



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 24 275 T2** 2008.12.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 401 869 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 24 275.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/17402**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 734 634.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/098920**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.05.2002**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **12.12.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **26.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 16/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**295449 P**      **01.06.2001**      **US**

**295907 P**      **04.06.2001**      **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**BIOGEN IDEC MA INC., Cambridge, Mass., US;  
The General Hospital Corp., Boston, Mass., US**

(72) Erfinder:

**BAILLY, Veronique, Boxborough, MA 01719, US;  
BONVENTRE, Joseph, Wayland, MA 01778, US**

(74) Vertreter:

**df-mp, 80333 München**

(54) Bezeichnung: **MOLEKÜLE UND VERFAHREN ZUR INHIBIERUNG DER FREISETZUNG VON KIM-1**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf Antikörper, die an Polypeptide binden, die in verletzten oder erkrankten Nierenzellen exprimiert werden, ebenso wie auf Verfahren zur Herstellung und Verwendung solcher Antikörper.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Das kidney injury-molecule-1 ("KIM-1")-Gen wurde als ein Gen identifiziert, dessen Expression bei postischämischen Rattennierenzellen im Vergleich zur Expression des Gens in unverletzten Rattennierenzellen hochreguliert ist. Das KIM-1-Gen kodiert für Typ-I-Zellmembran-Glycoprotein. Zwei Formen des Gens wurden bei Menschen beschrieben. Eine Form wird als KIM-1(a) bezeichnet und hat eine Länge von 334 Aminosäuren. Die zweite Form wird als KIM1-(b) bezeichnet und hat eine Länge von 359 Aminosäuren. Die beiden humanen Homologe sind in all ihren 323 aminoterminalen Aminosäuresequenzen identisch, unterscheiden sich aber in der Sequenz ihrer carboxyterminalen Aminosäuren. Das KIM-1-Gen wird in entdifferenzierten proximalen Tubulusepithelzellen in beschädigten Regionen exprimiert. Hohe Expression wird im S3-Segment des proximalen Tubulus im äußeren Streifen der äußeren Medulla festgestellt. Diese Region ist in hohem Maße anfällig für Schäden, die aus Ischämie oder Toxinen resultieren.

**[0003]** In der aminoterminalen Region des KIM-1 Proteins befindet sich der extrazelluläre Teil des KIM-1-Proteins. In dieser Region befinden sich eine Immunglobulin-ähnliche Domäne mit sechs Cysteinen und eine an T/SP reiche Domäne, die charakteristisch ist für Mucin-ähnliche O-glykolisierte Proteine. Immunglobulin-ähnliche Domänen sind stark an der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt, besonders an der Zelloberfläche, wo sie für Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre Matrix-Interaktionen verantwortlich sind.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0004]** Die Erfindung basiert zum Teil auf der Entdeckung, dass monoklonale Antikörper, die gegen die humane KIM-1-extrazelluläre Domäne erzeugt wurden, die proteolytische Freisetzung (Shedding) eines löslichen KIM-1-Polypeptids aus der membran-assoziierten Form des KIM-1-Proteins inhibieren können.

**[0005]** Allgemein ist ein Merkmal der Erfindung ein Antikörper, ein Antikörperderivat oder antigenbindendes Polypeptid, das die proteolytische Freisetzung eines löslichen KIM-1-Polypeptids aus KIM-1-exprimierenden Zellen inhibiert. Der Antikörper kann ein monoklonaler Antikörper oder ein polyklonaler Antikörper sein. Der Antikörper kann ein humanisierter monoklonaler Antikörper oder ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper sein. Der Antikörper kann z. B. ein IgG Polypeptid aufweisen.

**[0006]** Der Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne eines Vollängen-KIM-1-Polypeptids an einem Epitop, das innerhalb der Aminosäuresequenz SSDGLWNNNQTQLFLEHS (SEQ ID NO: 1) in der extrazellulären Domäne eines KIM-1-Polypeptids lokalisiert ist.

**[0007]** Ebenso wird durch die Erfindung ein Konjugat bereitgestellt, das einen Proteolyse-inhibierenden KIM-1-Antikörper, ein Antikörperderivat oder antigenbindendes Polypeptid gebunden an ein nachweisbares Label aufweist. Das nachweisbare Label kann z. B. ein Radiotracer oder eine Fluoreszenzmarkierung sein.

**[0008]** Desweiteren beinhaltet die Erfindung ein Konjugat oder Fusionspolypeptid, das einen KIM-1-Proteolyse-inhibierenden Antikörper, ein Antikörperderivat oder ein antigenbindendes Polypeptid und einen Toxinteil enthält.

**[0009]** Außerdem Bestandteil der Erfindung ist ein Antikörper mit derselben Epitopspezifität wie der Antikörper, der von dem Hybridom produziert wird, das am ATCC unter der Zugangsnummer PTA-3350 hinterlegt ist.

**[0010]** Darüber hinaus stellt die Erfindung einen Antikörper bereit, der an die extrazelluläre Domäne von humanem KIM-1 bindet und die Bindung des Antikörpers, der von dem Hybridom produziert wird, das am ATCC unter der Zugangsnummer PTA-3350 hinterlegt ist, kreuzblockiert. In einigen Ausführungsformen wird der Antikörper von dem Hybridom produziert, das beim ATCC als Zugangsnummer PTA-3350 hinterlegt ist. Auch ist eine Nukleinsäure, die für den monoklonalen Antikörper kodiert, der von dem Hybridom produziert wird ein Merkmal der Erfindung.

**[0011]** Außerdem ist das Hybridom, das beim ATCC unter der Zugangsnummer PTA-3350 hinterlegt ist, ein Merkmal der Erfindung.

**[0012]** Ein Merkmal der Erfindung ist eine Zusammensetzung, die den hierin beschriebenen KIM-1-Proteolyse-inhibierenden Antikörper, das Antikörperderivat oder das antigenbindende Polypeptid und einen pharmazeutisch zulässigen Träger enthält.

**[0013]** Außerdem beinhaltet die Erfindung ein Verfahren zur Inhibierung der Freisetzung einer löslichen Form eines KIM-1-Polypeptids aus einer Zelle. Das Verfahren beinhaltet das Inkontaktbringen einer Zelle, die ein KIM-1 Zelloberflächenpolypeptid exprimiert, mit einer wirksamen Menge eines KIM-1-Proteolyse-inhibierenden Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids. Die Zelle kann z. B. eine Nierenzelle sein. In einigen Ausführungsformen ist die Nierenzelle eine Nierenkrebszelle.

**[0014]** Die Zelle kann in vitro oder in vivo bereitgestellt werden. Vorzugsweise beträgt die wirksame Menge an Antikörper zwischen etwa 0,1 und 100 mg/kg, mehr bevorzugt zwischen etwa 0,5 und etwa 50 mg/kg und noch mehr bevorzugt zwischen etwa 1 und etwa 20 mg/kg. Wenn die Zelle in vivo bereitgestellt wird, kann die wirksame Menge an Antikörper durch intravenöse Infusion in ein Individuum während einer Infusionsdauer von 1–6 Stunden verabreicht werden. In einigen Ausführungsformen weist die lösliche Form des KIM-1-Polypeptids die Polypeptidsequenz VKVGGEAGP (SEQ ID NO: 2) auf. Daten aus Beispiel 3 zeigten, dass eine lösliche Form von KIM-1, welche in die extrazelluläre Umgebung durch proteolytische Spaltung an einer Stelle proximal zur transmembranen Domäne freigesetzt wurde, die durch SEQ ID NO: 2 vorgegebene Aminosäuresequenz enthielt.

**[0015]** Durch die Erfindung wird ebenfalls ein Verfahren zur Inhibierung proteolytischer Freisetzung eines KIM-1-Fragments durch Inkontaktbringen einer ein KIM-1-Polypeptid exprimierende Zelle bereitgestellt, welches das Fragment mit einer wirksamen Menge eines KIM-1-Proteolyseinhibierenden Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids umfasst.

**[0016]** Außerdem beinhaltet die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Nierenerkrankung oder -verletzung. Das Verfahren beinhaltet das Verabreichen eines KIM-1-Proteolyse-inhibierenden Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids an ein Säugetier, z. B. einen Menschen, bei dem der Bedarf danach besteht. Ein Beispiel einer Nierenerkrankung, die behandelt werden kann, ist Nierenkrebs, z. B. Nierenzellkarzinom.

**[0017]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff "Antikörper" auf ein Immunglobulinmolekül und immunologisch aktive Abschnitte des Immunglobulinmoleküls, d. h. ein Molekül, das eine Antigenbindestelle enthält, die ein Antigen spezifisch bindet (mit diesem immunologisch reagiert). Solche Antikörper beinhalten, sind aber nicht auf diese beschränkt, polyklonale, monoklonale, chimäre, Single-Chain, Fab und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente und eine Fab-Expressionsbibliothek.

**[0018]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „Derivat“ auf ein Molekül, das entweder zusätzliche chemische Teile enthält, die normalerweise nicht Bestandteil des Moleküls sind oder weniger Teile enthält als normalerweise Bestandteil des Moleküls sind. Das Hinzufügen oder Entfernen von Teilen kann die Löslichkeit des Moleküls, die Absorption oder die biologische Halbwertszeit verbessern oder kann die Toxizität des Moleküls vermindern.

**[0019]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff "antigenbindendes Polypeptid" auf ein Antikörperfragment, eine Variante, ein Analogon oder ein chemisches Derivat, das die antigenbindenden Eigenschaften des Antikörpers beibehält.

**[0020]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff "monoklonaler Antikörper" (MAb) auf eine Population von Antikörpermolekülen, die lediglich eine molekulare Spezies von Antikörpermolekülen enthält, die aus einem einzigartigen Leichtketten-Genprodukt und einem einzigartigen Schwerketten-Genprodukt bestehen. Insbesondere die Komplementarität-determinierenden Regionen (CDRs) des monoklonalen Antikörpers sind in allen Molekülen der Population identisch. Dementsprechend enthalten MAbs eine Antigenbindestelle, die zur immunologischen Reaktion mit einem bestimmten Epitop des Antigens fähig sind, welches durch eine einzigartige Bindungsaffinität für diese charakterisiert ist.

**[0021]** Wie hierin verwendet bezieht sich der "Begriff KIM-1-Proteolyse-inhibierender Antikörper auf einen Antikörper, der die proteolytische Freisetzung eines löslichen KIM-1-Polypeptids inhibiert.

**[0022]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „kreuzblockierender Antikörper“ auf einen Antikörper, der den Bindungsanteil von anti-KIM-1-Antikörper an ein Epitop auf einem KIM-1-Polypeptid in Bezug auf den Bindungsanteil des anti-KIM-1-Antikörpers an das Epitop in Abwesenheit des Antikörpers senkt.

**[0023]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff "Konjugat" auf einen Antikörper, der mit einem zweiten Teil kovalent verbunden ist. Der zweite Teil kann z. B. ein Label sein.

**[0024]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „Label“ auf einen Molekülteil, der nachgewiesen werden kann. Ein Label kann z. B. ein radioaktives Isotop, Enzym, lumineszierendes Mittel oder ein Farbstoff sein.

**[0025]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „Fusionspolypeptid“ auf ein anti-KIM-1-Antikörpermolekül, das funktionell mit einem nicht-anti-KIM-1-Antikörpermolekül verbunden ist.

**[0026]** Sofern nicht anders definiert, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe dieselbe Bedeutung wie sie gemeinhin von einem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet, zu welchem diese Erfindung gehört, verstanden werden. Obwohl Verfahren und Materialien ähnlich oder entsprechend den hierin beschriebenen in der Praxis oder beim Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind geeignete Verfahren und Materialien unten beschrieben. Konfliktfälle regelt die vorliegende Patentschrift, einschließlich Definitionen.

