



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 34 228 T2 2007.10.04

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 092 027 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/12 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 34 228.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/13194

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 937 843.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/064595

(86) PCT-Anmeldetag: 09.06.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 16.12.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.04.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 29.11.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.10.2007

(30) Unionspriorität:

88656 P	09.06.1998	US
103088 P	05.10.1998	US
328199	08.06.1999	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

La Jolla Pharmaceutical Co., San Diego, Calif., US

(74) Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,  
80538 München

(72) Erfinder:

Marquis, David M., Encinitas, CA 92024, US;  
Iverson, Gilbert M., Del Mar, CA 92014, US;  
Victoria, Edward J., San Diego, CA 92014, US;  
Jones, David S., San Diego, CA 92127, US; Linnik,  
Matthew D., San Diego, CA 92130, US

(54) Bezeichnung: DOMÄNE 1 BETA2-GPI POLYPETIDEN UND DEREN DIAGNOSTISCHE UND THEREPEUTISCHE VERWENDUNGEN

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 eingelebt, 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****FACHGEBIET**

**[0001]** Dies Erfindung betrifft Konjugate und Polypeptide für die Diagnose und Behandlung von Antiphospholipid-Antikörper-assoziierten Krankheiten, insbesondere solchen Krankheiten, die mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern assoziiert sind.

**HINTERGRUND**

**[0002]** Antiphospholipid-(aPL)-Antikörper ist der Ausdruck, der im Allgemeinen für die Bezeichnung von Autoantikörpern verwendet wird, die mit Thrombose, wiederholten Fehlgeburten und Thrombozytopenie als dem primären Antiphospholipid-Syndrom (APS) wie auch mit Autoimmunkrankheiten, wie systemischem Lupus erythematoses (SLE), assoziiert sind. Harris et al., (1983) Lancet 2:1211–1214; und Lockshin et al. (1985) N. Engl. J. Med. 313:152–156. Das APS kann primär oder sekundär sein, was bedeutet, dass es mit weiteren Zuständen, hauptsächlich mit SLE, assoziiert ist. PHOSPHOLIPID-BINDING ANTIBODIES (Harris et al., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991: McNeil et al. ADVANCES IN IMMUNOLOGY, Bd. 49, Seiten 193–281 (Husten et al., Hrsg., Academic Press, San Diego, CA, 1991). aPL-Antikörper (einschließlich aCL-Antikörper) werden bei vielen Zuständen nachgewiesen, aber nur die  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper, die in Verbindung mit einer Autoimmunkrankheit festgestellt werden, erfordern die Gegenwart des Phospholipidbindenden Serumproteins  $\beta_2$ GPI. Vaarala et al. (1986) Clin. Immunol. Immunopathol. 41:8–15.

**[0003]** Ungefähr 30% der Patienten, die persistierende aPL-Antikörper aufweisen, haben ein thrombisches Ereignis erlitten. Das Vorhandensein von aPL-Antikörpern definiert eine Gruppe von Patienten innerhalb von SLE, die ein Syndrom klinischer Merkmale zeigen, welches eine oder mehrere Thrombosen, Thromozytopenie (TCP) und Fehlgeburten umfasst. Das Risiko für dieses Syndrom bei SLE liegt insgesamt bei etwa 25%; dieses Risiko steigt auf 40% bei Anwesenheit von aPL-Antikörpern und fällt auf 15% bei ihrer Abwesenheit. Weil von aPL-Antikörpern angenommen wird, dass sie gegen Phospholipide in Plasmamembranen gerichtet sind, ist postuliert worden, dass sie direkte pathogene Effekte in vivo durch ein Interferieren mit hämostatischen Prozessen hervorrufen, die auf Phospholipidmembranen von Zellen, wie Plättchen oder Endothel, stattfinden. Bei Patienten mit APS ist die Tatsache, dass die aPL-Antikörper (einschließlich aCL-Antikörper) der einzige vorhandene Risikofaktor zu sein scheinen, ein weiterer Beweis, dass diese Antikörper eine direkte pathogene Rolle spielen. Die Induktion von APS bei Mäusen durch einen passiven Transfer von humanen aPL-Antikörpern ist der beste Beweis, obgleich die aPL-Antikörper direkt pathogen sind. Bakimer et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1558–1563; Blank et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:3069–3073. Schätzungen variieren, aber bei etwa 15% aller Schlaganfallpatienten wird angenommen, dass die aPL-Antikörper einen bedeutenden beitragenden Faktor darstellen.

**[0004]** Die eindeutige Korrelation zwischen dem Vorhandensein dieser Antikörper und zahlreichen Störungen macht ihren Nachweis und ihre Messung zwingend erforderlich. Allerdings ist die Messung von aPL-Antikörpern in einer klinischen Umgebung immer noch mangelhaft und stellt deshalb ein großes Problem dar. Ein im Handel erhältliches Kit mit Standard-Antiseren (APL Diagnostics, Inc., Louisville, KY) erlaubt die Erstellung einer Eichkurve für einen Vergleich von in verschiedenen Laboratorien durchgeföhrten Assays. Es besteht allerdings bei den erhaltenen Ergebnissen dieser Laboratorien eine große Unsicherheit hinsichtlich des genauen GPL und MPL, der Messeinheit für IgG- beziehungsweise IgM-Antiphospholipid-Antikörper, der Beurteilung von gegebenen Seren und den GPL- und MPL-Gehalten, die als hoch (80 oder höher), mittel (20–80), gering (10–20) oder normal (0–10) eingestuft werden. Die im Handel erhältlichen Kits schwanken bei den Werten, die für die im Handel erhältlichen Standards ermittelt werden, sehr stark. Reber et al. (1995) Thrombosis and Haemostat. 73:444–452.

**[0005]** Die exakte Natur der Antigen-Spezifität der aPL-Autoantikörper ist umstritten und spiegelt sich in der entstandenen Nomenklatur wider, die für diese Antikörper verwendet wird. Zunächst wurde angenommen, dass diese Autoantikörper gegen anionische Phospholipide gerichtet sind, daher der Name „Anticardiolipin-Antikörper“. Gharavi et al. (1987) Ann. Rheum Dis. 46m:1–6. Es wurde dann offensichtlich, dass  $\beta_2$ GPI eine wichtige Rolle bei der Antigen-Spezifität von aPL-Antikörpern (einschließlich aCL-Antikörper) spielte. Vermilyen et al. (1992) J. Lab. Clin. Med. 120:10; McNeil et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4120–4124. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass diese Antikörper richtiger als „ $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Autoantikörper“ bezeichnet werden, was auch der in dieser Beschreibung verwendete Ausdruck ist.

**[0006]** Die Berichte, dass  $\beta_2$ GPI eine Rolle als Co-Faktor bei der Bindung vom  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphos-

pholipid-Antikörper spielen würde, zusammen mit einigen Berichten, bei denen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper selbst  $\beta_2$ GPI binden könnten, hat zu widersprüchlichen Deutungen geführt, was die Natur der von diesen Antikörpern erkannten Antigen-Bindungsstellen anbelangt. Allerdings blieb die von  $\beta_2$ GPI gespielte Rolle unklar und mehrere Erklärungen sind postuliert worden. Einige Arbeitsgruppen haben geschlossen, dass  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper ein komplexes Antigen erkennen, das sowohl  $\beta_2$ GPI als auch anionisches Phospholipid umfasst, wohingegen andere eine  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Bindung an  $\beta_2$ GPI in Abwesenheit von Phospholipid beobachtet haben. McNeil et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4120–4124; Galli et al. (1990) Lancet 335:1544; Roubey et al. (1995) J. Immunol. 154(2):954–960; Arvieux et al. (1991) J. Immunol. Methods 143:223. Eine Anzahl von Erklärungsversuchen hinsichtlich dieser Unterschiede sind unternommen worden. Galli et al. postulieren, dass, da  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper Antikörper mit geringer Affinität für  $\beta_2$ GPI sind, diese Antikörper eine Beteiligung von beiden sich verbindenden Stellen auf einem gegebenen IgG-Molekül mit einem multivalenter Festphasen-Antigen benötigen. Galli et al. (1990). Sie führen des weiteren an, dass unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel gamma-Bestrahlung von Mikrotitervertiefungen, hinreichend  $\beta_2$ GPI immobilisiert werden kann, um diesen Antikörpern geringer Affinität ein Binden zu ermöglichen. Andere führen an, dass ein verborgenes Epitop gebildet wird, das von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern erkannt wird, wenn  $\beta_2$ GPI entweder an gamma-bestrahlte Vertiefungen oder mit Cardiolipin beschichtete Vertiefungen bindet. Matsuura et al. (1994) J. Exp. Med. 179:457.

**[0007]**  $\beta_2$ GPI ist ein Plasmaglycoprotein mit 50 Kilodalton, das einige Eigenschaften zeigt, die ein Antikoagulans definieren, wie Hemmung der Kontaktaktivierung des intrinsischen Koagulationsweges, Hemmung der Plättchen-Prothrombinaseaktivität und der ADP-induzierten Plättchenaktivierung. Roubey (1996) Arthritis Rheum. 39:1444; Valesinit et al. (1992) Autoimmunity 14:105. Die  $\beta_2$ GPI-Aminosäuresequenz ist bestimmt worden. Lozier et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:3640; Steinkasserer et al. (1991) Biochem. J. 277:387.  $\beta_2$ GPI besteht aus fünf homologen Domänen. Vier von ihnen bestehen aus ungefähr 60 Aminosäuren, die hoch konservierte Cysteine, Proline und Tryptophane enthalten. Lozier et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:3640; Steinkasserer et al. (1991) Biochem. J. 277:387–391. Dieses Proteinstrukturmotiv wurde zuerst bei  $\beta_2$ GPI beschrieben und ist durch seine Länge, unabhängiges Falten und durch ein Gerüst mit der homologen Positionierung von vier Halbcystinresten, die an der Bildung zweier interner Disulfidbrücken beteiligt sind; zwei Prolinen, zwei Phenylalanin-, Tyrosin- oder Histidinresten; zwei Glycinen und einem Leucin oder Valin gekennzeichnet. Diese sich wiederholenden Motive wurden aufgrund ihrer Form als Sushi-Strukturen bezeichnet oder werden manchmal als kurze Konsensus-Wiederholungen bezeichnet. Reid et al. (1989) Immunol. Today 10:177; Ichinose et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:13411–14. Die fünfte Domäne enthält 82 Aminosäurenreste und 6 Halbcystine.

**[0008]** Über den oben diskutierten Streit über die Natur der Antigen-Spezifität von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern hinaus gab es eine beträchtliche Kontroverse hinsichtlich der Natur und der Lage von Epitopen, die von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern bei  $\beta_2$ GPI erkannt werden. Es ist vermutet worden, dass die Phospholipid-bindende Stelle von  $\beta_2$ GPI sich in der fünften Domäne befindet. Hunt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2141. Hunt et al. berichteten ebenfalls über die Strukturunterschiede zwischen einer aktiven Form von  $\beta_2$ GPI und einer inaktiven Form von  $\beta_2$ GPI, der eine  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Cofaktor-Aktivität fehlte, und schloss daraus, dass das mutmaßliche Epitop für  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper höchstwahrscheinlich in der fünften Domäne von  $\beta_2$ GPI liegen würde. Hunt et al. (1994) J. Immunol. 152:653–659. Andere Arbeitsgruppen verwendeten rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine, um so zu versuchen, die Antigenstelle von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern zu lokalisieren. Zwei dieser Gruppen stellten mutierte  $\beta_2$ GPI-Proteine, von denen verschiedene Domänen deletiert worden waren, in einem Baculovirus-Expressionssystem her. Beide Gruppen schlossen, dass das Epitop für die  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper verborgen war und dass die Domäne 4 überwiegend an der Exposition des Epitops beteiligt sein könnte. Igarashi et al. (1996) Blood 87:3262–3270; George et al. (1998) J. Immunol. 160:3917–3923. Eine weitere Gruppe exprimierte mutierte  $\beta_2$ GPI-Proteine, von denen verschiedene Domänen deletiert worden waren, in Escherichia coli und schlossen daraus, dass die Domäne 5 Epitope enthielt, die von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern erkannt werden. Yang et al. (1997) APLAR J. Rheumatol. 1:96–100.

**[0009]** Es besteht ein wirklicher Bedarf an verbesserten Detektionssystemen und Toleragenen für  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper-vermittelte Zustände.

**[0010]** Sämtliche der hier zitierten Referenzen sind durch Bezugnahme in vollem Umfang hierin mit aufgenommen.

[0011] Del Papa et al. (1998) J. Immunol. 160:5572–5578 legt offen, dass humanes  $\beta_2$ -Glycoprotein I an Endothelzellen über ein Cluster von Lysinresten bindet, die für eine anionische Phospholipidbindung entscheidend sind, und nennt Epitope für anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörper.

[0012] Hagihara et al. (1995) J. Biochem. 118:129–136 legt offen, dass die – und C-terminalen Domänen des bovinen  $\beta_2$ -Glycoproteins I eine Rolle bei dessen Wechselwirkung mit Cardiolipin spielen.

[0013] WO97/46251 beschreibt ein aPL-Analogon, das an B-Zellen spezifisch bindet, an die ein aPL-Epitop bindet. Optimierte Analoga fehlen die T-Zell-Epitop(e), und sie sind als Konjugate für eine Behandlung von aPL-Antikörper-vermittelten Krankheiten zweckdienlich. Konjugate, die aPL-Analoga und nichtimmunogene Valenzplattformmoleküle umfassen, sind ebenfalls beschrieben.

[0014] EP-A-0730155 beschreibt ein Verfahren zum Testen auf einen Antiphospholipid-Antikörper, der in einer Probe enthalten ist, unter Verwendung von  $\beta_2$ -Glycoprotein I, wobei an dessen Stelle von einem Polypeptid Gebrauch gemacht wird, das dieselbe Aminosäuresequenz wie diejenige der Domäne IV vom  $\beta_2$ -Glycoprotein I besitzt, oder ein Polypeptid verwendet wird, das sich partiell vom obigen Polypeptid unterscheidet, aber eine äquivalente Funktion besitzt, wobei dadurch ein einfacher und genauer Test auf einen Antikörper ermöglicht wird, der ein Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom hervorruft.

#### OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Erfindung stellt ein Konjugat bereit, das ein Valenzplattformmolekül und ein Polypeptid umfasst, das wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NR. 4 umfasst, das weniger als 100 Aminosäuren lang ist und das spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper bindet. Das Polypeptid wird hier als „Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid“ bezeichnet und bindet spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper.

[0016] In einigen Anwendungsformen umfasst das Polypeptid Fragmente von Domäne 1, wie es in Tabelle 1 gezeigt ist. In anderen Anwendungsformen umfasst das Polypeptid ein Konformationsepitop. In noch anderen Anwendungsformen besteht das Polypeptid aus Domäne 1. Dem Polypeptid kann ein (detektierbares) T-Zell-epitop fehlen, wobei dieses T-Zellepitop zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern fähig ist.

[0017] Die Erfindung stellt ebenfalls ein Polypeptid bereit, das spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper bindet, das weniger als 75 Aminosäuren lang ist und das wenigstens 30 aufeinander folgende Aminosäuren von SEQ ID NR. 4 umfasst oder, falls es weniger als 30 Aminosäuren lang ist, es wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren umfasst, die aus SEQ ID NRN. 5, 9, 10, 11 und 12 ausgewählt sind, und ein Fusionspolypeptid, das ein derartiges Polypeptid umfasst.

[0018] In einem anderen Aspekt umfasst die Erfindung Polynukleotide (einschließlich isolierter, natürlicherweise vorkommender und nicht natürlicherweise vorkommender Polynukleotide), die ein beliebiges der Polypeptide dieser Erfindung codieren. Die Polynukleotide können isoliert, in Klonierungs- oder Expressionsvektoren und/oder in geeigneten Wirtszellen vorliegen. Außerdem stellt die Erfindung bereit:

- ein Kit zum Nachweis (a) von  $\beta_2$ GPI-Polypeptiden oder (b) einer Koagulation, wobei dieses Kit ein Konjugat oder Polypeptid der Erfindung in einer geeigneten Verpackung umfasst;
- eine Zusammensetzung, die eine wirksame Menge eines Konjugats oder Polypeptids der Erfindung umfasst, wobei dem Polypeptid ein T-Zellepitop fehlt, das zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern fähig ist, und wobei eine wirksame Menge eine Menge ist, die zur Induktion einer Toleranz hinreichend ist;
- eine Zusammensetzung, die eine wirksame Menge eines Konjugats oder Polypeptids der Erfindung umfasst, wobei eine wirksame Menge eine Menge ist, die zum Nachweis eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers hinreichend ist;
- ein Verfahren zum Nachweisen eines Antikörpers, der spezifisch an ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid in einer Probe bindet, umfassend (a) Inkontaktbringen des Antikörpers in der Probe mit einem Konjugat oder Peptid der Erfindung unter Bedingungen, welche die Bildung eines stabilen Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und (b) Nachweisen des in Schritt (a) gebildeten stabilen Komplexes, sofern vorhanden;
- ein Polypeptid oder Konjugat der Erfindung, wobei dem Polypeptid ein T-Zellepitop fehlt, das zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern fähig ist, für eine Verwendung in einem Verfahren zur Induktion von Toleranz in einem Individuum;
- ein Verfahren zum Nachweisen eines Verfahrens zum Nachweisen einer  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospho-

lipid-Antikörper-Vermittlung von Koagulation, umfassend die Schritte:

- (a) Durchführen eines ersten Koagulations-Assays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum, wobei ein Konjugat oder Polypeptid gemäß der Erfindung zu dem Assay gegeben wird;
- (b) Durchführen eines zweiten Koagulations-Assays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von dem Individuum in Abwesenheit des Polypeptids; und
- (c) Vergleichen der Assay-Ergebnisse aus Schritten (a) und (b), wobei ein Unterschied in den Ergebnissen eine  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Vermittlung von Koagulation anzeigt; und
- Verwendung eines Polypeptids oder Konjugats der Erfindung, wobei dem Polypeptid ein T-Zellepitop fehlt, das zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern fähig ist, in der Herstellung eines Medikaments zur Toleranzinduktion in einem Individuum.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0019]** [Fig. 1](#) zeigt die Nukleotid-(SEQ ID NR. 1) und Aminosäure-(SEQ ID NR. 2) Sequenz von  $\beta_2$ GPI. Die Nummern über den Zeilen geben die Aminosäurepositionen an.

**[0020]** [Fig. 2](#) zeigt die Nukleotid-(SEQ ID NR. 3) und Aminosäure-(SEQ ID NR. 4) Sequenz von  $\beta_2$ GPI. Die Nummern über den Zeilen geben die Aminosäurepositionen an.

**[0021]** [Fig. 3](#) ist ein Modell der Tertiärstruktur der Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI, die Schlüssel-Aminosäuren bei der Bindung an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper umfasst.

**[0022]** [Fig. 4](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse eines auf NUNC-Mikrotiterplatten durchgeföhrten kompetitiven Inhibitions-ELISA zeigt. Die Platten waren mit Wildtyp- $\beta_2$ GPI-Antikörper beschichtet. Das Binden des Antikörpers (von Patient 7104) erfolgte in Konkurrenz mit den verschiedenen mutierten  $\beta_2$ GPI-Proteinen. Symbole stehen für folgende rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine: —□—, 12345; —□—, 1---; —□—, 12---; —□—, 123---; —□—, 1234---; —□—, -2345; —▲—, --345; —□—, ---45; und —□—, ----5. Bezeichnungen für rekombinante Proteine: Gedankenstriche stehen für fehlende Domänen; Ziffern geben die im Protein vorhandenen Domänen an. Zum Beispiel ist „--345“ ein rekombinantes  $\beta_2$ GPI-Protein, dem die Domänen 1 und 2 fehlen, das aber die Domänen 3, 4 und 5 behalten hat.

**[0023]** [Fig. 5](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse einer ELISA-Analyse des Bindens von Kaninchen-anti- $\beta_2$ GPI an verschiedene rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine zeigt. Mit Nickel-Chelat beschichtete Mikrotitervertiefungen waren mit verschiedenen rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteinen mit den gezeigten Konzentrationen beschichtet und wurden dann auf die Fähigkeit getestet, Kaninchen-anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper zu binden. Symbole stehen für folgende rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine: —□—, --345; —□—, ---45; —□—, -2345; —□—, 12345; —□—, 1234---; —□—, 123---; —▲—, ----5; und ---□--, GST-6his. GST-6his.

**[0024]** [Fig. 6](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse einer ELISA-Analyse des Bindens von anti- $\beta_2$ GPI an verschiedene rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine zeigt. Mit Nickel-Chelat beschichtete Mikrotitervertiefungen waren mit verschiedenen rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteinen mit den gezeigten Konzentrationen beschichtet und wurden dann auf die Fähigkeit getestet, humanen anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper 6701 (von Patient 6701) zu binden. Symbole stehen für rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine wie in [Fig. 5](#). Weitere Symbole stehen folgendermaßen für: ---⊗---, ohne  $\beta_2$ GPI, mit zugegebenem Antikörper; ---+---, ohne  $\beta_2$ GPI, ohne Antikörper.

**[0025]** [Fig. 7](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse eines ELISA zeigt, der die Fähigkeit von Kaninchen-anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper maß, an verschiedene rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine zu binden, die zunächst an Cardiolipin-(CL)-beschichtete Mikrotitervertiefungen gebunden wurden. IMMULON® Platten wurden mit CL beschichtet und dann mit den angegebenen Konzentrationen an rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteinen beladen. Symbole für das rekombinante  $\beta_2$ GPI sind dieselben wie in [Fig. 5](#).

**[0026]** [Fig. 8](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse eines ELISA zeigt, der die Fähigkeit eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparats 6641 (von Patient 6641) maß, an verschiedene rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine zu binden, die zunächst an Cardiolipin-(CL)-beschichtete Mikrotitervertiefungen gebunden wurden. IMMULON® Platten wurden mit CL beschichtet und dann mit den angegebenen Konzentrationen an rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteinen beladen. Symbole für das rekombinante  $\beta_2$ GPI sind dieselben wie in [Fig. 6](#).

[0027] [Fig. 9](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse eines kompetitiven Inhibition-ELISA zeigt, in dem verschiedene Peptide auf ihre Fähigkeit getestet wurden, mit Wildtyp- $\beta_2$ GPI um ein Binden an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu konkurrieren. Symbole für die Peptide sind die folgenden: —□—,  $\beta_2$ GPI; —□—, CTPRVC; —■—, FSTVVP; —□—, KPDDLP; —□—, GRTCPK; —□—, TLKCTP; —▲—, ICPLTG; —□—, FICPLT; —□—, ITYSCK; —|—, GRTCPK.

[0028] [Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#) sind Schaubilder, welche die scheinbaren Gleichgewichtsbindungswerte für verschiedene Konzentrationen von Domäne 1-Polypeptid ([Fig. 10A](#)) und tetramerer Konjugatverbindung 44 ([Fig. 10B](#)) mit affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern von Patient 6626 zeigen. Scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstanten sind ebenfalls gezeigt.

[0029] [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) sind Schaubilder, welche die scheinbaren Gleichgewichtsbindungswerte für verschiedene Konzentrationen von Domäne 1-Polypeptid ([Fig. 11A](#)) und tetramerer Konjugatverbindung 44 ([Fig. 11B](#)) mit affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern von Patient 6701 zeigen.

[0030] [Fig. 12](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse der kompetitiven Bindungsexperimente zeigt, in denen ein  $\beta_2$ GPI (auf NUNC-Mikrotiterplatten geschichtet) mit Plasma von Patient 6501 und variablen Mengen an tetramerer Domäne (—◊—) 1-Konjugatverbindung 44 (—▼—), und -verbindung 45 (—\*—) wie auch  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid (—◆—) und  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid, das reduziert und alkyliert worden war (—■—), reagierte.

