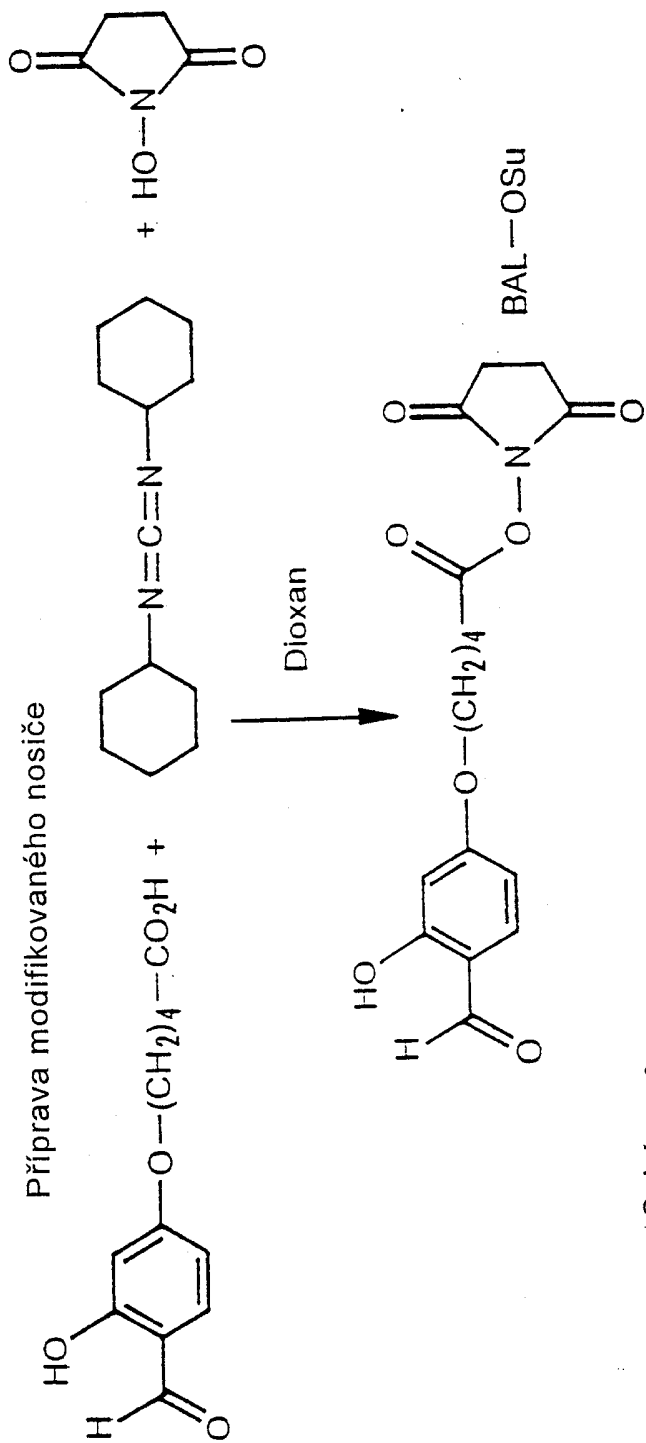
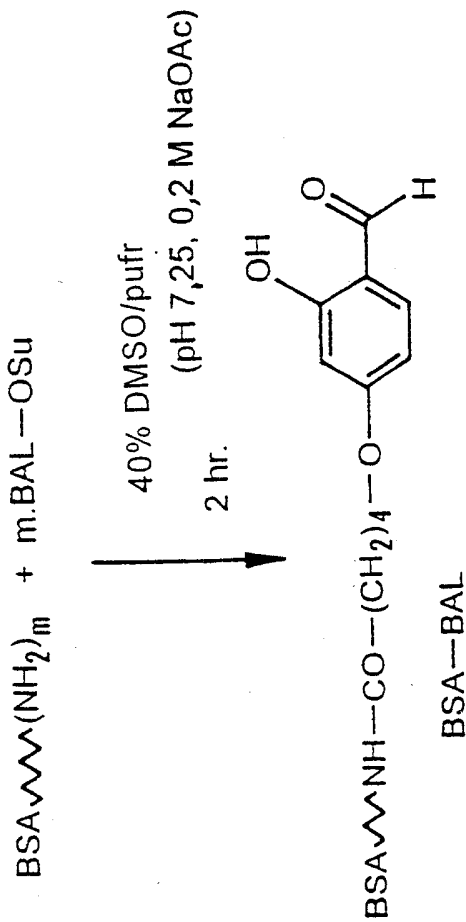


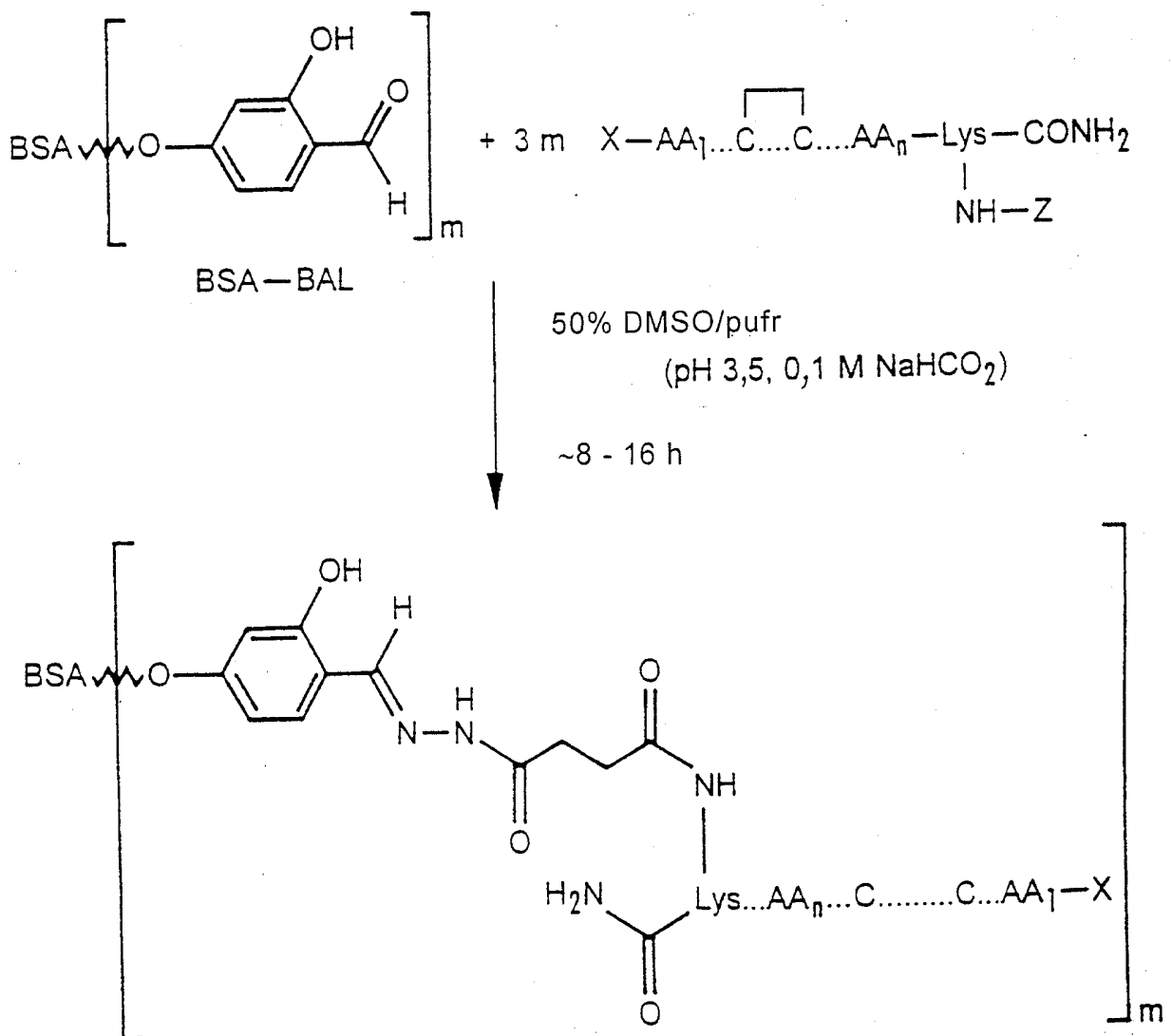
Schéma 3



Obr. 4

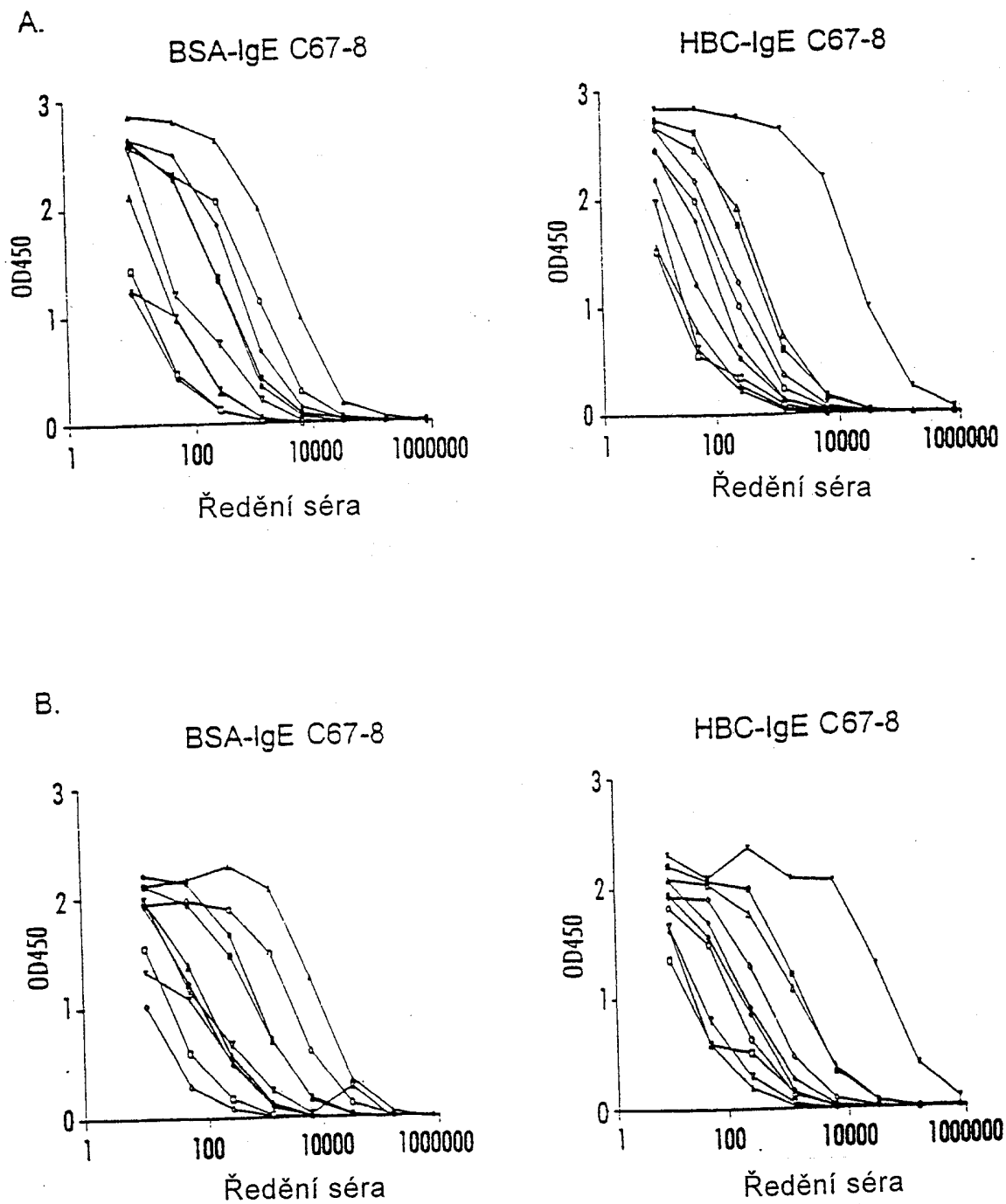
Reakční schéma 4, konjugace peptid/nosič