**[0027]** Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung und den Ansprüchen ersichtlich.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0028]** [Abb. 1A](#) ist eine schematische Abbildung der Polypeptidsequenz der humanen KIM-1-Mucindomäne (SEQ ID NO: 6) und des korrespondierenden 18-mers, welche sich mit den synthetischen Peptiden überschneiden, die zur Kartierung der bindenden Epitope der monoklonalen Antikörper ACA12, AKG7 und ABE3 verwendet werden.

**[0029]** [Abb. 1B](#) ist eine Reihe von grafischen Darstellungen der Bindungen der monoklonalen Antikörper ABE3, AKG7 und ACA 12 an die Peptide 43 bis 50 bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen.

**[0030]** [Abb. 2A–2C](#) sind Darstellungen der Western Blot Analyse von mit ABE3 zur Reaktion gebrachten Zellextrakten ([Abb. 2A](#)), wobei die Zellextrakte mit polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen den C-Terminus von humanem KIM-1(b) zur Reaktion gebracht wurden ([Abb. 2B](#)), sowie von konditionierten Medien, die mit dem monoklonalen Antikörper AKG7 ([Abb. 2C](#)) zur Reaktion gebracht wurden.

**[0031]** [Abb. 3A–3C](#) sind Darstellungen von Western Blot Analysen von COS-7-Zellextrakten oder konditionierten Medien, die mit AKG7 ([Abb. 3A](#)), ABE3 ([Abb. 3B](#)) oder polyklonalen Kaninchenantikörpern, die gegen den C-Terminus des humanen KIM-1(b) erzeugt wurden ([Abb. 3C](#)), zur Reaktion gebracht wurden.

**[0032]** [Abb. 4](#) ist ein Histogramm, das die Konzentration von löslichem KIM-1 in konditioniertem Medium von COS-7-Zellen, die KIM-1(b) exprimieren und in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von ABE3 oder einer Kontrolle von murinem IgG gezüchtet wurden, zeigt.

**[0033]** [Abb. 5](#) ist eine grafische Darstellung der Konzentration von löslichem KIM-1 im konditionierten Medium von 769-P-Zellen, die in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von BB-94 oder GM6001 MMP Inhibitoren gezüchtet wurden.

**[0034]** [Abb. 6A](#) ist eine Sequenz von humanem KIM-1(a) (SEQ ID NO: 7) und humanem HAVcr-1 oder KIM-1(b) (SEQ ID NO: 8). Eine einzelne Sequenz ist bis Rest 323, entsprechend der Sequenz, die den beiden Polypeptiden gemeinsam ist, dargestellt.

**[0035]** Die mutmaßliche Signalsequenz und Transmembrandomäne sind unterstrichen.

**[0036]** Die vier mutmaßlichen N-Glykolisierungsmotive sind schattiert dargestellt. Die Sequenz des synthetischen Peptids, das dazu verwendet wird, Antikörper gegen den C-Terminus von KIM-1(b) zu erzeugen, ist kurz dargestellt.

**[0037]** [Abb. 6B](#) ist eine schematische Darstellung des KIM-1(b) Proteins. Graue Kästchen stellen die Signalsequenz und die Transmembrandomäne dar. Cysteinreste in der Ig-ähnlichen Domäne sind markiert (C). Die vier Dreiecke stellen mutmaßliche N-Glykane dar. Die TSP-reiche Region ist zur schematischen Darstellung der Mucin-ähnlichen Domäne verdickt dargestellt.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0038]** Merkmale der vorliegenden Erfindung sind Antikörper, die spezifisch an ein KIM-1-Polypeptid binden und proteolytische Freisetzung einer löslichen Form von KIM-1 aus KIM-1-exprimierenden Zellen inhibieren.

**[0039]** KIM-1 ist eines einer Reihe von Membranproteinen, die auch in einer löslichen (gekürzten) Form vorliegen.

**[0040]** Obwohl diese löslichen Formen durch alternatives Spleißen entstehen können, stammen sie häufiger aus der Proteolyse der Membranform.

**[0041]** Die Spaltung geschieht in der Nähe der Transmembrandomäne und führt zur Freisetzung von physiologisch aktivem Protein.

**[0042]** Die hierin beschriebenen Antikörper können zur Detektion einer KIM-1-Polypeptid exprimierenden Zelle, z. B. einer Nierenzelle verwendet werden. Da KIM-1-Polypeptide in hohem Maß in postischämischen oder erkrankten Nierenzellen exprimiert werden, sind die hierin offenbarten Antikörper nützlich zur Detektion von verletzten oder erkrankten Nierenzellen bei einem Individuum. Die Antikörper können außerdem dazu verwendet werden, die proteolytische Spaltung eines KIM-1-Polypeptids zu inhibieren und dadurch die Funktionen oder Prozesse, die durch lösliche Formen eines KIM-1 Polypeptids vermittelt werden, zu inhibieren. Die Antikörper können außerdem einem Individuum zur Behandlung oder Prävention von Nierenerkrankung oder Verletzung verabreicht werden.

Anti-KIM-1-Antikörper, die proteolytische Freisetzung eines löslichen KIM-1-Polypeptids inhibieren

**[0043]** Zur Herstellung Proteolyse-inhibierender KIM-1-Antikörper werden Immunogene verwendet, die die extrazelluläre Domäne eines KIM-1-Polypeptids beinhalten. Die extrazelluläre Domäne erstreckt sich von Aminosäure 1 bis 290 des humanen KIM-1-Polypeptids. Die Aminosäuresequenzen der humanen KIM-1-Polypeptide und der von Ratten und die Nukleinsäuren, die für die Polypeptide kodieren werden in WO97/44460, veröffentlicht am 27. November 1997 und in Ichimura et al. bereitgestellt. (1998) J. Biol. Chem. 273: 4135–42.

**[0044]** Geeignete Antikörper beinhalten z. B., polyklonale, monoklonale, chimäre, Single-Chain,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$ ,  $F_{sc}$ ,  $F_v$ , und  $F_{(ab')_2}$ -Fragmente und eine Fab-Expressionsbibliothek. Allgemein kann ein von Menschen gewonnenes Antikörpermolekül in einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD klassifiziert werden, welche sich untereinander durch die im Molekül vorhandene schwere Kette unterscheiden. Bestimmte Klassen haben außerdem Unterklassen wie z. B. IgG1, IgG2 und andere. Desweiteren kann bei Menschen die leichte Kette eine Kappa- oder eine Lambda-Kette sein.

**[0045]** Die Bezugnahme auf Antikörper hierin beinhaltet eine Bezugnahme auf alle diese Klassen, Subklassen und Typen von humanen Antikörperarten.

**[0046]** Die extrazelluläre Domäne des KIM-1-Polypeptids oder eines Abschnitts oder Fragments davon kann als Antigen fungieren und kann zusätzlich als Immunogen verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die das Antigen immunspezifisch mithilfe von Standardtechniken zur polyklonalen und monoklonalen Antikörperherstellung binden. Vorzugsweise umfasst das antigene Peptid mindestens 10 Aminosäurereste oder mindestens 15 Aminosäurereste oder mindestens 20 Aminosäurereste oder mindestens 30 Aminosäurereste. Der anti-KIM-1-Antikörper bindet an ein Epitop innerhalb der Aminosäuresequenz SSDGLWNNQTLFLEHS (SEQ ID NO: 1) in KIM-1. Die in Beispiel 2 gewonnenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sich ein bindendes Epitop des anti-KIM-1-Antikörpers ABE3 gegen das KIM-1-Polypeptid etwa in dem Abschnitt der Aminosäuresequenz des KIM-1-Polypeptids befindet, der durch SEQ ID NO: 1 angegeben ist.

**[0047]** Verschiedene auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Herstellung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, die die proteolytische Freisetzung von löslichem KIM-1-Polypeptid aus KIM-1-exprimierenden Zellen inhibieren, eingesetzt werden. Siehe z. B.: ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Einige dieser Antikör-

per werden unten stehend erörtert. Gegen das KIM-1-Polypeptid erzeugte Antikörper können zur Identifizierung ihrer bindenden Epitope mithilfe von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren charakterisiert werden, einschließlich jener, die unten in Beispiel 2 beschrieben sind. Antikörper können mithilfe von Verfahren wie z. B. denen, die unten stehend in Beispiel 4 beschrieben sind, gescreent werden, um jene zu identifizieren, die die proteolytische Freisetzung löslicher Formen von KIM-1 inhibieren.

**[0048]** Einige Proteolyse-inhibierende Antikörper besitzen dieselbe Epitopspezifität wie der Antikörper, der vom Hybridom produziert wird, das den monoklonalen Antikörper ABE3 produziert. Es werden auch Antikörper erwogen, die die Bindung des monoklonalen Antikörpers ABE3 an ein in der extrazellulären Domäne des humanen KIM-1-Polypeptids lokalisiertes Epitop kreuzblockieren. Kreuzblockierende Antikörper können durch den Vergleich der Bindung des monoklonalen Antikörpers ABE3 an ein KIM-1-Polypeptid in An- und Abwesenheit eines Testantikörpers identifiziert werden. Verminderte Bindung des ABE3 monoklonalen Antikörpers in Anwesenheit des Testantikörpers im Vergleich zur Bindung des monoklonalen Antikörpers ABE3 in Abwesenheit des Testantikörpers deutet darauf hin, dass der Testantikörper ein kreuzblockierender Antikörper ist.

#### Polyklonale Antikörper

**[0049]** Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern, kann ein beliebiges Tier (z. B. Kaninchen, Ziege, Maus oder anderes Säugetier) durch eine oder mehrere Injektionen eines Polypeptids, das die KIM-1 Ektodomäne enthält, immunisiert werden. Das Polypeptid kann z. B. das natürlich vorkommende KIM-1 sein, ein chemisch synthetisiertes Polypeptid, das die Ektodomäne darstellt, oder ein rekombinant exprimiertes Fusionsprotein. Der Fusionsteil oder ein chemisch konjugierter Teil kann ein zweites Protein sein, das für seine Immunogenität im immunisierten Säugetier bekannt ist. Beispiele für solche immunogenen Proteine beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Keyhole Limpet Hemocyanin, Serumalbumin, bovines Thyroglobulin und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor.

**[0050]** Die Zubereitung kann weiterhin ein Adjuvans enthalten. Verschiedene Adjuvanzen, die zur Verstärkung der Immunreaktion eingesetzt werden, umfassen, sind aber nicht auf diese beschränkt, Freund-Adjuvans (vollständig und unvollständig), Mineralgele (z. B. Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen (z. B. Lysolecithin, pluronische Polyole, Polyanione, Peptide, Ölemulsionen, Dinitrophenol, etc.), beim Menschen anwendbare Adjuvanzen wie z. B. Bacille Calmette-Guerin und Corynebacterium parvum oder ähnliche immunstimulierende Mittel. Zusätzliche Beispiele für Adjuvanzen, die eingesetzt werden können, beinhalten MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl Lipid A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat).

**[0051]** Die gegen das immunogene Protein gerichteten polyklonalen Antikörpermoleküle können aus dem Säugetier isoliert werden (z. B. aus dem Blut) und durch wohlbekannte Techniken wie z. B. Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein A oder Protein G, welche vor allem die IgG Fraktion des Immunserrums bereitstellen, weiter gereinigt werden. Anschließend oder alternativ kann das spezifische Antigen, welches das Ziel des gesuchten Immunglobulins oder eines Epitops davon ist, auf einer Säule immobilisiert werden, um den immunspezifischen Antikörper durch Immunoaffinitätschromatographie zu reinigen. Reinigung von Immunglobulinen wird z. B. von Wilkinson erörtert. Wilkinson (2000) The Scientist 14: 25–28.