[0031] [Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#) sind Schaubilder, die die Dosis-Antwort von poplitealen Lymphknotenzellen von Mäusen zeigen, die mit einem  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid-KLH-Konjugat in CFA ([Fig. 13A](#)) oder nur mit CFA ([Fig. 13B](#)) immunisiert waren. Symbole: —□—, KLH-Konjugat; —▼—,  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid nicht an konjugiert; —■—, KLH; Δ, PPD.

[0032] [Fig. 14](#) ist ein Säulendiagramm, das die Dosis-Antwort (bezogen auf anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper) der Immunstimulierung mit einem  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid-KLH-Konjugat (10 µg, 50 µg und 100 µg) zeigt.

[0033] [Fig. 15](#) ist ein Schaubild, das die Spezifität von polyklonalen Maus-Antikörpern, die gegen ein  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid-KLH Konjugat gezüchtet sind, zeigt, wie es mit Hilfe von Kompetitionsassays unter Verwendung verschiedener mutierter  $\beta_2$ GPI-Domänen (—□—, 1---; —◆—, 1--- reduziert und alkyliert; —■—, 12---; —Δ—, 1234-; ---■---, -2345; ---□---, --345; --▲--, ---45; —Δ—, 1---5; —X—, 12345) bestimmt wurde.

[0034] [Fig. 16](#) ist ein Säulendiagramm, das die Wirkung von affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern im Blut von verschiedenen Patienten (6501, 6636, 6644, 7011, 7013, 6701, 7001, 6625, 6641) wie auch von normalem Plasma und IgG auf die Faktor Va-Aktivität zeigt.

#### AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

[0035] Wir haben entdeckt, dass Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI spezifisch an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper bindet (d.h. ein Epitop oder Epitope eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers enthält). Diese Erkenntnis ist besonders im Hinblick auf die vorhandene Literatur bedeutsam, wo nur die Domänen 4 und 5 als wichtig für dieses Binden beschrieben sind. Siehe z.B. George et al. (1998) und Yang et al. (1997). Wir haben ebenfalls entdeckt, dass Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI an  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper von wenigstens 100 verschiedenen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern bindet, was besonders im Zusammenhang mit Nachweis/Diagnose wie auch im Zusammenhang mit Toleragenen bedeutsam und wichtig ist, da Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) für einen großen Teil der Population, die  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper trägt, zweckdienlich sein können. Außerdem haben wir festgestellt, dass besonders Peptide der Domäne 1 (die hier beschrieben sind) spezifisch an  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper zu binden scheinen.

[0036] Dementsprechend stellt die Erfahrung Polypeptide bereit, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide (einschließlich isolierter Domäne 1) umfassen, die spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden. Die Erfahrung stellt ebenfalls Polypeptide bereit, die im Wesentlichen aus Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden bestehen, die spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden. Die Polypeptide der Erfahrung sind für den Nachweis von  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper (im Zusam-

menhang mit Diagnose, Prognose und/oder Monitoring) und ebenfalls als Toleragene zweckdienlich. In einigen Anwendungsformen, insbesondere im Zusammenhang mit Toleragenen, fehlt dem/den  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) ein T-Zellepitop und/oder liegt in multivalenter Form vor, wie beispielsweise an ein Plattformmolekül konjugiert. Die Erfindung stellt ebenfalls Polynukleotide bereit, die  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) codieren. Derartige Polynukleotide können zum Herstellen von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) sowohl in vitro als auch in vivo verwendet werden. Die Erfindung stellt ebenfalls Zusammensetzungen bereit, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) und Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) codierende Polynukleotide umfassen. Die Erfindung stellt außerdem Verfahren unter Verwendung von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en), wie beispielsweise für den Nachweis oder für die Induktion von Toleranz (d.h. Induktion der B-Zelltoleranz), bereit.

#### Allgemeine Techniken

**[0037]** Bei der praktischen Umsetzung der vorliegenden Erfindung werden herkömmliche Techniken der Molekularbiologie (einschließlich rekombinanter Techniken), Mikrobiologie, Zellbiologie, Biochemie und Immunologie angewandt, die im Rahmen der Fachkenntnisse liegen, außer anderes ist angegeben. Derartige Techniken sind in der Literatur ausführlich erklärt, wie beispielsweise in „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, zweite Ausgabe (Sambrook et al., 1989); „Oligonucleotide Synthesis“ (M.J. Gait, ed., 1984); „Anima Cell Culture“ (R.I. Freshney, ed., 1987); „Methods in Enzymology“ (Academic Press, Inc.); „Handbook of Experimental Immunology“ (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); „Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells“ (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); „Current Protocols in Molecular Biology“ (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); „PCR: The Polymerase Chain Reaction“, (Mullis et al., eds., 1994) und „Current Protocols in Immunology“ (J.E. Coligan et al., eds., 1991).

#### Definitionen

**[0038]** Ein „ $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid“ ist ein Polypeptid, das einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper spezifisch bindet und wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren umfasst, die in [Fig. 2](#) (SEQ ID NR. 4; Domäne 1) gezeigt sind. Es kann mit Hilfe von Standardassays, die in der Technik bekannt sind, wie beispielsweise mit kompetitiven Inhibitionssassays, die hier wie auch in der Technik beschrieben sind, gezeigt werden, dass ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper spezifisch bindet. Der Ausdruck „Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid“ umfasst verschiedene Anwendungsformen (viele davon sind hier beschrieben), einschließlich, aber hierauf nicht beschränkt, SEQ ID NR. 4; Fragmente von SEQ ID NR. 4; Extensionen, Insertionen und/oder Deletionen von SEQ ID NR. 4; Sequenzvarianten von SEQ ID NR. 4. Folglich dient der Ausdruck „Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid“ der Beschreibung einer Klasse von Domäne 1-basierten Molekülen, die die erforderliche Funktionalität zeigen. Als solches kann ein  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid wenigstens 10, wenigstens 12, wenigstens 15, wenigstens 20, wenigstens 25, wenigstens 30, wenigstens 40 und/oder wenigstens 60 aufeinander folgende Aminosäuren besitzen, die in [Fig. 2](#) (SEQ ID NR. 4) gezeigt sind. Ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid kann ebenfalls verschiedene Regionen der Domäne 1 umfassen, so dass diese Regionen gemeinsam fähig sind, einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper spezifisch zu binden (wie bei der Bildung eines konformationalen Epitops). Wie unten diskutiert, fehlt in einigen Anwendungsformen einem „Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid“ ebenfalls ein (jegliches) nachweisbare(s) T-Zellepitop. Im Sinne dieser Erfindung besitzt das T-Zellepitop per Definition die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern.

**[0039]** Ein Polypeptid, das an einen Antikörper „spezifisch bindet“, ist ein in der Technik wohl verstandener Terminus, und Verfahren zur Bestimmung eines derartigen spezifischen Bindens sind in der Technik ebenfalls gut bekannt. Ein Molekül zeigt ein „spezifisches Binden“, wenn es häufiger, schneller, länger und/oder mit größerer Affinität mit einer bestimmten Zelle oder Substanz reagiert oder assoziiert als mit anderen Zellen oder Substanzen. „Spezifisch bindet“ ein Antikörper an ein Ziel, wenn er mit größerer Affinität, Aktivität, schneller und/oder länger bindet als er mit anderen Substanzen bindet.

**[0040]** Ein „ $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper“ ist ein beliebiger Antikörper, der an  $\beta_2$ GPI spezifisch bindet. Wie oben diskutiert, verwendet die in den klinischen Wissenschaften und in der Literatur genutzte Nomenklatur alternative Bezeichnungen für diese Antikörper, wie „aPL“ und „aCL“ Antikörper, die in der Definition des Ausdrucks „ $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper“ mit inbegriffen sind, solange die erforderliche Bindungseigenschaften vorhanden ist (d.h. die Ausdrücke „aPL“ und „aCL“ Antikörper umfassen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper). Wie es eindeutig durch die hier gegebene Definition „Antikörper“ angezeigt ist, umfasst ein „ $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper“ Fragmente, welche die variable Region enthalten, wie Fab-Fragmente, solange wie die Fähigkeit erhalten bleibt,  $\beta_2$ GPI spezifisch zu binden. Wie unten diskutiert, versteht es sich, dass ein spezifisches Binden an einen beliebigen  $\beta_2$ GPI-abhängigen An-

tiphospholipid-Antikörper hinreichend ist, obwohl es für ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid bevorzugt sein kann, mehr als einen, bevorzugt wenigstens zwei, bevorzugt wenigstens fünf, bevorzugter wenigstens zehn, noch bevorzugter wenigstens 20 verschiedene  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper zu binden.

**[0041]** Ein „Antikörper“ (die Pluralform kann austauschbar verwendet werden) ist ein Immunglobulinmolekül, das in der Lage ist, an ein Ziel, wie beispielsweise an ein Polypeptid, über wenigstens eine Erkennungsstelle, die sich in der variablen Region des Immunglobulinmoleküls befindet, spezifisch zu binden. Wie hier verwendet, umfasst der Ausdruck nicht nur intakte Antikörper, sondern ebenfalls Fragmente davon (wie Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), einzelkettige (ScFv), Mutanten davon, Fusionsproteine, humanisierte Antikörper und jede andere modifizierte Konfiguration des Immunglobulinmoleküls, das eine Antigenerkennungsstelle der erforderlichen Spezifität umfasst.

**[0042]** „Intaktes  $\beta_2$ GPI“ bezeichnet die Aminosäuresequenz des gesamten  $\beta_2$ GPI-Moleküls (in [Fig. 1](#) und SEQ ID NR. 2 gezeigt). Die Polynukleotid- und Polypeptidsequenzen von  $\beta_2$ GPI sind ebenfalls in der Literatur und bei GeneBank (Hinterlegungsnummer X58100) öffentlich zugänglich.

**[0043]** Ein „Fusionspolypeptid“ ist ein Polypeptid, das Regionen in einer anderen Position als natürlicherweise vorkommend umfasst. Diese Regionen können üblicherweise in separaten Proteinen vorkommen und werden im Fusionspolypeptid zusammen gebracht oder sie kommen üblicherweise im selben Protein vor, sind aber im Fusionspolypeptid neu angeordnet. Ein Fusionspolypeptid kann ebenfalls aus polymeren Formen, entweder linearen oder verzweigten, von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) hervorgehen.

**[0044]** Ein „T-Zellepitop“ ist ein in der Technik gut verstandener Ausdruck und bedeutet eine Bindungsstelle für eine T-Zelle oder spezifischer eine Polypeptidsequenz oder chemische Struktur, die (eine) T-Zelle(n) aktiviert. Verfahren, mit denen ermittelt werden kann, ob T-Zellepitope vorhanden sind, sind ebenfalls in der Technik gut bekannt und hier beschrieben. Es versteht sich, dass mit der Zeit empfindlichere Assays für den Nachweis des Vorhandenseins von T-Zellepitopen entwickelt werden können und dass dieses Bestimmen des Fehlens von T-Zellepitopen von der Art des eingesetzten Nachweissystems abhängt. Im Sinne dieser Erfindung soll „Fehlen“ eines T-Zellepitops heißen, dass ein T-Zellepitop nicht mit Hilfe von Standardassays nachweisbar ist, insbesondere wie am Tag der Erstanmeldung dieser Anmeldung. Es versteht sich ebenfalls, dass im Sinne dieser Erfindung ein „T-Zellepitop“ ein Epitop ist, das zur Stimulierung von T-Zellen in einem Individuum fähig ist, das  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper aufweist.

**[0045]** Die Ausdrücke „Polynukleotid“ und „Nukleinsäure“, die hier austauschbar verwendet sind, bezeichnen polymere Formen von Nukleotiden beliebiger Länge, entweder von Ribonukleotiden oder Desoxyribonukleotiden. Die Ausdrücke umfassen einzel-, doppel- oder dreisträngige DNA, genomische DNA, cDNA, RNA, DNA-RNA-Hybrid oder ein Polymer, das Purin- und Pyrimidinbasen oder andere natürliche, chemisch oder biochemisch modifizierte, nicht natürliche oder derivatisierte Nukleotidbasen umfasst. Das Rückgrat des Polynukleotids kann Zucker und Phosphatgruppen (wie sie üblicherweise in RNA oder DNA gefunden werden) oder modifizierte oder substituierte Zucker oder Phosphatgruppen umfassen. Alternativ kann das Rückgrat des Polynukleotids ein Polymer aus synthetischen Untereinheiten, wie beispielsweise Phosphoramidaten, umfassen und kann folglich ein Oligodesoxynukleosid-Phosphoramidat (P-NH<sub>2</sub>) oder ein gemischtes Phosphoramidat-phosphodiester-Oligomer sein. Eine Phosphorthioatbindung kann ebenfalls anstelle einer Phosphodiesterbindung verwendet sein. Zusätzlich kann ein doppelsträngiges Polynukleotid von dem einzelsträngigen Polynukleotidprodukt der chemischen Synthese entweder durch Synthetisieren des Komplementärstranges und Reassoziiieren der Stränge unter geeigneten Bedingungen oder durch Synthetisieren des Komplementärstranges de novo unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit einem geeigneten Primer erhalten werden.

**[0046]** Nun folgen nicht einschränkende Beispiele für Polynukleotide: ein Gen oder Genfragment, Exons, Introns, mRNA, tRNA, rRNA, Ribozyme, cDNA, rekombinante Polynukleotide, verzweigte Polynukleotide, Plasmide, Vektoren, isolierte DNA beliebiger Sequenz, isolierte RNA beliebiger Sequenz, Nukleinsäure-Sonden und Primer. Vorzugsweise ist DNA das Polynukleotid. Wie hier verwendet, umfasst „DNA“ nicht nur die Basen A, T, C und G, sondern sie umfasst ebenfalls beliebige Analoga von ihnen oder modifizierte Formen dieser Basen, wie methylierte Nukleotide, Internukleotidmodifikationen, wie ungeladene Bindungen und Thioate, die Verwendung von Zuckeralanologa, und modifizierte und/oder alternative Rückgratstrukturen, wie Polyamide.

**[0047]** „Natürlich vorkommend“ bezieht sich auf eine endogene Polynukleotid- oder Polypeptidsequenz, d.h. eine, die in der Natur gefunden wird. Der Ausdruck umfasst Allele und Allelformen des codierten Proteins, ebenso wie volllange wie auch prozessierte Polynukleotide und Polypeptide. Ein Prozessieren kann in einem oder mehreren Schritten erfolgen und diese Ausdrücke umfassen alle Stadien des Prozessierens. Im Gegen-

satz hierzu bezeichnet eine „nicht natürlich vorkommende“ Sequenz alle anderen Sequenzen, d.h. Sequenzen, die nicht in der Natur vorkommen, wie rekombinante Sequenzen.

**[0048]** Eine „Wirtszelle“ umfasst eine einzelne Zelle oder eine Zellkultur, die eine Empfängerin für Vektoren oder für den Einbau von Polynukleotiden und/oder Proteinen sein kann oder gewesen sein kann. Wirtszellen umfassen Nachkommen einer einzelnen Wirtszelle und die Nachkommen müssen nicht notwendigerweise vollkommen identisch (morphologisch oder genomisch als vollständige Gesamtheit der DNA) mit ihrer ursprünglichen Elternzelle sein, aufgrund einer natürlichen, zufälligen oder herbeigeführten Mutation. Eine Wirtszelle umfasst Zellen, die mit Polynukleotid(en) dieser Erfindung *in vivo* transfiziert sind.

**[0049]** „Transformation“ oder „Transfektion“ bezeichnet die Insertion eines exogenen Polynukleotids in eine Wirtszelle, ungeachtet des für die Insertion angewandten Verfahrens, wie zum Beispiel Lipofektion, Transduktion, Infektion oder Elektroporation. Das exogene Polynukleotid kann als ein nicht integrierter Vektor, zum Beispiel ein Plasmid, belassen bleiben oder kann alternativ in das Wirtszellgenom integriert sein.

**[0050]** Ein „Individuum“ ist ein Vertebrat, bevorzugt ein Säuger, bevorzugter ein Mensch. Säuger umfassen, sind hierauf aber nicht beschränkt, Nutztiere, Sporttiere, Haustiere, Primaten, Mäuse und Ratten.

**[0051]** „B-Zellanergie“ ist ein in der Technik gut verstandener Ausdruck und bedeutet ein Nichtansprechen von denjenigen B-Zellen, die eine Hilfe von T-Zellen für eine Antikörperproduktion und -sekretion benötigen, und umfasst, ist aber hierauf nicht beschränkt, die klonale Deletion von unreifen und/oder reifen B-Zellen und/oder die Unfähigkeit von B-Zellen, Antikörper zu produzieren.

**[0052]** „Induzieren von Toleranz“ bedeutet eine Verringerung und/oder Stabilisierung des Ausmaßes einer Immunantwort auf ein Immunogen. Eine „Immunantwort“ kann eine humorale und/oder zelluläre Antwort sein und kann unter Verwendung in der Technik bekannter Standardassays gemessen werden. Im Sinne dieser Erfindung gibt die Immunantwort im Allgemeinen das Vorhandensein von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern wieder. Quantitativ beträgt die Verringerung (wie durch die Verringerung der Antikörperproduktion gemessen) wenigstens etwa 25%, bevorzugter wenigstens etwa 50%, bevorzugter wenigstens etwa 75%, bevorzugter wenigstens etwa 90%, noch bevorzugter wenigstens etwa 95% und am bevorzugtesten etwa 100%. Es versteht sich, dass die Toleranz antigenspezifisch ist und lässt sich im Sinne der vorliegenden Erfindung auf diejenigen Individuen anwenden, die  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper aufweisen. „Induzieren von Toleranz“ umfasst ebenfalls die Verlangsamung und/oder Verzögerung des Anstiegs des Antikörperspiegels.

**[0053]** Eine „biologische Probe“ umfasst eine Reihe an Probentypen, die von einem Individuum erhalten sind und bei einem Diagnose- oder Monitoring-Assay verwendet sein können. Die Definition umfasst Blut und andere Flüssigproben biologischen Ursprungs, feste Gewebeproben, wie eine Biopsieprobe, oder Gewebekulturen oder davon stammende Zellen und die Nachkommen davon. Die Definition umfasst ebenfalls Proben, die auf beliebige Art und Weise nach ihrer Gewinnung behandelt worden sind, wie durch Behandlung mit Reagenzien, Solubilisierung oder Anreicherung von bestimmten Bestandteilen, wie Proteinen oder Polynukleotiden. Der Ausdruck „biologische Probe“ umfasst eine klinische Probe und beinhaltet ebenfalls Zellen in Kultur, Zellüberstände, Zellysate, Serum, Plasma, biologische Flüssigkeit und Gewebeproben.

**[0054]** Ein „stabiler Komplex“, der zwischen beliebigen zwei oder mehreren Komponenten in einer biochemischen Reaktion gebildet ist, bezeichnet einen Duplex oder Komplex, der hinreichend lang beständig ist, um zwischen Bildung des Duplexes oder Komplexes und nachfolgendem Nachweis zu bestehen, einschließlich beliebiger optionaler Waschschrifte oder weiterer Manipulation, die in der Zwischenzeit stattfinden können.

**[0055]** Ein „isoliertes“ oder „gereinigtes“ Polypeptid oder Polynukleotid ist ein Polymer, das im Wesentlichen frei von Materialien ist, mit denen es in der Natur vorkommt. Im Wesentlichen frei heißt wenigstens zu 50%, bevorzugt wenigstens zu 70%, bevorzugter wenigstens zu 80%, noch bevorzugter wenigstens zu 90% frei von Materialien, mit denen es in der Natur assoziiert ist.

**[0056]** Es heißt, ein Polynukleotid „codiert“ ein Polypeptid, falls es in seinem nativen Zustand oder wenn es mit Verfahren manipuliert ist, die dem Fachmann gut bekannt sind, transkribiert oder translatiert werden kann, um das Polypeptid oder ein Fragment davon herzustellen. Im Sinne dieser Erfindung und um einen umständlichen Bezug auf komplementäre Stränge zu vermeiden, soll ebenfalls der Antisense-Strang (oder der Komplementärstrang) eines derartigen Polynukleotids die Sequenz codieren; das heißt, eine Polynukleotidsequenz, die ein Polypeptid „codiert“, umfasst den üblichen codierenden Strang und die komplementäre Sequenz

(oder Strang).

**[0057]** Eine „wirksame Menge“ (wenn im Zusammenhang mit Toleragenen gebraucht) ist eine Menge, die hinreichend ist, vorteilhafte oder erwünschte klinische Ergebnisse zu bewirken. Eine wirksame Menge kann mit einer oder mehreren Verabreichungen verabreicht sein. Im Sinne dieser Erfindung ist eine wirksame Menge an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) eine Menge, die hinreichend ist, Toleranz zu induzieren, insbesondere bezogen auf die  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper. Hinsichtlich der Behandlung ist eine „wirksame Menge“ an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) eine Menge, die hinreichend ist, eine Progression eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-assoziierten Krankheitsstadiums (d.h. ein Stadium, in dem  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper eine mögliche oder tatsächliche Krankheit anzeigen) zu lindern, zu verbessern, zu stabilisieren, zu revertieren, oder zu verlangsamen oder zu verzögern. Nachweis und Messung von Indikatoren der Wirksamkeit basieren im Allgemeinen auf Messung von  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper und/oder klinischen Symptomen, die mit dem Krankheitsstadium assoziiert sind, wie arterielle oder venöse Thrombose, Fehlgeburt, transitorisch ischämische Attacke, cerebrovaskuläre Anfälle, Amaurose fugax (monokuläre Vision), autoimmune hämolytische Anämie, Herzklappenläsionen, Myokardinfarkt, Thrombozytopenie und Migränezustände.

**[0058]** Wie hier verwendet, bedeutet „Plattformmolekül“ ein nichtimmunogenes Molekül, das Stellen enthält, welche die Bindung einer diskreten Anzahl an Polypeptiden (in dieser Erfindung Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden) und/oder Mimetika erlaubt.

**[0059]** „Nichtimmunogen“ bedeutet, wenn es für die Beschreibung des Valenzplattformmoleküls verwendet ist, dass das Valenzplattformmolekül keine Immunantwort auslöst und/oder keine hinreichende Immunantwort auslöst, wenn es allein an ein Individuum verabreicht wird. Das Ausmaß einer akzeptablen Immunantwort hängt von dem Kontext ab, in dem das Valenzplattformmolekül verwendet ist und kann empirisch bestimmt werden.

**[0060]** Wie hier verwendet, bedeutet „Pharmakophor“ die dreidimensionale Ausrichtung und chemischen Eigenschaften von Schlüsselgruppen, die am Binden eines Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids an das Antikörperziel beteiligt sind.

#### Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide der Erfindung

**[0061]** Die Erfindung stellt Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) bereit. Wie hier beschrieben, enthält ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid (a) wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren von [Fig. 2](#) (SEQ ID NR. 4), die Domäne 1 zeigt; und (b) bindet spezifisch an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper (d.h. einen oder mehrere  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper). Ein Modell der dreidimensionalen Struktur von Domäne 1- $\beta_2$ GPI ist in [Fig. 3](#) dargestellt (basierend auf der tatsächlichen Struktur von Faktor H1 Sushi-Domäne 16, wie mittels NMR bestimmt) (Norman et al. (1991) J. Mol. Biol. 219:717; Barlow et al. (1991) Biochem. 30:997), und Reste, die an der strukturellen Integrität und/oder Antikörperbindung beteiligt sein können, wie es durch Mutagenese-Untersuchungen bestimmt wurde, einschließlich der hier angeführten, sind gezeigt. Unter Bezugnahme auf sämtliche Polypeptid-Anwendungsformen der Erfindung, versteht es sich, dass die Polypeptide der Erfindung kein natives, intaktes  $\beta_2$ GPI oder irgendeine bereits isolierte und charakterisierte Form von  $\beta_2$ GPI, wie beispielsweise Domänendeletionsmutanten (d.h. Domänen 1,2,3; Domänen 1,2,3,4), umfassen.