Schéma 4



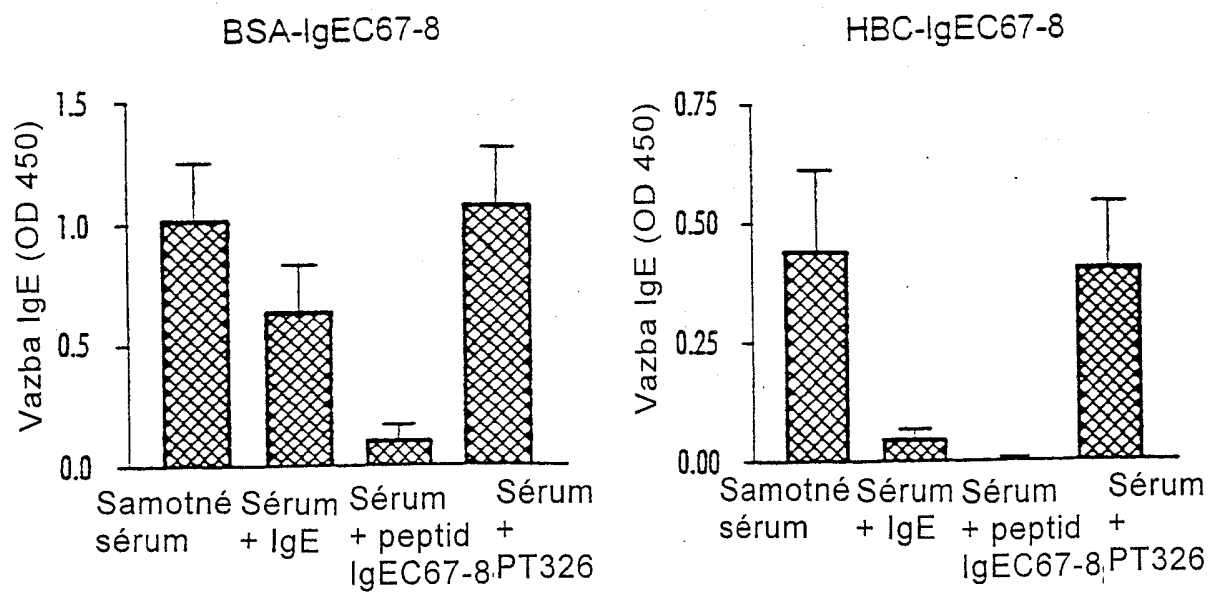
Obr. 5

Data anti-IgE C67-8



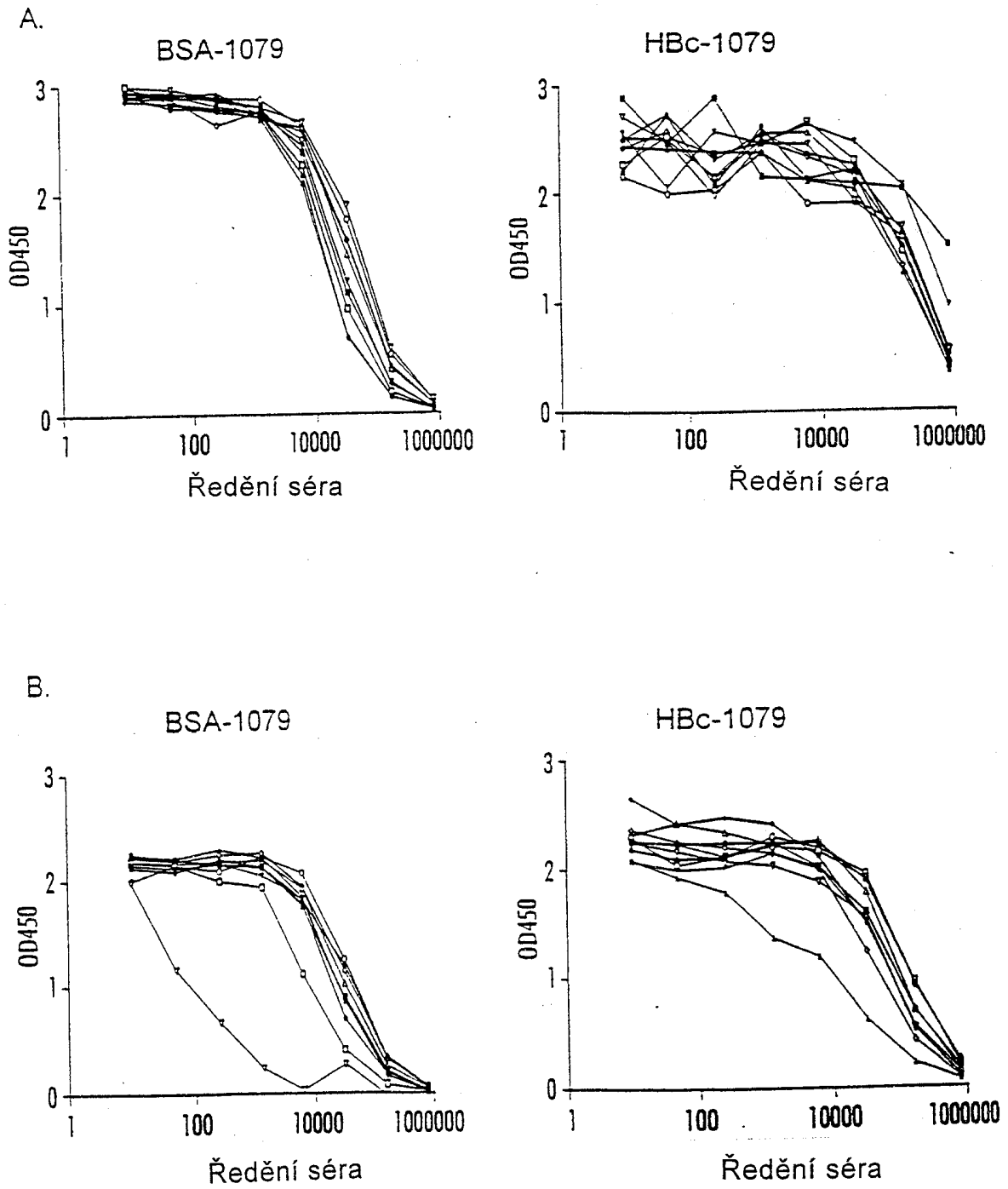
Obr. 6

Kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem IgE C67-8



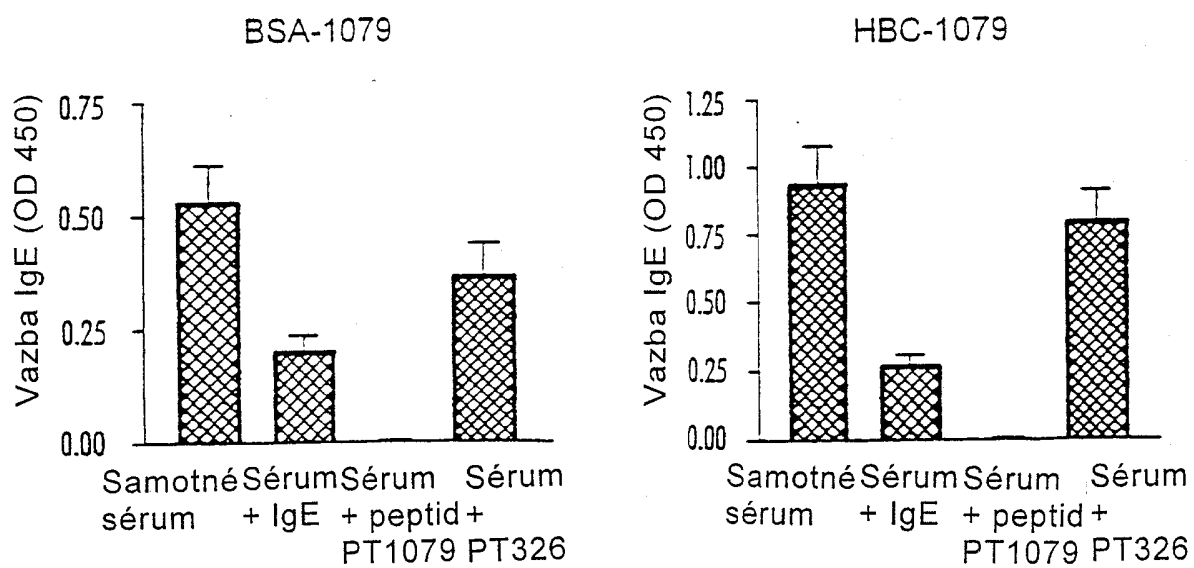
Obr. 7

Údaje anti-IgE pro PT1079



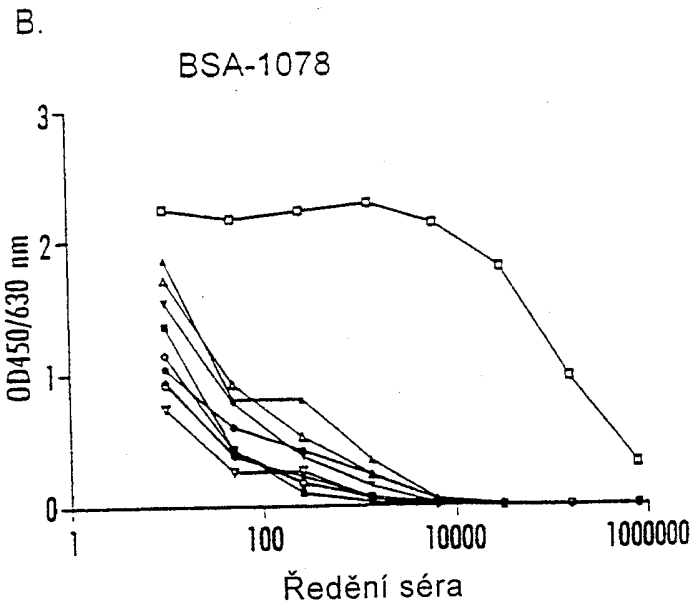
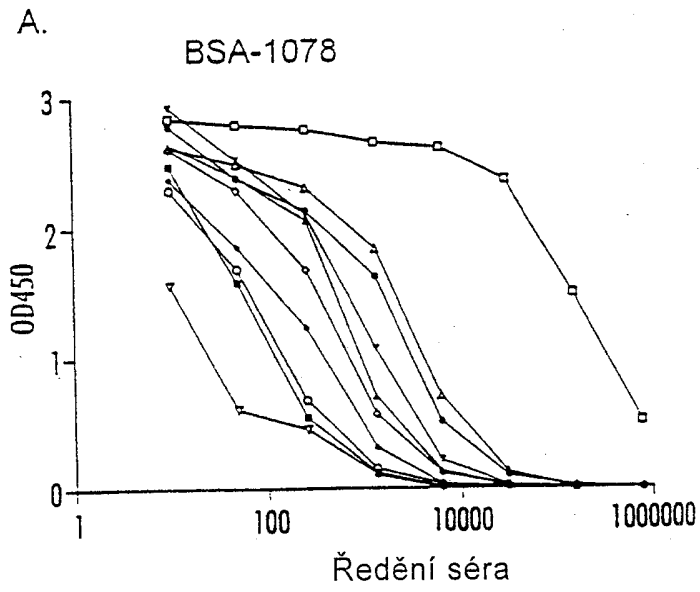
Obr. 8

Kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1079



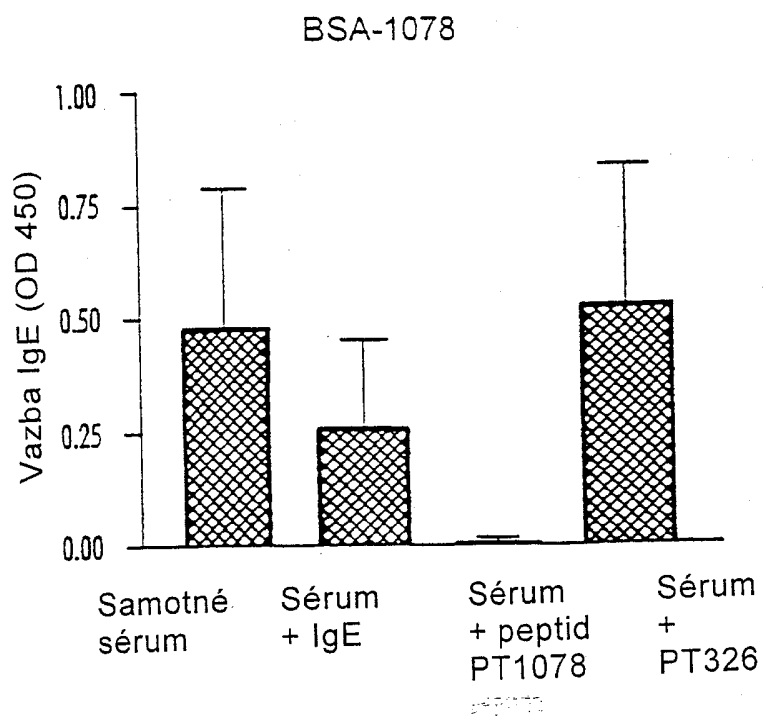
sazba

Obr. 9
Údaje anti-IgE pro PT1078

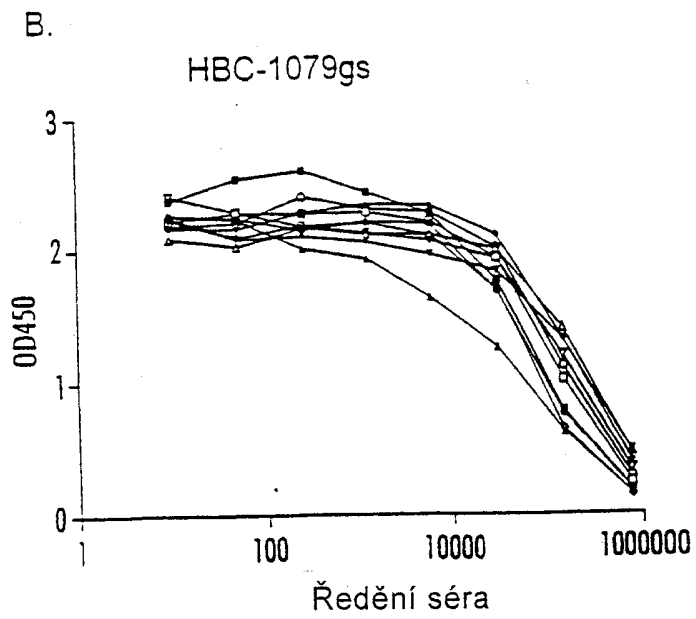
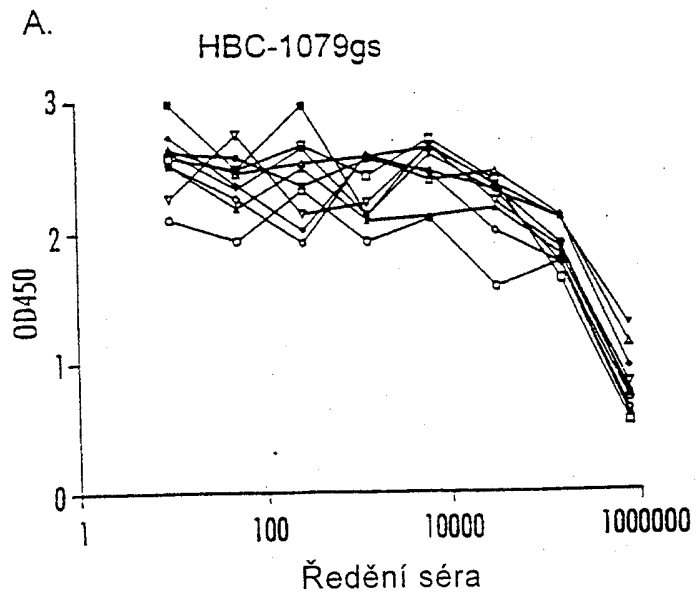