#### Monoklonale Antikörper und Hybridome

**[0052]** Monoklonale Antikörper können mithilfe von Hybridom-Verfahren, wie denen, die von Kohler und Milstein (1975) Nature 256: 495 beschrieben wurden, hergestellt werden. Bei einem Hybridom-Verfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem immunisierenden Mittel immunisiert, um Lymphozyten anzuregen, welche Antikörper produzieren oder in der Lage sind, Antikörper zu produzieren, die spezifisch an das immunisierende Mittel binden.

**[0053]** Das immunisierende Mittel beinhaltet typischerweise das Proteinantigen, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein davon. Allgemein werden entweder periphere Blutlymphozyten verwendet, falls Zellen humanen Ursprungs erwünscht sind, oder es werden Milzzellen oder Lymphknotenzellen verwendet, falls nicht-humane Quellen von Säugetieren erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mithilfe eines geeigneten Fusionsmittels wie z. B. Polyethylenglykol mit einer immortalisierten Zelllinie fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59–103. Immortalisierte Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen von Nagetieren, Rindern und Menschen. Üblicherweise werden Ratten- oder Mäusemyelomzelllinien eingesetzt. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, welches vorzugsweise eine oder mehr Substanzen enthält, welche das Wachstum oder Überleben der nicht-fusionierten, immortalisierten Zel-

len inhibiert. Zum Beispiel, wenn den Elternzellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, enthält das Kulturmedium für Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin („HAT-Medium“), welche das Wachstum von Zellen ohne HGPRT hemmen.

**[0054]** Bevorzugte immortalisierte Zelllinien sind solche, die effizient fusionieren, stabile hohe Antikörperexpression durch die gewählten antikörperproduzierenden Zellen unterstützen und die empfindlich gegenüber einem Medium wie HAT-Medium sind. Mehr bevorzugte immortalisierte Zelllinien sind murine Myelomlinien, welche z. B. vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California und von der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia erworben werden können. Humane Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden außerdem für die Herstellung von Humanen monoklonalen Antikörpern beschrieben, (Kozbor (1984) J. Immunol. 133: 3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and APPLICATIONS, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51–63).

**[0055]** Das Kulturmedium, in welchem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Anwesenheit von gegen das Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpern hin untersucht werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität der von den Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper durch Immunpräzipitation oder durch einen in-vitro-Bindungsassay, wie z. B. den Radioimmunoassay (RIA) oder den enzymgebundenen Immunadsorptionstest (ELISA) bestimmt. Solche Techniken und Assays sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann z. B. durch die Scatchard-Analyse von Munson und Pollard (1980) Anal. Biochem 107: 220 bestimmt werden. Vorzugsweise werden Antikörper mit einem hohen Maß an Spezifität und einer hohen Bindungsaffinität für das Zielantigen isoliert.

**[0056]** Nachdem die gewünschten Hybridomzellen identifiziert sind, können die Klone durch einschränkende Verdünnungsprozeduren subkloniert und mit Standardverfahren gezüchtet werden.

**[0057]** Zu geeigneten Kulturmedien für diesen Zweck gehören z. B. Dulbeccos Modified Eagles Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ können die Hybridomzellen in vivo als Aszites in einem Säuger gezüchtet werden.

**[0058]** Ein Hybridom, das den monoklonalen Antikörpersubklon ABE3.16 produziert wurde bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md., 20852 (USA) am 2. Mai 2001 hinterlegt, und ihm wurde die Zugangsnummer PTA-3350 zugewiesen. ABE3.16 ist ein Subklon von ABE3.

**[0059]** Die von den Subklonen sezernierten monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium oder Aszites mithilfe von konventionellen Immunglobulin-Reinigungsverfahren isoliert oder gereinigt werden, wie z. B. Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie.

**[0060]** Die monoklonalen Antikörper können außerdem durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellt werden, wie diejenigen, die in US-Patent Nr. 4,816,567 beschrieben sind. Die DNA, die für die monoklonalen Antikörper von Interesse kodiert kann ohne weiteres mithilfe konventioneller Verfahren isoliert und sequenziert werden (z. B. durch Verwendung von Oligonukleotidsonden, die spezifisch an Gene binden, die für schwere und leichte Ketten muriner Antikörper kodieren). Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle solcher DNA. Das Klonen von Genen mit variabler Immunglobulinregion mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine etablierte Technik. Siehe z. B. Kettleborough et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23: 206–211. Einmal isoliert, kann die DNA in Expressionsvektoren eingebracht werden, welche dann in Wirtszellen transfiziert werden, wie z. B. COS-Zellen von Affen, Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder Myelomzellen, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese von monoklonalen Antikörpern in den rekombinanten Wirtszellen zu erreichen.

**[0061]** Die DNA kann außerdem z. B. durch Substitution mit der kodierenden Sequenz für humane konstante Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle von homologen murinen Sequenzen modifiziert werden (US-Patent Nr. 4,816,567; Morrison (1994) Nature 368: 812–13) oder durch kovalente Bindung der gesamten kodierenden Sequenz für ein nicht-Immunglobulin-Polypeptid oder einem Teil davon an die für das Immunglobulin kodierende Sequenz. Ein solches nicht-Immunglobulin-Polypeptid kann anstelle der konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung substituiert werden oder kann anstelle der variablen Domänen einer Antigen-kombinierenden Stelle eines Antikörpers der Erfindung substituiert werden, um einen chimären bivalenten Antikörper zur erzeugen.

## Humanisierte Antikörper

**[0062]** Die gegen die Protein-Antigene gerichteten Antikörper der Erfindung können weiterhin humanisierte oder humane Antikörper umfassen. Diese Antikörper eignen sich zur Verabreichung an Menschen ohne eine starke Immunreaktion des Menschen gegen das verabreichte Immunglobulin hervorzurufen. Humanisierte Formen von Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z. B.  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$ ,  $F_{(ab)2}$  oder andere antigenbindende Subsequenzen von Antikörpern), die prinzipiell die Sequenz eines humanen Immunglobulins umfassen und eine minimale Sequenz aus einem nicht-humanen Immunglobulin enthalten. Humanisierung kann gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al. (1986) Nature 321: 522–525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332: 323–327; Verhoeyen et al. (1988) Science, 239: 1534–1536) durch Substitution mit Nagetier CDRs oder CDR-Sequenzen anstelle der korrespondierenden humanen Antikörpersequenzen durchgeführt werden. (Siehe auch US-Patent Nr. 5,225,539). In einigen Fällen werden die  $F_v$ -Framework-Reste des humanen Immunglobulins durch korrespondierende nicht-humane Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können außerdem Reste umfassen, die weder im aufnehmenden Antikörper noch in den importierten CDR- oder Framework-Sequenzen vorhanden sind. Allgemein umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von mindestens einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in welcher alle oder im Wesentlichen alle CDR-Regionen mit denen eines nicht-humanen Immunglobulins korrespondieren, und alle oder im Wesentlichen alle Framework Regionen diejenigen einer humanen Immunglobulin-Konsensus-Sequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst optimalerweise mindestens einen Abschnitt einer konstanten Region eines Immunglobulins (Fc), typischerweise den eines humanen Immunglobulins (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593–596).

## Humane Antikörper

**[0063]** Vollständig humane Antikörper beziehen sich auf Antikörpermoleküle, in welchen im Wesentlichen die gesamten Sequenzen sowohl der leichten als auch der schweren Kette, einschließlich der CDRs, aus humanen Genen stammen. Solche Antikörper werden als „humane Antikörper“ oder „vollständig humane Antikörper“ bezeichnet. Humane monoklonale Antikörper können mithilfe der Trioma-Technik hergestellt werden; der humanen B-Zellen-Trioma-Technik (Siehe Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4: 72) und die EBV-Hybridoma-Technik zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern (Siehe Cole et al. 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96). Humane monoklonale Antikörper können mithilfe von humanen Hybridomen hergestellt werden (Siehe Cote, et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026–2030) oder durch Transformation von humanen B-Zellen mit dem Epstein Barr Virus in vitro (Siehe Cole, et al. (1985) In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96). Darüber hinaus können humane Antikörper auch mithilfe zusätzlicher Techniken, einschließlich Phagen-Display-Bibliotheken, erzeugt werden. Hoogenboom und Winter (1991) J. Mol. Biol., 227: 381; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581. Ähnlich können humane Antikörper durch Einführen humaner Immunglobulinloci in transgene Tiere, z. B. Mäuse, in denen die endogenen Immunglobulingene teilweise oder vollständig inaktiviert wurden, erzeugt werden. Nach Provokation wird die Produktion der humanen Antikörper beobachtet, die der beim Menschen festgestellten in jeder Hinsicht sehr ähnelt, einschließlich Genumlagerung, Zusammenbau und Antikörperrepertoire.

**[0064]** Dieser Ansatz ist beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, und in Marks et al. (Bio/Technology 10, 779–783 (1992)); Lonberg et al. (Nature 368 856–859 (1994)); Morrison (Nature 368, 812–13 (1994)); Fishwild et al., (Nature Biotechnology 14, 845–51 (1996)); Neuberger (Nature Biotechnology 14, 826 (1996)); und Lonberg und Huszar (Intern. Rev. Immunol. 13 65–93 (1995)) beschrieben.

**[0065]** Humane Antikörper können zusätzlich mithilfe transgener nicht-humaner Tiere erzeugt werden, welche so modifiziert sind, dass sie als Reaktion auf Provokation durch ein Antigen eher vollständig humane Antikörper produzieren als die endogenen Antikörper des Tieres. Siehe z. B. PCT Veröffentlichung WO94/02602. Die endogenen Gene, die für die schweren und leichten Immunglobulinketten im nicht-humanen Wirt kodieren, wurden funktionsunfähig gemacht und aktive Loci, die für humane Schwer- und Leichtkettenimmunglobuline kodieren, werden in das Wirtsgenom eingefügt. Die humanen Gene werden z. B. mithilfe von künstlichen Hefechromosomen, die die notwendigen humanen DNA-Segmente enthalten, eingefügt. Ein Tier, das alle erwünschten Modifikationen liefert, wird dann als Nachkomme durch Kreuzung von intermediären transgenen Tieren erhalten, die weniger als das vollständige Komplement der Modifikationen enthalten. Die bevorzugte Ausführungsform eines solchen nicht-humanen Tieres ist eine Maus und wird als Xenomouse<sup>TM</sup> bezeichnet, wie in den PCT-Veröffentlichungen WO 96/33735 und WO 96/34096 offenbart. Dieses Tier produziert B-Zellen, welche vollständig humane Immunglobuline sezernieren. Die Antikörper können direkt aus dem Tier nach Im-



munisierung mit einem Immunogen von Interesse gewonnen werden, beispielsweise als eine Erzeugung eines polyklonalen Antikörpers oder alternativ aus immortalisierten B-Zellen aus dem Tier, wie z. B. Hybridome, die monoklonale Antikörper produzieren. Zusätzlich können die Gene, die für die Immunglobuline mit humanen variablen Regionen kodieren, wiederhergestellt und exprimiert werden, um die Antikörper direkt zu gewinnen, oder sie können weiter modifiziert werden, um Antikörperanaloge, wie z. B. Single-Chain-Fv-Moleküle zu gewinnen.

**[0066]** Ein Beispiel für ein Verfahren zur Herstellung eines nicht-humanen Wirts am Beispiel einer Maus mit fehlender Expression einer endogenen schweren Immunglobulinkette wird im US-Patent Nr. 5,939,598 offenbart.