**[0062]** In einer Anwendungsform umfasst die Erfindung ein Polypeptid, bestehend aus (oder in einigen Anwendungsformen bestehend im Wesentlichen aus) der in [Fig. 2](#) (SEQ ID NR. 4) gezeigten Aminosäuresequenz, die Domäne 1 darstellt. Wir haben gezeigt, dass nur diejenigen  $\beta_2$ GPI-Polypeptide mit Domänendeletionen, welche die Domäne 1 enthalten, fähig sind, spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu binden, wie es in Beispiel 1 beschrieben ist. Im Sinne dieser Erfindung erstreckt sich Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI im Allgemeinen von etwa Aminosäure 1 bis etwa Aminosäure 64 von  $\beta_2$ GPI ([Fig. 1](#)). Alternativ und ebenfalls im Sinne dieser Erfindung kann sich die Domäne 1 (und dementsprechend ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid der Erfindung) (a) von etwa dem ersten Cystein bis zu etwa dem vierten Cystein (wenn vom N-Terminus festgelegt); (b) von etwa dem N-Terminus bis etwa dem fünften Cystein (genauer der letzten Aminosäure vor dem fünften Cystein); (c) von etwa dem ersten Cystein bis etwa dem fünften Cystein erstrecken. In einigen Anwendungsformen kann ein zusätzliches Cystein in einer beliebigen geeigneten Position hinzugefügt sein, um als eine reaktive Gruppe für eine Konjugation zu dienen. Dementsprechend kann ein zusätzliches Cystein (das in einigen Anwendungsformen das fünfte Cystein von  $\beta_2$ GPI ist) in einer beliebigen Position, insbesondere nahe des oder am C-Terminus oder am N-Terminus mit enthalten sein. Ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid kann ebenfalls beliebiges vom folgenden umfassen (oder bestehen aus oder im Wesentlichen bestehen aus): (a)

Aminosäure 1 bis Aminosäure 59 von SEQ ID NR. 4; (b) Aminosäure 2 bis Aminosäure 60 von SEQ ID NR. 4; (c) Aminosäure 2 bis Aminosäure 63 von SEQ ID NR. 4; (d) Aminosäure 1 bis Aminosäure 66 von SEQ ID NR. 1; (e) Aminosäure 4 bis Aminosäure 66 von SEQ ID NR. 1; (f) etwa Aminosäure 1 bis etwa Aminosäure 60 von SEQ ID NR. 4; (g) etwa Aminosäure 1 bis etwa Aminosäure 66 von SEQ ID NR. 1. Wir haben festgestellt, dass Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide, die das fünfte Cystein enthalten, besonders für eine Konjugation geeignet sind (siehe Diskussion unten). Für diejenigen Anwendungsformen, welche die ersten fünf Cysteine von  $\beta_2$ GPI enthalten (umfassen), ist es einzusehen, dass im Allgemeinen die Aminosäuresequenz zwischen den Cysteinen derart sein sollte, dass die geeigneten Disulfidbrücken gebildet werden, während die die Cysteine flankierenden Aminosäuresequenzen (d.h. die N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren) eine beliebige Sequenz sein können (solange die erforderliche Struktur beibehalten wird, die ein Binden an den Antikörper erlaubt).

**[0063]** In anderen Anwendungsformen beinhaltet die Erfindung ein Polypeptid, das ein beliebiges der in Tabelle 1 gezeigten Polypeptide (SEQ ID NRN. 5–11) umfasst. Unsere Versuche (in Beispiel 3 beschrieben) zeigen, dass diese Polypeptide fähig sind, spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu binden.

**[0064]** Bei sämtlichen Poplypeptid-Anwendungsformen dieser Erfindung bindet das/die Polypeptid(e) an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper. Spezifisches Binden an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper kann unter Anwendung von Standardverfahren in der Technik, wie beispielsweise kompetitiven Bindungsassays, bestimmt werden. Zum Beispiel können Mikrotiterplatten mit  $\beta_2$ GPI beschichtet werden (entweder mit natürlich vorkommendem oder rekombinantem, solange das rekombinante Molekül die erforderlichen Bindungseigenschaften zeigt) und das zu testende Polypeptid wird in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Affinitätsgereinigter  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper wird dann zugegeben und die Bindung kann dann erfolgen. Die Menge an gebundenem Antikörper wird mit Detektionssystemen, wie beispielsweise alkalische Phosphatasekonjugiertes anti-humanes IgG oder Radioaktivität, bestimmt. Ein spezifisches Binden wird durch die Fähigkeit des Testpolypeptids angezeigt, um ein Binden an  $\beta_2$ GPI zu konkurrieren. Beispiele 1 und 3 stellen beispielhafte Assays für den Nachweis des kompetitiven Bindens bereit. Ein spezifisches Binden kann ebenfalls mit Hilfe direkter Bindungsassays bestimmt werden, die in der Technik bekannt sind und in Beispielen 1 und 3 beispielhaft dargestellt sind.

**[0065]** Es versteht sich, dass im Sinne dieser Erfindung das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid nur an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden muss, obwohl es für das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid erwünscht sein kann (zum Beispiel im Zusammenhang mit dem Nachweis), an mehr als einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu binden. Das Ausgangsmaterial für den  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper ist im Allgemeinen von einem Individuum und die Antikörpersequenz kann von Individuum zu Individuum variieren. Es versteht sich ebenfalls, dass ein spezifisches Binden an den  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper unter Verwendung eines Fragments oder anderer rekombinanter Produkte von einem  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper, wie ein Fab-Fragment oder einzelkettige Konstrukte der variablen Region (scFv), die in der Technik bekannt sind, demonstriert werden kann.

**[0066]** Dementsprechend bindet in einigen Anwendungsformen ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid mehr als einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper (d.h. wenigstens 2, wenigstens 5, wenigstens 10, wenigstens 20, wenigstens 50 oder mehr). Diese Anwendungsformen sind besonders für einen Nachweis zweckdienlich, da diese Polypeptide für einen Nachweis eines breiten Spektrums an Individuen eingesetzt sein können, die einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper tragen können.

Tabelle 1. Fragmente von Domäne 1, die spezifisch an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden

Sequenz	SEQ ID NR.
CTPRCV	5
FSTVVP	6
KPDDLP	7
GRTCPK	8
TLKCTP	9
ICPLTG	10
FICPLT	11
ITYSCK	12

[0067] In einigen Anwendungsformen umfasst ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid eine Sushi-Struktur. Der Ausdruck „Sushi-Domäne“ ist dem Fachmann bekannt und ist allgemein dadurch gekennzeichnet, dass die Domäne (a) bestimmte Reste (wie Prolin, Phenylalanin, Tyrosin, Glycerin, Leucin, Valin und/oder Histidin) enthält, die die Polypeptidkette eine spiralförmige Struktur einnehmen lassen; (b) im Allgemeinen ein Molekulargewicht von ungefähr 6 kD besitzt; und (c) eine  $\beta$ -gefaltete Struktur enthält. Ichmose et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:13411.

[0068] Es versteht sich ebenfalls, dass ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid über (ein) konformationales Epitop(e) an  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden kann. Dementsprechend umfasst in einigen Anwendungsformen ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid (a) Aminosäuren 55, 56 und 58 (ile; asn; leu) von [Fig. 3](#) (Aminosäuren 55, 56 und 58 von SEQ ID NR. 4); (b) Aminosäuren 43–45 (arg; lys; phe) von [Fig. 3](#) (Aminosäuren 43 bis 45 von SEQ ID NR. 4); (c) Aminosäuren 40 bis 45 von SEQ ID NR. 4 (gly; gly; met; arg; lys; phe), bevorzugt Aminosäuren 38–44 von [Fig. 3](#) (Aminosäuren 38 bis 44 von SEQ ID NR. 4); und/oder (d) Aminosäure 19 (lys) von [Fig. 3](#) (Aminosäure 19 von SEQ ID NR. 4); vorzugsweise (a) und (b); vorzugsweise (a) und (c); vorzugsweise (b) und (c); vorzugsweise (a) und (d); vorzugsweise (b) und (d); vorzugsweise (c) und (d); vorzugsweise (a), (b) und (d); vorzugsweise (a), (c) und (d); vorzugsweise (b), (c) und (d); vorzugsweise (a), (b) und (c); vorzugsweise (a), (b), (c) und (d). Wir haben mit unseren Mutagenese-Untersuchungen herausgefunden, dass diese Aminosäuren für ein Binden, entweder gemeinsam oder einzeln, entscheidend sind.

[0069] Die Größe eines Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids (oder eines Polypeptids, das ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid umfasst) kann stark variieren, solange die erforderliche Funktionalität (basierend auf dem spezifischen Binden eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers) besteht. Unsere Daten haben gezeigt, dass so kleine Aminosäuresequenzen wie ein Hexamer spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper binden können (Beispiel 3).

[0070] In einigen Anwendungsformen ist das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) (und das Polypeptid, das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) umfasst oder im Wesentlichen daraus besteht) weniger als etwa 100 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 75 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 60 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 50 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 25 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 15 Aminosäuren lang, vorzugsweise weniger als etwa 10 Aminosäuren lang.

[0071] Es versteht sich, dass Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) mit (einem) weiteren Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) (diese Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) sind entweder gleich oder verschieden) wie auch mit weiteren Domänen von  $\beta_2$ GPI assoziiert, konjugiert und/oder verbunden sein kann. Dementsprechend umfasst die Erfindung polymere Formen von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en). Wie hier verwendet, enthält eine polymere Form eines Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids eine Vielzahl (d.h. mehr als 1) Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide. In einer Anwendungsform sind lineare Polymere von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden bereitgestellt. In einer anderen Anwendungsform sind verzweigte Polymere von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden bereitgestellt. In anderen Anwendungsformen stellt die Erfindung eine Vielzahl an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden bereit.

**[0072]** In einer anderen Anwendungsform sind Domäne 1- $\beta_2$ GPI multiple Antigenpeptide (Maps) bereitgestellt. Maps besitzen einen kleinen immunologisch inerten Kern mit radial verzweigenden Lysin-Dendriten, auf denen mehrere Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide verankert (d.h. kovalent gebunden) sein können. Posnett et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:1719–1725; Tam (1989) Meth. Enr. 168:7–15. Das Ergebnis ist ein großes Makromolekül mit einem hohen Verhältnis von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden zu Kern. Maps sind zweckdienliche, wirksame Antigene für Assays, wie E-LISA, und können ebenfalls für eine multivalente Präsentation, wie im toleragenen Kontext, zweckdienlich sein. Maps können synthetisch hergestellt werden und sind im Handel erhältlich (Quality Controlled Biochemicals, Inc. Hopkinton, MA). In einem typischen Map-System besteht eine Kernmatrix aus drei Lysinebenen und acht Aminosäuren für die Verankerung von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptiden. Das Map kann mit einem beliebigen in der Technik bekannten Verfahren synthetisiert werden, zum Beispiel mit einem Festphasenverfahren, zum Beispiel R.B. Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149.

**[0073]** Es versteht sich, dass jede beliebige verzweigte Struktur, wie Cyclodextrin, verwendet sein kann. Die verzweigte Struktur kann, muss aber nicht, klein sein. Im Zusammenhang mit einer Toleranzinduktion sollte die Plattform nicht als ein T-Zellunabhängiges Antigen wirken.

**[0074]** Es ist ebenfalls zu verstehen, dass bestimmte Sequenzvariationen in Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) eingeführt werden können, die dessen Reaktivität erhalten oder verstärken. Dementsprechend beinhaltet die Erfindung Modifikationen von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en), die nicht signifikant ihre Eigenschaften beeinflussen wie auch Varianten, die eine verstärkte Aktivität aufweisen. Diese Varianten und modifizierten Sequenzen werden zusammen als „funktionell äquivalente Varianten“ bezeichnet, die gleich, verstärkt oder verringert binden, wenn sie mit anderen Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid verglichen werden, und werden als „äquivalent“ bezeichnet, da sie die Fähigkeit zum spezifischen Binden an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper aufrechterhalten. Eine Modifizierung von Polypeptiden erfolgt in der Technik mit Routineverfahren und bedarf hier keiner detaillierten Beschreibung. Beispiele für modifizierte Polypeptide umfassen Polypeptide mit konservativen Substitutionen von Aminosäureresten, mit einer oder mehreren Deletionen oder Additionen von Aminosäuren, die die funktionelle Aktivität nicht signifikant verändern, oder die Verwendung chemischer Analoga, einschließlich alpha-Methyl-Aminosäuresubstitutionen, nichtproteinartige natürlich vorkommende Nichtprotein-Aminosäuren (wie Canavanin, DL-Methioninsulfoxid, delta-Hydroxylysin-Hydrochlorid und Aminoiso-buttersäure) und nicht-natürliche Aminosäuren. Aminosäurereste, die gegeneinander konservativ substituiert werden können, umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt: Glycerin/Alanin; Valin/Isoleucin/Leucin; Asparagin/Glutamin; Asparaginsäure/Glutaminsäure; Serin/Threonin; Lysin/Arginin und Phenylalanin/Tyrosin. Diese Polypeptide umfassen ebenfalls glycosyierte und nicht-glycosyierte Polypeptide, wie auch Polypeptide mit anderen post-translationalen Modifikationen, wie beispielsweise Glycosylierung mit verschiedenen Zuckern, Acetylierung und Phosphorylierung. Vorzugsweise sind die Aminosäuresubstitutionen konservativer Natur, d.h. die substituierte Aminosäure besitzt ähnliche chemische Eigenschaften wie die ursprüngliche Aminosäure. Derartige konservative Substitutionen sind in der Technik bekannt und Beispiele sind oben bereitgestellt.

**[0075]** Es versteht sich, dass bestimmte Aminosäurevariationen (wie Substitutionen) das Binden eines Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids an  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper auf die gleiche Art und Weise oder im gleichen Ausmaß beeinflussen können oder nicht. Außerdem könnte die Natur der substituierten Aminosäure(n) die Art und Weise sowie das Ausmaß des Bindens beeinflussen. Zum Beispiel haben wir festgestellt, dass die Substitution eines Argininrests durch einen Glycerinrest an Position 43 (Aminosäure 43 von SEQ ID NR. 4) zu einem Verlust der Fähigkeit führt, an einen Antikörper in manchen Patientenserien zu binden, während bei anderen Substitutionen keine Veränderung bei der Bindungsfähigkeit erfolgte (und bei noch weiteren Substitutionen sich Veränderungen ereigneten (d.h. dazwischen liegend). Als weiteres Beispiel scheint eine Substitution des Methionins an Position 42 durch ein Lysin oder Threonin das Binden nicht zu beeinflussen (in den Patienten, die wir getestet haben); allerdings, wenn Methionin an Position 42 durch Valin substituiert ist, scheint bei allen Patienten das Binden auszubleiben.

**[0076]** Zusätzlich zu den zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren und ihren Homoanaloga und Nonanaloga können mehrere Klassen von alpha-Aminosäuren in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Beispiele für diese weitere Klassen umfassen d-Aminosäuren, N<sup>a</sup>-Alkylaminosäuren, alpha-Alkylaminosäuren, cyclische Aminosäuren, chimäre Aminosäuren und diverse Aminosäuren. Diese nicht-natürlichen Aminosäuren sind weit verbreitet eingesetzt worden, um bioreaktive Polypeptide zu modifizieren, um die Widerstandsfähigkeit gegen einen proteolytischen Abbau zu verstärken und/oder konformationale Beschränkungen zu übertragen, um die biologische Aktivität zu verbessern. Hruby et al. (1990) Biochem. J. 268:249–262; Hruby et al. (1995) Methods in Mol. Biol. 35:201–240.

**[0077]** Die häufigsten N<sup>a</sup>-Alkylaminosäuren sind die N<sup>a</sup>-Methylaminosäuren, wie N<sup>a</sup>-Methylcystein (nC),

$N^{\alpha}$ -Methylglycin (nG),  $N^{\alpha}$ -Methylleucin (nL),  $N^{\alpha}$ -Methyllysin (nK) und  $N^{\alpha}$ -Methylvalin (nV). Beispiele für alpha-Alkylaminosäuren umfassen alpha-Methylalanin (mA), alpha-Aminoisobuttersäure (aiB), alpha-Methylprolin (mP), alpha-Methylleucin (mL), alpha-Methylvalin (mV), alpha-Methyl-alpha-aminobuttersäure (tv), Diethylglycin (deG), Diphenylglycin (dpG) und Dicyclohexylglycin (dcG). Balaran (1992) Pure & Appl. Chem. 64:1061–1066; Toniolo et al. (1993) Biopolymers 33:1061–1072; Hinds et al. (1991) Med. Chem. 34:1777–1789.

**[0078]** Beispiele für cyclische Aminosäuren umfassen 1-Amino-1-cyclopropancarboxylsäure (cG), 1-Amino-1-cyclopentancarboxylsäure (AcSc), 1-Amino-1-cyclohexancarboxylsäure (Ac6c), Aminoindancarboxylsäure (ind), Tetrahydroisochinolincarboxylsäure (Tic) und Pipedolinsäure (Pip). C. Toniolo (1990) Int'l. J. Peptide Protein Res. 35:287–300; Burgess et al. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:3808–3819. Beispiele für chimäre Aminosäuren umfassen Penicillamin (Pe) und Kombinationen von Cystein mit Valin, 4R- und 4S-Mercaptoprolin (Mpt), Kombinationen von Homocystein und Prolin und 4R- und 4S-Hydroxyprolinen (hyP) und eine Kombination von Homoserin und Prolin. Beispiele für diverse alpha-Aminosäuren umfassen basische Aminosäure-Analoga, wie Ornithin (Or),  $N^{\epsilon}$ -Methyllysin (mK), 4-Pyridylalanin (pyA), 4-Piperidinoalanin (piA) und 4-Aminophenylalanin; saure Aminosäure-Analoga, wie Citrullin (Cit) und 3-Hydroxyvalin; aromatische Aminosäure-Analoga, wie 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal), Phenylglycin (pG), 3,3-Diphenylalanin (dpA), 3-(2-Thienyl)-alanin (Thi) und Halogenphenylalanine (z.B. 2-Fluorphenylalanin und 4-Chlorphenylalanin); hydrophobe Aminosäure-Analoga, wie t-Butylglycin (d.h. tertiäres Leucin (tL)), 2-Aminobuttersäure (Abu), Cyclohexylalanin (Cy), 4-Tetrahydropyranylalanin (tpA), 3,3-Dicyclohexylalanin (dcA) und 3,4-Dehydroprolin.

**[0079]** Zusätzlich zu den alpha-Aminosäuren können ebenfalls in der vorliegenden Erfindung weitere Aminosäuren, wie beta-Aminosäuren, verwendet sein. Beispiele für diese weiteren Aminosäuren umfassen 2-Aminobenzoësäure (Abz),  $\beta$ -Aminopropanonsäure ( $\beta$ -Apr),  $\gamma$ -Aminobuttersäure ( $\gamma$ -Abu) und 6-Aminohexansäure ( $\epsilon$ -Ahx). Carboxylsäuren, wie 4-Chlorbuttersäure (By) und 3-Chlorpropansäure (Pp) sind ebenfalls als der erste Rest am N-Terminus bei der Synthese von cyclischen Thioetherpeptiden verwendet werden.

**[0080]** Weitere Verfahren zur Modifizierung, einschließlich der Verwendung von in der Technik bekannten Kopplungsverfahren umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, enzymatische Mittel, oxidative Substitution und Chelatbildung. Modifikationen können verwendet werden, zum Beispiel für ein Anheften von Markierungen für Immunoassays, wie das Anheften von radioaktiven Resten für einen Radioimmunoassay. Modifizierte Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) werden unter Anwendung etablierter Verfahren in der Technik hergestellt und können unter Anwendung in der Technik bekannter Standardassays durchmustert werden, wobei einige dieser Verfahren hier und in den Beispielen beschrieben sind.

**[0081]** Die Erfindung umfasst ebenfalls Fusionsproteine, die ein oder mehrere  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptide umfassen. Im Sinne dieser Erfindung enthält ein  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Fusionsprotein ein oder mehrere  $\beta_2$ GPI-Polypeptide und eine weitere Aminosäuresequenz, an die es im nativen Molekül nicht gebunden ist, zum Beispiel eine heterologe Sequenz oder homologe Sequenz von einer anderen Region, wie beispielsweise einer anderen Domäne von  $\beta_2$ GPI. Zweckdienliche heterologe Sequenzen umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Sequenzen, die für eine Sekretion von einer Wirtszelle sorgen, die eine immunologische Reaktivität verstärken oder die Kopplung des Polypeptids an einen Immunoassay-Träger oder Trägerelement erleichtern. Zum Beispiel kann ein  $\beta_2$ GPI-Polypeptid mit einer heterologen Sequenz fusioniert sein, die eine Reinigung erleichtert. Beispiele für derartige Sequenzen sind in der Technik bekannt und umfassen diejenigen, die Epitope wie Myc, HA (von Influenzavirus-Hämaggglutinin abgeleitet), His-6 oder FLAG codieren. Weitere heterologe Sequenzen, die eine Reinigung erleichtern, stammen von Proteinen, wie Glutathion S-Transferase (GST), Maltose-bindendes Protein (MBP) oder dem Fc-Teil von Immunglobulin.

**[0082]** Ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid kann ein T-Zellepitop enthalten oder nicht enthalten. Für Detektionszwecke kann ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid ein T-Zellepitop oder -epitope enthalten oder nicht enthalten, da die primäre Verwendung des Polypeptids in diesem Zusammenhang dem Nachweis eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers dient, was vom Vorhandensein von T-Zellepitopen nicht abhängig ist. Im Tolerogen-Zusammenhang fehlt allerdings einem Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid ein (jegliches) nachweisbare T-Zellepitop oder -epitope bezogen auf ein Individuum, das  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper aufweist. Folglich enthält in manchen Anwendungsformen ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid kein(e) T-Zellepitop(e) (d.h. sie fehlen) (und dementsprechend ein Polypeptid, das ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid umfasst und kein T-Zellepitop enthält).

**[0083]** Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins eines T-Zellepitops sind in der Technik gut bekannt. Zum Beispiel können verschiedene Assays angewandt werden, die eine T-Zellproliferation (wie Thymidinein-

bau) nachweisen. Das Vorhandensein von T-Zellepitopen kann ebenfalls durch Messen der Sekretion von T-Zellen stammenden Lymphokinen mit Hilfe in der Technik bekannter Verfahren bestimmt werden. Polypeptide, die keinen statistisch signifikanten Einbau von Thymidin über den Hintergrund induzieren (d.h. im Allgemeinen p kleiner als 0,05 unter Anwendung statistischer Verfahren), werden im Allgemeinen als ohne T-Zellepitope erachtet, obwohl es bekannt ist, dass der Thymidineinbau abhängig vom zu testenden Polypeptid quantitativ variieren kann. Im Allgemeinen zeigt ein Stimulationsindex unter etwa 2–3, bevorzugter kleiner als etwa 1 ein Fehlen von T-Zellepitopen an. Ort und Gehalt an T-Zellepitopen werden empirisch bestimmt.

**[0084]** Im toleragenen Zusammenhang bindet eine Domäne bevorzugt spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper auf der Oberfläche einer B-Zelle (d.h. bindet an einen Oberflächen-Antikörper von einer B-Zelle, wobei der Antikörper zum spezifischen Binden eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidepitops fähig ist). Es wird vermutet, dass dieses Binden, besonders zusammen mit einer Vernetzung, eine B-Zellenergie auslöst. Es versteht sich, dass, weil ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid definitionsgemäß in der Lage ist, spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu binden, es zu erwarten wäre, dass ein beliebiges Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid ähnlich in der Lage wäre, an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper auf der Oberfläche einer B-Zelle zu binden.

**[0085]** Wie es unten diskutiert ist (und oben bei der Diskussion der polymeren Formen), vorzugsweise im Zusammenhang mit Toleragenen, wird ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid in einer multivalenter Form präsentiert, entweder über eine polymere Form und/oder an ein geeignetes Valenzplattformmolekül konjugiert.