Obr. 10

Kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1078

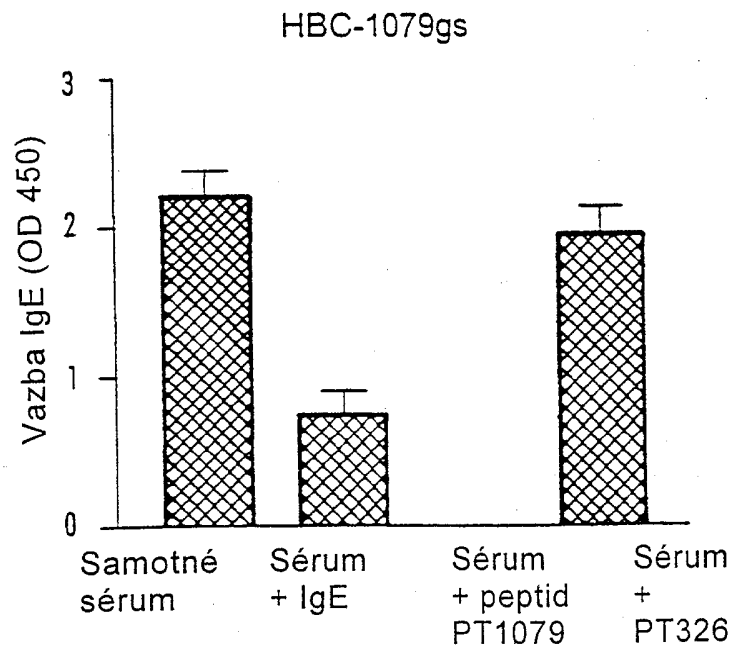


Obr. 11
Údaje anti-IgE pro PT1079gs



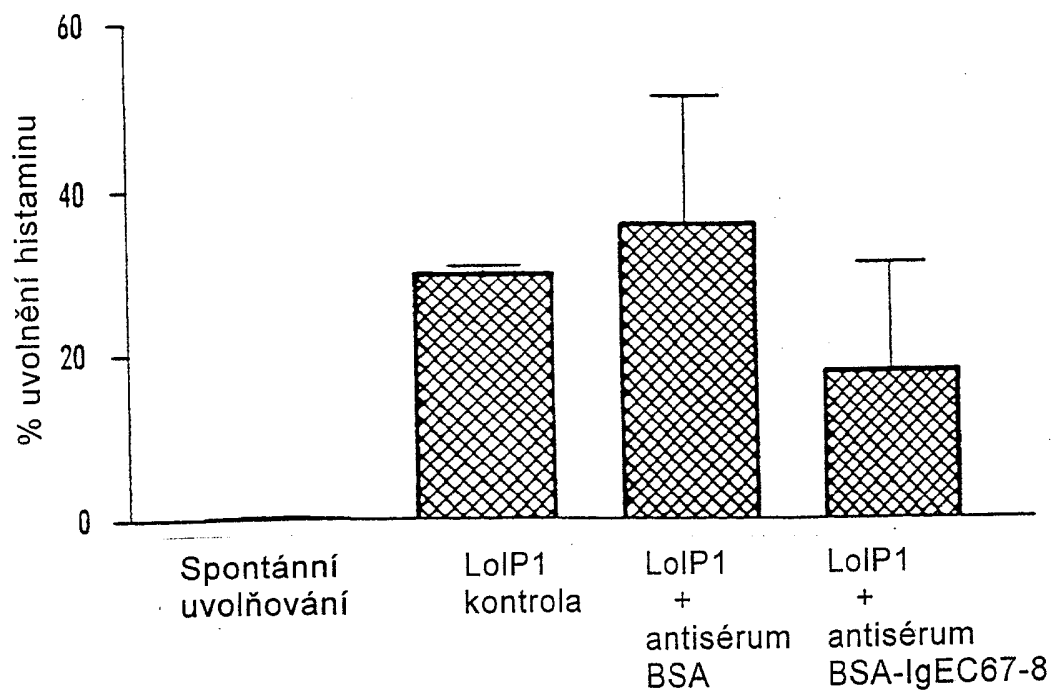
Obr. 12

Kompetitivní test s rozpustným IgE a peptidem PT1079



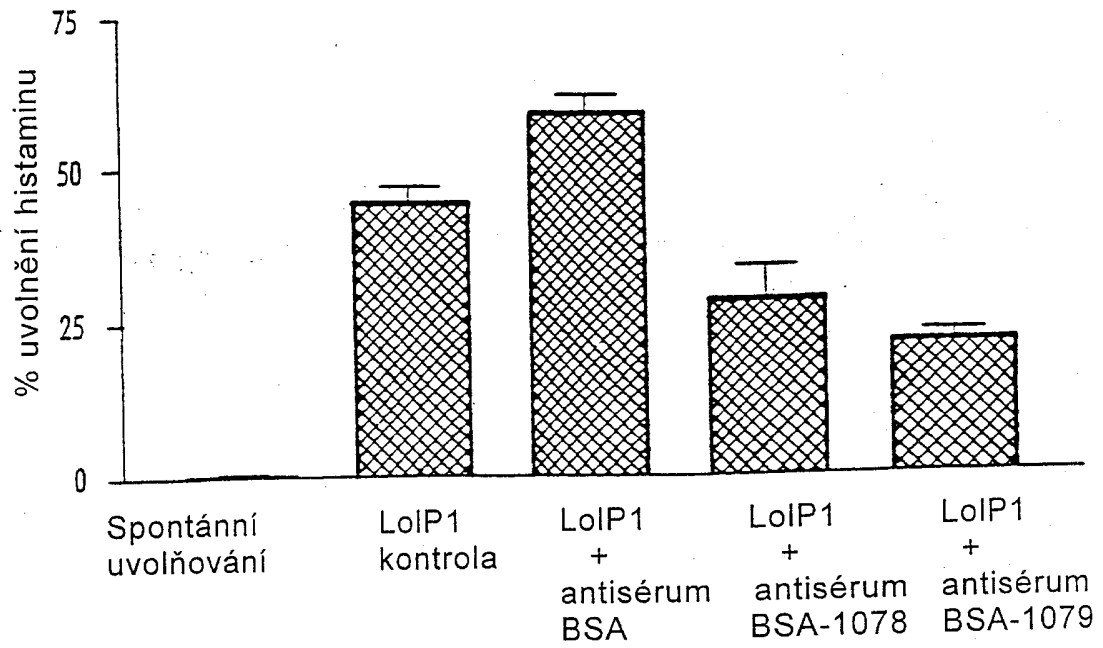
Obr. 13

Inhibiční aktivita myšního antiséra indukovaného BSA-C67-8



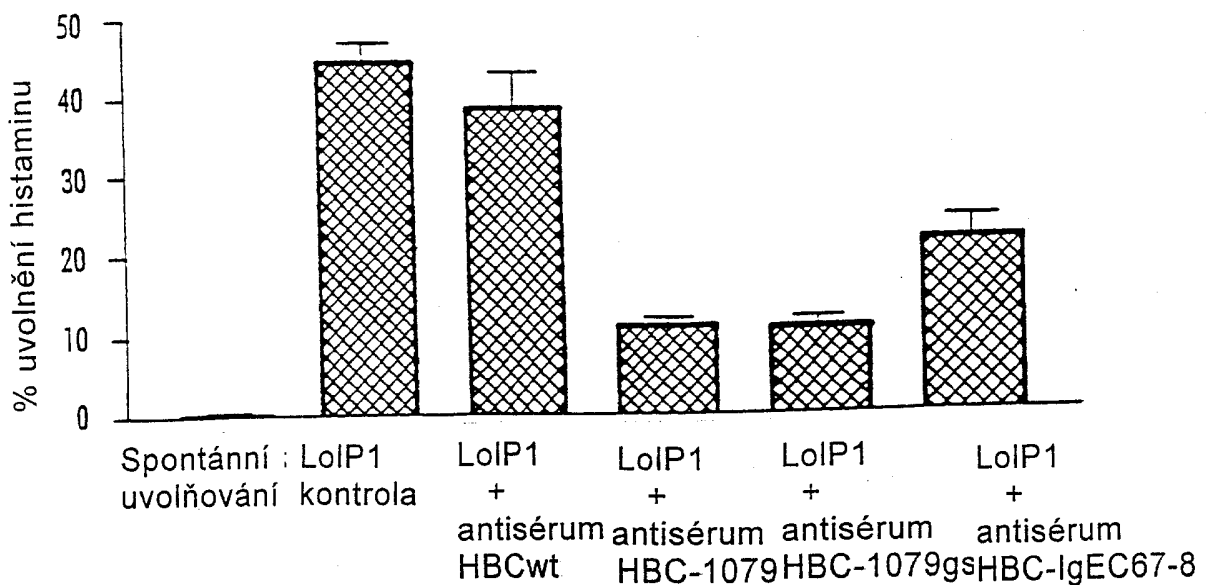
Obr. 14

Inhibiční aktivita myšního antiséra indukovaného BSA-1078 a BSA-1079



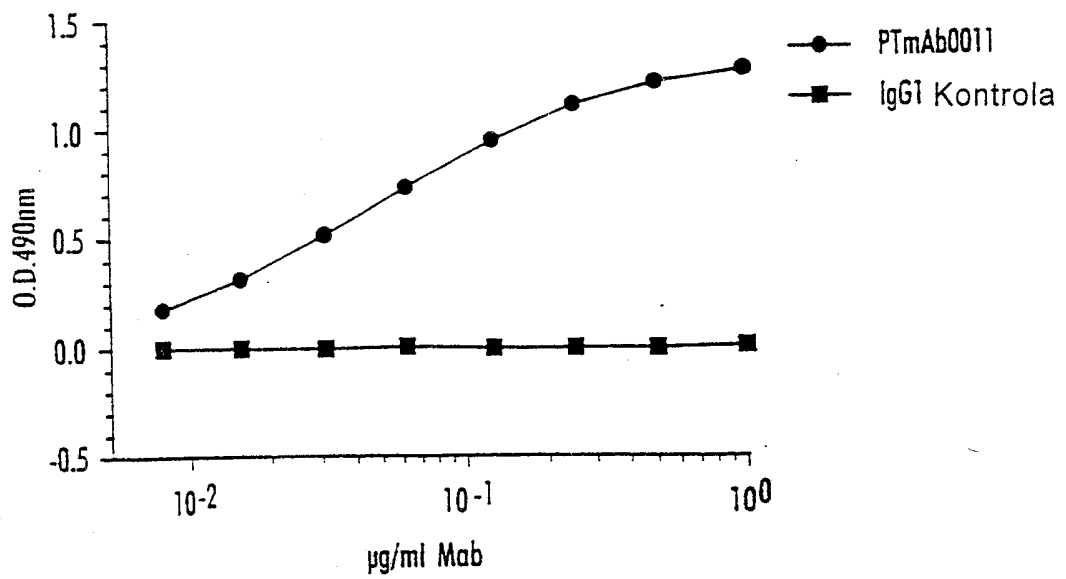
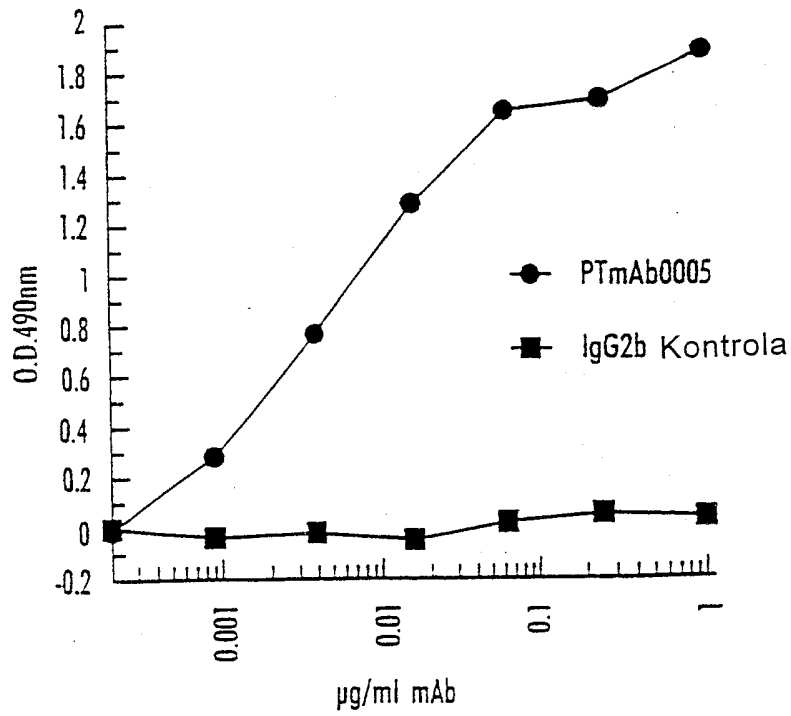
Obr. 15

Inhibiční aktivita myšního antiséra indukovaného HBC-C67-8, HBC-1078, HBC-1079 a HBC-1079gs

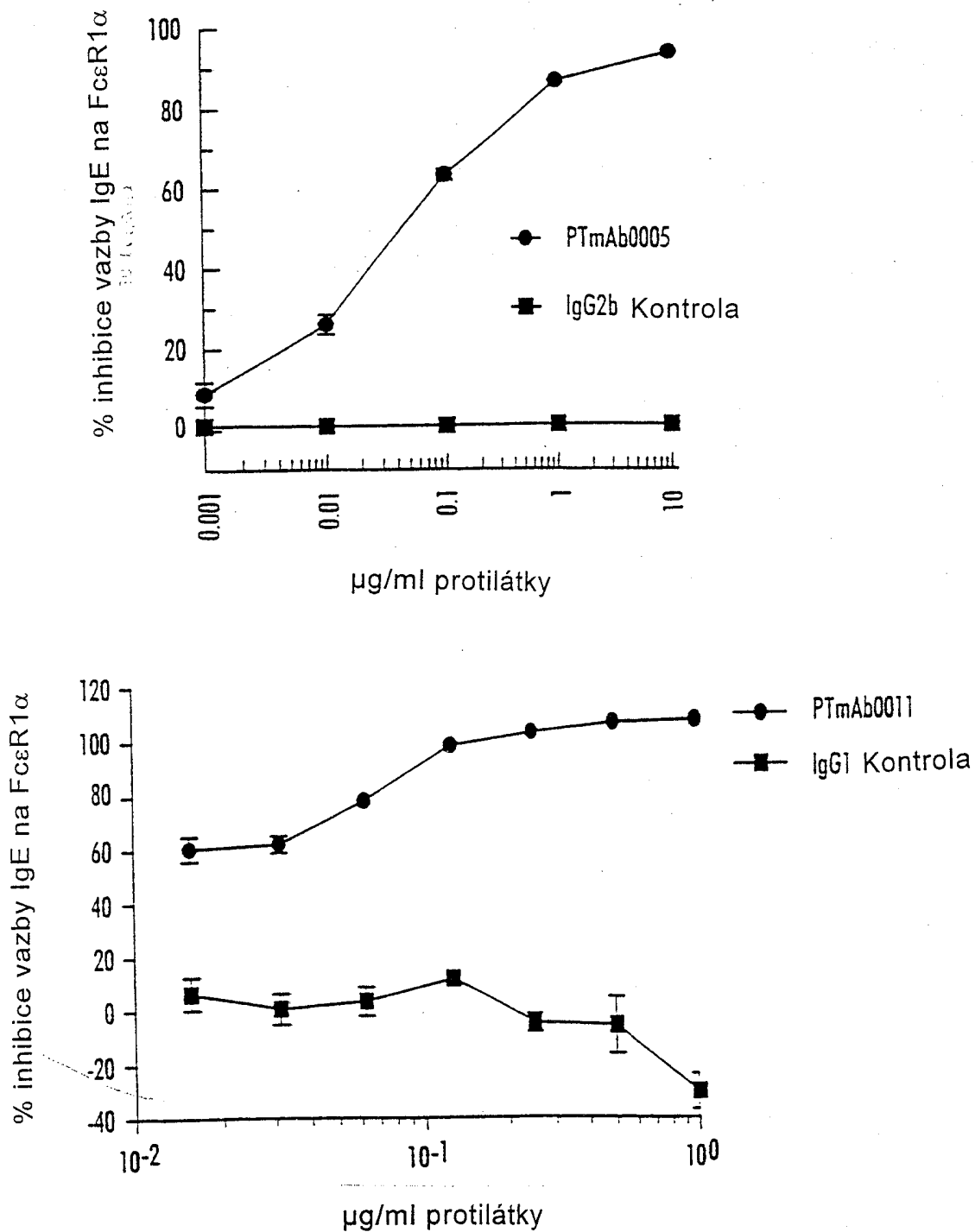


Obr. 16

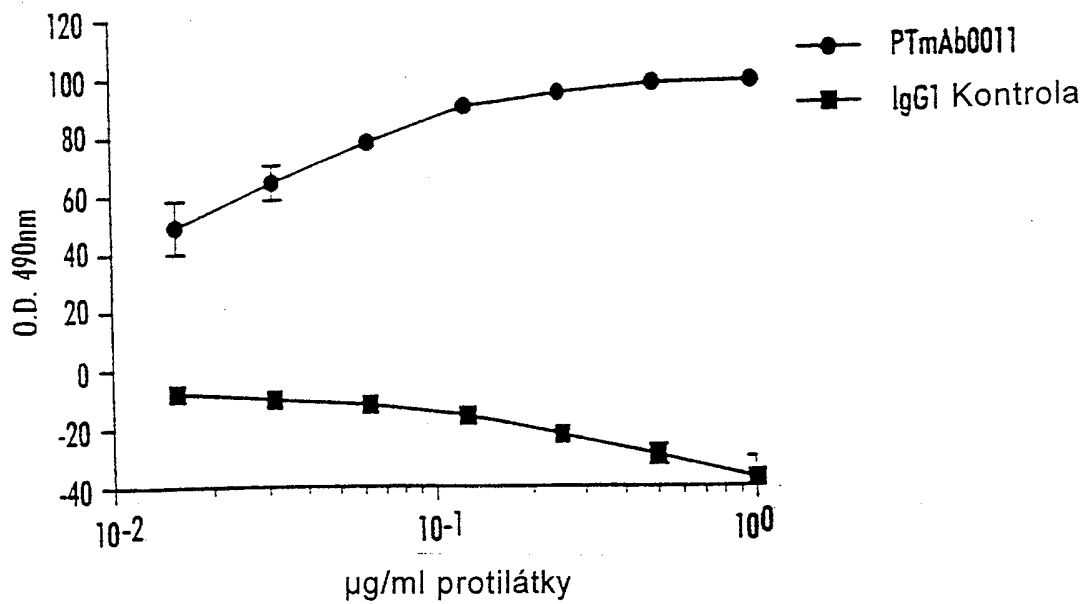
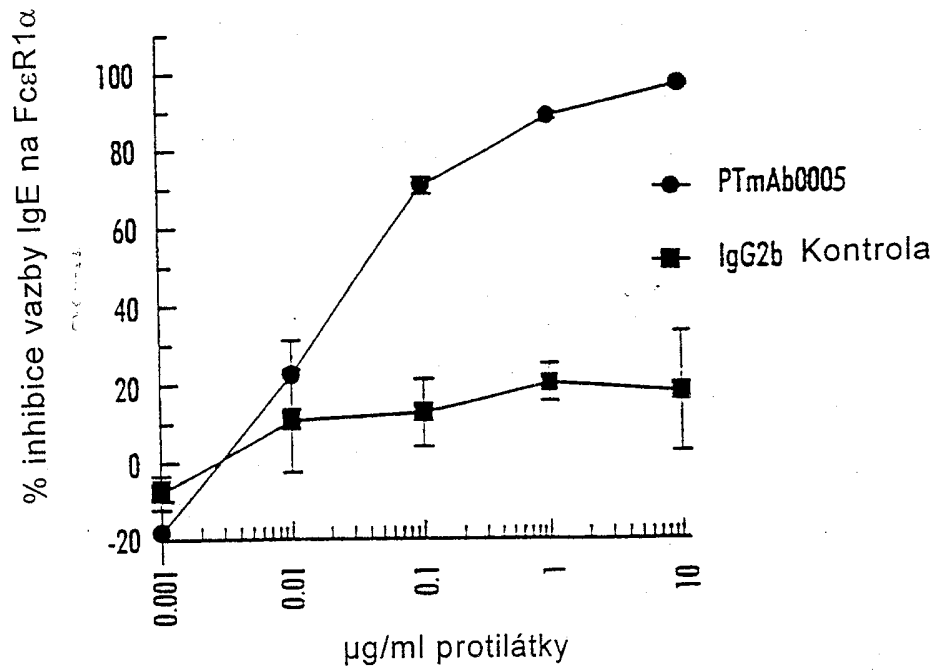
Ukazuje vazbu závislou na koncentrácii protilátky PTmAb0005 a PTmAb0011 na IgE