**[0067]** Man kann sie durch ein Verfahren erhalten, das das Entfernen der J-Segment-Gene aus mindestens einem endogenen Schwerkettenlocus in einer embryonalen Stammzelle, um die Umlagerung des Locus zu verhindern, und um die Bildung eines Transkripts eines umgelagerten Immunglobulin-Schwerkettenlocus zu verhindern, beinhaltet, wobei das Entfernen durch einen Zielvektor durchgeführt wird, der ein Gen enthält, das für einen selektierbaren Marker kodiert und das Erzeugen einer transgenen Maus aus der embryonalen Stammzelle, deren somatische Zellen und Keimzellen das Gen, das für den selektierbaren Marker kodiert, enthalten.

**[0068]** Ein Verfahren, das zur Herstellung eines Antikörpers der Erfindung nützlich ist, wie z. B. ein humaner Antikörper, ist im US-Patent No. 5,916,771 offenbart. Es beinhaltet das Einführen eines Expressionsvektors, der eine Nukleotidsequenz enthält, die für eine schwere Kette kodiert, in eine Säugetierzelle in Kultur, das Einführen eines Expressionsvektors, der eine Nukleotidsequenz enthält, die für eine leichte Kette kodiert, in eine andere Säugetierwirtszelle und das Fusionieren der beiden Zellen, um eine Hybridzelle zu bilden. Die Hybridzelle exprimiert einen Antikörper, der die schwere Kette und die leichte Kette enthält. Zusätzliche nützliche Vorgehensweisen, d. h. ein Verfahren zur Identifizierung eines klinisch relevanten Epitops auf einem Immunogen, und ein korrelatives Verfahren zur Auswahl eines Antikörpers, der immunspezifisch an das relevante Epitop mit hoher Affinität bindet, sind in der PCT-Veröffentlichung WO 99/53049 offenbart.

#### F<sub>ab</sub>-Fragmente und Single-Chain-Antikörper

**[0069]** Techniken können zur Herstellung von Single-Chain-Antikörpern an ein antigenes Protein spezifisch angepasst werden (Siehe US-Patent Nr. 4,946,778). Zusätzlich können Verfahren zum Aufbau von F<sub>ab</sub>-Expressionsbibliotheken angepasst werden (Siehe z. B. Huse et al. (1989) Science 246: 1275–1281), um schnelle und effektive Identifikation von monoklonalen F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit der gewünschten Spezifität für ein Protein oder Derivate, Fragmente, Analoga oder Homologe davon zu ermöglichen. Antikörperfragmente, die die Idiotypen eines Proteinantigens enthalten, können mit Techniken hergestellt werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt: (i) ein F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>-Fragment, das durch Pepsindigestion eines Antikörpermoleküls hergestellt wird; (ii) ein F<sub>ab</sub>-Fragment, das durch Reduktion der Disulfidbrücken eines F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>-Fragments erzeugt wird; (iii) ein F<sub>ab</sub>-Fragment, das durch die Behandlung des Antikörpermoleküls mit Papain und einem Reduktionsmittel erzeugt wird und (iv) F<sub>v</sub>-Fragmenten.

#### Immunkonjugate

**[0070]** Die hierin beschriebenen Antikörper können mit einem Mittel konjugiert werden, wie z. B. einem chemotherapeutischen Mittel, einem Bildgebungsmittel, einem Toxin (z. B. einem enzymatisch aktiven Toxin aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder tierischen Ursprungs oder Fragmenten davon, oder einem radioaktiven Isotop (d. h. ein Radiokonjugat).

**[0071]** Zu enzymatisch aktiven Toxinen und Fragmenten davon, die verwendet werden können, gehören Diphtherie-A-Kette, nicht-bindende aktive Fragmente des Diphtherie-Toxins, Exotoxin-A-Kette (aus *Pseudomonas aeruginosa*), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, Alpha-Sarcin, Aleurites fordii Proteine, Dianthin Proteine, Phytolaca Americana Proteine (PAPI, PAPII, und PAP-S), Momordica-Charantia-Inhibitor, Curcin, Croton, Saponaria-officinalis-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Trichothecene. Eine Vielzahl von Radionuklidern steht für die Herstellung von radiokonjugierten Antikörpern zur Verfügung. Beispiele beinhalten <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y und <sup>186</sup>Re.

**[0072]** Konjugate des Antikörpers und des cytotoxischen Mittels können mithilfe einer Vielzahl von bifunktionalen Proteinkopplungsmitteln hergestellt werden, wie z. B. N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithiol)propionat (SPDP), Iminoethanol (IT), bifunktionale Derivate von Imidoestern (wie z. B. Dimethyladipimidat HCL), aktive

Ester (wie z. B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyde (wie z. B.

**[0073]** Glutaraldehyd), Bis-Azidverbindungen (wie z. B. Bis-(p-Azidobenzoyl)hexandiamin), Bis-Diazonium-derivate (wie z. B. Bis-(p-Diazoniumbenzoyl)-ethylendiamin), Diisocyanate (wie z. B. Tolyen 2,6-diisocyanat) und Bis-aktive Fluorverbindungen (wie z. B. 1,5-Difluor-2,4-Dinitrobenzol). Z. B. kann ein Ricin-Immunotoxin wie in Vitetta et al., (1987) Science 238: 1098 beschrieben hergestellt werden. Kohlenstoff-14-markierte 1-Isothiocyanatobenzyl-3-Methyldiethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein exemplarischer Chelatbildner zur Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe WO94/11026.

**[0074]** Die hierin beschriebenen Antikörper können außerdem mit einem Bildgebungsreagenz, das ein nachweisbares Signal bildet, markiert werden. Bildgebungsreagenzien und Vorgehensweisen zur Markierung von Antikörpern mit solchen Reagenzien sind wohl bekannt (siehe z. B., Wensel and Meares, Radio Immunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York, (1983); Colcher et al., Meth. Enzymol. (1986) 121: 802–16. Der markierte Antikörper kann mit auf dem Fachgebiet anerkannten Techniken, einschließlich z. B. radionuklearem Scan nachgewiesen werden (siehe z. B. Bradwell et al., in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (Hrsg.) S. 65–85, Academic Press (1985)).

#### Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0075]** Die hierin beschriebenen Antikörper können einem Säugetierindividuum, z. B. einem Menschen verabreicht werden, um Nierenzellen darzustellen oder um Störungen, die die Nierenzellen betreffen, zu behandeln. Die Antikörper können allein oder in einer Mischung verabreicht werden. Zum Beispiel können die Antikörper in Gegenwart eines pharmazeutisch zulässigen Hilfsstoffes oder Trägers, wie z. B. physiologische Kochsalzlösung verabreicht werden. Der Hilfsstoff oder Träger wird auf Grundlage der Verabreichungsart und des Verabreichungswegs ausgewählt. Geeignete pharmazeutische Träger sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W. Martin) und in der USP/NF (United States Pharmacopeia und der National Formulary) beschrieben. Eine pharmazeutische Zusammensetzung wird so formuliert, dass sie mit dem beabsichtigten Verabreichungsweg kompatibel ist. Beispiele für Verabreichungswege beinhalten z. B. intravenöse, intradermale, subkutane, orale (z. B. Inhalation), transdermale (topische), transmukosale und rektale Verabreichung. Lösungen oder Suspensionen, die zur parenteralen, intradermalen oder subkutanen Verabreichung verwendet werden, können die folgenden Bestandteile enthalten: ein steriles Verdünnungsmittel, wie z. B. Wasser zu Injektionszwecken, Kochsalzlösung, fette Öle, Polyethylenglykole, Glycerin, Polypropylenglykol oder andere synthetische Lösungsmittel, antibakterielle Mittel, wie z. B. Benzylalkohol oder Methylparabene, Antioxidanzien, wie z. B. Ascorbinsäure oder Natriumbisulfid, Chelatbildner, wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure, Puffer, wie z. B. Acetat, Citrat oder Phosphat und Mittel zur Einstellung des Tonus, wie z. B. Natriumchlorid oder Dextrose. Der pH-Wert kann mit Säuren oder Basen eingestellt werden, wie z. B. Salzsäure oder Natriumhydroxid. Die parenterale Zubereitung kann in Ampullen, Einwegspritzen oder Mehrfachdosen-Phiole aus Glas oder Plastik aufbewahrt sein.

**[0076]** Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung können eine „therapeutisch wirksame Menge“ umfassen oder „eine prophylaktisch wirksame Menge“ eines Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids der Erfindung. Wie hierin verwendet bedeutet „therapeutisch wirksame Menge“ eine Menge, die in notwendigen Dosen und Zeiträumen wirksam ist, das erwünschte therapeutische Ergebnis zu erreichen. Eine therapeutisch wirksame Menge des Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids kann gemäß Faktoren wie Krankheitszustand, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit des Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids, die gewünschte Reaktion bei einem Individuum hervorzurufen, variieren. Wenn eine therapeutisch wirksame Menge verabreicht wird, werden jegliche toxische oder nachteilige Wirkungen des Antikörpers, Antikörperderivats oder antigenbindenden Polypeptids durch die therapeutisch nützliche Wirkung aufgewogen. Wie hierin verwendet, bedeutet „prophylaktisch wirksame Menge“ eine Menge, die in notwendigen Dosen und Zeiträumen wirksam ist, das erwünschte prophylaktische Ergebnis zu erreichen. Da eine prophylaktische Dosis Individuen vor Einsetzen der Krankheit verabreicht wird, ist die prophylaktisch wirksame Menge typischerweise geringer als die therapeutisch wirksame Menge.

**[0077]** Dosisregimes können angepasst werden, die optimale gewünschte Reaktion bereitzustellen, z. B. eine therapeutische oder prophylaktische Reaktion. Zum Beispiel wird in einigen Ausführungsformen der Erfindung ein Einzelbolus verabreicht. In anderen Ausführungsformen werden mehrere geteilte Dosen über einen Zeitraum verabreicht. Die Dosis kann proportional reduziert oder erhöht werden, je nach Indikation durch die Erfordernisse der Situation. Es ist von Vorteil, parenterale Zusammensetzungen zur erleichterten Verabreichung und Einheitlichkeit der Dosierung in Form von Dosierungseinheiten zu formulieren. Wie hierin verwendet be-

deutet „in Form von Dosierungseinheiten“ physikalisch getrennte Einheiten, die als einheitliche Dosen für die zu behandelnden Säugetierindividuen geeignet sind, wobei jede eine vorgegebene Menge an Wirkstoff enthält, von der errechnet wurde, dass sie im Zusammenhang mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger, die gewünschte therapeutische Wirkung erbringt.

**[0078]** Eine beispielhafte, nicht-einschränkende Bandbreite für eine therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Menge eines Antikörpers oder Antikörperabschnitts der Erfindung liegt bei 0,1–100 mg/kg, bevorzugt 0,5–50 mg/kg, mehr bevorzugt 1–20 mg/kg und noch mehr bevorzugt 1–10 mg/kg. Dosierungswerte können mit der Art und Schwere der behandelten Krankheit variieren. Für jedes einzelne Individuum sollten spezifische Dosisregimes über einen Zeitraum gemäß dem individuellen Bedürfnis und der professionellen Einschätzung der Person, die die Verabreichung der Zusammensetzungen durchführt oder überwacht, eingestellt werden. Es muss verstanden werden, dass die hierin aufgeführten Dosisbandbreiten nur beispielhaft sind und nicht beabsichtigen, den Umfang der beanspruchten Erfindung einzuschränken.

**[0079]** Parenterale injizierbare Verabreichung wird allgemein für subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektionen und Infusionen eingesetzt. Zusätzlich verwendet ein Ansatz zur parenteralen Verabreichung die Implantation eines Systems mit langsamer oder konstanter Wirkstofffreisetzung, welches einen konstanten Dosispiegel aufrechterhält, gemäß US Pat. Nr. 3,710,795, welches durch Bezugnahme hierin aufgenommen ist.