#### Präparation von Polypeptiden dieser Erfindung

**[0086]** Die Polypeptide der Erfindung können mit in der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden. Die Polypeptide können mit rekombinantern Verfahren (d.h. einzelne oder fusionierte Polypeptide) oder mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Polypeptide, besonders kürzere Polypeptide mit bis zu etwa 50 Aminosäuren werden bequemerweise mittels chemischer Synthese hergestellt. Verfahren zur chemischen Synthese sind in der Technik bekannt und im Handel erhältlich. Zum Beispiel könnte ein Polypeptid mit einem automatisierten Polypeptidsynthetisierer mit Hilfe des Festphasenverfahrens hergestellt werden. Polypeptide können ebenfalls mittels chemischer Synthese unter Anwendung in der Technik bekannter Verfahren hergestellt werden.

**[0087]** Polypeptide können ebenfalls mit Expressionssystemen unter Anwendung rekombinanter Verfahren hergestellt werden. Die Verfügbarkeit von Polypeptide codierenden Nukleinsäuren erlaubt die Konstruktion von Expressionsvektoren, die intakte (d.h. native) Polypeptide, funktionell äquivalente Fragmente davon oder rekombinante Formen codieren. Ein Polynukleotid, welches das erwünschte Polypeptid codiert, ob in fusionierter oder reifer Form, und das entweder eine die Sekretion erlaubende Signalsequenz enthält oder nicht enthält, kann in Expressionsvektoren ligiert werden, die für einen beliebigen passenden Wirt geeignet sind. Sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Wirtssysteme können Verwendung finden. Das Polypeptid wird dann aus lysierten Zellen oder aus dem Kulturmedium isoliert und in dem für die beabsichtigte Verwendung erforderlichen Ausmaß gereinigt. Reinigung oder Isolierung der in den Wirtssystemen exprimierten Polypeptide können mit einem beliebigen in der Technik bekannten Verfahren erfolgen. Zum Beispiel kann cDNA, die ein intaktes Polypeptid oder ein Fragment davon codiert, an einen in einem Expressionssystem inserierten geeigneten Promotor funktionsfähig geknüpft werden und in eine geeignete Wirtszelle transformiert werden. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, die eine zu erfolgende Transkription und Translation erlauben, und das erwünschte Polypeptid wird wiedergewonnen. Weitere die Transkription und Translation kontrollierende Abschnitte, wie Signalsequenzen, die das Polypeptid zu spezifischen Zellkompartimenten steuern (d.h. für eine Sekretion), können ebenfalls verwendet sein. Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind in der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel *E. coli* und *B. subtilis*. Beispiele für eukaryotische Wirtszellen sind in der Technik bekannt und umfassen Hefe, Vogel-, Insekten-, Pflanzen- und Tierzellen, wie COS7, HeLa, CHO und weitere Säugerzellen. Hefesysteme umfassen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Pichia pastoris*.

**[0088]** Zum Beispiel wird zur Expression eines  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptids in *Pichia pastoris* (zum Beispiel unter Verwendung der Stämme SMD 1168 und SMD 1168H) eine  $\beta_2$ GPI-codierende volllange cDNA als ein PCR-Template verwendet, um Domäne 1-Genfragmente mit einer rekonstituierten Kex2-Signalpeptidschnittstelle am Amino-Terminus zu erzeugen. Die Fragmente werden in den Expressionsvektor pPIC-Zalpha (Invitrogen Corp.) kloniert, der mit den Restriktionsenzymen Xho I und Sal I linearisiert wird. Die konstruierten Gene ersetzen das native Domäne 1-Signalpeptid durch das alpha-Faktor-Signalpeptid der Hefe und enden am ausgewählten Aminosäuren am Carboxy-Terminus.

**[0089]** Wenn ein Expressionssystem für die Produktion von  $\beta_2$ GPI-Polypeptiden eingesetzt wird, so wird häufig die Konstruktion eines Fusionsproteins bevorzugt, das die Reinigung erleichtert. Beispiele für Komponenten für diese Fusionsproteine umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, myc, HA, FLAG, His-6, Glutathion S-Transferase, Maltose-bindendes Protein oder den Fc-Teil vom Immunglobulin. Diese Verfahren sind in der Technik bekannt. Siehe zum Beispiel Redd et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:11193–11197. In der Technik bekannte Verfahren können zum Entfernen unerwünschter Aminosäuren von Fusionen, wie His-6, eingesetzt werden. Zum Beispiel kann Carboxypeptidase A für eine Eliminierung Carboxy-terminaler Aminosäuren verwendet werden. Carboxypeptidase A stoppt an den Aminosäuren Prolin oder Arginin. Für eine geeignete Reinigung kann Festphasen-Carboxypeptidase A (Sigma) eingesetzt werden.

**[0090]** Bevorzugt werden die Polypeptide wenigstens partiell gereinigt oder isoliert, insbesondere wenn sie für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Bevorzugt sind die Polypeptide wenigstens zu 50% rein. In diesem Zusammenhang wird die Reinheit als Gewichtsprozent des Gesamtproteinangehalts des Präparats berechnet. Bevorzugter sind die Proteine zu 50-75% rein. Höher gereinigte Proteine können ebenfalls erhalten werden und sind von der vorliegenden Erfindung umfasst. Für den klinischen Gebrauch sind die Proteine bevorzugt hoch rein, wenigstens etwa zu 80% rein und frei von Pyrogenen und anderen Verunreinigungen. Verfahren für eine Proteinreinigung sind in der Technik bekannt und werden hier nicht detailliert beschrieben.

**[0091]** In einigen Systemen, besonders in einigen rekombinanten Systemen, bei Anwendungsformen, die ein zusätzliches (fünftes) Cystein oder ein Cystein enthalten, das reduziert werden soll (zum Beispiel um das Polypeptid an ein Plattformmolekül zu konjugieren), kann das Ausgangsprodukt niedermolekulare gemischte Disulfide umfassen, in denen das fünfte (oder zusätzliche, reaktive) Cystein an einem anderen relativ niedermolekularen Rest oder Reste kovalent gebunden ist. In diesen Beispielen ist eine selektive Reduktion des zusätzlichen Cysteins erwünscht (unter Beibehaltung der anderen Disulfidbindungen). Eine derartige selektive Reduktion kann unter Verwendung eines Festphasenreduktionsmittels, wie DTT, an einem festen Träger, wie Acrylamid (wie beispielsweise REDUCTACRYL von CalBiochem, San Diego) durchgeführt werden.

**[0092]** Außerdem kann es in Systemen erwünscht sein, die für eine Produktion eines Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids mit einem zusätzlichen Cystein (d.h. dieses Cystein dient als reaktive Gruppe) entwickelt und/oder eingesetzt sind, das Polypeptid so zu produzieren, dass eine weitere Aminosäure oder -säuren dem zusätzlichen Cystein in der Sequenz folgen, um das Cystein während der Synthese oder Produktion zu schützen.

**[0093]** Insbesondere wenn das Polypeptid an eine Plattform konjugiert werden soll (unten diskutiert), wird bevorzugt eine chemische Synthese genutzt. Die chemische Synthese erlaubt eine Modifikation des N- oder C-Terminus, was eine Konjugation an ein Plattformmolekül erleichtert.

**[0094]** Wenn ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid produziert wird, wie diejenigen, die ein weiteres Cystein zusätzlich zu den vier Cysteinen von Domäne 1 (welche Disulfidbindungen bilden) besitzen, sollten die Bedingungen so ausgewählt sein, dass sie eine korrekte Bildung der Disulfidbrücken fördern. Als ein Beispiel wird ein reduziertes Polypeptid durch Lösen in 6 M Guanidinhydrochlorid (GnHCl) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml denaturiert. Das Falten wird durch eine Dialyse bei Raumtemperatur gegen folgenden renaturierenden Puffer erreicht: 0,1 M GnHCl, 0,5 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 8,5. Um eine korrekte Disulfidbrückenbildung zu unterstützen, wird ein Gemisch aus 0,3 mM beziehungsweise 3 mM oxidiertem und reduziertem Glutathion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird mittels HPLC kontrolliert und die verschiedenen Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert. In unseren Versuchen zeigte die analytische HPLC nach 5 Stunden Cyclisierung ungefähr 65% Umwandlung, von denen ~ 50% die korrekte Masse (MG = 7260) besaßen und ~ 15% als ein Glutathion-Addukt (MG = 7567) vorlagen. Das gefaltete Protein, dem Glutathion fehlt, wird dann mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

#### Konjugate von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en)

**[0095]** Die Erfindung stellt ebenfalls Konjugate von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) bereit. In einigen Anwendungsformen kann/können Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) mit einem Träger oder einer Markerierung konjugiert sein. Mehrere Verfahren für eine Bildung einer derartigen Bindung sind in der Technik bekannt und müssen hier nicht detailliert beschrieben werden. Jeder beliebige Träger kann verwendet werden, der sicher ist und selbst keine Produktion für den Wirt gesundheitsschädlicher Antikörper induziert. Geeignete Träger sind üblicherweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, wie Proteine; Polysaccharide, wie Latex, funktionalierte Sepharose, Agarose, Cellulose, Cellulose-Kügelchen und ähnliches, polymere Aminosäuren, wie Polyglutaminsäure, Polylysin, und ähnliche; Aminosäure-Copolymere und inaktive Viruspartikel oder attenuierte Bakterien, wie Salmonella. Besonders zweckdienliche Proteinsubstrate sind Serumalbumine, Keyhole-Lim-

pet-Hämocyanin, Immunglobulinmoleküle, Thyroglobulin, Ovalbumin, Tetanustoxoid und andere Proteine, die dem Fachmann gut bekannt sind.

**[0096]** Markierungen sind in der Technik bekannt und müssen hier nicht detailliert beschrieben werden. Es gibt zahlreiche dem Fachmann bekannte verschiedene Markierungen und Verfahren zum Markieren. Beispiele für Markierungsarten, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt sein können, umfassen Enzyme, Radioisotope, fluoreszierende Verbindungen, kolloidale Metalle, chemilumineszierende Verbindungen und biolumineszierende Verbindungen. Der Fachmann kennt weitere geeignete Markierungen oder ist in der Lage, mit Hilfe von Routineexperimenten weitere zu ermitteln. Außerdem kann die Bindung dieser Markierungen an Polypeptide der Erfindung unter Anwendung von Standardverfahren erfolgen, die dem Fachmann allgemein bekannt sind.

**[0097]** Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) (am bevorzugtesten ohne ein T-Zellepitop) kann/können an ein nicht immunogenes Valenzplattformmolekül (auch als „Plattform“ bezeichnet) konjugiert sein, das die Präsentation von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) verstärkt. U.S. Pat. Nr. 5.162.515; 5.276.013; 5.552.391. Eine Plattform kann eine proteinartige oder nicht-proteinartige (d.h. organische) Plattform sein. Beispiele für proteinartige Plattformen umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Albumin, Gammaglobulin, Immunglobulin (IgG) und Ovalbumin. Borel et al. (1990) Immunol. Methods 126:159–168; Dumas et al., (1995) Arch. Dermatol. Res. 287:123–128; Borel et al. (1995) Int. Arch. Allergy Immunol. 107:264–267; Borel et al. (1996) Ann. N. Y. Acad. Sci. 778:80–87. Am bevorzugtesten ist eine Plattform multivalent (d.h. enthält mehr als eine Bindungs- oder Verknüpfungsstelle). Bevorzugt enthält eine multivalente Plattform wenigstens 2, bevorzugter wenigstens 3, bevorzugter wenigstens 5, bevorzugter wenigstens 7, bevorzugter wenigstens 10, noch bevorzugter wenigstens 12, noch bevorzugter wenigstens 15 Verknüpfungsstellen. Es versteht sich, dass im Zusammenhang der Toleranzinduktion (d.h. wenn eine Plattform zusammen mit einem geeigneten Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid verwendet ist, um eine Immuntoleranz zu bewirken) in Abhängigkeit der Natur des eingesetzten Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids/e und des bestimmten Zustands, jede beliebige Anzahl an Verknüpfungsstellen hinreichend sein kann. Es versteht sich ebenfalls, dass eine Plattform kein T-Zell-unabhängiges Antigen ist.

**[0098]** Bevorzugte Valenzplattformmoleküle sind biologisch stabilisiert, d.h. sie zeigen eine in vivo Exkretionshalbwertszeit häufig von Stunden bis zu Tagen oder Monaten, um eine therapeutische Wirksamkeit zu verleihen, und bestehen bevorzugt aus einer synthetischen Einzelkette einer definierten Zusammensetzung. Sie besitzen im Allgemeinen ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 200 bis etwa 200.000, bevorzugt etwa 200 bis etwa 50.000 (oder weniger, wie 30.000). Beispiele für Valenzplattformmoleküle im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Polymere (oder bestehen aus Polymeren), wie Polyethylenglycol (PEG), Poly-D-Lysin, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, D-Glutaminsäure und D-Lysin (im Verhältnis 3:2). Bevorzugte Polymere basieren auf Polyethylenglycolen (PEGs) mit einem Molekulargewicht von etwa 200 bis etwa 8.000. Weitere Moleküle, die an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) konjugiert sein können, sind Albumin und IgG.

**[0099]** Weitere bevorzugte Valenzplattformmoleküle, die für eine Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind chemisch definierte, nichtpolymere Valenzplattformmoleküle, wie diejenigen, die im mit U.S. Patent 5.552.391 desselben Anmelders offen gelegt sind. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen, herkömmlicheren Plattformen besitzen diese Plattformen den Vorteil, dass sie ein homogenes (d.h. einheitliches) Molekulargewicht besitzen (wie im Gegensatz zu einem polydispersen Molekulargewicht) und folglich „chemisch definiert“ sind. Dementsprechend versteht es sich, dass eine Population von Konjugaten unter Verwendung dieser Plattformen eine Plattform mit homogenem Molekulargewicht umfassen oder im Wesentlichen monodispers sind (d.h. eine enge Molekulargewichtsverteilung besitzen). Ein Maß für die Breite der Verteilung des Molekulargewichts in einer Probe (wie eine Zusammensetzung und/oder Population von Plattformmolekülen) eines Plattformmoleküls ist die Polydispersität der Probe. Die Polydispersität wird als ein Maß für die Homogenität oder Nichthomogenität des Molekulargewichts einer Polymerprobe verwendet. Die Poyldispersität wird durch Dividieren des gewichtsmittleren Molekulargewichts (MG) durch das zahlenmittlere Molekulargewicht (Mn) berechnet. Der Wert Mw/Mn ist für ein vollkommen monodisperses Polymer gleich Eins. Die Polydispersität (Mw/Mn) wird mit vielen in der Technik verfügbaren Verfahren bestimmt, wie Gelpermeationschromatographie. Die Polydispersität (Mw/Mn) einer Probe von Plattformmolekülen ist bevorzugt kleiner als 2, bevorzugter kleiner als 1,5 oder kleiner als 1,2, kleiner als 1,07, kleiner als 1,02 oder z.B. etwa 1,05 bis 1,5 oder etwa 1,05 bis 1,2. Typische Polymere weisen allgemein eine Polydispersität von 2–5 oder in manchen Fällen gar 20 oder mehr auf. Vorteile der Eigenschaft der geringen Polydispersität des Valenzplattformmoleküls umfassen eine verbesserte Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit, da die Moleküle hinsichtlich ihrer Größe im Wesentlichen homogen sind und Variationen der biologischen Aktivität aufgrund der großen Variationen des Molekulargewichts minimiert sind. Die gering polydispersen Moleküle sind folglich pharmazeutisch optimal formuliert und einfach zu analysieren. Außerdem besteht eine kontrollierte Valenz der Population von Molekülen

in der Probe.

**[0100]** Beispiele für bevorzugte homogene, chemisch definierte Valenzplattformmoleküle, die für eine Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen derivatisiertes Ethylendioxydiethylamin (EDDA) und Triethylenglycol (TEG). Weitere Beispiele für bevorzugte homogene, chemisch definierte Plattformen sind unten wie auch in der Technik beschrieben. In weiteren Anwendungsformen ist Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) an Albumin, IgG und/oder PEG konjugiert.

**[0101]** Weitere geeignete Valenzplattformmoleküle umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Tetraaminobenzol, Heptaaminobetacyclodextrin, Tetraaminopentaerythritol, 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan (Cyclam) und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen).

**[0102]** Im Allgemeinen werden diese Plattformen mit Hilfe chemischer Standardsyntheseverfahren hergestellt. PEG muss derivatisiert und multivalent gemacht werden, was mit Hilfe von Standardverfahren gelingt. Einige für die Konjugatsynthese geeignete Substanzen, wie PEG, Albumin und IgG sind im Handel erhältlich.

**[0103]** Eine Konjugation von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) an ein Valenzplattformmolekül kann auf beliebige Art und Weise erfolgen, üblicherweise mit Hilfe eines oder mehrerer Vernetzungsmittel sowie funktioneller Gruppen auf dem Polypeptid und dem Valenzplattformmolekül. Plattformen und Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) müssen über geeignete verknüpfende Gruppen verfügen. Verknüpfende Gruppen werden an Plattformen mit Hilfe von Standardverfahren der chemischen Synthese addiert. Verknüpfende Gruppen können an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) unter Anwendung entweder von Festphasen-Standardsyntheseverfahren oder von rekombinantern Verfahren addiert werden. Rekombinante Ansätze können eine posttranskriptionale Modifikation erfordern, um einen Linker anzuheften, und derartige Verfahren sind in der Technik bekannt.

**[0104]** Als Beispiel enthalten Polypeptide Aminosäure-Seitenkettenreste, die funktionelle Gruppen wie Amino-, Carboxyl- oder Sulfhydrylgruppen enthalten, die als Kopplungsstellen des Polypeptids an der Plattform dienen. Reste, die derartige funktionelle Gruppen aufweisen, können an das Polypeptid addiert werden, falls das Polypeptid diese Gruppen nicht schon enthält. Derartige Reste können mit Festphasen-Syntheseverfahren oder rekombinantern Verfahren eingefügt werden, wobei beide Verfahren in der Peptidsynthese gut bekannt sind. Wenn das Polypeptid eine Kohlenwasserstoff-Seitenkette(n) besitzt, können funktionelle Amino-, Sulfhydryl- und/oder Aldehydgruppen darin mit Hilfe der konventionellen Chemie eingefügt werden. Zum Beispiel können primäre Aminogruppen durch eine Reaktion mit Ethyldiamin in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid, Sulfhydrylgruppen können durch eine Reaktion mit Cysteamindihydrochlorid und anschließender Reduktion mit einem Standarddisulfidreduktionsmittel eingefügt werden, während Aldehydgruppen im Anschluss an eine Oxidation gebildet werden. Auf ähnliche Weise kann das Valenzplattformmolekül ebenfalls derivatisiert werden, um dann funktionelle Gruppen zu enthalten, falls es nicht bereits geeignete funktionelle Gruppen besitzt.

**[0105]** Polypeptide können ebenfalls ortsspezifisch an ihren C-Termini mit einem als reverse Proteolyse genannten Prozess modifiziert werden. Im Grunde verwendet die reverse Proteolyse proteolytische Enzyme, um die Bildung einer Amidbindung unter Bedingungen zu katalysieren, die die Reaktion in diese Richtung lenken. Polypeptide sind unter Anwendung der reversen Proteolyse für eine Bindung Hydrazid-haltiger Linker (Rose, K. et al. Bioconjugate Chemistry 1991, 2, 154–159) oder Aminoxy-haltiger Linker (Rose, K. et al. Bioconjugate Chemistry 1996, 7, 552–556) an ihren C-Termini über Amidbindungen modifiziert worden. Derartige modifizierte Polypeptide können umgesetzt werden, um Hydrazon- oder Oxim-Bindungen mit anderen Molekülen von Interesse zu bilden, die Aldehyd- oder Ketogruppen enthalten. Zusätzlich könnten weitere Linker, wie Sulfhydryl-haltige Linker, bequemerweise über eine reverse Proteolyse angeheftet werden.

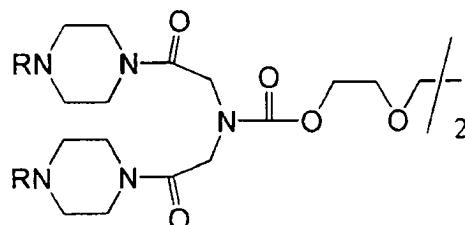
**[0106]** Hydrophile Linker mit variablen Längen sind für eine Kopplung von Polypeptiden (oder anderen bioaktiven Molekülen) an Valenzplattformmoleküle zweckdienlich. Geeignete Linker umfassen lineare Oligomere oder Polymere von Ethylenglycol. Derartige Linker umfassen Linker mit der Formel  $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ , wo  $n = 0–200$ ,  $m = 1$  oder  $2$ ,  $R^1 = H$  oder eine Schutzgruppe, wie Trityl,  $R^2 = H$  oder Alkyl oder Aryl, z.B. 4-Nitrophenylester, ist. Diese Linker sind bei einer Kopplung eines Moleküls, das eine Thiol-reaktive Gruppe enthält, wie Halogenacyl, Maleimid, etc. über einen Thioether an ein zweites Molekül zweckdienlich, das eine Aminogruppe über eine Amidbindung enthält. Diese Linker sind hinsichtlich der Reihenfolge der Bindung flexibel, d.h. der Thioether kann zuerst oder zuletzt gebildet werden.

**[0107]** Wie oben diskutiert, kann/können Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) an eine beliebige von mehreren geeigneten Plattformen auf eine beliebige von mehreren Arten konjugiert werden. In einer bevorzugten Anwen-

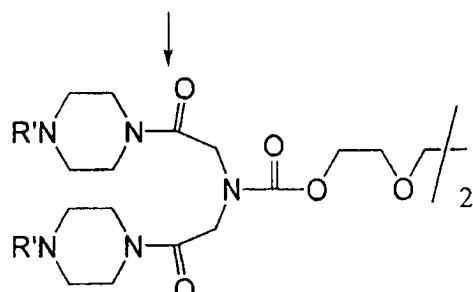
dungsform wird die Tetrabromacetyl-Plattform PIZ/IDA/TEG- $\beta_2$ GPI Domäne 1 verwendet. Weitere bevorzugte Anwendungsformen stehen in den Beispielen.

[0108] Derivate der PIZ/IDA/TEG-(PITG)-Plattform können, wie unten gezeigt, dargestellt werden.

[0109] Beispiele für kompatible vernetzende Gruppen an einer PITG-Plattform



Plattform (Bromoacetyl-PITG)



Konjugat

Plattform	Domäne 1-Polypeptid	Konjugat
R = XCH <sub>2</sub> OH	D1-SH	R' = D1-SCH <sub>2</sub> CO

[0110] Um ein Beispiel für eine Konjugat-Anwendungsform zu geben, wird Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) mit einem Thiol-Linker am N-Terminus mit Hilfe einer Festphasensynthese oder mit rekombinanten Verfahren dargestellt. Der Linker kann Cystein oder ein SH-haltiger Rest sein. Das modifizierte Polypeptid kann dann mit einer geeignet derivatisierten Plattform (wie Bromoacetyl oder Iodacetyl) alkyliert werden.

[0111] In einigen Anwendungsformen wird ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid über eine Sulfhydrylgruppe (Thiol oder SH), zum Beispiel an einem Cystein, konjugiert und führt zu einer Thioether-Bindung in dem Konjugat. In einigen Anwendungsformen wird dieses reaktive Cystein von dem fünften Cystein, das in  $\beta_2$ GPI mit enthalten ist, bereitgestellt (Beispiel 5).

[0112] In einigen Anwendungsformen werden die Konjugate über eine Oxim-Bindung gebildet. Eine Oxim-Bindung kann durch Umsetzen, zum Beispiel einer Carbonylgruppe, wie ein Aldehyd oder Keton, auf einem Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid mit einer Plattform, die eine Aminooxy-reaktive Gruppe, wie Aminooxy, Aminooxyacetyl und Aminooxyalkyl, gebildet werden. Die Aminooxygruppen können auf Triethylenglycol- oder Hexylketten vorliegen, allerdings würde jede beliebige Kette hinreichend sein, die Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome umfasst, solange sie mit -ONH<sub>2</sub> endet.