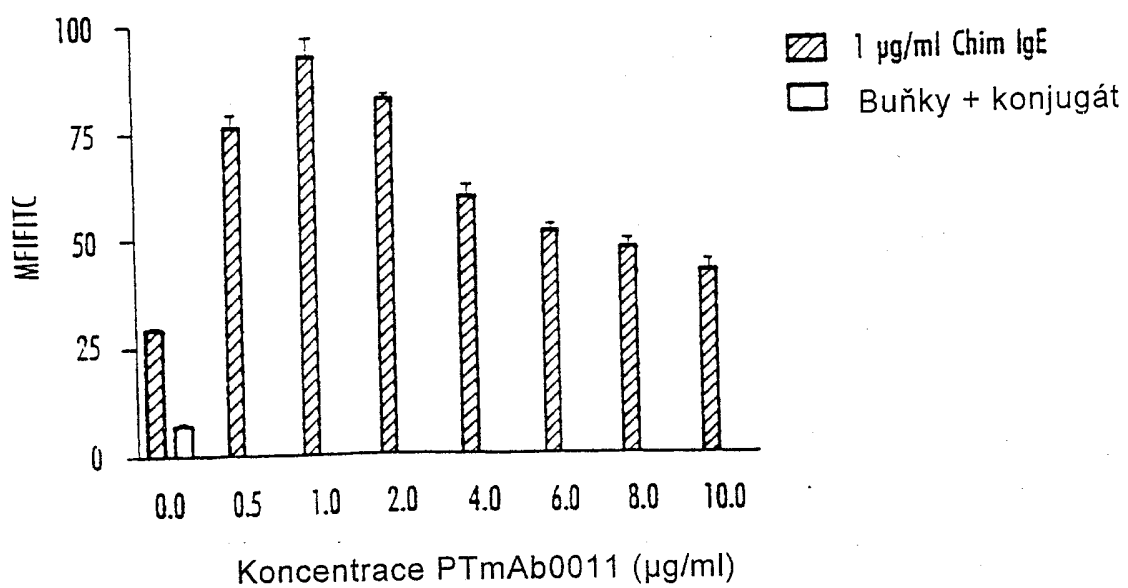
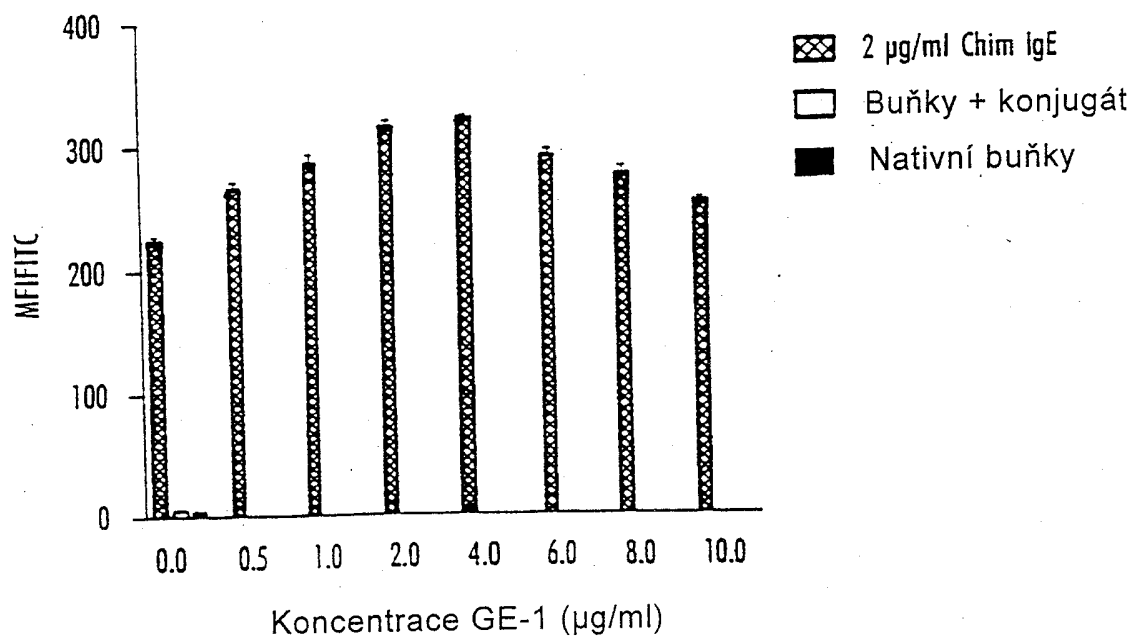
Obr. 17 ukazuje inhibiči závislou na koncentrácii vazby IgE na konštrukt FcεR1α/IgG, protilátkou PTmAb0005 a PTmAb0011 ve srovnání s kontrolou.



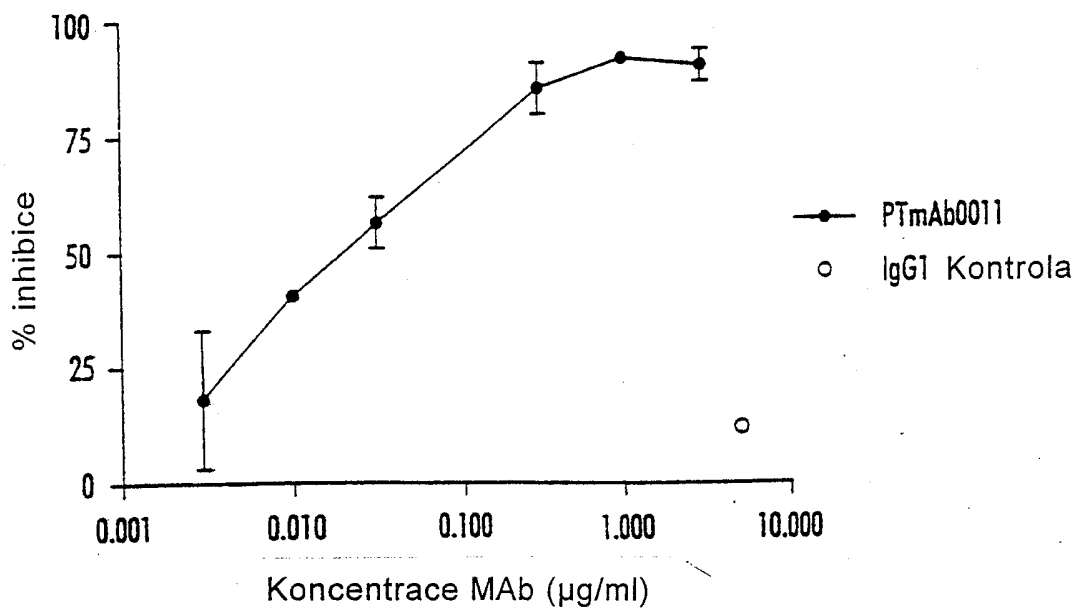
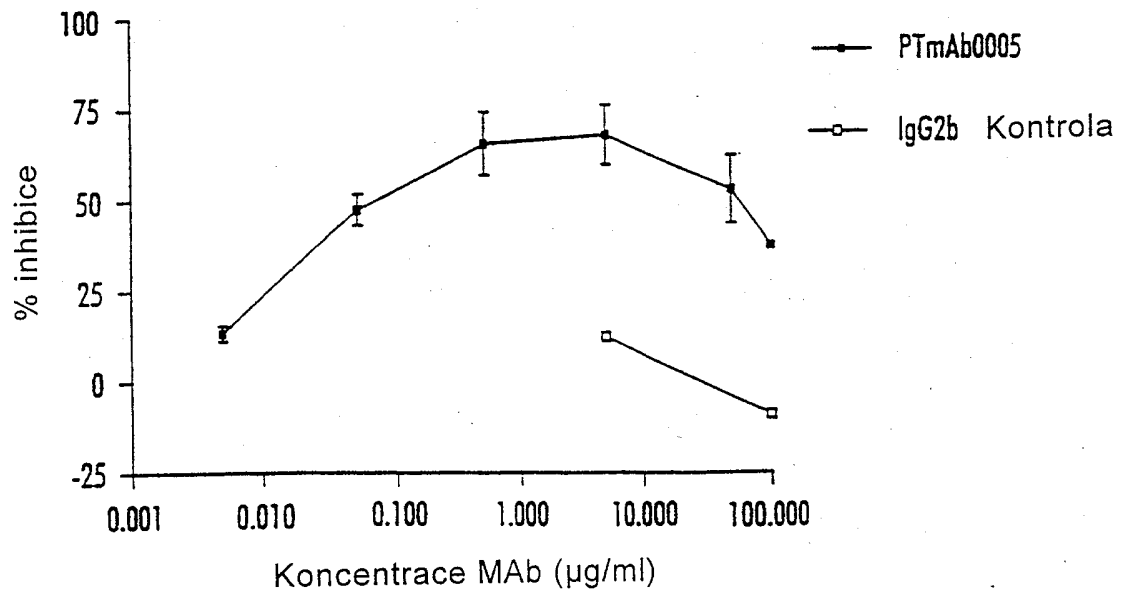
Obr. 18 ukazuje koncentračně závislou inhibici vazby IgE na ektodoménu FcεR1α navázanou přímo na plastové destičky, protilátkou PTmAb0005 ve srovnání s kontrolou.



Obr. 19 ukazuje vazbu IgE na FcεRII (CD23), protilátkou PTmAb0005 (GE-1) a PTmAb0011.

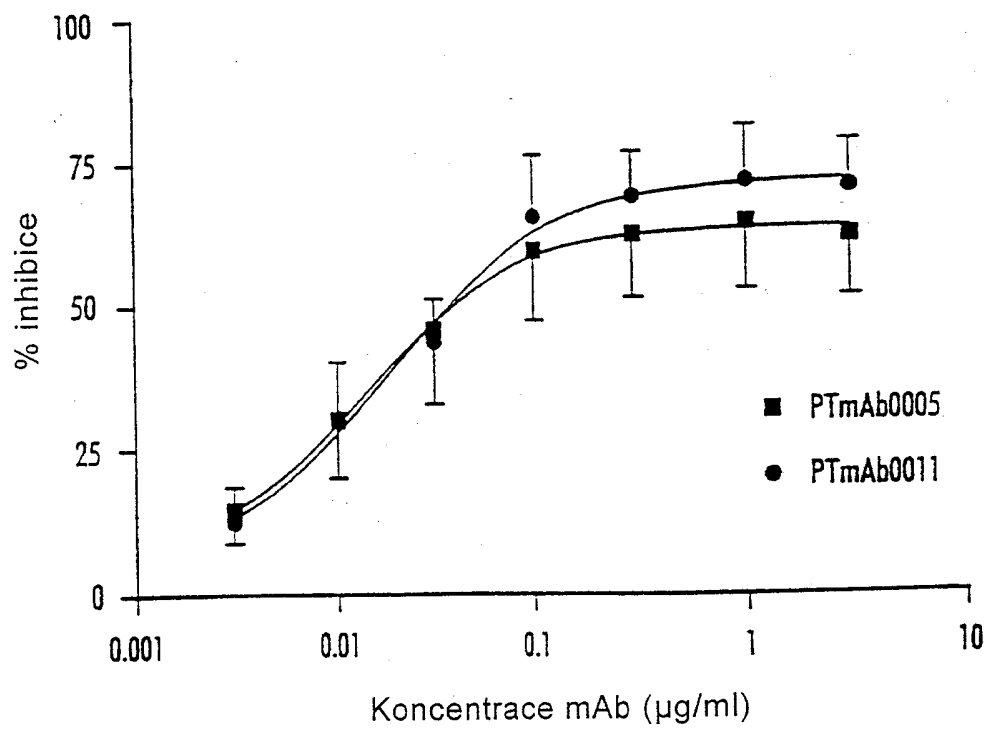


Obr. 20 ukazuje koncentračně závislé blokování uvolňování histaminu z krevních basofilů alergického člověka protilátkou PTmAb0005 a PTmAb0011 ve srovnání s kontrolou



Obr. 21

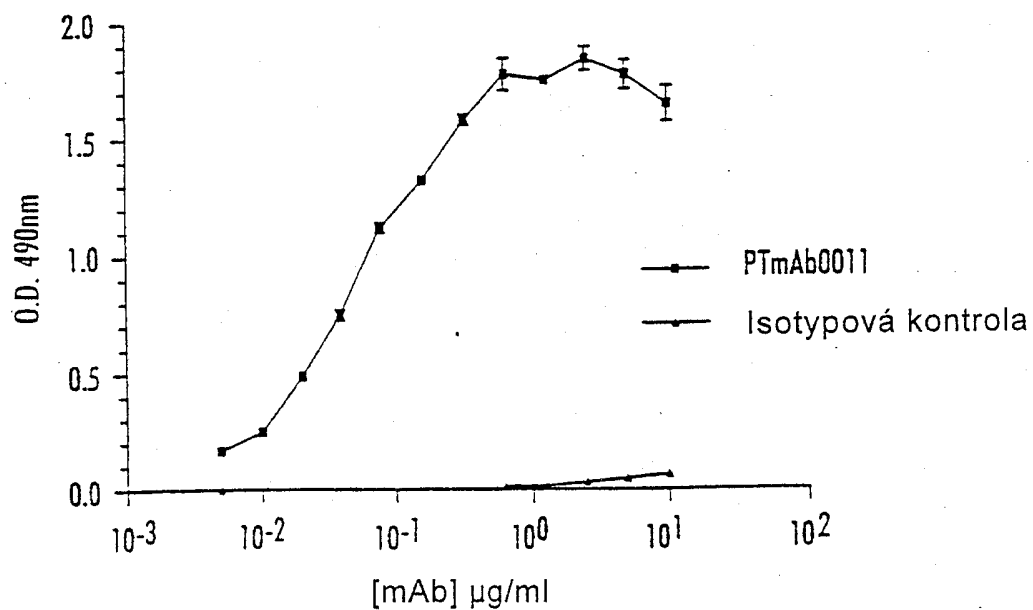
Inhibice uvolňování histaminu spouštěného LoIP1 v basofilech alergického člověka.