**[0080]** Im Allgemeinen handelt es sich bei einem geeigneten Individuum um ein Säugetier, dem ein KIM-1 Antikörper verabreicht werden kann. Zu Individuen, die insbesondere zur Behandlung vorgesehen sind, gehören Menschen, nicht-humane Primaten, Schafe, Pferde, Rinder, Ziegen, Schweine, Hunde, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Wüstenrennmäuse, Ratten und Mäuse.

**[0081]** Zu Nierenerkrankungen, die von der Behandlung profitieren, gehören solche, bei denen die Inhibition der Freisetzung von löslichem KIM-1 aus einer Zelle, die ein KIM-1-Zelloberflächenprotein exprimiert, die Erkrankung lindern kann. Beispiele für solche Erkrankungen sind Nierenkrebs oder Nierenverletzung, einschließlich Nierenkrebsarten wie Nierenzellkarzinome. Zu weiteren Erkrankungen gehören z. B. Nierenversagen, chronisches Nierenversagen, akute Nephritis, nephritisches Syndrom, Nierenkanälchendefekte, Nierentransplantationen, toxische Verletzung, hypoxische Verletzung und Trauma. Zu den Nierenkanälchendefekten gehören jene erblicher oder erworbener Natur, wie z. B. polycystische Nierenerkrankung, Medullary Cystic Disease und medulläre Schwammniere.

#### Hinterlegungen

**[0082]** Ein Hybridom, welches den monoklonalen Antikörper ABE3.16 produziert, wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC) gemäß den Bedingungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren am 2. Mai 2001 hinterlegt und trägt die Zugangsnummer ATCC PTA-3350. Antragsteller verpflichten sich, das hinterlegte Material zu ersetzen, falls aufgrund des Zustands des hinterlegten Materials keine Probe von der Hinterlegungsstelle vor Ablauf des hierauf erteilten Patents auf Anfrage bereitgestellt werden kann. Antragsteller erklären sich außerdem damit einverstanden, dass sie für die Benachrichtigung des ATCC von der Erteilung eines solchen Patents verantwortlich sind, woraufhin das hinterlegte Material der Öffentlichkeit zugänglich gemacht wird. Zuvor wird das hinterlegte Material dem Präsidenten des Patentamtes gemäß 37 C.F.R. §1.14 und 35 U.S.C. §112 zur Verfügung gestellt.

**[0083]** Die Erfindung wird durch die folgenden experimentellen Beispiele weiter veranschaulicht. Die Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung und dürfen nicht als den Umfang oder den Inhalt der Erfindung einschränkend aufgefasst werden.

#### BEISPIEL 1: Erzeugung von anti-KIM-1-monoklonalen Antikörpern

**[0084]** Monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne eines humanen KIM-1-Polypeptids wurden erzeugt. Ein Konstrukt (KIM-1-Ig) wurde erstellt, in welchem die extrazelluläre Domäne von humanem KIM-1 (Reste 1-290) an den Fc-Abschnitt von humanem IgG1 (Hinge- CH2 + CH3 Domänen) angehängt und in ein Säugetier-Expressionsplasmid pEAG347 geklont wurde. Eine humane KIM-1(b) Vollängen-cDNA wurde durch RT-PCR mithilfe von mRNA aus der humanen Karzinomzelllinie 769-P und Primern basierend auf der veröffentlichten DNA-Sequenz erhalten (Feigelsstock et al. (1998) J. Virol. 72: 6621–28).

**[0085]** Die Sequenz der erhaltenen cDNA war identisch mit derjenigen der cDNA, die aus humaner Niere und

Leber gewonnen wurde. Das pEAG347-Expressionsplasmid enthält einen Tandempromoter (SV40 Early/Adenovirus Major late) zur konstitutiven Expression und das DHFR-Gen zur Methotrexat-Selektion von stabil exprimierenden Zelllinien. Transfizierte CHO-Zelllinien, die die Fusionsproteine exprimieren, wurden ausgewählt, in Suspension angepasst und in Fermentern gezüchtet.

**[0086]** Vier Mäuse wurden mit humanem KIM-1-Ig immunisiert. Die Erhöhung des Antikörpertiters gegen KIM-1 wurde durch enzymgebundene Immunadsorptionstests (ELISA) überwacht. Die ELISAs wurden auf 96-Well-Platten (MaxiSorb, Nunc) durchgeführt. Die Platten wurden durch Inkubation über Nacht bei 4°C mit 100 µl Antigen oder Fängerantikörper in 50 mM Natriumcarbonat bei pH 9,6 beschichtet. Verbleibende potentielle Adsorptionsstellen wurden dann mit BSA durch Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 400 µl PBS enthaltend 1% BSA blockiert. Die Platten wurden vier Mal mit PEST nach jedem Reaktionsschritt gewaschen. Meerrettichperoxidase-(HRP)konjugate wurden als sekundäre Nachweisreagenzien verwendet und die Farbreaktion wurde mit Tetramethylbenzidin ausgeführt.

**[0087]** Die Maus, die den höchsten serologischen Titer gegen KIM-1 aufwies, wurde identifiziert und mit KIM-1-Ig geboostert. Die Maus wurde dann geopfert, und ihre Milzzellen wurden mit FL653-Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:6 Milzzellen zu Myelomzellen fusioniert. Die Zellfusionen wurden auf 96-Well-Gewebskulturplatten in Selektionsmedium bei einer Dichte von  $10^5$  Zellen pro Well, einer Dichte von  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro Well oder einer Dichte von  $1,1 \times 10^4$  Zellen pro Well plattiert. Die Wells, die ein positives Ergebnis für Wachstum aufwiesen, wurden mit ELISA auf Expression von Antikörper gegen humanes KIM-1 gescreent und subkloniert. Am Ende der Selektion wurden die zehn Klone, die die stärkste Bindung aufwiesen, zurückbehalten und durch ELISA und Western Blot Analyse charakterisiert. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

KLON	AUF1	ASG1	ACA1 2	ABE3	ATE11	AMC1 2	AKG7	BIE6	AWE2	ARD5
Isotyp	Glk	G2b	Glk	Glk	Glk	Glk	Glk	Glk	Glk	Glk
ELISA bei hKIM-1-Ig	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ELISA bei hKIM-1(mu cinminus)-Ig	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+
Western blot KIM-1-Ig reduziert	–	–	+	+	+	–	+	–	–	–
Western Blot hKIM-1-Ig nicht reduziert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**[0088]** Vier Hybridomklone (ABE3, ACA12, AKG7 und ARD5) wurden in der Peritonealhöhle von Mäusen gezüchtet. Die Aszitesflüssigkeit wurde aufgefangen, und jeder Antikörper wurde durch Chromatographie mithilfe von Protein-A-Sepharose gereinigt. Biotinyliertes AKG7 wurde durch Direktbindung des aminoreaktiven Sulfo-NHS-LC-Biotins (Pierce) hergestellt.

#### Beispiel 2: Identifizierung von bindenden Epitopen von anti-KIM-1 monoklonalen Antikörpern

**[0089]** Die von Hybridomen produzierten monoklonalen Antikörper ABE3, ACA12, AKG7 und ATE11 konnten nicht an ein KIM-1 Fusionsprotein, dem die Mucindomäne (hKIM-1(mucin-min)-Ig) fehlte, binden. Die Ergebnisse zeigten, dass die bindenden Epitope für diese Antikörper zumindest teilweise in der Mucindomäne liegen. Zusätzlich waren diese vier Antikörper die einzigen Antikörper, bei denen eine Reaktion mit reduziertem denaturierten hKIM-1-Ig auf einem Western Blot beobachtet wurde. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Epitope für diese Antikörper einem einzelnen Abschnitt von Aminosäureresten in der primären Prote-

instruktur entsprechen.

**[0090]** Bindende Epitope wurden durch Messung der Bindung der Antikörper an acht überschneidende synthetische 18-mer Peptide identifiziert, wobei der Startpunkt bei KIM-1-Rest 210 lag, welcher innerhalb der Mucindomäne liegt und der Endpunkt bei Rest 290, dem letzten Rest der extrazellulären Domäne. Die in den Bindungsstudien eingesetzten Peptide werden in **Abb. 1A** im Vergleich zur KIM-1-Polypeptidsequenz dargestellt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in **Abb. 1B** für die monoklonalen Antikörper ACA12, AKG7 und ABE3 dargestellt. Sowohl AKG7 als auch ACA12 sind an die Peptide 45 und 46 gebunden, obwohl sie sich in ihren jeweiligen Bindungsaffinitäten unterscheiden. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass beide Antikörper an eine Sequenz banden, die LQGAIIRREP (SEQ ID NO: 3) beinhaltet, welches eine 9-Restsequenz ist, die den Peptiden 45 und 46 (**Abb. 1A**) gemeinsam ist. Dieser Peptidsequenz fehlten die mutmaßlichen Stellen für sowohl N-gebundene als auch O-gebundene Glykolisierung, was darauf hindeutete, dass ACA12 und AKG7 sowohl glykolisierte als auch nicht-glykolisierte Formen des KIM-1-Polypeptids erkannten.

**[0091]** Der monoklonale Antikörper ABE3 band an Peptid #49, wies aber keine wesentliche Bindung weder an Peptid #48 noch #50 auf. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass das bindende Epitop von ABE3 sich bei etwa DGLWNNNQ TQL (SEQ ID NO: 1) befindet. Diese Sequenz beinhaltet eine potentielle Glykolisierungsstelle zumindest am letzten Asparaginrest. Da ABE3 jedoch an synthetische Peptide ebenso wie an verschiedene glykolisierte Formen von KIM-1 band, wurde geschlussfolgert, dass die Bindung von ABE3 hauptsächlich an einen Peptidteil erfolgt.

### Beispiel 3: Identifizierung einer freigesetzten Form eines KIM-1-Polypeptids

**[0092]** Dieses Beispiel zeigte, dass lösliche Formen von KIM-1-Polypeptiden aus KIM-1-exprimierenden Zellen freigesetzt werden.

**[0093]** Drei Nierenzelllinien und eine humane Leberzelllinie wurden mit Western Blot auf Expression von KIM-1 hin analysiert. Die verwendeten Zelllinien waren 293 (embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus: CRL-1573), HK2 (humane proximale tubuläre Nierenzellen, transduziert mit HPV-16; CRL-2190), 769-P (humanes Nierenzelladenokarzinom; CRL-1933) und HepG2 (hepatozelluläres Karzinom; HB-8065). Proteine aus Zellextrakten oder konditionierten Medien wurden mit Western Blot analysiert und mit dem monoklonalen Antikörper ABE3, dem monoklonalen Antikörper AKG7 oder einem gegen den carboxyterminalen Abschnitt des KIM-1(b)-Proteins erzeugten polyklonalen Kaninchenantikörper sondiert. Der polyklonale Kaninchenantikörper wurde gegen ein synthetisches Peptid (CKEVQAEDNIYIENSLYATD (SEQ ID NO: 4); Research Genetics), das mit den letzten 19 Aminosäureresten am C-Terminus des humanen KIM-1(b)-Proteins korrespondiert, und gegen einen zusätzlichen Cysteinrest zur Konjugation erzeugt. Das Peptid wurde mit dem maleimindaktivierten KLH (Pierce) konjugiert und das Konjugat wurde zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Antiseren wurden nach mehreren Immunisierungen gewonnen.

**[0094]** Das konditionierte Medium und die Zellen wurden bei etwa 90% Zellkonfluenz geerntet. Die Zellen wurden mit PBS gespült und in eiskalter PBS, welche 5 mM EDTA und einen Cocktail von Proteaseinhibitoren (Boehringer Mannheim, Mini tablet) enthielt, mit einem Gummiwischer abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert und lysiert durch Resuspension in 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5, 1% NP-40 mit Proteaseinhibitoren (20 µl Lysislösung pro mg Zellpellets).