[0113] Zur Herstellung dieser Konjugate wird ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid selektiv modifiziert, um einen Aldehyd- oder Ketonrest an einer bestimmten Position auf dem Polypeptid, wie dem N-Terminus, zu erzeugen. Zweitens wird das Polypeptid mit einer multivalenten Plattform umgesetzt, die Aminooxygruppen enthält, um Oxim-Bindungen zwischen der Plattform und dem Polypeptid zu bilden.

[0114] Der N-Terminus des Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids kann zu einem Aldehyd oder Keton durch eine Transaminierungsreaktion, die in der Technik bekannt ist, umgewandelt werden. Allgemein macht die Transaminierungsreaktion aus der N-terminalen Kohlenstoff-Stickstoff-Einzelbindung eine Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung. Ein Glycin am N-Terminus reagiert und bildet eine Glyoxylgruppe, einen Aldehyd. Die meisten anderen Aminosäuren reagieren und bilden aufgrund der Aminosäure-Seitenkette einen Keton.

**[0115]** Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung einer Glyoxylgruppe am N-Terminus ist, ein N-terminates Serin oder Threonin mit Natriumperiodat zu oxidieren. Diese Oxidation spaltet die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen den Hydroxyl- und Aminogruppen des N-terminalen Serins oder Threonins und liefert somit eine Glyoxylgruppe.

**[0116]** In einigen Anwendungsformen können multivalente Plattformen, die Aminoxyacetyl-(AOA)-reaktive Gruppen enthalten, hergestellt werden, um die selektiv modifizierten Polypeptide mit den Plattformen zu verbinden. Aminoxyacetyl-(AOA)-Gruppen können an die Aminogruppen enthaltenden Plattformen durch eine Acylierung mit einer N-geschützten Aminoxyacetylgruppe und anschließende Entfernung der Schutzgruppe bequem angeheftet werden. Allerdings geht die Reaktion von Glyoxypolypeptiden mit AOA-derivatisierten Plattformen nur langsam vonstatten und beansprucht mehrere Tage, um Oxim-Bindungen zwischen dem Polypeptid und der Plattform zu bilden. Beispiel 5 beschreibt die Synthese von Konjugatverbindung 44, die ein Anheften eines transaminierten Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids an eine aminoacylierte tetramere Plattform zur Folge hat. Die Erfindung umfasst dieses Konjugat.

**[0117]** In anderen Anwendungsformen können Plattformen, die Aminoxyalkyl-reaktive Gruppen enthalten, verwendet werden. Aminoxyalkylgruppen sind als eine Aminoxygruppe an einem ersten Kohlenstoff definiert, wobei der erste Kohlenstoff vorzugsweise nicht direkt an einer elektronenziehenden Gruppe, wie an einem zweiten Kohlenstoff, der Teil einer Carbonylgruppe ist, gebunden ist. Wir haben beobachtet, dass Aminoxyalkylgruppen einfacher mit Ketonen und Aldehyden zur Bildung von Oximen reagieren als Aminoxyacetylgruppen. Die Aminoxyacetylgruppe scheint allgemein weniger reaktiv zu sein als andere Aminoxygruppen (Aminoxyalkylgruppen), die nicht einem Carbonyl benachbart sind. Es wird vermutet, dass das Carbonyl der Aminoxyacetylgruppe eine Verringerung der Reaktivität aufgrund elektronenziehender Effekte verursacht. Weitere Informationen bezüglich dieser Plattformen und Konjugate stehen in den Beispielen. Konjugatverbindung 45, in Beispiel 5 beschrieben, wurde durch Anheften eines transaminierten  $\beta_2$ GPI-Domäne 1-Polypeptids an eine tetramere Aminoxy-Plattform synthetisiert. Die Erfindung umfasst dieses Konjugat, wie auch die  $\beta_2$ GPI-Domäne 1-Polypeptid-Oximkonjugate, die bei einer AO-basierten Synthese entstehen.

#### Polynukleotide der Erfindung

**[0118]** Die Erfindung stellt ebenfalls Polynukleotide (einschließlich isolierter natürlich vorkommender und nicht-natürlich vorkommender Polynukleotide) bereit, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) codieren. Derartige Polynukleotide sind zum Beispiel für die Herstellung von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) zweckdienlich. Die Herstellung von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) kann unter Anwendung von Standardverfahren der Technik, wie rekombinannten Klonierungs/Expressionsvektoren und Proteinaufreinigungsverfahren, erfolgen. Falls die Herstellung *in vivo* erfolgen soll, wird ein geeignetes Expressionssystem eingesetzt, wie sie unten aufgeführt sind. Wenn die Aminosäuresequenz von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) bekannt ist (die mit Hilfe von Standardverfahren der Proteinsequenzierung erhalten wird), kann eine Polynukleotid konstruiert werden, das für diese bestimmte Aminosäuresequenz codiert. Polynukleotide können synthetisiert oder (wenn geeignet) von genomischen oder cDNA-Sequenzen gewonnen werden.

**[0119]** Die Erfindung umfasst ebenfalls Klonierungsvektoren und Expressionsvektoren, die ein beliebiges der oben beschriebenen Polynukleotide enthalten. Diese Vektoren sind in der Technik gut bekannt (z.B. diejenigen für eine Verwendung *in vitro*, in Bakterien-, Säuger-, Hefe- und Insektenexpressionssystemen) und müssen hier nicht beschrieben werden. Siehe zum Beispiel Gacesa und Ramji, Vectors, John Wiley & Sons (1994).

**[0120]** Die Erfindung umfasst ebenfalls Wirtszellen, die ein beliebiges der Polynukleotide und/oder beliebige Vektoren, die hier beschrieben sind, enthalten (d.h. transformiert sind mit oder umfassen). Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Wirtszellen können verwendet werden. Prokaryotische Werte umfassen Bakterienzellen, wie zum Beispiel *E. coli*, *B. subtilis* und Mycobakterien. Eukaryotische Werte sind Pilz-(einschließlich Hefe), Insekten-, Vogel-, Pflanzen- und Säugerzellen. Wirtssysteme sind in der Technik bekannt und müssen hier nicht detailliert beschrieben werden. Die Wirtszellen dieser Erfindung können unter anderem als Behältnisse für die oben beschriebenen Polynukleotide und/oder Vehikel für die Herstellung von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e)-Polynukleotiden und/oder Polypeptiden verwendet sein. Sie können ebenfalls als Vehikel für eine *in vivo* Übertragung von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) verwendet sein.

#### Zusammensetzungen der Erfindung

**[0121]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem Zusammensetzungen bereit, umfassend Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide (einschließlich aller oben beschriebenen Polypeptid-Anwendungsformen, wie Fusionen,

polymerer Polypeptide und Konjugate), und stellt auch Zusammensetzungen bereit, umfassend Domäne 1- $\beta_2$ GPI codierende Polynukleotide. Diese Zusammensetzungen sind besonders für eine Verabreichung an diejenigen Individuen zweckdienlich, für die eine Induktion von Toleranz von Vorteil ist. Die Zusammensetzungen sind ebenfalls als Reagenzien für Nachweissysteme zweckdienlich.

**[0122]** Im Allgemeinen umfassen die Zusammensetzungen der Erfindung für eine Verwendung bei Induktion von Toleranz eine wirksame Menge an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en), vorzugsweise in einem pharmazeutisch verträglichen Exzipienten, und können in verschiedenen Formulierungen vorliegen. Wie es in der Technik bekannt ist, ist ein pharmazeutisch verträglicher Exzipient eine relativ inerte Substanz, die eine Verabreichung einer pharmazeutisch wirksamen Menge erleichtert. Zum Beispiel kann ein Exzipient form- oder konsistenzgebend sein oder als ein Verdünnungsmittel dienen. Geeignete Exzipienten umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Stabilisatoren, Befeuchtungsmittel und Emulgatoren, Salze zur Änderung der Osmomolarität, Einkapselungsmittel, Puffer und Hautpenetrationsverbesserer. Exzipienten wie auch Formulierungen für eine parenterale und nichtparentarale Medikamentenabgabe sind in Remington's Pharmaceutical Sciences 19. Ausgabe, Mack Publishing (1995) genannt.

**[0123]** Im Allgemeinen sind diese Zusammensetzungen für eine Verabreichung mittels Injektion (z.B. intraperitoneal, intravenös, subkutan, intramuskulär, etc.) formuliert. Dementsprechend sind diese Zusammensetzungen vorzugsweise mit pharmazeutisch verträglichen Trägern, wie Saline, Ringer-Lösung, Dextroselösung und ähnlichem, kombiniert. Im Allgemeinen bildet das Konjugat aufgrund praktischer, empirischer Erwägungen, wie Solubilität und Osmomolarität, normalerweise etwa 0,01 bis 10 Gewichts-% der Formulierung. Das bestimmte Dosierungsschema, d.h. Dosis, Zeitpunkt und Wiederholung, hängt vom bestimmten Individuum und der medizinischen Vorgesichte des Individuums ab. Im Allgemeinen wird eine Dosis von etwa 1 µg bis etwa 100 mg Konjugat/kg Körpergewicht, vorzugsweise von etwa 100 µg bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht, wöchentlich gegeben. Empirische Erwägungen, wie Halbwertszeit, tragen im Allgemeinen zur Festlegung der Dosierung bei. Weitere geeignete Dosierungspläne können eine Häufigkeit, wie eine tägliche Dosis oder 3 Dosen je Woche oder eine Dosis je Woche oder eine Dosis alle zwei oder vier Wochen oder eine Dosis je Monat oder ein Schema mit einer geringeren Häufigkeit vorsehen, abhängig vom Individuum oder dem Krankheitszustand. Wiederholte Verabreichungen, üblicherweise entsprechend den B-Zellumwandlungsraten, können erforderlich sein, um ein Stadium einer humoralen Anergie zu erreichen oder aufrecht zu halten. Derartige wiederholte Verabreichungen beinhalten normalerweise Behandlungen mit etwa 1 µg bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht oder höher alle 30 bis 60 Tage, oder eher, falls ein Anstieg des Antikörper GPL-Werts detektiert wird. Alternativ können Depot-Formulierungen der Depot-Zusammensetzungen bei einigen Krankheiten indiziert sein. Verschiedene Formulierungen und Mittel zum Erzielen einer Langzeit-Abgabe sind in der Technik bekannt.

**[0124]** Andere Formulierungen umfassen geeignete Abgabeformen, die in der Technik bekannt sind, einschließlich, aber hierauf nicht beschränkt, Träger wie Liposomen. Mahato et al. (1997) Pharm. Res. 14:853–859. Liposomenpräparate umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Cytofektine, multilamellare Vesikel und unilamellare Vesikel.

**[0125]** In einigen Anwendungsformen kann mehr als ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid in einer Zusammensetzung vorliegen. Derartige Zusammensetzungen können wenigstens ein, wenigstens zwei, wenigstens drei, wenigstens vier, wenigstens fünf verschiedene Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide enthalten. Derartige „Cocktails“, wie sie oft in der Technik bezeichnet werden, können besonders für eine Behandlung eines breiteren Spektrums einer Population an Individuen zweckdienlich sein. Sie können ebenfalls zweckdienlich sein, da sie wirksamer sind als die Verwendung von nur einem (oder weniger als in dem Cocktail enthalten sind) Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en).

**[0126]** Die Zusammensetzungen können allein oder zusammen mit anderen Formen von Agenzien verabreicht werden, welche die Wirksamkeit von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) verstärken oder ergänzen, einschließlich, aber hierauf nicht beschränkt, anti-T-Helferzellen-Behandlungen. Bei derartige Behandlungen werden üblicherweise Agenzien, die T-Zellen supprimieren, wie Steroide oder Cyclosporin, verwendet.

**[0127]** Geeignete Individuen, die derartige Zusammensetzungen erhalten, können mit Hilfe in der Technik bekannter klinischer Parameter, wie Bestimmung von GPL-Werten von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern, Bestimmung des Vorhandenseins von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern, die besonders mit Krankheitsstadien assoziiert sind, und/oder Symptomen von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern assoziierten Krankheiten identifiziert werden. Vorzugsweise ist das Individuum ein Mensch. Bezuglich  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper kann ein GPL-Wert von wenigstens etwa 10, bevorzugt wenigstens etwa 20, bevorzugter wenigstens etwa 40 eine Verabreichung einer beliebigen dieser Zusammenset-

zung anzeigen. Dieser Wert basiert auf einem heute im Handel erhältlichen Assay, der ein ELISA-Festphasen-Assay auf  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper ist (z.B. Inova (San Diego); Theratest (Chicago); APL Diagnostics (Louisville)). Ebenfalls ist eine Verabreichung von Zusammensetzungen bei diejenigen Individuen angebracht, die eine familiäre Krankengeschichte einer beliebigen Störung aufweisen, die mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern assoziiert ist, oder diejenigen Individuen, die als einen „normalen“ GPL-Wert zu besitzen angesehen werden, aber einen erhöhten GPL-Wert über einen Zeitraum gezeigt haben.

**[0128]** Im Allgemeinen wird die Wirksamkeit der Verabreichung jeder dieser Zusammensetzungen durch Messen einer beliebigen Veränderung der oben beschriebenen klinischen Parameter, insbesondere des  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern GPL-Wert beurteilt. Allerdings ist das Messen eines jeden Parameters geeignet, von dem vermutet wird oder von dem gezeigt worden ist, dass er mit dem zu behandelnden Zustand assoziiert ist.

**[0129]** Bezuglich derjenigen Zusammensetzungen, die als Reagenzien eingesetzt werden können (wie in Detektionsassays), umfassen diese Zusammensetzungen im Allgemeinen eine Menge an Domäne 1 $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) (d.h. ein oder mehrere Polypeptide), die hinreichend ist, einen Nachweis zu bewerkstelligen. Diese Mengen werden einfach empirisch bestimmt. Diese Zusammensetzungen können außerdem eine Substanz, wie Puffer, umfassen, um den Nachweis zu bewerkstelligen. Diese Zusammensetzungen können ebenfalls gegebenenfalls zu einer Detektionsmatrix, wie einer Festphase (z.B. in einer Immunaffinitätssäule), komplexiert werden.

#### Kits, die $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) umfassen

**[0130]** Die Erfindung stellt ebenfalls Kits bereit, die ein oder mehrere Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide und gegebenenfalls Antikörper gegen Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) als ein Standard enthalten (d.h. umfassen), vorzugsweise diagnostische Kits für den Nachweis von  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper. Diagnose- und Kontrollverfahren, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) dieser Erfindung nutzen, können von diagnostischen Laboratorien, experimentellen Laboratorien, Praktikern und Privatpersonen durchgeführt werden. Kits im Rahmen dieser Erfindung umfassen solche, die einem die Durchführung von Assays auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) erlauben, wie ein beliebiger hier offen gelegter Assay, der folglich diese Antikörper nachweist und/oder quantifiziert. Die Kits im Rahmen dieser Erfindung umfassen ebenfalls Kits, die einen Nachweis von Antikörpern gegen Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e), zum Beispiel ex vivo oder in vivo, in transfizierten Zellen erlauben. Dementsprechend umfasst die Erfindung ein Kit, der Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) für einen Nachweis und/oder eine Quantifizierung eines anti-Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e)-Antikörpers, vorzugsweise eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers, in einer biologischen Probe enthält. Die Kits dieser Erfindung sind geeignet verpackt und können gegebenenfalls zusätzliche Komponenten bereitstellen, die bei der Prozedur zweckdienlich sind. Diese optionalen Komponenten umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Puffer, Einfangreagenzien, Entwicklungsreagenzien, Markierungen, Reaktionsoberflächen, Mittel zum Nachweis, Kontrollproben, Anleitungen und interpretierende Informationen.

**[0131]** Jedes geeignete Mittel für einen Nachweis der Bindung der Antikörper kann eingesetzt werden (und in den Kits bereitgestellt werden), wie einen markierten anti-humanen Antikörper, wenn auf Vorhandensein von humanen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern getestet wird, wobei die Markierung ein Enzym, Fluorophor, chemilumineszierendes Material, Radioisotop, Coenzym sein kann. Im Allgemeinen ist die eingesetzte Markierung ein Enzym.

**[0132]** Zusätzlich zum Nachweis  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper kann ein  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) eine Komponente eines Kits zum Nachweis von Koagulation (Gerinnung) sein. Ein derartiges Kit würde den Nachweis der Rolle (sofern vorhanden) von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern bei Vermittlung des Thromboseweges ermöglichen. Zum Beispiel verzögern  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper die Inaktivierung von aktiviertem Faktor Va durch aktiviertes Protein C oder aktivieren den Gewebe-Faktor-Koagulationsweg. Wir haben festgestellt, dass Domäne 1-spezifische anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper die Inaktivierung von Faktor Va verzögern, wie es in Beispiel 11 diskutiert ist. Ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) kann bei Unterscheidung von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-vermittelten Wirkungen von anderen Mechanismen zweckdienlich sein, die eine Inaktivierung von Faktor Va oder die Aktivierung des Gewebe-Faktor-Wegs beeinflussen. Zusätzlich können Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) in anderen funktionellen Koagulations-Assays (wie Thrombose) zweckdienlich sein, in denen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper oder Serum oder Plasma von Individuen das Resultat des spezifischen KoagulationsAssays beeinflusst. Wenn zum

Beispiel das Vorhandensein von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) das Ergebnis eines Koagulations-Assays verändert (im Vergleich zu Ergebnissen eines derartigen Assays in Abwesenheit von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en)) stehen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper mit dem Gerinnungsweg in Verbindung. Diese Information könnte bei der Einschätzung potenzieller spezifischer Behandlungen besonders wertvoll sein.

#### Verfahren, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide verwenden

**[0133]** Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren bereit, die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) verwenden, die im Zusammenhang mit einem Nachweis und/oder einer Therapie eingesetzt werden können. Dementsprechend umfasst die Erfindung Verfahren, die  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) der Erfindung nutzen, um geeignete Ziele in einer biologischen Probe nachzuweisen. Verfahren zur Durchführung diagnostischer (d.h. nachweisender) Tests unter Verwendung von Polypeptiden sind in der Technik weit bekannt und sind für den erfahrenen Praktiker reine Routine. Im Allgemeinen wird zur Durchführung eines diagnostischen (d.h. nachweisenden) Verfahrens dieser Erfindung eines der Polypeptide dieser Erfindung (im Allgemeinen als eine Zusammensetzung) als ein Reagenz bereitgestellt, um ein Ziel zu detektieren, mit dem es in einer biologischen Probe reagiert. Bereitgestellt wird das Ziel durch Gewinnung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum, bei dem der diagnostische Parameter gemessen werden soll. Falls erwünscht, kann das Ziel vor Ausführung des Assays partiell aus der Probe gereinigt oder amplifiziert werden. Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zur Reinigung eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers unter Verwendung eines Polypeptids der Erfindung bereit. Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren unter Verwendung der Polypeptide und Polynukleotide der Erfindung bereit, um Toleranz zu induzieren.

#### Nachweis des $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers

**[0134]** In einer Anwendungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis eines Antikörpers, vorzugsweise eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers, in einer biologischen Probe bereit, der an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) spezifisch bindet. Diese Verfahren sind generell für die klinische Anwendung geeignet, zum Beispiel bei Diagnose und/oder Kontrolle von  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper-Levels in einem Individuum. Diese Verfahren erfordern das Inkontaktbringen von ( $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid)-Antikörper in einer Probe mit Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) (d.h. einem beliebigen Polypeptid der Erfindung) unter Bedingungen, die für die Bildung von stabilen Komplexen zwischen anti-Domäne 1- $\beta_2$ GPI-spezifischem Antikörper (wie einem  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper) und Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) geeignet sind, und Nachweis eines stabil gebildeten Komplexes, sofern vorhanden. Das/die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) der Erfindung machen diese Verfahren besonders zweckdienlich, da kein gängiger einfacher und geeigneter Assay für diese Antikörper bis jetzt entwickelt worden ist. Mehrere Immunoassay-Verfahren sind in der Technik bekannt und müssen nicht detailliert beschrieben werden. Geeignete Proben für die Messung von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern sind biologische Proben, einschließlich Serum oder Plasma (vorzugsweise Serum) und Eluat von Zielgewebe. Es ist in der Technik gut bekannt, dass ein Nachweis eines gebildeten Komplexes direkt (wie durch Messen einer Markierung, die mit einem Komplex assoziiert ist) oder indirekt (wie bei einem Messen der Menge eines markierten Liganden, der während des Assays verdrängt wird) erfolgen kann.

**[0135]** Um die/das Polypeptid(e) oder Mimetika dieser Erfindung beim Nachweis derartiger Antikörper in einem Individuum zu verwenden, wird ein Immunoassay durchgeführt. Das/die Polypeptid(e) der Erfindung wird als Reagenz bereitgestellt und der Antikörper ist das Ziel in der biologischen Probe. Zum Beispiel können in einer Serumprobe vorhandene humane IgG-Antikörpermoleküle mit einem Festphasen-Protein A eingefangen werden, und dann mit dem markierten Polypeptidreagenz überschichtet werden. Die Menge an Antikörper wäre dann proportional zu der an der festen Phase gebundenen Markierung. Alternativ können Zellen oder GeWEBESCHNITTE, die das Polypeptid exprimieren, zunächst mit der den Antikörper enthaltenden Testprobe und dann mit einem Detektionsreagenz, wie markiertem anti-Immunoglobulin, überschichtet werden. Die Menge an Antikörper wäre dann zu der an den Zellen gebundenen Markierung proportional. Die Menge an Antikörper, die in der Probe detektiert wird, würde dann mit der Menge, die in einer Kontrollprobe detektiert wird, verglichen werden.

**[0136]** In den Verfahren der Erfindung wird das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid üblicherweise auf einer geeigneten festen Phase, wie Packungsmaterial für Affinitätssäulen, oder einer Kunststoffoberfläche, wie Mikrotiterplatte oder Tauchstäbchen, mit bekannten Verfahren immobilisiert. Geeignete Packungsmaterialien für Affinitätssäulen umfassen zum Beispiel Agarosematrix-Kügelchen, Polyacrylamid, Glas, Cellulose oder vernetztes Dextran. Geeignete Kunststoffoberflächen umfassen Polymethacrylat, Polystyrol, Polyethylen, Polyterephthalat, Ethylenglycol, Polyester, Polypropylen und ähnliches. Im Allgemeinen kann jede Standardmikrotiterplatte

verwendet werden. Alternativ kann die feste Phase in Form eines Gels oder einer Matrix vorliegen, in der das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid eingebaut ist.

**[0137]** Zur weiteren Veranschaulichung kann eine Testprobe, die möglicherweise ein Antikörper enthält, der an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) (wie an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper) spezifisch bindet, mit einer vorbestimmten nicht limitierenden Menge des/der  $\beta_2$ GPI-Polypeptids/e gemischt werden, das im Allgemeinen detektierbar markiert ist (wie mit einem Radioisotop oder Enzym). In einem Flüssigphasen-Assay werden nicht umgesetzte Reagenzien mit Hilfe von Trennverfahren, wie Filtration oder Chromatographie, entfernt. Bei diesen Immunoassay-Techniken korreliert die Menge an Markierung, die mit dem Komplex assoziiert ist, positiv mit der Menge an  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper, der in der Probe vorhanden ist. Ähnliche Assays können entwickelt werden, in denen der  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper in der Testprobe mit einem markierten Antikörper um die Bindung an eine limitierende Menge an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) konkurriert. Hier korreliert die Menge an Markierung negativ mit der Menge an  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper in der Probe.