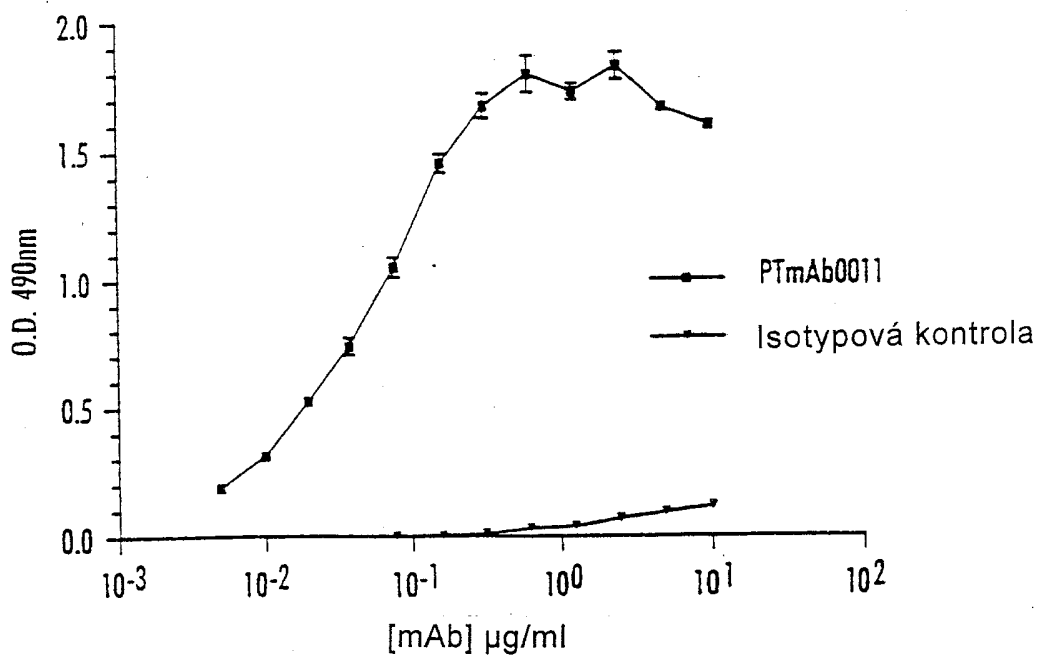
Obr. 22

Vazba PTmAb0011 na různé IgE

(A) Chimerní IgE

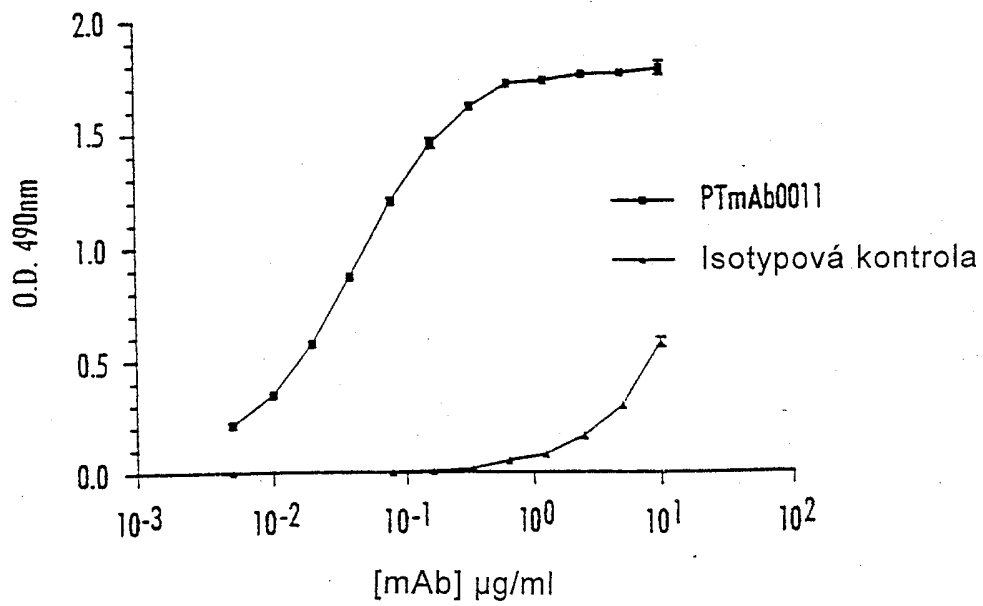


(B) Vazba na myelomový IgE

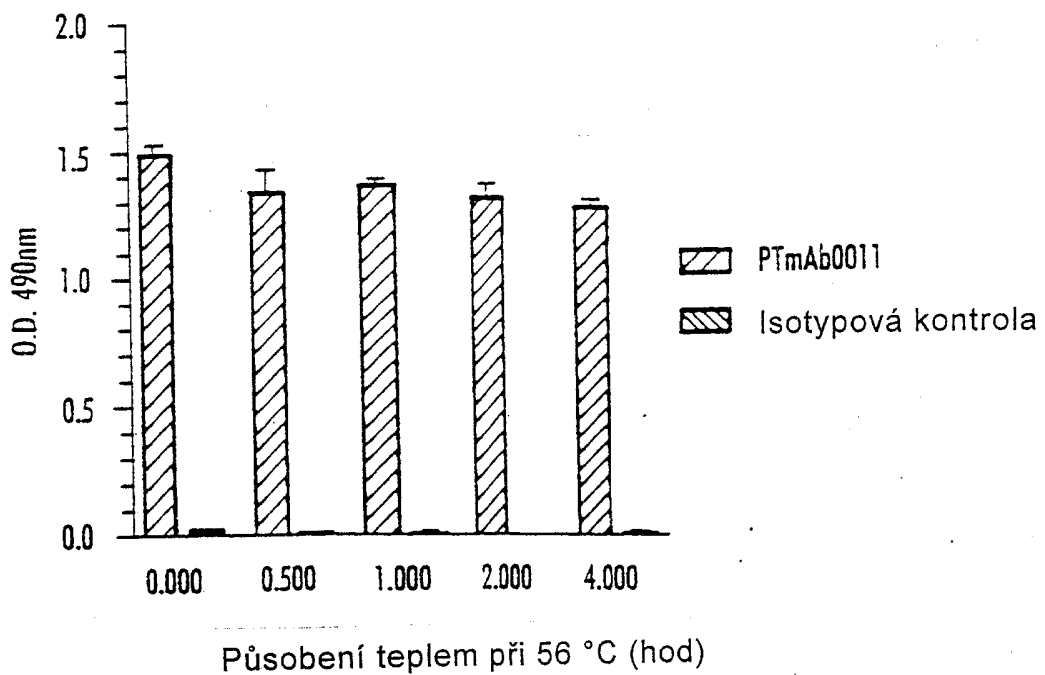


Obr 22

(C) Vazba na IgE orientovaný antigenem

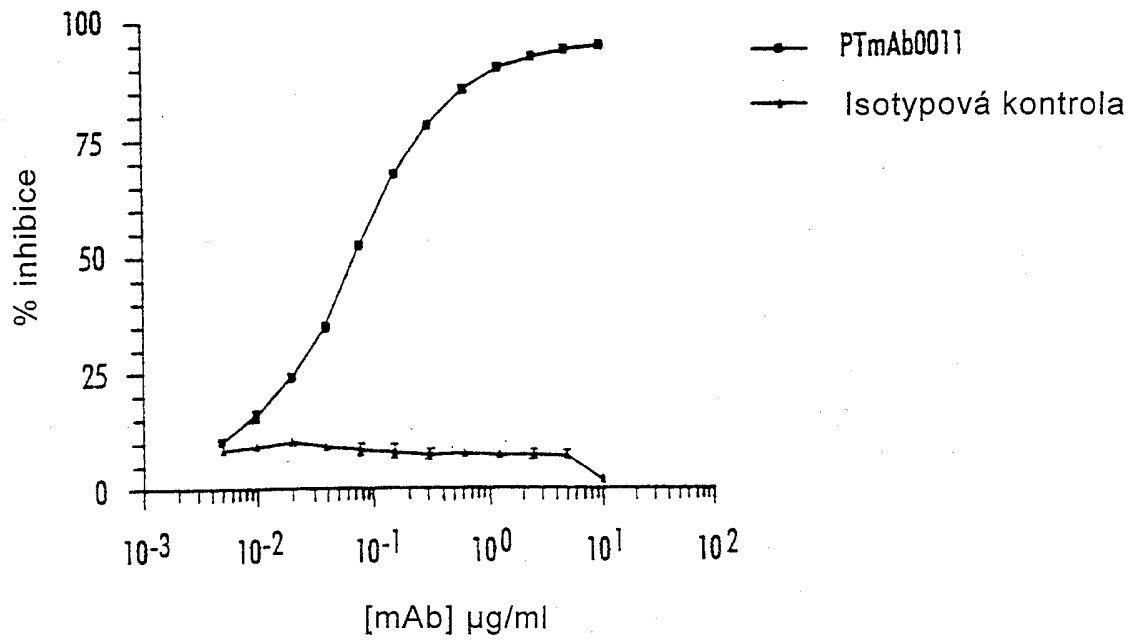


(D) Vazba na IgE denaturovaný teplem



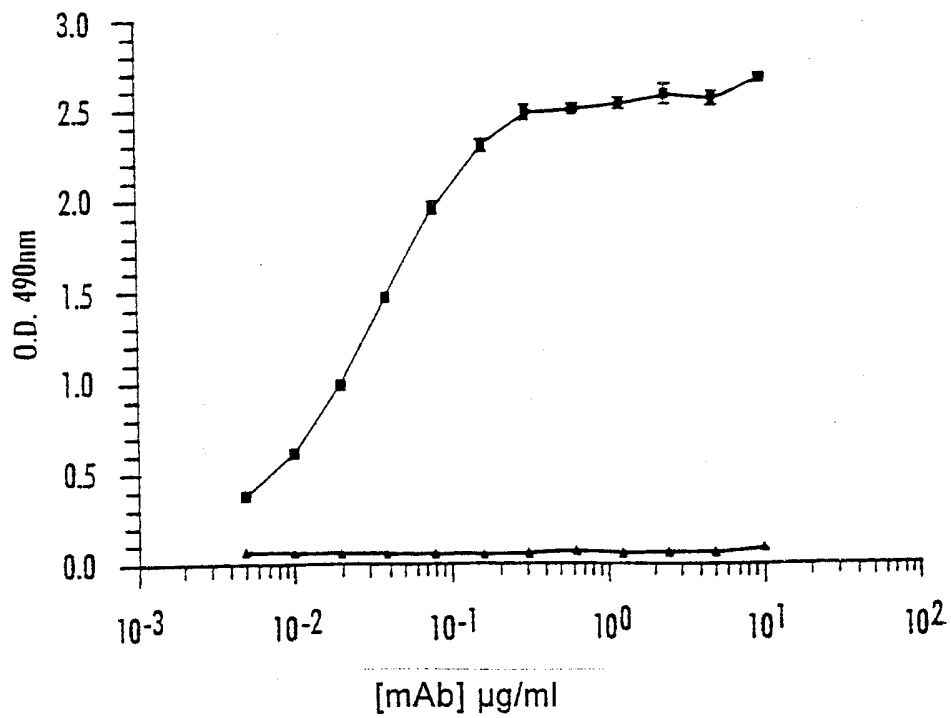
Obr. 23

Inhibice vazby IgE na FcεR1α způsobená PTmAb0011