**[0095]** Nach 5 Min. auf Eis wurde das unlösliche Material durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 16000 g gewonnen und der Überstand wurde mit 2× reduzierendem Ladepuffer gemischt. Ein Aliquot von jedem konditionierten Medium wurde ebenfalls mit einem gleichen Volumen an 2× reduzierendem Ladepuffer gemischt.

**[0096]** Für SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurden Proteinproben mit reduzierendem Ladepuffer gemischt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Reduzierte und denaturierte Proteine wurden dann durch SDS-PAGE auf 4–20% Polyacrylamidgelen getrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosefolie übertragen. Der Blot wurde mit einer 5%igen fettlosen Trockenmilchlösung (Carnation) in PEST blockiert und in derselben Lösung mit den murinen monoklonalen Antikörpern AKG7, ABE3 oder ACA12 (bei 1 µg/ml) oder mit dem gegen das C-terminale Peptid von KIM-1(b) erzeugten polyklonalen Kaninchenantiserum (1000-fach verdünnt) sondiert, gefolgt von entweder Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern konjugiert mit Meerrettichperoxidase. Waschungen zwischen den Schritten wurden mit PEST durchgeführt. Reaktive Banden traten durch Chemolumineszenz hervor.

**[0097]** Western Blot Analyse der zellulären Extrakte mithilfe von ABE3 (**Abb. 2A**) zeigte die Expression von

KIM-1 in der Nierenzellkarzinomzelllinie (lane 3) ebenso wie in der transformierten proximal tubulären Nierenzelllinie HK2 (lane 2); eine große Bande bei etwa 100 kDa ebenso wie zwei andere Banden bei etwa 70 kDa und 50 kDa wurden entdeckt. Dieses Muster ähnelte dem zuvor beobachteten Expressionsmuster für das Ratten KIM-1-Protein, das ebenso als drei unterschiedliche Banden nach SDS-PAGE (Ichimura et al., J. Biol. Chem. 273: 4135–42) in Erscheinung trat. Die gleichen drei Banden wurden auch bei einem polyklonalen Antiserum beobachtet, das gegen ein synthetisches Peptid, das mit dem C-Terminus von humanen KIM 1(b) korrespondiert, erzeugt wurde (**Abb. 2B**).

**[0098]** Expression von KIM-1 konnte nicht in der transformierten embryonalen Nierenzelllinie 293 oder in der Hepatokarzinomzelllinie HepG2 nachgewiesen werden. Obwohl die erwartete Größe für das humane KIM-1-Polypeptid 36 kDa beträgt, wird erwartet, dass die Proteinbande bei einem weit höheren scheinbaren Molekulargewicht nachgewiesen wird, da das Protein vier potentielle Stellen für die N-Glykolisierung und multiple O-Glykolisierungsstellen aufweist.

**[0099]** Zelloberflächenbiotinylierung von 769-P-Zellen zeigte, dass die 100 kDa KIM-1 Bande das aktuelle Zelloberflächenprotein war. Die anderen Banden korrespondierten höchstwahrscheinlich mit KIM-1 verarbeitenden Zwischenprodukten, die den Golgi-Apparat durchlaufen.

**[0100]** Western Blot Analysen der konditionierten Kulturmedien, welche den monoklonalen Antikörper AKG7 (**Abb. 2C**) einsetzten, wiesen die Anwesenheit eines löslichen KIM-1-Proteins nach, das bei etwa 90 kDa wanderte. Die 90 kDa-Bande wurde außerdem mit dem monoklonalen Antikörper ACA12, aber nicht mit dem monoklonalen Antikörper ABE3 oder anti-KIM-1(b)-C-terminalen Antikörpern nachgewiesen. Eine Proteinbande bei etwa 14 kDa wurde ebenfalls mit dem anti-KIM-1(b)-C-Terminus-Serum nachgewiesen. Obwohl diese Bande möglicherweise in keinem Zusammenhang mit KIM-1 steht, ist es auch möglich, dass die 14 kDa Bande das C-terminale Produkt einer Zelloberflächenspaltung von KIM-1(b) darstellt.

**[0101]** Die Größenverminderung um 10 kDa kann ebenso wie der Verlust der ABE3-Bindung das Ergebnis einer proteolytischen Zelloberflächenspaltung sein, die eine lösliche Form in das extrazelluläre Milieu freisetzt. Alternativ könnte die lösliche Form von einem alternativen Spleißereignis stammen, bei welchem dem durch das alternative Spleißen produzierten Protein die transmembranen und cytoplasmatischen Domänen fehlten.

**[0102]** Zum Überprüfen der Möglichkeit, dass die lösliche humane 90 kDa-KIM-1-Form aus alternativem Spleißen von KIM-1-mRNA stammen könnte, wurde rekombinantes humanes KIM-1 aus einem KIM-1-cDNA-Konstrukt exprimiert (**Abb. 3A–3C**). KIM-1(b)-cDNA wurde in einem Vektor zur konstitutiven Überexpression (pEAG347) in Säugerzellen geklont. Das resultierende Plasmid phKIM1.2 und pEAG347 wurden zur Transfektion von COS-7 Zellen verwendet. Transformierte Zellen wurden gezüchtet bis zum Erreichen von Konfluenz (etwa 4 Tage nach Transfektion). Aliquots von konditioniertem Medium von KIM-1-exprimierenden Zellen wurden nach 1 und 2 Tagen genommen. Am Tag 4 wurden die konditionierten Medien geerntet und die Zellen wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben verarbeitet, um den Zellextrakt zu gewinnen. Die Proben wurden mit Western Blot mit AKG7 (**Abb. 3A**), ABE3 (**Abb. 3B**) oder gegen den C-Terminus von hKIM-1(b) erzeugtem polyklonalen Antikörper (**Abb. 3C**) analysiert.

**[0103]** Analog zum beobachteten Muster mit nativem humanen KIM-1 aus Nierenzelllinien erschien das rekombinante KIM-1(b) als mehrere Banden, die mit den verschiedenen posttranslational modifizierten Formen des Proteins korrespondierten. Die Analyse des Zellkulturüberstands, der AKG7 verwendete zeigte ebenfalls sehr deutlich, dass eine lösliche Form von KIM-1 freigesetzt wurde und sich im Zellmedium ansammelte. Das freigesetzte rekombinante KIM-1 wurde wie das lösliche native KIM-1 nicht mit anti-hKIM-1(b)-C-terminalen Antikörpern nachgewiesen. Es wurde auch nicht mit ABE3 nachgewiesen, obwohl manchmal eine schwache Bande bei hoher Proteinkonzentration beobachtet wurde. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass ein Teil des Epitops nach Spaltung übrig blieb und eine schwache Bindung des Antikörpers ermöglichte. Eine 14 kDa-Bande wurde außerdem im zellulären Extrakt ausschließlich mit den anti-hKIM-1(b)-C-terminalen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen.

**[0104]** Zusammen zeigten diese Daten, dass lösliches KIM-1 in das extrazelluläre Milieu durch proteolytische Spaltung an einer Stelle proximal zur transmembranen Domäne freigesetzt wurde und sich mit dem ABE3-bindenden Epitop überschneidet. N-terminale Sequenzanalyse durch Edman-Degradierung des löslichen KIM-1, das durch Immunpräzipitation und SDS-PAGE isoliert wurde, identifizierte die Sequenz SVKVGGEAGPXVXLX (SEQ ID NO: 5), was darauf hindeutete, dass entweder die tatsächliche Signalsequenz um vier Reste länger ist als die vorhergesagte Signalsequenz, die durch das Verfahren von Heijne unter Einsatz des PSORT II-Programms bestimmt wurde, oder dass der N-Terminus nach Entfernen des Signalpeptids abgeschnitten wird.

## Beispiel 4: Inhibierung der Freisetzung von KIM-1-Polypeptid mit monoklonalem Antikörper ABE3

**[0105]** Zur Untersuchung der Wirkung des monoklonalen Antikörpers ABE3 auf die proteolytische Freisetzung von KIM-1 wurden COS-7 Zellen, die vorübergehend humanes KIM-1(b) exprimieren, 2 Tage lang in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von ABE3 oder Maus IgG als negative Kontrolle gezüchtet ([Abb. 4](#)).

**[0106]** Zur vorübergehenden Expression von humanem rekombinanten KIM-1(b) wurden COS-7-Zellen durch Elektroporation mit 10 µg Plasmid-DNA pro 10<sup>6</sup> Zellen transfiziert. Transfizierte Zellen wurden plattiert und in DMEM mit 4 mM Glutamin und 10% fötalem Rinderserum gezüchtet. Nach 4-stündiger Inkubation, um den Zellen das Anheften zu ermöglichen, wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Die Zellkonfluenz betrug zu dem Zeitpunkt etwa 20%. Für die Studien zur Inhibierung der Freisetzung wurden transfizierte Zellen in Wells von 12-Well-Platten plattiert und in Medium gezüchtet, dem verschiedene Konzentrationen von ABE3 oder Maus IgG (Sigma) als negative Kontrolle beigegeben wurde. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach 2 Tagen der Inkubation wurden die konditionierten Medien aus den Wells entnommen, durch Zentrifugation geklärt und mit ELISA mithilfe von gereinigtem KIM-1-Ig als Standard untersucht. Die Ergebnisse sind in ABB 4 dargestellt. Während die Hinzugabe von nicht-spezifischem Maus-IgG die Menge an löslichem KIM-1 im Medium nicht beeinflusste, gab es eine signifikante Verminderung von löslichem KIM-1, wenn ABE3 im Medium vorhanden war. Es ist daher möglich, die proteolytische Freisetzung von KIM-1 partiell durch kompetitive Bindung an den Antikörper ABE3 zu inhibieren. Dies bestätigte, dass die KIM-1-Spaltungsstelle an oder in der Nähe der Bindungsstelle von ABE3 liegt.

**[0107]** Es ist vorstellbar, dass die Freisetzung von löslichem KIM-1 das Ergebnis einer hohen Sensibilität des KIM-1 gegenüber nicht-spezifischen Proteasen an der ABE3-Bindungsstelle sein könnte. Jedoch wurde keine Spaltung eines C-Terminus eines rekombinanten löslichen KIM-1 beobachtet, das mit der gesamten extrazellulären Domäne mit 6 Histidinresten am C-Terminus korrespondiert und vorübergehend im selben Medium wie das Volllänge KIM-1 exprimiert wird.

## Beispiel 5: Inhibierung der KIM-1-Polypeptidfreisetzung mit Metalloproteinaseinhibitoren

**[0108]** Metalloproteinasen (MMPs) oder eine Disintegrin- und Metalloproteinase (ADAMs) wurden zur spezifischen Spaltung von Zelloberflächenproteinen eingesetzt. Die Wirkung der beiden MMP-Inhibitoren auf die Spaltung von KIM-1-Polypeptiden wurde untersucht.

**[0109]** BB-94 (Batimastat) und GM6001 (Ilomastat) sind zwei Zink-Metalloproteinaseinhibitoren auf der Basis von Hydroxamsäure mit breitem Wirkspektrum, welche verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMP) inhibieren (20). BB-94 ist außerdem ein hochwirksamer Inhibitor von TACE (TNF-alpha-konvertierendes-Enzym) (18). Die Aktivität dieser beiden Inhibitoren auf die Freisetzung von KIM-1 in Zellkultur wurde untersucht.