**[0138]** In einigen Anwendungsformen ist die biologische Probe eine Gewebeprobe oder ein Gewebeeluat und die Menge an  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper, die mit der Gewebeprobe assoziiert ist, wird zum Beispiel mit einem kompetitiven Bindungsassay gemessen. Diese Verfahren können besonders in einem Zusammenhang zweckdienlich sein, wo ein bestimmtes Gewebe auf das Vorhandensein und/oder Menge an  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper getestet und/oder kontrolliert werden soll. Dieser Assaytyp kann zum Beispiel anzeigen, ob eine bestimmte Krankheit (oder Krankheitsrisiko) angezeigt ist (wie eine bestimmte Form der Thrombose oder Gerinnungsstörung). Ein derartiger Assay kann ebenfalls bei der Bereitstellung einer genaueren und empfindlicheren Bestimmung der Lokalisierung von  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper für Diagnose- und/oder Kontrollzwecke zweckdienlich sein. Zudem können Informationen über eine Lokalisierung von  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Antikörper dem Kliniker Indikationen über geeignete Behandlungsoptionen liefern.

**[0139]** Es versteht sich, dass diese Nachweisverfahren in verschiedenen klinischen Zusammenhängen anwendbar sind. Zum Beispiel kann der Nachweis für eine Identifizierung von Individuen verwendet werden, die ein Risiko der Entwicklung von  $\beta_2$ GPI- abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-assoziierten Zuständen und Störungen zeigen (was dann wieder die Folge davon sein kann, dass es möglich ist, die mit einer Krankheit assoziierten Antikörper von denjenigen zu unterscheiden, die nicht mit einer Krankheit assoziiert sind.) Der Nachweis kann ebenfalls für eine Kontrolle der Behandlung (wie Verabreichung einer beliebigen der oben beschriebenen Zusammensetzungen) genutzt werden. Ein Nachweis kann ebenfalls bei der Unterscheidung von pathogenen Antikörpern von nicht pathogenen Antikörpern helfen. Ein Nachweis kann ebenfalls den Kliniker bei der Entscheidung für die besten Behandlungsoptionen und/oder Prognose unterstützen.

**[0140]** Wie es oben diskutiert ist, kann/können  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) auch als eine diagnostische Komponente in einem Koagulations-Assay, spezifisch in einem Assay verwendet werden, in dem  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper das Ergebnis eines spezifischen Koagulations-Assays modifizieren können. Wenn zum Beispiel das Vorhandensein von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) das Ergebnis eines Koagulations-Assays verändert (verglichen mit den Ergebnissen eines derartigen Assays in Abwesenheit von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en)), stehen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper mit dem Gerinnungsweg in Verbindung. Weil Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) bei der Unterscheidung der von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern vermittelten Wirkungen von anderen Koagulationsmechanismen (wie Thrombose) zweckdienlich sind, umfasst die Erfindung Verfahren zum Nachweis der Beteiligung (Vermittlung) eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers bei der Koagulation (wie Thrombose), umfassend (a) Durchführung eines Koagulationsassays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum unter Verwendung von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en); (b) Durchführung eines Koagulations-Assays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum ohne Verwendung von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en); (c) Vergleich der Ergebnisse von (a) und (b), wobei eine Differenz im Ergebnis eine Beteiligung eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers bei der Koagulation anzeigt. Diese Verfahren können ebenfalls für die Kontrolle des Patientenstatus bezüglich der Beteiligung eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers bei der Koagulation, ebenso wie bei einem ersten Nachweis verwendet werden. Diese Verfahren können ebenfalls eine anormale Koagulation mit einer Beteiligung (d.h. vermittelt von) von  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern anzeigen oder nachweisen.

**[0141]** Für diese Verfahren kann Plasma oder Serum verwendet werden. Alternativ wird die IgG-Fraktion verwendet, die unter Anwendung von Standardverfahren in der Technik isoliert wird. Ein Beispiel für ein Koagulationsnachweissystem ist in Beispiel 11 bereitgestellt. In einigen Anwendungsformen werden Levels des akti-

vierten Faktors V (Va) bestimmt, im Allgemeinen durch Messung der Gerinnungszeit. Assays, Instrumente und Kits zum Nachweis der Koagulation sind in der Technik bekannt und im Handel erhältlich.

#### Reinigung von $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern

**[0142]** Die Erfindung umfasst ebenfalls Verfahren zur Reinigung eines Antikörpers, der spezifisch an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) (wie ein  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper) bindet, umfassend in Kontakt bringen einer biologischen Probe, die einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper enthält, mit  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) unter Bedingungen, die die Bildung eines stabilen Antigen-Antikörper-Komplexes und den Erhalt eines gebildeten Komplexes, sofern vorhanden, zulassen. Üblicherweise wird das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) an eine Affinitätsmatrix für die Affinitätsreinigung in einer Säule gekoppelt. Derartige Verfahren sind in der Technik Routine und müssen hier nicht detailliert beschrieben werden. Beispiel 1 beschreibt eine Affinitätsreinigung eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpers.

#### Verfahren zur Induktion von Toleranz

**[0143]** Diese Erfindung umfasst ebenfalls Verfahren zur Induktion von Toleranz (d.h. einen toleragenen Zustand), umfassend Verabreichen an ein Individuum einer wirksamen Menge an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) (oder einem Polypeptid, das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) umfasst), dem/denen ebenfalls ein detektierbares T-Zellepitop fehlt. Vorzugsweise ist/sind das/die Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) (oder ein beliebiges Polypeptid, umfassend Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e)) ebenfalls an ein geeignetes Plattformmolekül konjugiert, wie es oben beschrieben ist. Es versteht sich, dass, im Sinne dieser Erfindung, die Immunantwort, die über eine Induktion der Toleranz verringert werden soll (und/oder eliminiert, stabilisiert und/oder deren Anstiegsrate verringert werden soll), eine Immunantwort auf  $\beta_2$ GPI ist. Dementsprechend ist die induzierte Toleranz antigenspezifisch, wobei das Antigen  $\beta_2$ GPI ist, und die Toleranz in einem Individuum erhalten wird, bei dem festgestellt worden ist, dass es  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper (wenigstens vor Verabreichung des/der Polypeptids/e der Erfindung) aufweist.

**[0144]** Die geeigneten Polypeptide dieser Erfindung (das heißt Polypeptide, umfassend Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e), dem/denen ein T-Zellepitop fehlt) können allein oder zusammen mit weiteren Agenzien verwendet sein, die in erwünschter Weise die Aktivität/das Ziel fördern. Wie es oben diskutiert ist, können verschiedene Polypeptide ebenfalls in verschiedenen Kombinationen miteinander verwendet sein. Verschiedene Formulierungen und Möglichkeiten der Verabreichung sind oben diskutiert worden.

**[0145]** Die Bestimmung, ob eine Toleranz induziert worden ist, kann mit beliebigen in der Technik bekannten Mitteln durchgeführt werden. Im Allgemeinen wird die Toleranz durch Messen der Immunantwort auf Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) bestimmt. Eine Immunantwort auf Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide kann mit Hilfe von Standardassays gemessen werden, einschließlich beispielsweise Messen der Levels der Antikörper, die an Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) binden; Messen der Zytokinproduktion im Anschluss an eine Immunisierung mit Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en); Durchführen von in vitro Analysen einer T-Zellantwort auf Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) nach einer Verabreichung von  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) der Erfindung unter Verwendung von T-Zellen von dem Individuum, das eine derartige Verabreichung erhalten hat (d.h. einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern), einschließlich beispielsweise Standardassays mit einer  $^3$ H-Thymidin-Aufnahme zur Messung der Proliferation von T-Zellen, wenn sie mit Domäne 1  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(en) im Zusammenhang mit einer Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert werden, mit  $^{51}$ Cr-Standardfreisetzungssassays zum Messen des Abtötens einer Zelle, die Domäne 1  $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) präsentiert, von cytotoxischen T-Zellen und ähnliches.

**[0146]** Die folgenden Beispiele dienen als Veranschaulichung und beschränken nicht die vorliegende Erfindung

#### BEISPIELE

Beispiel 1: Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI ist mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern immunreakтив

#### Material und Methoden

##### Herstellung von Domänendeletionsmutanten

**[0147]**  $\beta_2$ GPI besteht aus 5 „Sushi“-Domänen. Um die Antigenregion(en) von  $\beta_2$ GPI zu bestimmen, entfernten

wir selektiv eine oder mehrere Domänen von  $\beta_2$ GPI. Dieser Ansatz wurde von Igarashi et al. ((1996) Blood 87:3262–3270) angewandt, indem sie Deletionen von humanem  $\beta_2$ GPI herstellten, die Domäne 4 und 5, Domänen 3 bis 5, Domänen 2 bis 5, Domänen 1 bis 4 und Domänen 1 bis 3 enthielten. Zusätzlich zu den von Igarashi et al. beschriebenen Domänendeletionsmutanten haben wir humane  $\beta_2$ GPI-Mutanten hergestellt, die nur Domäne 1 und 2 enthielten.

**[0148]** Das Ausgangsmaterial für die Herstellung dieser Deletionsmutanten war die volllange cDNA von humanem  $\beta_2$ GPI (Steinkasserer et al. (1991) Biochem J. 277:387–391), die in pBacPAK9 (Clontech) kloniert wurde, das von S. Krilis zur Verfügung gestellt wurde. Der erste Schritt war, ein GlyHis<sub>6</sub> in den C-Terminus einzuführen. Bei diesem Vorgang wurde eine einzige Msc 1 Restriktionsstelle (TGGCCA) durch Änderung des C-terminalen Cys Codons von TGC zu TGT und daran anschließend Gly (GGC) und His (CAC) geschaffen. Der Sinn des His<sub>6</sub>-Markers war, eine leichtere Reinigung der mutierten Proteine mittels Ni-Chelat-Chromatographie zu ermöglichen.

**[0149]** Das GlyHis<sub>6</sub> wurde durch eine ortsgerichtete Einzelstrang-DNA-Mutagenese eingeführt. Das eingesetzte Verfahren folgte in enger Anlehnung den von Kunkel et al. Methods in Enzymology (1987) 154:367–382 veröffentlichten Verfahren. Wenn die Zellen, die Phagemid pBacPAK9 enthielten, in das die cDNA für humanes  $\beta_2$ GPI inseriert worden war, mit einem Helfer-Phagen, M13K07, infiziert wurden, enthielten die aus dem Wachstumsmedium gesammelten Phagenpartikel überwiegend eine einzelsträngige DNA-Version des pBacPAK9. Wenn die eingesetzten Zellen vom Genotyp dut 1, ung 1 waren, wie CJ236, war außerdem etwas Thymidin in der DNA durch Uridin ersetzt. Die einzelsträngige DNA wurde aus den Phagen mittels Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

**[0150]** Das Oligonukleotid ApoH-G6H mit der Sequenz 5' AAACCACCTTAATGGTGATGGTATGGTGGC-CACATGGCTTACA 3' (SEQ ID NR. 13), die zu Regionen auf jeder Seite des C-terminalen Cys komplementär ist und GlyHis<sub>6</sub> codiert, wurde an die einzelsträngige DNA von pBacPAK9 assoziiert, die das Gen für humanes  $\beta_2$ GPI enthielt und in E. coli CJ236 angezogen worden war. Das Verfahren von Kunkel wurde angewandt, um das komplementäre Oligonukleotid zu verlängern und ergab eine doppelsträngige DNA. Die Reaktion wurde in E. coli K91 transformiert. Stamm K91 enthält keinen dut 1, ung 1 Genotyp mit dem Ergebnis, dass Uridin-haltige DNA abgebaut werden wird. Der das GlyHis<sub>6</sub> codierende neu synthetisierte Strang sollte angereichert werden. Klone wurden mittels DNA-Sequenzierung entweder unter Verwendung des T7-Sequenase-Kits oder des Thermo-Sequenase-Kits (Amersham Life Sciences) analysiert.

**[0151]** Die folgenden Oligonukleotide wurden auf die oben beschriebene Weise verwendet, um Domänendeletionsmutanten von humanem  $\beta_2$ GPI zu erzeugen:

B2Del3-60

5' GAC ATA CTC TGG GTG TCC GTC CTG CAA TAG C 3' (SEQ ID NR. 14)

B2Del3-120

5' TGG AGG GCA GAT GAT CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NR. 15)

B2Del3-182

5' GAA TGG GCA TTT TAC TTC CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NR. 16)

B2Del3-242

5' AGG TAA TTT ACA AGA TGC CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NR. 17)

B2Del242-326

5' ATG GTG ATG GTG GCC ACA ACT TGG CAT GGC 3' (SEQ ID NR. 18)

B2Del182-326

5' ATG GTG ATG GTG GCC GCA TTC TGG TAA TTT AG 3' (SEQ ID NR. 19)

**[0152]** Die Nummern der Oligonukleotide beziehen sich auf die Aminosäuren von humanem  $\beta_2$ GPI. Zum Beispiel bezieht sich B2del3-60 auf die Aminosäuren 3–60, die von  $\beta_2$ GPI deletiert sind. Das resultierende Protein enthält Domänen 2–5.

**[0153]** Eine Zusammenfassung der Konstrukte folgt.

<u>Domäne(n)</u>	<u>Konstrukt</u>	<u>erwartete Proteinsequenz</u>	<u>SEQ ID NR.</u>
2,3,4,5	B2del3-60	GRTPR	20
3,4,5	B2del3-120	GRIIC	21
4,5	B2del3-182	GREVK	22
5	B2del3-242	GRASC	23
1,2,3,4	B2del242-326	GRTCP	24
1,2,3	B2del182-326	GRTCP	24

**[0154]** Die PCR wurde zur Bildung weiterer Mutanten eingesetzt. Das Template für die Reaktion war das pBacPAK9, das die cDNA für humanes  $\beta_2$ GPI enthielt. Das Oligonukleotid, pBacPac9 PCR 1270, 1297, das die Sequenz 5' CTA TAA ATA CGG ATC CCG GGA ATT CG 3' (SEQ ID NR: 25) besitzt und stromaufwärts der Multiklonierungsregion in pBacPAK9 bindet, wurde als der 5'-Primer verwendet. Um Klone mit nur der Domäne 1 zu konstruieren, wurde das Oligonukleotid Domäne 1 PCR(64) Msc 1, mit der Sequenz 5' GCA GCT GGC CAA CTC TGG GTG TAC ATT TCA GAG TG 3' (SEQ ID NR: 26) als der 3'-Primer verwendet. Ähnlich wurde zur Bildung einer Mutante, die die Domänen 1 und 2 enthielt, das Oligonukleotid Domäne 1, 2 PCR(122) Msc 1, mit der Sequenz 5' GCA GCT GGC CAA TGA TGG GAG CAC AGA GAG GAA G 3' (SEQ ID NR: 27) als der 3'-Primer verwendet. Fünfundzwanzig PCR-Zyklen wurden durchlaufen. Das Produkt wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Fragmente wurden am 5'-Ende mit Bam HI und am 3'-Ende mit Msc 1 verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden Gel gereinigt und in pBac-PAK9 ligiert, aus dem das volllange  $\beta_2$ GPI mit denselben Restriktionsenzymen ausgeschnitten worden war. Die Ligationen wurden in E. coli XL1-blue transformiert und die Klone wurden mittels DNA-Sequenzierung charakterisiert. Die Ergebnisse sind die folgenden:

<u>Domäne(n)</u>	<u>Konstrukt</u>	<u>erwartete Proteinsequenz</u>	<u>SEQ ID NR.</u>
1	B2del165-326	GRTCP	24
1,2	B2del123-326	GRTCP	24

**[0155]** Alle Deletionsmutanten von  $\beta_2$ GPI wurden aus den Medien infizierter Insektenzellen aufgereinigt. Im Allgemeinen wurden die Zellen mittels Zentrifugation entfernt und die Medien gegen wenigstens 10 Volumina Phosphat-gepufferter Saline (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 18 Stunden bei 4°C dialysiert. Am nächsten Tag wurde sämtlicher Niederschlag mittels Zentrifugation entfernt. Das dialysierte Medium wurde auf 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7,5, 0,5 M NaCl eingestellt und Ni-NTA-Harz wurde zu dem dialysierten Medium unter vorsichtigem Mischen gegeben. Nach 1 Stunde bei 4°C wurde das Harz in einem Büchner-Trichter gesammelt und in eine bei 4°C gehaltene, Wasser-gekühlte Säule gepackt. Die Säule wurde ausgiebig mit 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7,5, 0,5 M NaCl gewaschen, bis kein Protein mehr detektierbar war. Die Säule wurde nacheinander mit demselben Puffer, der 20 mM, 35 mM oder 100 mM Imidazol enthielt, eluiert. Die Analyse erfolgte mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE). Geeignete Fraktionen wurden vereint und das Protein wurde aufkonzentriert und gegen Tris-gepufferte Saline (TBS; 50 mM TrisCl pH 7,5, 150 mM NaCl) dialysiert.

#### Affinitätsgereinigte $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper

**[0156]** Um  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper zu isolieren, werden multilamellare, Cardiolipin-haltige Lipiddispersionen (die ebenfalls Cholesterin und Diacetylphosphat enthielten) mit  $\beta_2$ GPI-abhängigem Antiphospholipid-Plasma (oder Serum) inkubiert. Diese Liposomen werden aus dem Serum mittels Zentrifugation pelletiert. Nach dem Waschen wird das Liposomengemisch mit 2% Octylglucosid-Detergens aufgebrochen und auf eine Protein A-Agarosegel-Säule aufgetragen.

**[0157]** Nach intensivem Waschen, um zunächst Lipide zu entfernen und dann nicht-IgG-Komponenten zu

entfernen, wird der IgG  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper vom Protein A mit einer schwachen Säure eluiert, neutralisiert, einem Pufferaustausch unterzogen und in ACA ELISA getestet. Dieses Verfahren erbringt einen bis zu 10.000-fach angereicherten aPL-Antikörper, der ohne jegliches kontaminierendes  $\beta_2$ GPI ist, wie es mit einem Western-Blot mit Kaninchen IgG anti-humanen  $\beta_2$ GPI-Antiseren gezeigt wird. Ein spezifisches Beispiel dieses Verfahrens folgt noch.

#### Reinigung von $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern aus Serum

**[0158]** Antikörper von verschiedenen Patienten wurden aus dem Serum von Patienten unterschiedlichen Alters gereinigt, die verschiedene Symptome zeigten, einschließlich: SLE, APS (einschließlich APS-Manifestationen, einschließlich venöser Thrombose, Fehlgeburten, Thrombozytopenie, CVA (cerebrovaskulärer Anfall, d.h. Schlaganfall), TIA (transitorische-ischämische Attacken)) und Arterienverschluss.

**[0159]** In einem 25 ml Rundbodenkolben (Kontes Scientific Co., Vineland, N.J.) wurde ein Gemisch aus 1,2 ml Cardiolipin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, #C-1649), 0,464 ml Cholesterin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, #C-965-25), 0,088 ml 5 mg Diacetylphosphat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, D-263 1) pro ml Chloroform ungefähr 5 Minuten in einem Rotationsverdampfer (Buchi, Schweiz) getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurden 2 ml 0,96% (wt./vol.) NaCl (J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) zugegeben und in einem Vortex Genie Mixer (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NJ) 11 Minuten gemischt. Die Liposomensuspension wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde Serum 6501 mit 600 × g in einer Sorvall RT 6000 Zentrifuge (Dupont Co. Wilmington, DE) 10 Minuten bei 8°C zentrifugiert. Vier Milliliter Überstand wurden in einen 25 ml Rundbodenkolben mit 1 ml präparierter Liposomensuspension gegeben und das Gemisch wurde unter Rühren mit mittlerer Geschwindigkeit auf einem Rundschüttler, Tektator V (Scientific Products, McGraw Park, IL) 48 Stunden bei 4°C und zwei weiteren Stunden bei 37°C inkubiert. Zwanzig ml kalte TBS wurde zugegeben und das Gemisch wurde in ein 50 ml Polycarbonat-Röhrchen (Nalge Co., Rochester, NY) transferiert und mit 27.000 × g 15 Minuten bei 4°C in einer RC3 Zentrifuge in einem SS-34 Rotor (Sorvall-Dupont, Wilmington, DE) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dreimal mit 25 ml kalter 0,96% NaCl unter Verwendung einer RC3 Zentrifuge gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 2% (wt/vol) Lösung von n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Calbiochem, La Jolla, CA) in TBS gelöst und auf eine 0,6 ml Protein A/vernetzte Agarose-Säule (Repligen Corporation, Cambridge, MA) gegeben, die mit dem 15-fachen Bettvolumen 1 M Essigsäure vorgesäuert und mit dem 15-fachen TBS-Volumen äquilibriert worden war. Die Antikörper-Protein A/Agarose-Säule wurde mit dem 40-fachen Bettvolumen mit 2% Octylglucopyranosid gewaschen, um Lipide zu entfernen, und anschließend mit TBS intensiv gewaschen, bis die optische Dichte des Eluats bei 280 nm sich der Grundlinie annäherte. Der gebundene Antikörper wurde mit 1 M Essigsäure eluiert. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt, sofort mit 0,34 ml 3 M Tris (Bio-Rad, Elektrophorese-Qualität) pro Fraktion neutralisiert und in einem Eisbad gehalten. Die optische Dichte jeder Fraktion wurde bei 280 nm in einem Spektralphotometer (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array Spectrophotometer, Palo Alto, CA) bestimmt. Die Antikörper-haltigen Fraktionen wurden vereint, aufkonzentriert und 4-mal mit TBS in Centricon-30 Konzentratoren (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, MA) gemäß Herstellerprotokoll gewaschen. Die Endausbeute an gereinigtem Antikörper aus 4 ml Serum 6501 wurde durch Ablesen der optischen Dichte bei 280 nm eines Aliquots der Konzentration bestimmt, wo 1 mg = 1,34 A<sub>280nm</sub> entspricht. Die erhaltene durchschnittliche Ausbeute betrug 750 µg Antikörper von 4 ml Serum 6501. Der gereinigte Antikörper wurde auf eine ACA-Aktivität getestet und mit Laemmli SDS-PAGE auf Reinheit kontrolliert.

#### Cardiolipin-basierter ELISA

**[0160]** Mikrotiterplatten (Immulon 1 #3350 von Dynex Technologies) wurden mit 30 µl einer 50 µg/ml Lösung von Cardiolipin in Ethanol beschichtet, über Nacht bei 4°C getrocknet, dreimal mit PBS, pH 7,2, gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit 75 µl 5% (w/v) Fischgelatine (Hipure Liquid Gelatine, Norland Products Inc., 695 Joyce Kilmer Ave., New Brunswick N.J., USA) blockiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 50 µl volllangem rekombinantern  $\beta_2$ GPI mit 10 µg/ml in 5% Fischgelatine beladen und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl entweder affinitätsgereinigter  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper (die Konzentration von jedem verwendeten Antikörper ist in Tabelle 2 angegeben) oder Kaninchen-anti- $\beta_2$ GPI wurde zu jeder Vertiefung gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-Immunglobulin (anti-humanes IgG, gamma-Ketten-spezifisch, Zymed #62-8422 oder anti-Kaninchen IgG, Zymed #362-61220), geeigneterweise in 5% Fischgelatine verdünnt, wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase chromogenes Substrat wurden zugegeben (PPMP-Lösung; Stammlösung von 7,8 g Phenolphthaleinmonophosphat plus 69,5 g 2-Amino-2-methyl-1-propanol in 100 ml Wasser, 1:26 mit Wasser unmittelbar vor Gebrauch verdünnt) und 30

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 550 nm durch Ablesen der Platten in einem Autoreader (Bio-Teck Instruments, model EL311) bestimmt.