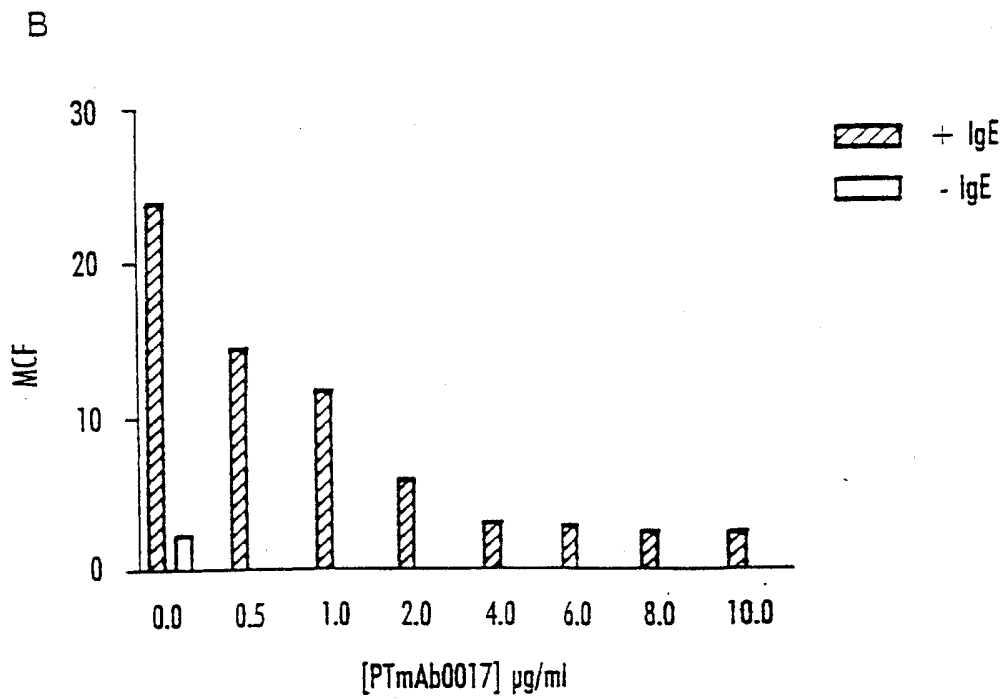
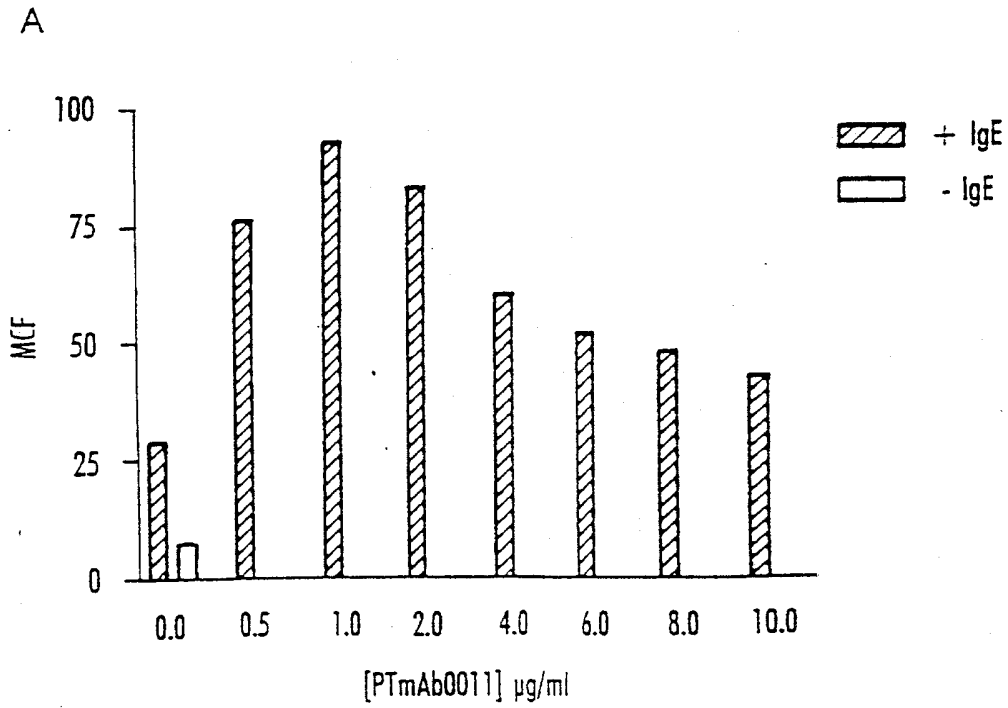
Obr. 24

Vazba PTmAb0011 na IgE navázaný na receptor



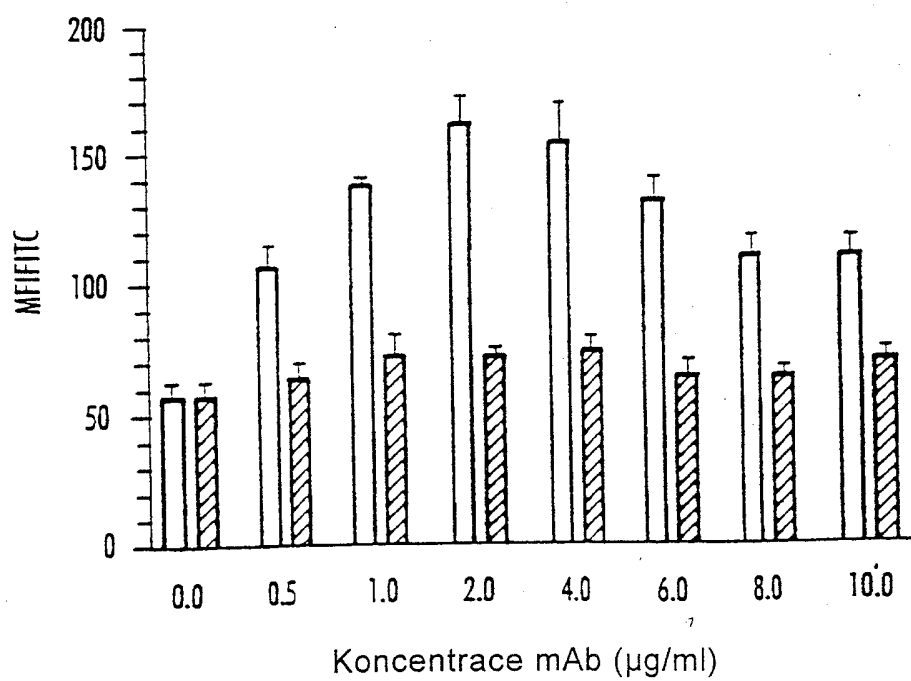
Obr. 25

Vliv PTmAb0011 na vazbu IgE na FcεRII na buňkách RPMI 8866



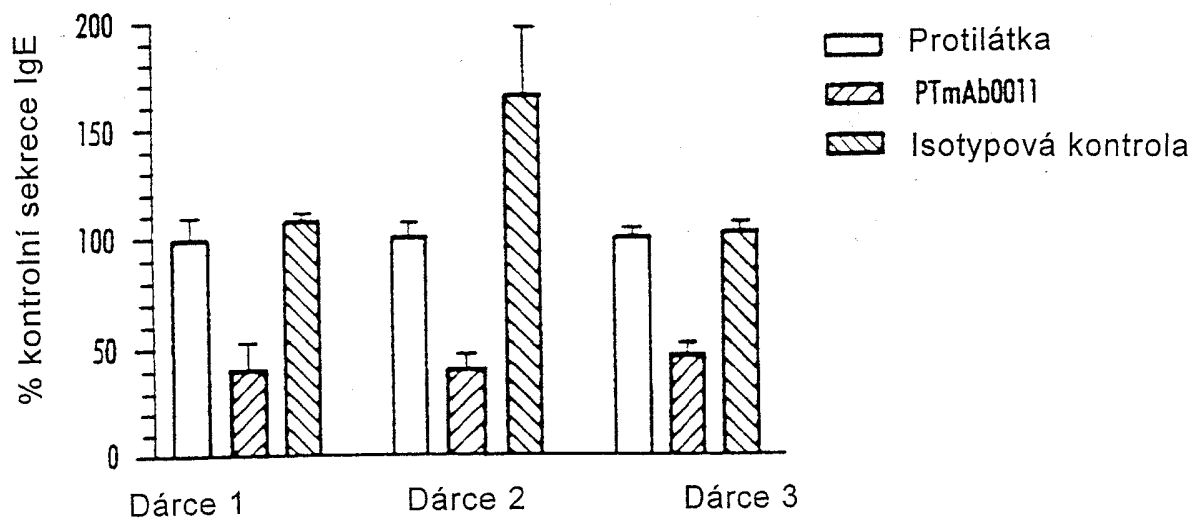
Obr. 26

Analýza vlivu PTmAb0011 na vazbu IgE na FcεRII na primárních lidských B-buňkách



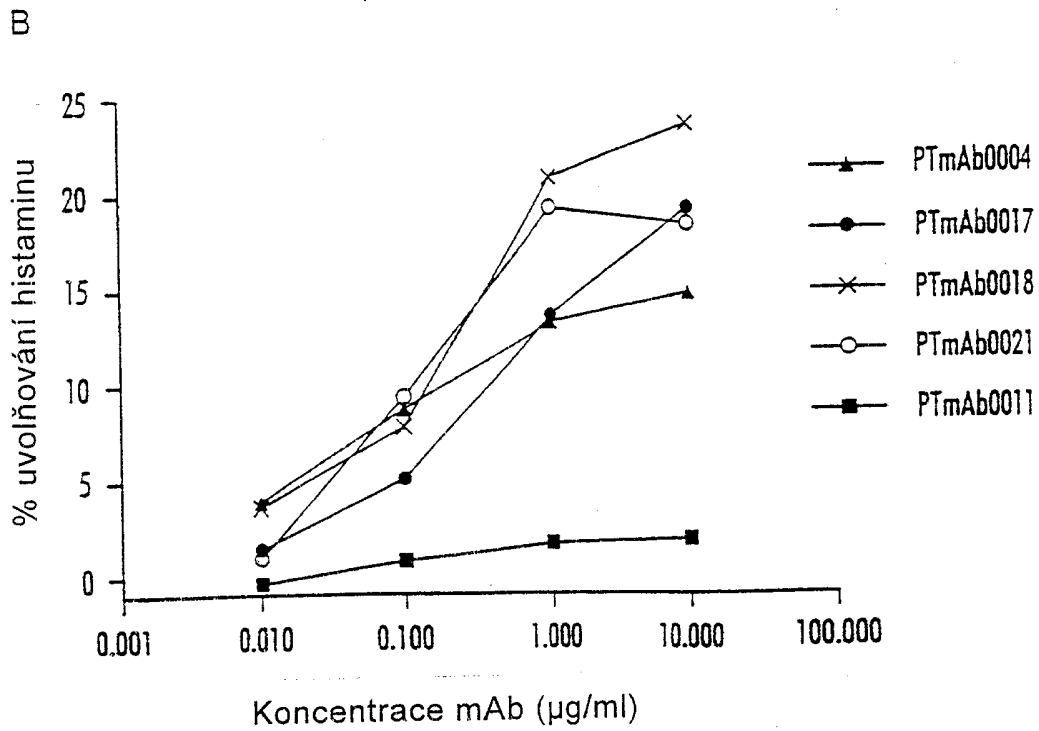
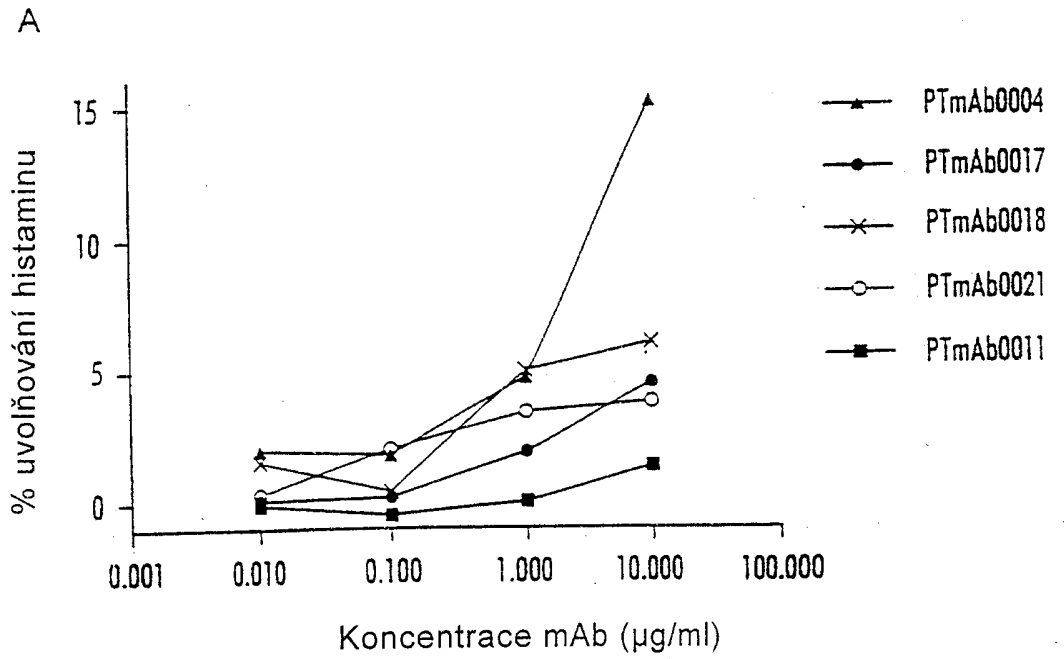
Obr. 27