**[0110]** Stammlösungen von BB-94 und GM6001 wurden in DMSO in einer Konzentration von 70 mM für BB-94 und 2,5 mM für GM6001 aufrechterhalten. Die Zusammensetzungen wurden direkt in das frische Medium auf Konzentrationen zwischen 0,5 µM und 32 µM verdünnt. Nierenkarzinomzellen 769-P wurden in RPMI-Medium, dem 10% fötales Rinderserum, 10 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat hinzugefügt wurde, und in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von BB-94 und GM6001 28 Stunden lang gezüchtet. Das Fehlen von Zytotoxizität der beiden Verbindungen wurde durch Überprüfung der Zelllebensfähigkeit am Ende des 28-stündigen Kulturzeitraums mithilfe des Mitochondrienfarbstoffs MTT (19)(21) festgestellt. Die Menge an löslichem KIM-1, die in das extrazelluläre Milieu während des 28-stündigen Zeitraums freigesetzt wurde, wurde mit ELISA ([Abb. 5](#)) gemessen.

**[0111]** Eine vollständige Inhibierung der KIM-1-Freisetzung wurde in Gegenwart von 32 µM eines der beiden MMP-Inhibitoren erreicht. BB-94 schien bei einem IC<sub>50</sub> von etwa 1 µM leicht wirksamer zu sein im Vergleich zu GM6001 für welches der IC<sub>50</sub> bei etwa 4 µM lag. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Spaltung von KIM-1 durch eine Metalloproteinase vermittelt wird, möglicherweise ein Mitglied der MMP- oder der ADAM-Familien. Weitere Ausführungsformen sind Bestandteil der folgenden Ansprüche.

## SEQUENZLISTE

<110> Biogen, Inc.

<120> Moleküle und Verfahren zur Inhibierung der Freisetzung von KIM-1

<130> 00689-512-061

<140> Noch nicht zugewiesen

<141> 2002-05-31

<150> 60/295,449

<151> 2001-06-01

<150> 60/295,907

<151> 2001-06-04

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu  
 1 5 10 15

His Ser

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro  
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Konsensussequenz

<400> 3

Leu Gln Gly Ala Ile Arg Arg Glu Pro  
 1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT



2/5

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: chemisch synthetisiertes Polypeptid

&lt;400&gt; 4

Cys Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Glu Asn Ser Leu  
 1 5 10 15

Tyr Ala Thr Asp  
 20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANTE

&lt;222&gt; (11)

&lt;223&gt; Wobei Xaa eine beliebige Aminosäure ist, wie in der Patentschrift definiert

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANTE

&lt;222&gt; (13)

&lt;223&gt; Wobei Xaa eine beliebige Aminosäure ist, wie in der Patentschrift definiert

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANTE

&lt;222&gt; (15)

&lt;223&gt; Wobei Xaa eine beliebige Aminosäure ist, wie in der Patentschrift definiert

&lt;400&gt; 5

Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Xaa Val Xaa Leu Xaa  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala Ile  
 20 25 30

Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp Gly  
 35 40 45

Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn Gln  
 50 55 60

Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr Lys

65

70

75

80

Gly

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 334

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp  
 1 5 10 15

Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val  
 20 25 30

Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn  
 35 40 45

Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr  
 50 55 60

Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala  
 85 90 95

Val Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp  
 100 105 110

Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys  
 115 120 125

Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val  
 130 135 140

Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr  
 145 150 155 160

Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr  
 165 170 175

Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro  
 180 185 190

Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro  
 195 200 205

Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro  
 210 215 220

Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala  
 225 230 235 240

Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp  
 245 250 255

Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn

260	265	270
Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr 275 280 285		
Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala 290 295 300		
Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val 305 310 315 320		
Gln Gln Leu Arg Pro His Lys Ser Cys Ile His Gln Arg Glu 325 330		
<210> 8		
<211> 359		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 8		
Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp 1 5 10 15		
Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val 20 25 30		
Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn 35 40 45		
Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr 50 55 60		
Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu 65 70 75 80		
Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala 85 90 95		
Val Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp 100 105 110		
Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys 115 120 125		
Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val 130 135 140		
Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr 145 150 155 160		
Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr 165 170 175		
Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro 180 185 190		
Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro 195 200 205		
Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro		

210					215					220					
Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Glu	Thr	His	Pro	Thr	Thr	Leu	Gln	Gly	Ala
225					230					235					240
Ile	Arg	Arg	Glu	Pro	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asp
				245					250					255	
Gly	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Ser	Asp	Gly	Leu	Trp	Asn	Asn	Asn
			260					265					270		
Gln	Thr	Gln	Leu	Phe	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala	Asn	Thr	Thr
			275				280					285			
Lys	Gly	Ile	Tyr	Ala	Gly	Val	Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Ala
290					295					300					
Leu	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Ala	Lys	Lys	Tyr	Phe	Phe	Lys	Lys	Glu	Val
305				310						315				320	
Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln
			325					330					335		
Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Asn	Ile	Tyr	Ile	Glu
			340				345					350			
Asn	Ser	Leu	Tyr	Ala	Thr	Asp									
			355												

### Patentansprüche

1. Ein Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon, die an die extrazelluläre Domäne von humanem KIM-1 an ein Epitop innerhalb SSDGLWNNQTLFLEHS (SEQ ID NO: 1) binden.
2. Ein Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon, die an die extrazelluläre Domäne von humanem KIM-1 binden und die Bindung des Antikörpers, der von dem Hybridoma produziert wird, das bei der ATCC unter der Zugangsnummer PTA-3350 hinterlegt wurde, kreuzblockieren.
3. Ein Antikörper, der von dem Hybridoma produziert wurde, das unter der Zugangsnummer PTA-3350 bei der ATCC hinterlegt wurde.
4. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
5. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper ein polyklonaler Antikörper ist.
6. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.
7. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper ein vollständig humaner Antikörper ist.
8. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper ein Single-Chain-Antikörper ist.
9. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon ein chimärer Antikörper, ein Fab Fragment, ein  $F_{(ab)2}$  Fragment, ein  $F_{ab}$  Fragment, ein Fragment, oder ein  $F_v$  Fragment ist.
10. Ein Konjugat, umfassend den Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gebunden an ein nachweisbares Label.

11. Ein Konjugat oder ein Fusionspolypeptid, umfassend den Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9, und einen Toxinrest.
12. Hybridoma ABE3, hinterlegt bei der ATCC unter der Zugangsnummer PTA-3350.
13. Eine Nukleinsäure, die für den monoklonalen Antikörper kodiert, der von dem Hybridoma nach Anspruch 12 produziert wird.
14. Eine Zusammensetzung, umfassend den Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
15. Ein in vitro Verfahren zur Hemmung der Freisetzung einer löslichen Form eines KIM-1 Polypeptids aus einer Zelle, das Verfahren umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Zelle, die ein KIM-1 Zelloberflächen-Polypeptid exprimiert, mit dem Antikörper oder einem antigenbindenden Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
16. Ein in vitro Verfahren zur Hemmung der Proteolyse eines KIM-1 Polypeptids, das Verfahren umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Zelle, die ein KIM-1 Zelloberflächen-Polypeptid exprimiert, mit dem Antikörper oder einem antigenbindenden Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
17. Das in vitro Verfahren nach Ansprüchen 15 oder 16, wobei die Zelle eine renale Zelle ist.
18. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Verwendung in der Therapie oder Diagnose.
19. Verwendung des Antikörpers oder eines antigenbindenden Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder zur Prävention einer renalen Erkrankung oder Verletzung in einem Säugetier.
20. Die Verwendung nach Anspruch 19, wobei die renale Erkrankung oder Verletzung renaler Krebs ist.
21. Die Verwendung nach Ansprüchen 19 oder 20, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

ABBILDUNG 1 A

210  
ACA12  
AKG7  
ABE3  
290  
MPLPRQNHVPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSTTDGNDIVTESSDGLWNNNQTLFLEHSLLTANTTKG  
#43 MPLPRQNHVPVATSPSSP  
#44 PVATSPSSPQPAETHPTT  
#45 QPAETHPTTLQGAIRREP  
#46 LQGAIRREPTSSPLYSTT  
#47 TSSPLYSTTDGNDIVTE  
#48 TDGNDIVTESSDGLWNNN  
#49 SSDGLWNNNQTLFLEHS  
#50 QTLFLEHSLLTANTTKG