#### Kompetitiver Inhibitions-ELISA

**[0161]** Mikrotiterplatten (MaxiSorp™, Nalge Nunc International, Dänemark) wurden mit 50 µl volllangem rekombinantem  $\beta_2$ GPI mit 10 µg/ml in 0,1 M Bicarbonat, pH 9,5, beschichtet, über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal mit 0,15 M PBS, pH 7,2, gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit 75 µl 2% fettfreier Trockenmilch (Carnation, 2% NFDM) blockiert. Testinhibitoren wurden in 2% NFDM verdünnt und 25 µl jeder Verdünnung wurde zu den beschichteten Vertiefungen gegeben. Affinitätsgereinigter  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper wurde in 2% NFDM verdünnt und 25 µl einer konstanten Konzentration wurden zu jeder Vertiefung gegeben, einschließlich einer Gruppe von Vertiefungen, die keinen Inhibitor enthielten und als positive Kontrollen dienten. Die Inhalte der Vertiefungen wurden gemischt und die Platten wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-humane IgG, gamma-Ketten-spezifisch, (Zymed #62-8422), geeigneterweise verdünnt in 2% NFDM, wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase chromogenes Substrat wurden zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 550 nm durch Ablesen der Platten in einem Autoreader (Bio-Teck Instruments, model EL311) bestimmt. Die prozentuale Inhibition wurde durch Teilen der optischen Dichte<sub>550</sub>, die bei Anwesenheit des Inhibitors erhalten wurde, durch die mittlere OD<sub>550</sub>, die von den Vertiefungen ohne Inhibitor erhalten wurde, und dann Multiplizieren mal 100 erhalten (genauer [mittlere A<sub>550</sub>, erhalten von den Kontrollvertiefungen ohne Inhibitor minus A<sub>550</sub> des Hintergrunds] minus [A<sub>550</sub>, erhalten in Anwesenheit des Inhibitors minus A<sub>550</sub> des Hintergrunds] geteilt durch [mittlere A<sub>550</sub>, erhalten von den Kontrollvertiefungen ohne Inhibitor minus A<sub>550</sub> des Hintergrunds] mal 100).

Direktes Binden von rekombinantem  $\beta_2$ GPI und Mutanten, mittels ELISA bewertet

**[0162]** Nickel-Chelat-beschichtete Mikrotiterplatten (NCP 010 00 Xenopore Corp. 374 Midland Ave. Saddle Brook, NJ, USA) wurden mit 50 µl von Verdünnungsreihen der verschiedenen rekombinanten  $\beta_2$ GPI in PBS bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 75 µl 1 % Gelatine (Sigma #G-2500) in PBS eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, entweder 50 µl affinitätsgereingter  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper (mit einer Konzentration, die zuvor etwa 80% maximales Binden zeigte) oder Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-Immunglobulin (anti-humanes IgG, gamma-Kettenspezifisch, Zymed #62-8422) oder anti-Kaninchen IgG (Zymed #62-61220), geeigneterweise in 1 % Gelatine verdünnt, wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl alkalische Phosphatase chromogenes Substrat wurden zugegeben) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 550 nm durch Ablesen der Platten in einem Autoreader (Bio-Teck Instruments, model EL311) bestimmt.

#### Ergebnisse der Inhibitionsuntersuchungen

**[0163]** Sieben bis neun verschiedene rekombinante  $\beta_2$ GPI mutierte Proteine wurden eingesetzt, um die Antigenpezifität von affinitätsgereinigtem  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparaten von 13 verschiedenen Patienten zu bestimmen. Jedes mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Protein wurde dosisabhängig auf seine Fähigkeit getestet, affinitätsgereingten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper an einer Bindung an volllangem rekombinantem  $\beta_2$ GPI zu hemmen. Die Ergebnisse eines typischen Assays sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Die Ergebnisse aller Assays von allen 13 affinitätsgereingten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die folgenden Werte wurden für ausschließlich Domäne 1 rekombinantes Protein (1----; siehe Tabelle 2 bezüglich der Bezeichnungen) festgestellt:

Ab 6203, Max 20, 50% > 10; Ab 7008, Max 40, 50% > 10; Ab 6501, Max 30, 50% > 10; Ab 6626, Max 50, 50% > 10; Ab 6632, Max 70, 50% 3; Ab 6644, Max 45, 50% > 10; Ab 7015, Max 30, 50% > 10; Ab 7101, Max 20, 50% > 10; Ab 6701, Max 80, 50% 4; Ab 6641, Max 98, 50% > 10.

**[0164]** Nur diejenigen Mutanten, die Domäne 1 enthielten, hemmten die  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper an einer Bindung an volllangem rekombinantem  $\beta_2$ GPI ([Fig. 4](#)). Dies traf für alle 13 Präparate der  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper zu (Tabelle 2). Die Tatsache, dass alle diese rekombinanten mutierten  $\beta_2$ GPI-Proteine, die die Domäne 1 enthielten, mehr als zu 90% hemmten, zeigt, dass die gesamte detektierbare anti- $\beta_2$ GPI-Aktivität dieser Antikörper gegen die Domäne 1 gerichtet ist.

Tabelle 2

**Zusammenfassung der Daten der kompetitiven Inhibitions-Assays mit 13 verschiedenen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörper-Präparaten gegen neu rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine.**

Ab#	Max = bei getesteten Konzentrationen maximale Hemmung. 50% = Konzentration ( $\mu$ M), die 50% Hemmung ergibt											
	12345			1----			12---			123--		
	Max	50%	Max	Max	50%	Max	Max	50%	Max	Max	50%	Max
7104	90	0.8	90	0	0.8	90	1	98	1	90	0.7	10
6203	75	0.8	60	(20)	>10	20	>10	75	1	30	>8	10
7008	90	0.2	70	(40)	>10	40	>10	80	0.4	50	>8	20
6501	80	0.2	70	(30)	30	(>10)	30	>10	85	0.8	30	>8
6626	80	0.3	85	(50)	8	(>10)	50	>10	90	0.8	40	>8
6632	90	0.8	90	(70)	8	(3)	70	3	90	0.2	60	2
6644	90	0.2	90	(45)	8	(>10)	45	>10	90	0.7	50	8
7015	90	0.2	90	(30)	8	(>10)	30	>10	90	0.7	50	8
7101	80	0.8	70	(20)	8	(>10)	20	>10	70	3	20	>8
6652	95	0.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	95	0.3	100	0.5
6509	70	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	90	0.3	80	3
6701	100	0.1	ND	(80)	ND	(4)	ND	ND	95	0.3	30	>8
6641	96	0.1	ND	(98)	ND	(>10)	ND	ND	60	4	60	2

Testergebnisse des direkten Bindens von rekombinanten mutierten  $\beta_2$ GPI-Proteinen mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern in Abwesenheit von Cardiolipin

**[0165]** Sieben bis neun verschiedene mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine wurden untersucht, um zu bestimmen, ob sie das direkte Binden von affinitätsgereinigtem  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparaten in Abwesenheit von anionischem Phospholipid unterstützen könnten. Alle rekombinanten mutierten  $\beta_2$ GPI wurden mit affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparaten von 11 verschiedenen Patienten getestet. Jedes mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Protein wurde dosisabhängig getestet und GST-6his war als negative Kontrolle enthalten. Die mutierten rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteine wurden an Nickelbeschichtete Mikrotiterplatten über ihren 6-His-Schwanz gebunden. Alle getesteten mutierten rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteine banden Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI, was zeigt, dass sie mit dem Antikörper bewertbar waren (Fig. 5). Die Ergebnisse eines typischen Bindungsexperiments zeigen, dass nur diejenigen Proteine, die Do-

mäne 1 enthielten, affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper banden ([Fig. 6](#)). Diese Ergebnisse aus Assays mit allen 11 affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Antikörper der Patienten signifikant an Domäne 1 enthaltende  $\beta_2$ GPI rekombinante Proteine banden, während nur eine geringe, wenn überhaupt, spezifische Bindung mit rekombinanten Proteinen, denen Domäne 1 fehlte, erfolgte.

Tabelle 3

Direktbindungs-Assays mit Nickel-Chelat-Vertiefungen, die mit angegebenem rekombinantern deletionsmutiertem  $\beta_2$ GPI-Protein beladen sind, gegen 8 verschiedene  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipidantikörper-Präparate Maximale OD für jede Kombination von Deletionsmutante: Antikörper

Ab#	12345	1----	12---	123--	1234-	-2345	--345	---45	----5
6501	1.772	0.911	0.028	0.909	0.628	0.018	0.030	0.086	0.004
6626	1.527	0.560	0.073	1.250	0.563	0.008	0.022	0.086	0.028
6652	0.640	0.262	ND	0.320	0.135	0.008	0.016	0.013	0.012
6632	1.419	0.351	0.016	0.121	0.003	0.031	0.004	0.000	0.013
7008	1.380	0.195	0.008	0.360	0.149	0.019	0.018	0.030	0.007
6701	0.948	0.388	ND	0.841	0.715	0.002	0.002	0.000	0.000
6203	1.270	1.029	0.119	0.938	0.668	0.074	0.072	0.142	0.044
7015	1.864	1.102	0.063	1.160	0.454	0.114	0.042	0.167	0.078
6641	2.555	0.252	--	0.530	0.145	0.045	0.019	0.112	0.018
6644	1.848	0.493	--	1.020	0.768	0.041	0.048	0.151	0.017
7101	1.257	0.804	--	0.951	0.843	0.056	0.042	0.167	0.078
Rabbit	2.065	1.9737	--	1.971	1.708	1.873	1.993	1.941	1.663

Direktes Binden von mutierten rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteinen mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern in Gegenwart von Cardiolipin

**[0166]** Sieben verschiedene mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine wurden untersucht, um zu bestimmen, ob sie das direkte Binden von affinitätsgereinigtem  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparaten in Gegenwart von anionischem Phospholipid unterstützen könnten. Alle sieben rekombinanten mutierten  $\beta_2$ GPI wurden mit Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI und mit einem affinitätsgereinigten  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper-Präparat getestet. Jedes mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Protein wurde dosisabhängig getestet und GST-6his war als negative Kontrolle mit umfasst. Die mutierten rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteine wurden an Mikrotiterplatten gebunden, die zuvor mit Cardiolipin beschichtet worden waren. Alle sieben mutierten rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteine banden Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI, was zeigt, dass sie an Cardiolipin binden und dass sie mit dem Antikörper bewertbar waren ([Fig. 7](#)). Die Ergebnisse eines typischen Experiments mit Patientenantikörper zeigen, dass nur diejenigen Proteine, die Domäne 1 und Domäne 5 enthielten, affinitätsgereinigte  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper banden ([Fig. 8](#)).

**[0167]** Basierend auf den obigen Daten dieses Beispiels glauben wir, dass unter bestimmten Bedingungen  $\beta_2$ GPI an Festphasenträger (wie beispielsweise bestrahlte Platten, Cardiolipin-beschichtete Platten, Mikrotiterplatten der Marke Nunc und Nickel-Chelat-Platten im Falle der rekombinanten  $\beta_2$ GPI-Proteine, die einen 6-his-Schwanz aufweisen) auf eine derartige Weise gebunden wird, dass das/die antigenen Epitop(e) auf Domäne 1 für  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper frei zugänglich sind, aber nicht, wenn es an anderen Oberflächen, wie beispielsweise nicht bestrahlte Platten, Mikrotiterplatten vieler anderer Marken, gebunden ist. Diese Inhibitionsuntersuchungen bestätigen Berichte von anderen Gruppen, dass  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper  $\beta_2$ GPI in Abwesenheit von Phospholipid binden können. Galli et al. (1990) Lancet 335:1544; Rouby et al. (1995); Arvieux et al. (1991) J. Immunol. Methods 143:223. Dieselben fünf rekombinanten mutierten  $\beta_2$ GPI's, die in dem kompetitiven Inhibitionsassay hemmen – diejenigen, die Domäne 1 enthalten – sind dieselben, wie diejenigen, die  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper auf Nickel-Chelat-Platten binden. An Nickel-Chelat-Platten gebundene rekombinante  $\beta_2$ GPI-mutierte Proteine wurden durch die Fähigkeit des Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI verifiziert, an alle neun Proteine zu binden. Im Gegensatz hierzu konnten nur das volllange rekombinante  $\beta_2$ GPI (das heißt, das einzige getestete rekombinante Protein, das sowohl Domäne 1 als auch Domäne 5 enthält) ohne weiteres auf Cardiolipinbeschichteten Platten detektiert werden. An Cardiolipin-beschichtete Platten gebundene mutierte rekombinante  $\beta_2$ GPI-Proteine, wurde von der Fähigkeit des Kaninchen anti- $\beta_2$ GPI bestätigt, an alle neun rekombinante Proteine zu binden.

**[0168]** Sowohl die Inhibitionsdaten ([Fig. 4](#)) als auch die Daten des direkten Bindens auf Nickel-beschichteten Platten ([Fig. 6](#)) zeigen eindeutig, dass die Antigenspezifität der untersuchten 13 Präparate der  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper sich gegen ein Epitop richtet, das in Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI vorhanden ist.

#### Beispiel 2: Spezifität von Antikörpern von APS-Patienten

**[0169]** Die Lokalisierung der Epitop-bindenden Region in den im vorhergehenden Beispiel beschriebenen Untersuchungen beruhte auf der Verwendung von affinitätsgereinigtem Antikörper von APS-Patienten mit hohem Titer. Die Affinitätsreinigung von APS-Antikörpern erfordert Patienten mit einem hohen Titer und eignet sich nicht ohne weiteres zur Untersuchung von Patienten mit einem niedrigeren Titer oder von großen Patientenpopulationen. Deshalb entwickelten wir einen alternativen Versuchsansatz, der auf Serum basiert, um die Antikörper bindende(n) Domäne(n) in APS-Patientenproben zu bestimmen, und für eine Beurteilung vieler Patienten geeignet ist.

**[0170]** Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR) liefert eine quantitative Messung der Wechselwirkung zwischen immobilisiertem Protein und einem löslichen Analyt. Die gegenwärtigen Untersuchungen wenden SPR an, um die Wechselwirkung zwischen immobilisiertem  $\beta_2$ GPI-Protein und Domänendeletionsmutanten von  $\beta_2$ GPI mit humanem Plasma von einer Kohorte normaler und APS-Patienten zu messen. Diese Untersuchungen waren so aufgebaut, um herauszufinden, ob die Immundominanz von  $\beta_2$ GPI Domäne 1 für eine größere Population an APS-Patienten verallgemeinert werden könnte.

#### Material und Methoden

**[0171]** Reagenzien. CM5-Chips, NHS und EDC und HBS-EP-Puffer waren von BIACore. Humanes Haptoglobin (Phänotyp 1-1), ein Protein, welches das in  $\beta_2$ GPI festgestellte kurze Konsensus-Wiederholungsmotiv enthält, wurde in einer separaten Durchflusszelle auf dem Chip immobilisiert und als negative Kontrolle eingesetzt. Rekombinantes  $\beta_2$ GPI und Domänendeletionsmutanten von  $\beta_2$ GPI wurden in Tn5-Zellen unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert und aus den Überständen mit einer Nickel-Chelat-Affinitätsäule gereinigt. Iverson et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15542–15546. Normale humane Plasma-proben wurden erworben (George King Biomedical) oder im Haus erhalten. Patientenplasmaproben von Individuen, bei denen entweder ein primäres oder sekundäres (für Lupus) Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom diagnostiziert worden war, wurden von mehreren klinischen Quellen erhalten.

**[0172]** Die in dieser Untersuchung verwendeten 55 Kontrollen stammten aus einer heterogenen Probe. Drei-ßig Kontrollproben (15 männlich; 15 weiblich, Durchschnittsalter 34 Jahre zwischen 19 und 45 Jahren) wurden von George King Bio-Medical (Overland Park, KS) erworben, 5 Freiwillige am Ort (3 männlich, 2 weiblich), 2 vereinte kommerzielle Quellen und 18 Blutspenden unbekannten Ursprungs waren in der Untersuchung mit eingeschlossen. Die Patientenproben wurden von mehreren Quellen gesammelt und umfassten Patienten, deren Krankengeschichten venöse Thrombose, arterielle Okklusionen, cerebrovaskuläre Okklusionen, mehrfache Fehlgeburten und Thrombozytopenie beinhalteten. Alle Patienten in der Untersuchung zeigten IgG-Antiphospholipid-Antikörperlevel (GPL)  $\geq 20$  bei einem Assay für den internen Gebrauch.

**[0173]** Die Gesamt-IgG-Fraktion wurde aus dem Plasma unter Verwendung von Immunopure Plus Protein G-Agarosekügelchen und Immunopure IgG-Bindungs- und Elutionspuffer gemäß Herstelleranleitung (Pierce) gereinigt.

**[0174]** Oberflächen-Plasmonresonanz. Alle Experimente wurden unter Verwendung des BIACore<sup>TM</sup> 2000 Instruments bei 25°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/Minute durchgeführt. Die Äquilibrierung des Chips und die Bindungsuntersuchungen wurden mit entgastem HBS-EP-Puffer durchgeführt, der aus 0.01 M HE-PES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA und 0,005% (v/v) Detergens P20 bestand. Das kovalente Koppeln von Proteinliganden über ihre freien Aminogruppen an den CM5-Chip wurde durch eine Aktivierung des Chips mit 40  $\mu$ l 0,05 M NHS/0,2 M EDC und anschließende Exposition an den geeigneten Proteinliganden erreicht. Rekombinantes  $\beta_2$ GPI(His)<sub>6</sub>, Domänendeletionsmutanten von  $\beta_2$ GPI und Haptoglobin wurden durch Leiten von 50  $\mu$ l einer 25  $\mu$ g/ml Lösung in 10 mM Acetat (pH 4,8) über den NHS-aktivierten Chip immobilisiert. Die überschüssigen reaktiven Gruppen auf der Chip-Oberfläche werden dann mit 40  $\mu$ l 1 M Ethanolamin (pH 8,5) deaktiviert. Humanplasmaproben (130  $\mu$ l) wurden mit HBS-EP 1:1 verdünnt, über den  $\beta_2$ GPI-Chip geleitet und die Reaktionswerte wurden 780 Sekunden gesammelt. Die Chips wurden zwischen den Probenexpositionen mit 80  $\mu$ l 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,1), 0,1 M NaCl regeneriert. Da die Annäherung an das Bindungsgleichgewicht während des Messzeitraums nicht vollständig gelang, wurde der Gleichgewichtsbindungswert ( $R_{eq}$ ) durch Anpassung der Assoziationskurven an die folgende Gleichung unter Anwendung der Hersteller-Software (BioE-

valuation version 2.2, Uppsala, Schweden)  $R_1 = R_{eq}(1 - e^{-ks(t-t_0)}) + R_0$  bestimmt, wo  $R_1$  die gemessene BIACore Antwort zum Zeitpunkt  $t$  ist,  $R_{eq}$  das Gleichgewichtsplateau der Antwort ist,  $t$  die Zeit ist,  $t_0$  die Anfangszeit ist,  $k_s$  eine scheinbare Assoziationskonstante ist ( $k_s = k_a + k_{dis}$ , wo  $K_a$  die Assoziationskonstante ist,  $C$  die Analyt-Konzentration ist und  $k_{dis}$  die Dissoziationskonstante ist) und  $R_0$  ein Antwortausgleich ist. In einigen Experimenten wurden Gesamt-IgG-Fraktionen von Humanplasmaproben durch Binden an Protein-G und saure Elution von Protein G erhalten. Das nach Binden an Protein G verbleibende Plasma wurde erneut mit frischen Protein G-Kügelchen gemischt und als IgG-freies Plasma isoliert. Neutralisierte IgG-Präparate und mit Puffer 1:1 verdünntes IgG-freies Plasma wurden wie oben beschrieben über den  $\beta_2$ GPI-Chip geleitet.

#### Ergebnisse und Diskussion

**[0175]** Rekombinantes  $\beta_2$ GPI, das die Domänen 1–5, 2–5, und ausschließlich Domäne 1 enthielt, wurde in Baculovirus-Expressionsvektoren kloniert und in TN5-Zellen exprimiert. Aliquote der gereinigten Proteine wurden mit Hilfe einer Aminosäure-Analyse analysiert und quantifiziert. Jedes Protein enthielt einen einzigen Amino-Terminus und interne Standards erlaubten eine genaue Quantifizierung gestützt auf die Aminosäure-Analyse.

**[0176]** Die APS-Patientenkollekte wurde von mehreren Zentren erhalten und bestand aus 106 Patienten mit GPL  $\geq 20$ , bei denen Symptome des Antiphospholipid-Antikörper-Syndroms (APS) diagnostiziert worden waren. Die Patientenkrankengeschichten lagen nicht vollständig vor, aber verfügbare Krankengeschichten beinhalteten venöse Thrombose, arterielle Thrombose, cerebrovaskuläre Anfälle, mehrfache Fehlgeburten, Frühgeborene und Thrombozytopenie. GPL-Werte reichten von 20–807 ( $413 \pm 161$ , Durchschnitt  $\pm$  SD) mit einem durchschnittlichen Wert von 77. Die normale Kontrollpopulation bestand aus 55 Proben von internen Spendern, kommerziellen Quellen und der San Diego Blutbank.

**[0177]** Serum von APS-Patienten und Kontrollen wurden 1:1 verdünnt und für ein Binden an immobilisiertes  $\beta_2$ GPI(D1-5) untersucht. Das Ausmaß der Wechselwirkung mit  $\beta_2$ GPI(D1-5) ist in Tabelle 4 gezeigt. Der durchschnittliche  $R_{eq}$  für  $\beta_2$ GPI(D1-5) war 730 und 328 mit einem durchschnittlichen Wert von 635 und 201 für die 106 APS-Patienten beziehungsweise die 55 Kontrollpatienten. Der Unterschied zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ , t-Test nach Student). Das Ausmaß der Wechselwirkung von APS-Serum und Kontrollserum mit  $\beta_2$ GPI(D2-5) unterschied sich nicht bei diesen Gruppen.

Tabelle 4: Binden von Serum von Patienten

	Patienten (GPL $\geq 20$ )	Kontrollen
Anzahl an Personen	106	55
$R_{eq}$ D1-5 (Mittelwert $\pm$ SEM)	$730 \pm 42$	$328 \pm 52$
$R_{eq}$ D1-5 (Mittelwert $\pm$ SEM)	$158 \pm 36$	$160 \pm 26$
Mittlere $R_{eq}$ D1-5	635	201
Mittlere $R_{eq}$ D2-5	24	103
% D1 selektiv	88%	12%

**[0178]** Ein Selektivitätsverhältnis wurde errechnet, um das relative Binden von Serumproben an  $\beta_2$ GPI-Domänen-deletionsmutanten zu beschreiben, die sich nur durch das Vorhandensein von Domäne 1 unterscheiden. Dieses Selektivitätsverhältnis wurde durch Division des Bindens ( $R_{eq}$ ) an  $\beta_2$ GPI(D1-5) durch das Binden an  $\beta_2$ GPI(D2-5) berechnet. Ein Faktor von 3 oder größer wurde willkürlich gewählt, um diejenigen Patienten zu definieren, die eine bevorzugte Wechselwirkung mit dem nativen Protein zeigen, das die Domäne 1 enthält. Das Ausmaß der Wechselwirkung sowohl mit  $\beta_2$ GPI(D1-5) als auch mit  $\beta_2$ GPI(D2-5) war in der Kontrollgruppe gering und die Mehrheit der Kontrollpatienten zeigten keine Selektivität für ein immobilisiertes Protein (Tabelle 4). Im Gegensatz hierzu zeigten 88% der APS-Patienten eine  $\geq 3$ -fache Selektivität für Domäne 1 enthaltendes  $\beta_2$ GPI. 41 Prozent (43 von 106) der APS-Patienten zeigten eine geringfügige Wechselwirkung mit  $\beta_2$ GPI(D2-5) ( $R_{eq} < 9$ ), was zu sehr hohen Selektivitätsverhältnissen führte.

**[0179]** Serum von 10 Patienten mit einem Selektivitätsverhältnis von 3 wurden weiter charakterisiert, um zu bestimmen, ob die beobachteten Wechselwirkungen im Serum der IgG-Fraktion zugeschrieben werden könnte. Die Bindungswechselwirkungen des gesamten Plasmas, IgG-freien Plasmas und Gesamt-IgG mit  $\beta_2$ GPI(D1-5) ist in Tabelle 5 gezeigt. Das Entfernen des IgG aus dem Serum mit Protein G beseitigte im Wesentlichen sämtliche spezifischen Bindungswechselwirkungen mit den immobilisierten Proteinen. Die IgG-Fraktion wurde mit Säure von der Protein G-Fraktion eluiert und auf eine Wechselwirkung mit den Proteinen getestet (als „Gesamt-IgG“ in Tabelle 5 bezeichnet; eine anschließende Neutralisierung verdünnte die IgG-Fraktion um 50% bezogen auf das gesamte Plasma oder IgG-freies Plasma). Einzig die IgG-Fraktion zeigte eine Wechselwirkung mit  $\beta_2$ GPI(D1-5) und bildete Antworten, die dem Ausmaß der ursprünglichen Serum-Wechselwirkung mit  $\beta_2$ GPI(D1-5) ähnlich waren (man beachte den Verdünnungsunterschied). Folglich kann das Binden von Domäne 1 selektivem Patientenserum an  $\beta_2$ GPI durch die IgG-Fraktion in diesem Assay-system erklärt werden.