Vlivy PTmAb0011 na sekreci IgE z primárních lidských B-buněk



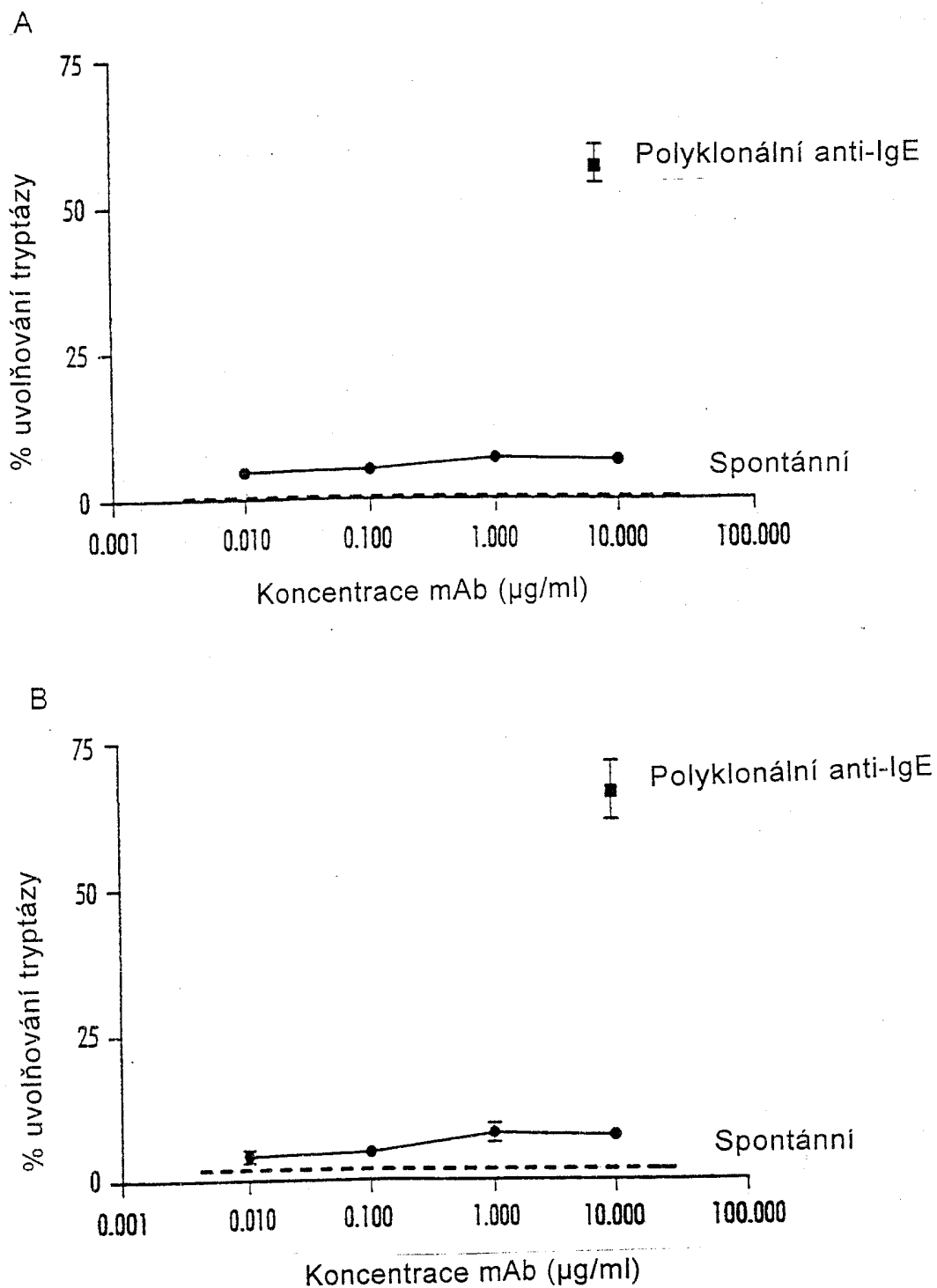
Obr. 28

Anafylaktogenicita monoklonálních protilátek proti lidskému IgE
v basofilech alergického (A) a nealergického (B) člověka



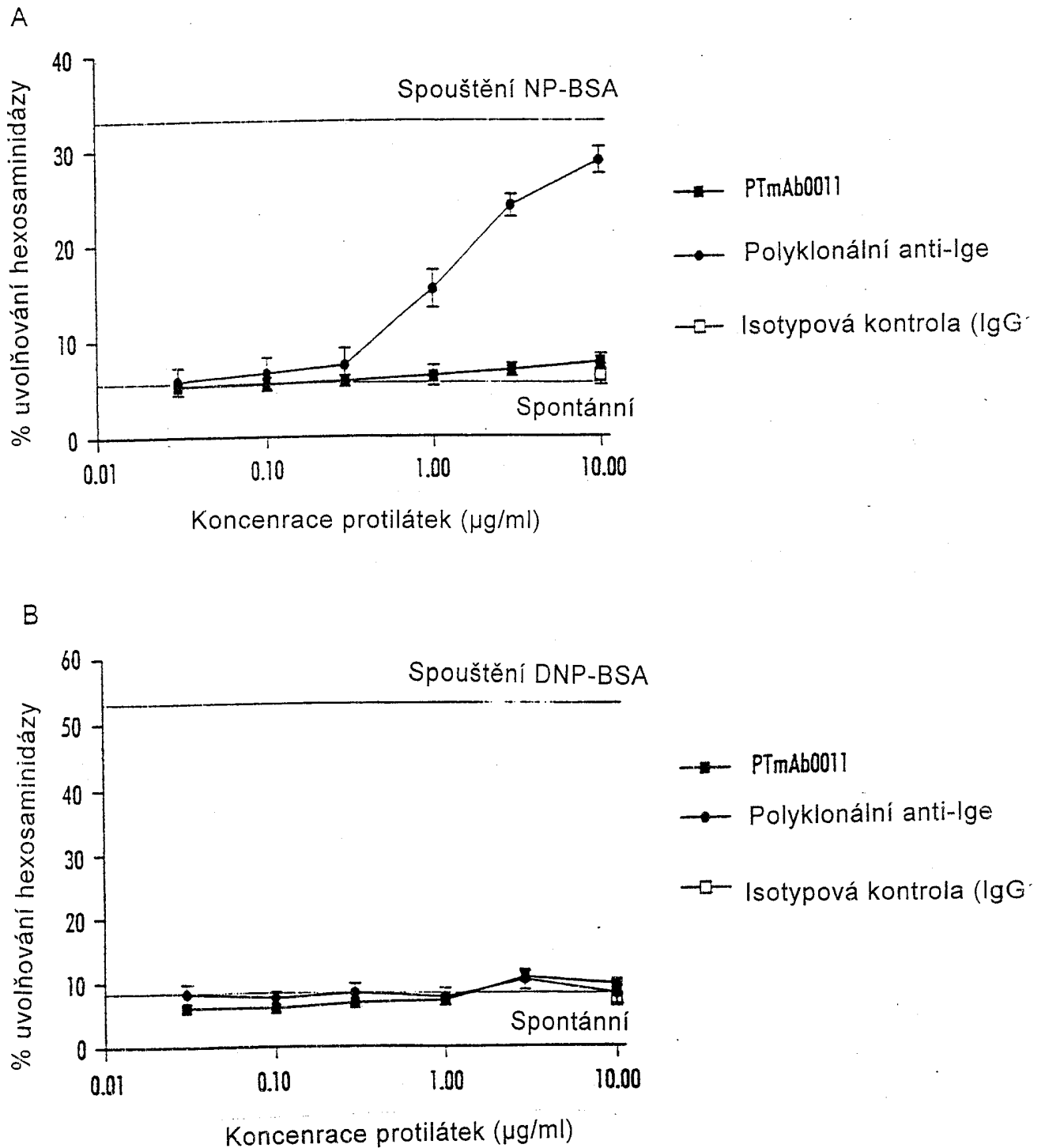
Obr. 29

Anafylaktogenicita protilátek proti lidskému IgE v senzitivovaných (A) a nesenzitivovaných (B) žírných buňkách lidských plic



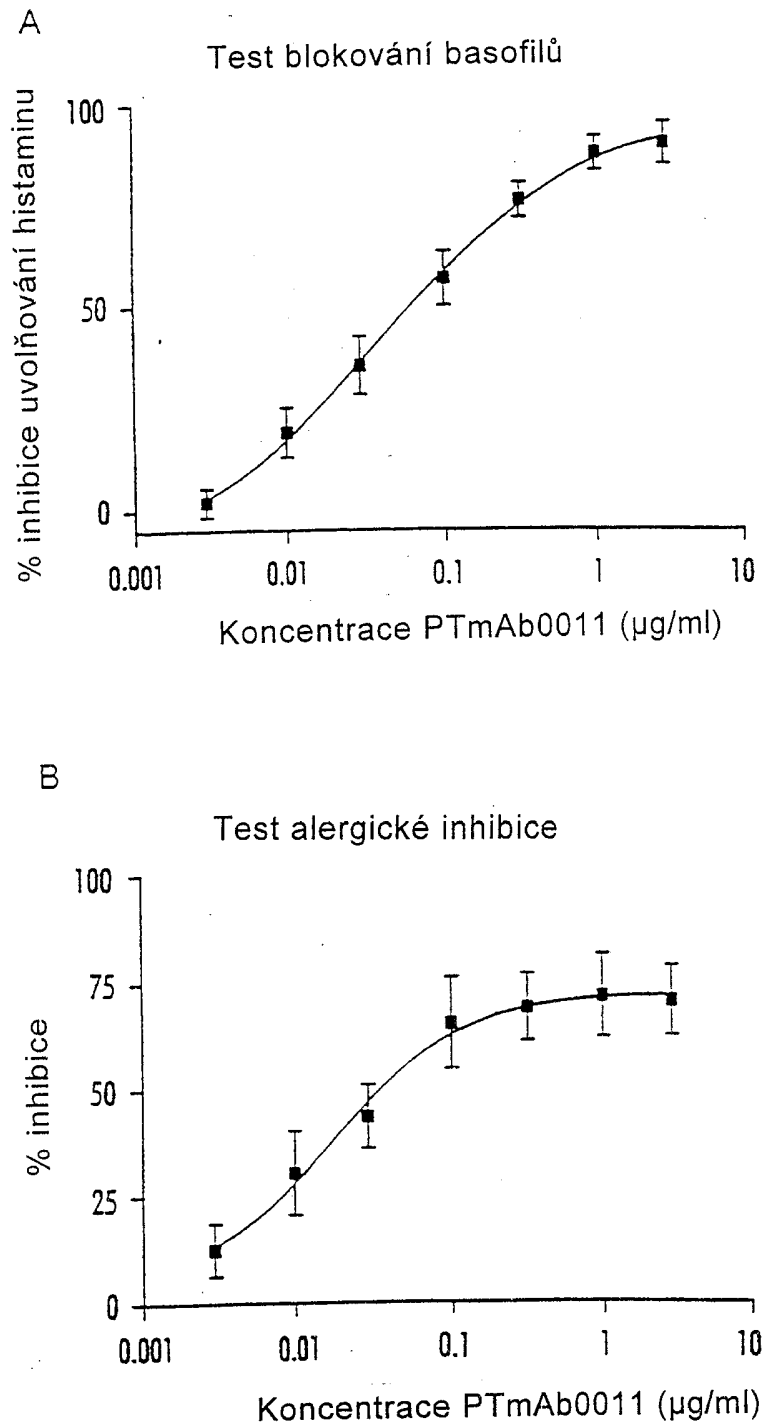
Obr. 30

Anafylaktogenicita protilátek proti lidskému IgE v buňkách RBL J41
vyvolaná lidským Fc ϵ RI (A) a myším Fc ϵ RI (B)



Obr. 31.

Inhibice uvolňování histaminu spouštěného alergenem v lidských basofilech protilátkou PTmAb0011



Obr. 32

Inhibice pasivní kožní anafylaxe v kůži opice protilátkami PTmAb0011
a PTmAb0005