ABBILDUNG 1B

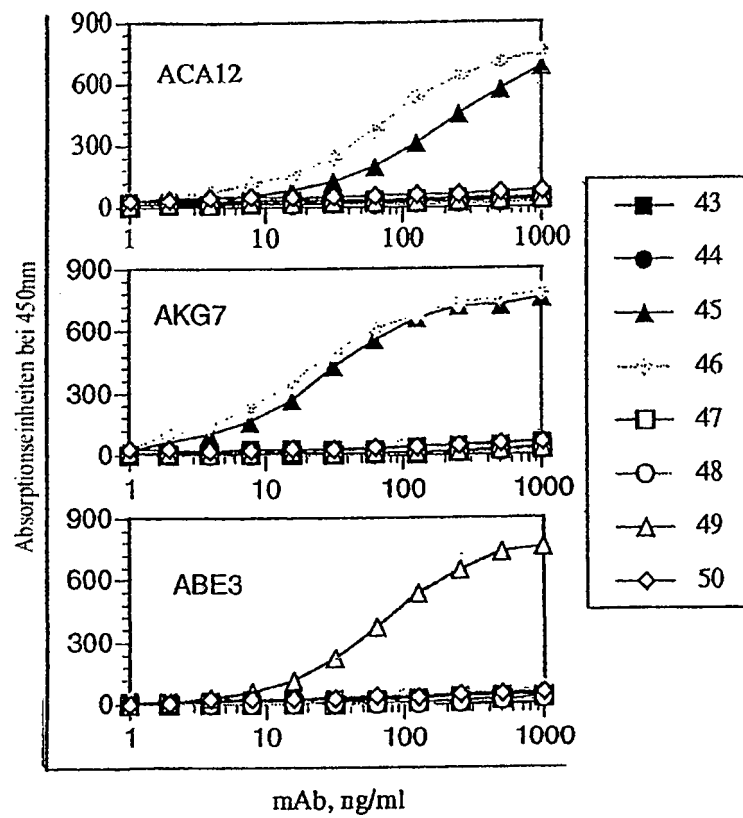


ABBILDUNG 2

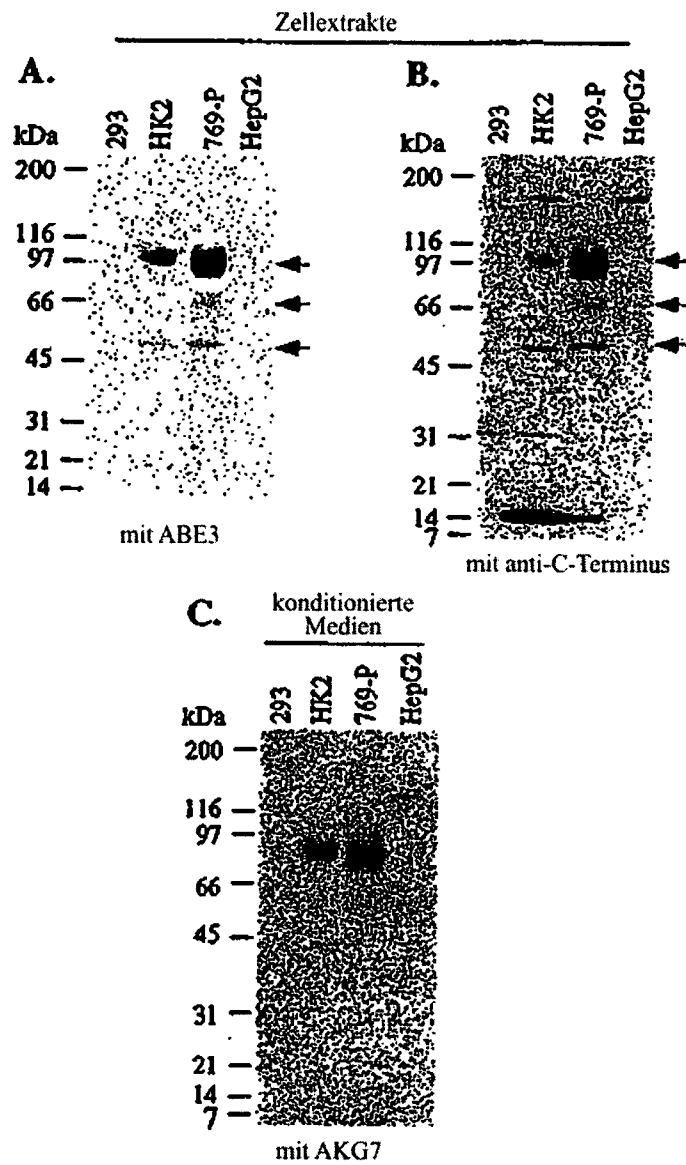




ABBILDUNG 3

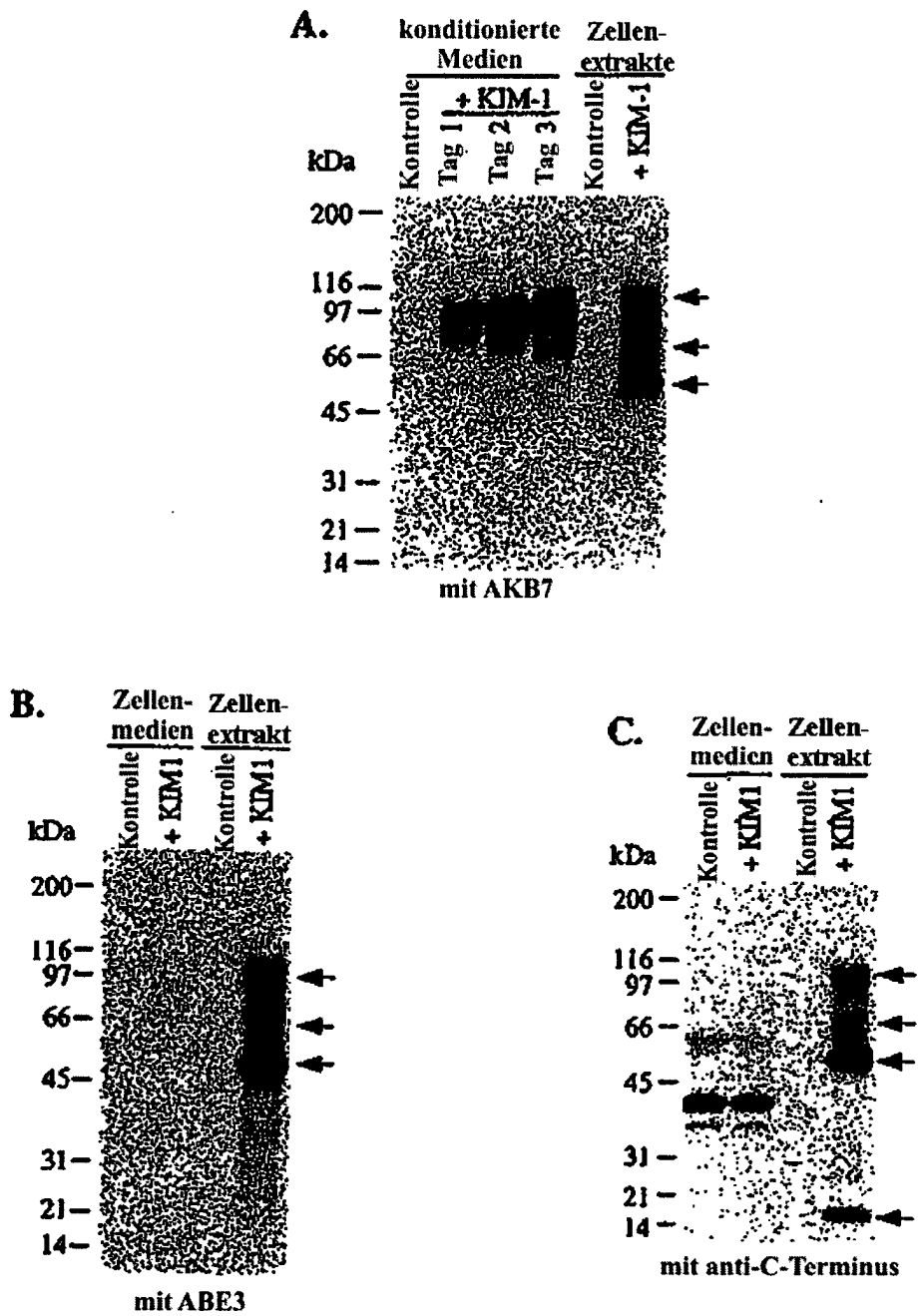


ABBILDUNG 4

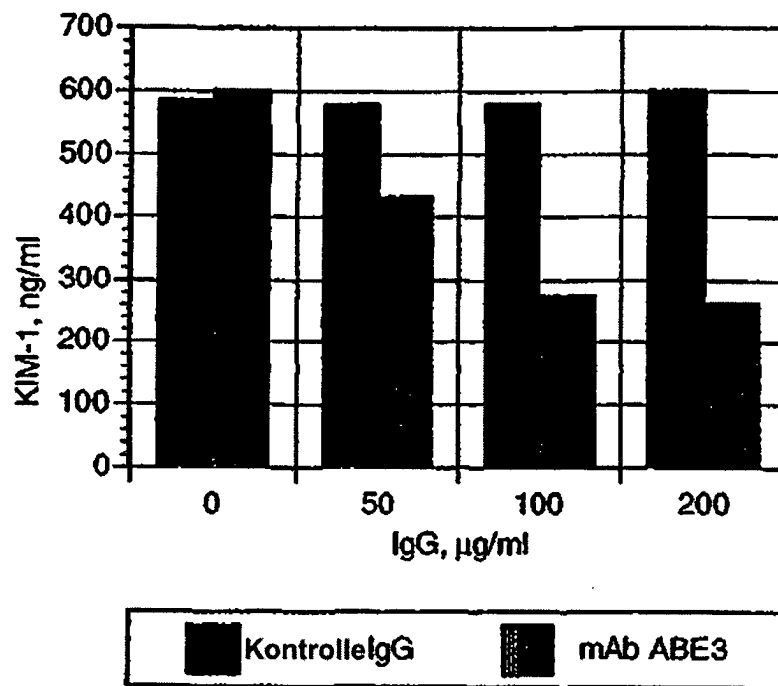
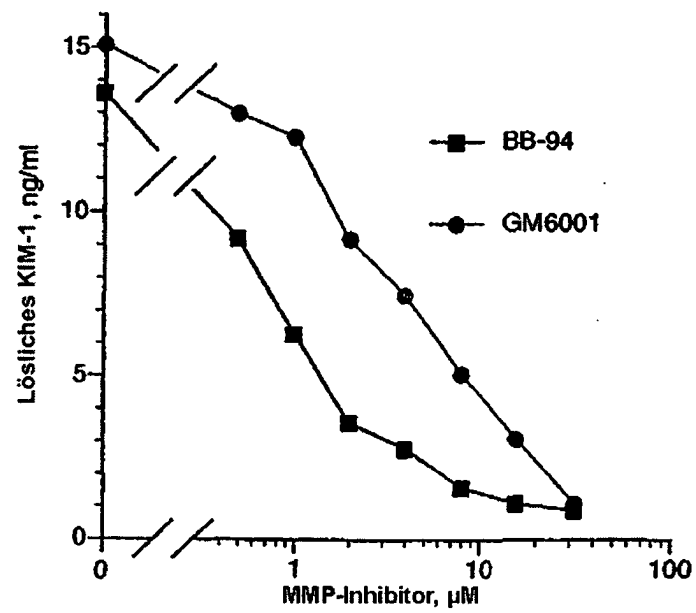


ABBILDUNG 5



**ABBILDUNGEN 6A UND 6B**

## A.

> humanes KIM-1 (a) 334 aa  
> humanes KIM-1 (b) (HAVcr-1) 359 aa

MHPOVVL<sup>1</sup>SLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTL<sup>2</sup>PC<sup>3</sup>HYS<sup>4</sup>GA<sup>5</sup>VTSMCWN<sup>6</sup>RGSCSL<sup>7</sup>FT<sup>8</sup>CQ<sup>9</sup>NG 60  
 IVW<sup>10</sup>NG<sup>11</sup>THV<sup>12</sup>YRK<sup>13</sup>DTRY<sup>14</sup>KLLGDL<sup>15</sup>SR<sup>16</sup>RDV<sup>17</sup>SL<sup>18</sup>TI<sup>19</sup>ENTAV<sup>20</sup>SDSGV<sup>21</sup>CCR<sup>22</sup>VEH<sup>23</sup>RGWF<sup>24</sup>N<sup>25</sup>DK<sup>26</sup>ITV 120  
 SL<sup>27</sup>EIV<sup>28</sup>PKV<sup>29</sup>IT<sup>30</sup>PI<sup>31</sup>VT<sup>32</sup>IV<sup>33</sup>PT<sup>34</sup>VT<sup>35</sup>VRT<sup>36</sup>ST<sup>37</sup>IV<sup>38</sup>PT<sup>39</sup>TT<sup>40</sup>VT<sup>41</sup>PT<sup>42</sup>VT<sup>43</sup>MT<sup>44</sup>SI<sup>45</sup>PT<sup>46</sup>TT<sup>47</sup>IV<sup>48</sup>PT<sup>49</sup>MT<sup>50</sup>VS 180  
 TT<sup>51</sup>TSV<sup>52</sup>PT<sup>53</sup>TS<sup>54</sup>IP<sup>55</sup>TT<sup>56</sup>SV<sup>57</sup>PT<sup>58</sup>TT<sup>59</sup>VS<sup>60</sup>T<sup>61</sup>VF<sup>62</sup>PM<sup>63</sup>PL<sup>64</sup>PR<sup>65</sup>ON<sup>66</sup>HE<sup>67</sup>PV<sup>68</sup>AT<sup>69</sup>SP<sup>70</sup>SS<sup>71</sup>PQ<sup>72</sup>PA<sup>73</sup>ETH<sup>74</sup>PT<sup>75</sup>LQ<sup>76</sup>GA 240  
 IRR<sup>77</sup>EPT<sup>78</sup>SS<sup>79</sup>PL<sup>80</sup>YS<sup>81</sup>TT<sup>82</sup>DG<sup>83</sup>IV<sup>84</sup>TES<sup>85</sup>SD<sup>86</sup>GL<sup>87</sup>WN<sup>88</sup>NG<sup>89</sup>QL<sup>90</sup>FL<sup>91</sup>EL<sup>92</sup>SL<sup>93</sup>TA<sup>94</sup>NG<sup>95</sup>K<sup>96</sup>GI<sup>97</sup>AG<sup>98</sup>VC<sup>99</sup>IS<sup>100</sup>VL 300

VLL<sup>101</sup>ALL<sup>102</sup>GV<sup>103</sup>I<sup>104</sup>AK<sup>105</sup>KY<sup>106</sup>FK<sup>107</sup>KE<sup>108</sup>VQ<sup>109</sup>QL { RPHK<sup>110</sup>SCI<sup>111</sup>HQ<sup>112</sup>RE 334  
 SVS<sup>113</sup>FSS<sup>114</sup>LQ<sup>115</sup>IK<sup>116</sup>AL<sup>117</sup>QNA<sup>118</sup>VE<sup>119</sup>KE<sup>120</sup>VQ<sup>121</sup>AED<sup>122</sup>NI<sup>123</sup>YI<sup>124</sup>ENS<sup>125</sup>LY<sup>126</sup>ATD 359

**B.**