Tabelle 5: BIACore  $R_{eq}$ -Werte für „D1-selektive“ APS-Patientenplasmaproben

Patient	gesamtes Plasma (1:2)		IgG-freies		Gesamt-IgG	
	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d2-5)	(d2-5)	(d1-5)
6501	333	1526	0	0	0	732
6701	199	952	0	0	0	460
6626	37	1622	0	49	0	1132
6515	259	1024	0	0	0	440
6207	19	1450	0	0	0	480
6642	8	811	0	48	0	480
7015	158	2092	0	0	0	864
6703	65	1001	0	0	0	556
6601	84	792	0	0	0	266
7201	0	603	0	0	0	292

**[0180]** Eine Untergruppe von nichtselektiven APS-Patienten (Selektivitätsverhältnis < 3) wurde weiter untersucht, um zu bestimmen, ob ihr Binden der IgG-Fraktion zugeschrieben werden könnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. Wie im Falle der Domäne 1 selektiven Patienten konnten sämtliche Wechselwirkungen mit jedem immobilisierten Protein durch Behandlung des Serums mit Protein G beseitigt werden, um die IgG-Fraktion von Patienten schien das beobachtete Binden in den ursprünglichen Serumproben wiederzugeben (Tabelle 6).

Tabelle 6: BIACore  $R_{eq}$ -Werte für „nicht-selektive“ APS-Patientenplasmaproben

Patient	gesamtes Plasma (1:2)		IgG-freies		Gesamt-IgG	
	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d2-5)	(d2-5)	(d1-5)
6117	386	324	0	0	79	120
6194	3197	2046	0	0	688	470
6649	553	758	0	0	127	253
6627	549	324	0	0	75	115
6611	1002	892	0	0	177	251

**[0181]** In der vorliegenden Untersuchung wurde die Oberflächen-Plasmonresonanz eingesetzt, um die Antikörper-bindende Domäne in einer großen Querschnittspopulation von APS-Patienten ( $n = 106$ ; GPL  $\geq 20$ ) zu lokalisieren. APS-Patientenserum zeigte ein signifikant größeres Binden an  $\beta_2$ GPI als nicht-APS-Kontrollen. Zusätzlich band die Mehrheit der Patientenserien natives  $\beta_2$ GPI(D1-5) in einem größeren Umfang als eine Domänen-deletionsmutante von  $\beta_2$ GPI, die alle Domänen außer Domäne 1 enthielt. Achtzig Prozent der Patienten zeigten eine dreifache oder noch höhere Spezifität für  $\beta_2$ GPI mit Domäne 1 verglichen mit einer Domänen-deletionsmutante, der Domäne 1 fehlte. Die Domäne 1 Bindungsaktivität in APS-Patientenserum wurde durch eine Entfernung der IgG-Komponente vollkommen beseitigt und die Bindungsaktivität konnte in der IgG-Fraktion vollständig wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die immundominanten bindenden Epitope bei der Mehrheit der APS-Patienten in der Amino-terminalen Domäne von  $\beta_2$ GPI lokalisiert sind.

Beispiel 3: Testen von Domäne 1-Fragmenten auf eine Immunreaktivität gegen  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipid-Antikörper

#### Hexapeptid-Synthese

**[0182]** N- $\alpha$ -Fmoc-geschützte Aminosäure, die an Wang Harz gebunden war, wurde zweimal in 20% Piperidin in Dimethylformamid (DMF) für eine Gesamtreaktionszeit von 30 Minuten suspendiert, um das Amin zu entschützen. Hexapeptide mit einem C-terminalen Prolin wurden mit einem ungeschützten Prolin hergestellt, die an Chlortriyl anstatt Wang-Harz gebunden waren, um eine Diketopiperazin-Bildung zu verhindern.

**[0183]** Das Harz wurde zweimal jeweils mit DMF und Methylalkohol gewaschen. Eine Lösung von N-Hydroxybenzotriazol (6 äq.), 1,3-Diisopropylcarbodiimid (6 äq.) und der zweiten Aminosäure (6 äq.) plus Indikator in DMF wurde zu dem Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wurde dann zweimal jeweils mit DMF und Methylalkohol gespült. Der Kaiser-Test (2 Tropfen 5% Ninhydrin in Ethylalkohol + 1 Tropfen Pyridin + 1 Tropfen 80% Phenol in Ethylalkohol) wurde bei einem kleinen Teil des gewaschenen Harzes durchgeführt, um auf die Abwesenheit eines freien Amins zu prüfen.

**[0184]** Die Entschützungs- und Aminosäurezugabe-Schritte wurden wiederholt, um die Sequenz zu beenden. Die Endaminosäure wurde wie oben entschützt, um das freie Amin zu ergeben.

**[0185]** Die Peptide wurden mit einer Lösung von 7,5 Gewichts-% Phenol, 2,5 Volumen-% Eethandithiol, 5,0 Volumen-% Wasser und 5,0 Volumen-% Thioanisol in Trifluoressigsäure (TFA) vom Harz abgespalten. Das Gemisch wurde mindestens 3 Stunden gerührt. Die TFA wurde unter Vakuum entfernt und das Peptid gefällt und zweimal mit Ether gewaschen. Der Feststoff wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 für eine Analyse gelöst. Die Peptide wurden mittels LCMS auf einer  $1,0 \times 150$  mm C18 (5  $\mu$ , 150 Å) Säule (A: 0,1 % TFA, 2% Acetonitril in Wasser; B: 0,08% TFA, 2% Wasser in Acetonitril) charakterisiert.

**[0186]** Das Acetonitril und Wasser wurden unter Vakuum oder durch Lyophilisieren entfernt und die Peptide wurden bei 0°C aufbewahrt.

**[0187]** Peptide, die eine Aktivität zeigten, wurden in größerem Maßstab erneut hergestellt und auf einer C18-Säule (A: 0,1 % TFA in Wasser; B: 0,08% TFA in Acetonitril) gereinigt.

#### Kompetitiver Inhibition-ELISA

**[0188]** Mikrotiterplatten (MaxiSorp™, Nalge Nunc International, Dänemark) wurden mit 50  $\mu$ l volllangem rekombinantem  $\beta_2$ GPI mit 10  $\mu$ g/ml in 0,1 M Bicarbonat, pH 9,5, beschichtet, über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal mit 0,15 M PBS, pH 7,2, gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit 75  $\mu$ l 2% fettfreier Trockenmilch (Carnation, 2% NFDM) blockiert. Die Testinhibitoren wurden in 2% NFDM verdünnt und je 25  $\mu$ l Verdünnung wurde zu den beschichteten Vertiefungen gegeben. Affinitätsgereinigter  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipid-Antikörper wurde in 2% NFDM verdünnt und 25  $\mu$ l einer konstanten Konzentration wurden zu den Vertiefungen gegeben, einschließlich einer Gruppe von 11 Vertiefungen, die keinen Inhibitor enthielten und als positive Kontrolle dienten. Die Inhalte der Vertiefungen wurden gemischt und die Platten wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und 50  $\mu$ l alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-humaner IgG, gamma-Ketten-spezifisch (Zymed #62-8422), geeigneterweise in 2% NFDM verdünnt, wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, 50  $\mu$ l Lösung alkalische Phosphatase PPMP chromogenes Substrat wurden zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 550 nm durch Ablesen der Platten in einem Autoreader

(Bio-Teck Instruments, model EL311) bestimmt. Die prozentuale Inhibition wurde durch Dividieren der OD<sub>550</sub>, die in Gegenwart des Inhibitors erhalten wurde, durch die durchschnittliche OD<sub>550</sub>, die von den 11 Vertiefungen ohne Inhibitor erhalten wurde, und dann Multiplizieren mit 100 erhalten.

#### Inhibitionsuntersuchungen

**[0189]** Vierundsiebzig Peptide wurden untersucht und im kompetitiven Inhibitions-ELISA durchmustert. Zusammengefasst, die „Rohpeptide“, das heißt die nicht gereinigten Peptide wurden in einer 1:2 Verdünnung gegen drei verschiedene affinitätsgereinigte anti-Cardiolipin-Antikörper durchmustert. Peptide, die bei einer 1:2 Verdünnung positiv waren, wurden erneut bei der doppelten Verdünnung durchmustert. Achtundzwanzig Peptide, die bei einer hohen Verdünnung hemmten, wurden erneut synthetisiert und gereinigt. Diese gereinigten Peptide wurden dann in dem kompetitiven Inhibitionsassay getestet. Rekombinantes β<sub>2</sub>GPI wurde ebenfalls als eine positive Kontrolle getestet.

**[0190]** Die in [Fig. 9](#) gezeigten Ergebnisse zeigen, dass einige der Peptide das Binden von anti-Cardiolipin-Antikörpern an β<sub>2</sub>GPI hemmen können. Die Mehrheit der getesteten Peptide waren nicht hemmend, was folglich den hemmenden Peptiden ein Ausmaß an Spezifität verleiht. Alle bis auf zwei der positiven Peptide sind um zwei, in Domäne 1 vorhandene Einheiten von Disulfid-verbundenen Cysteinen angeordnet. Die beiden Peptide, die nicht so angeordnet sind, hemmen ebenfalls am schlechtesten. Diese Disulfid-verbundenen Cysteine können Strukturen bilden, die von β<sub>2</sub>GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörpern erkannt werden.

Beispiel 4: Mutagenese- und Micropanningdaten zur Bestimmung der entscheidenden Aminosäurereste in Domäne 1 für ein Binden an β<sub>2</sub>GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper

#### Fehlerbehaftete PCR

**[0191]** Die fehlerbehaftete PCR wurde folgendermaßen ausgeführt. Domäne 1 von humanem β<sub>2</sub>GPI wurde mit PCR unter Bedingungen amplifiziert, die die Fehlerrate von Taq-Polymerase erhöhen. Die Primerwaren so gewählt, dass die Aminosäuren 1–64 amplifiziert wurden. Eine Sfc 1 Restriktionsstelle wurde als Teil von Aminosäure 1 eingebaut. Am 3'-Ende wurde eine Sal 1 Restriktionsstelle nach Aminosäure 64 eingebaut. Die PCR-Reaktion wurde, wie von Leung et al. (1989) Technique 1:11 beschrieben, unter Verwendung von 0,25 mM MnCl<sub>2</sub> durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit Sfc 1 und Sal 1 verdaut und in fd-tet-DOG2 kloniert, der mit Apal 1 und Sal 1 verdaut worden war. Dies positioniert Domäne 1 am N-Terminus von pIII unmittelbar nach der pIII-Signalsequenz. Die Ligationsreaktion wurde in E. coli K91 mittels Elektroporation transformiert. Der Phage wurde geerntet und mit Standardverfahren der Titer bestimmt. Resultierende Phagenklone wurden unter Anwendung der Mikropanning-Technik getestet.

#### Micropanning

**[0192]** Immulon Typ 2 Platten wurden mit Protein G beschichtet. Protein G wurde mit 5 µl/ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> angesetzt und 100 µl pro Vertiefung wurde zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen von überschüssiger Protein G-Lösung von den Platten, wurde jede Vertiefung mit 200 µl 2YT 1 Stunde bei RT unter Schütteln auf einer Schüttelplattform blockiert. Trisgepufferte Saline, pH 7,4/0,5% Tween 20 (TBS/Tween) wurde mit einem automatischen Plattenwascher eingesetzt, um die Vertiefungen 4-mal mit 200 µl zu waschen. 100 µl humanes β<sub>2</sub>GPI-abhängiges Antiphospholipid 6626, 6501, 6701, Kaninchen-β<sub>2</sub>GPI-abhängiges Antiphospholipid oder normales Kontroll-IgG, auf 2,5 µl/ml mit 2YT verdünnt, wurde zu den gewaschenen Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einer rotierenden Plattform inkubiert.

**[0193]** Der Phage, der mittels Micropanning getestet werden soll, wurde von Agarplatten erhalten, die mittels Biopanning gebildet wurden. Jeder zu testende Klon wurde mit einem sterilen Zahnstocher in eine separate Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 runden Vertiefungen (Corning, Corning, NY) verbracht, die 200 µl 2YT/Tet pro Vertiefung enthielt, und über Nacht bei 30°C kultiviert wurde. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Phagenkulturen in einem Mikrotiterplattenrotor mit 1300 × g 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände bildeten die Quelle des „reinen“ Phagen. Der reine Phagen wurde 1:100 bis 1:1000 verdünnt und 100 µl wurde zu der Platte gegeben, die Protein G-gebundenen β<sub>2</sub>GPI-abhängigen Antiphospholipid-Antikörper 6051 und normales IgG enthielt, wie es oben beschrieben ist. Die Inkubation des verdünnten Phagen mit aPL-Antikörper oder Kontroll-IgG erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem flachen Rotor. Nach neunmal Waschen mit TBS/Tween in einem automatischen Plattenwascher wurde der IgG-gebundene Phage mit 20 µl 0,2 N HCl-Glycin/0,1 % BSA, pH 2,2 eluiert. Die Elutionsinkubation dauerte 10 Minuten

bei RT, während dieser Zeit wurde eine neue Corning Mikrotiterplatte vorbereitet, die 20 µl frisch geerntete E. coli pro Vertiefung enthielt und kühl gehalten wurde. 140 µl 29 mM Tris wurde zu den Phageneluatenten enthaltenden Platten gegeben, um den pH zu neutralisieren, anschließend wurden 20 µl Phagensuspension aus jeder Vertiefung in die entsprechende Vertiefung in der Platte gegeben, die hungernde E. coli enthielt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C wurden 200 µl 2YT zugegeben und die Inkubation wurde weitere 30 Minuten weitergeführt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden 8 µl aus jeder Vertiefung auf eine große 2YT/Tet Agarplatte getüpfelt, während die originale 8 × 12 Vertiefungsanordnung und Orientierung von der letzten Mikrotiterplatte beibehalten wurde. Nach 30 Minuten Trocknen der Tüpfel wurden die Platten über Nacht bei 30°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien halbquantitativ von 0 bis 4+ bewertet, wobei 0 für < 10 Kolonien steht; 1+ = 10–30; 2+ = 30 Kolonien zu 70% konfluent; 3+ = 70% – 90% konfluent; 4+ = konfluent.

**[0194]** Die Ergebnisse sind in Tabellen 7A und 7B gezeigt. Für Tabelle 7A wurden zwei getrennte Ansätze mit Kaninchen-anti-humanem  $\beta_2$ GPI durchgeführt. Die Mutationen sind mit der ursprünglichen Aminosäure, der Positionsnummer und der Identität der Aminosäure in der Mutante aufgeführt. Zum Beispiel bedeutet S31F, dass das Serin an Position 31 zu einem Phe mutiert war. Nicht mutierte Domäne 1 hat eine Bewertung von 3+, während Domäne 5 Phage eine – Bewertung ergab. Stille Mutationen sind nicht gezeigt. Die Klone beginnen am N-Terminus und gehen in Richtung C-Terminus.

**[0195]** Tabelle B stellt eine Erweiterung der Mutationsanalyse dar, die weitere Mutanten zeigt, die gegen zusätzliche Antikörper getestet wurden. Die letzten vier Phagenklone haben Mutationen, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, der darauf hinweist, dass der Phage mehrere Mutationen besitzt (3A4: D8A, S13T; 3F123: L10I, P17Q, Y22C; 3G1: R2W, S38T; 4D1: N56T, R63G).

**[0196]** Die Ergebnisse zeigen an, dass, unter anderem (siehe unten), (a) der Assay konsistent ist; (b) nicht alle Antikörper gleich reagieren; (c) unterschiedliche Mutationen an derselben Position sehr unterschiedliche Wirkungen besitzen können (siehe beispielsweise Met 42).

**[0197]** Die Gesamtergebnisse schlagen sich in einem Modell der Tertiärstruktur von Domäne 1 nieder, das in [Fig. 3](#) gezeigt ist. Es scheint, dass Aminosäuren 55–58 (ile, asn, leu), Aminosäuren 40–45 (einschließlich Aminosäuren 43–45, nämlich arg, lys, phe) und Aminosäure 19 (lys) für die Bindung an einen aCL-Antikörper wichtig sind.

Tabelle 7A

Micropanning von mutierten Domäne 1-Phage

<b>Klon</b>	<b>Mutation</b>	<b>Micropan-Bewertung</b>			<b>Kaninchen</b>
		<b>6626</b>	<b>6501</b>	<b>6701</b>	
2D9	T3P	2	3	3	2
A4 A10	D8A	2	3	2	3, 3
	D8G	2	2	2	2, 2
H9	F12L	2	2	2	3
D1	T14A	2	2	3	3, 3
B6 C4	K19E	ND	1	1	2, 3
	K19L	--	ND	ND	1
E3 2A1	T20L	2	ND	ND	4
	T20S	3	3	3	3
H1	K33E	3	ND	ND	4
2B2	V37E	3	3	3	3
B11 2D4 A6	M42K	3	3	3	3, 4
	M42T	1	2	3	3
	M42V	ND	2	2	3, 3
C1 A1	R43G	1	ND	ND	3
	R43T	3	2	--	2, 3
2D12 C3	F45L	2	3	2	3
	F45S	--	ND	ND	4
A7	L52Q	3	3	3	3, 3
2C3	P54S	1	1	1	3
D11 B1	N56D	--	ND	--	2, 3
	N56T	4	3	--	2, 3
B2	L58N	1	ND	ND	3

Tabelle 7B

## Micropanning von mutierter Domäne 1-Phage

Beispiel 5: An Plattformen konjugierte(s) Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e)

Synthese der tetravalenten Plattform BA/PIZ/IDA/TEG (BA/PITG)

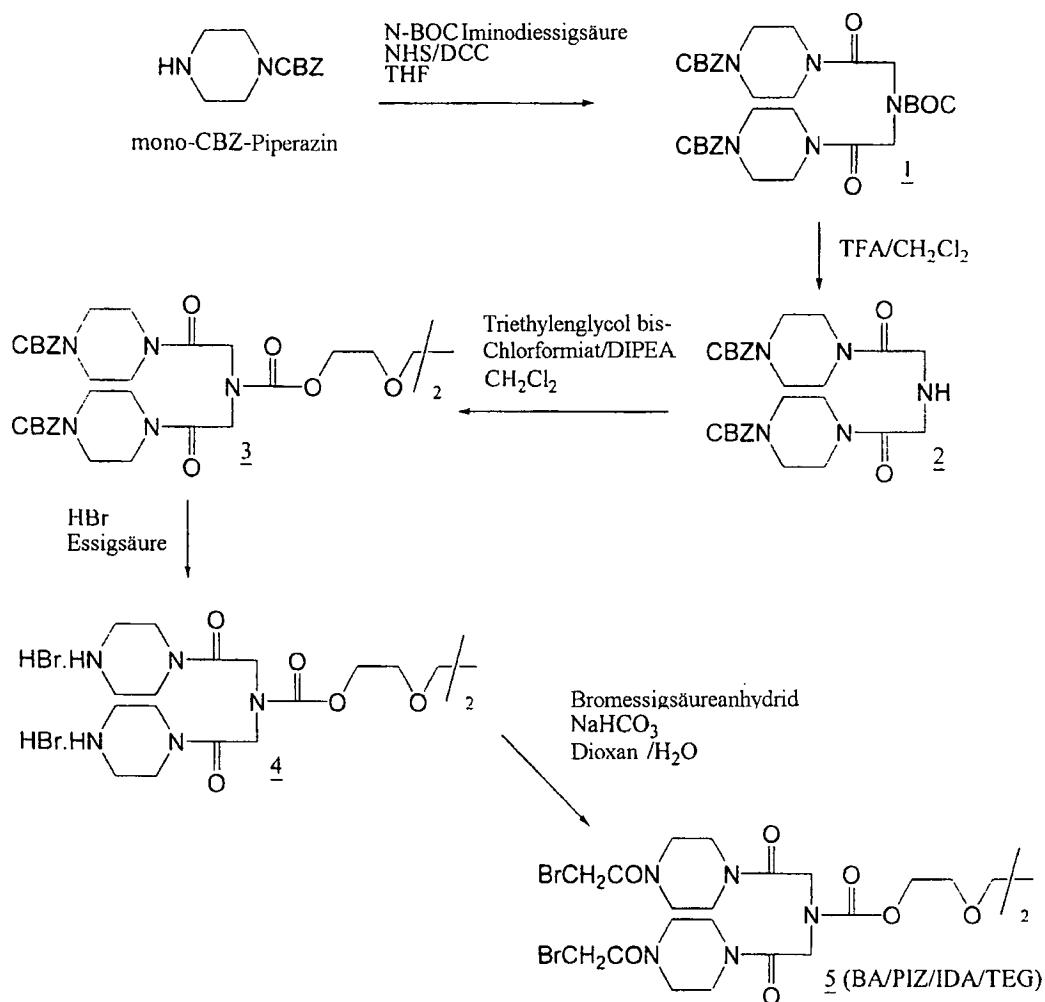
**[0198]** Verbindung 1: Zu einer Lösung von 1,02 g (4,37 mmol) N-(t-Butoxycarbonyl)-iminodiessigsäure (Verbindung 5 in U.S. 5.552.391; Chemically-Defined Non-Polymeric Valency Platform Molecules and Conjugates Thereof) und 1,01 g (8,75 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 50 ml trockenem THF, die auf 0°C gekühlt wurde, wurden 2,26 g (10,94 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Das Gemisch wurde 16 h gerührt und durfte sich langsam auf Raumtemperatur erwärmen und eine Lösung von 2,22 g (10,1 mmol) mono-CBZ-Piperazin

in 25 ml THF wurde zu dem Gemisch gegeben und anschließend wurden 1,22 ml (887 mg, 8,75 mmol) Et<sub>3</sub>N zugegeben. Das Gemisch wurde 7 h bei Raumtemperatur gerührt und filtriert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und der Rückstand wurde in 125 ml EtOAc gelöst und mit 2 × 125 ml Portionen 1 N HCl, 125 ml gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung geschüttelt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und aufkonzentriert und ergab 2,39 g klebrigen Feststoff. Die Reinigung mittels Silikagelchromatographie (95/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) ergab 1,85 g (66%) von 1.

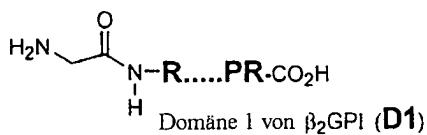
**[0199]** Verbindung 2: Zu einer Lösung von 1,74 g (2,74 mmol) Verbindung 1 in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden 10 ml Trifluoressigsäure gegeben und das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde aufkonzentriert und der Rückstand wurde in 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Das Gemisch wurde auf 0°C gekühlt und 100 ml gesättigte NaH-CO<sub>3</sub> wurden zugegeben. Das Gemisch wurde dann mit vier 100 ml Portionen CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phasen wurden vereint, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 1,46 g (99%) von 2 als einen klebrigen hygroskopischen Feststoff, der direkt im nächsten Schritt verwendet wurde.

**[0200]** Verbindung 3: Zu einer Lösung von 0,7 g (1,3 mmol) Verbindung 2 und 226 µl (168 mg, 1,30 mmol) Diisopropylethylamin bei 0°C wurde eine Lösung von 127 µl Triethylenglycol-Bis-chlorformiat in 4 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegeben und das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit 80 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 80 ml 1 N HCl ausgeschüttelt. Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase wurde mit zwei 80 ml Portionen Wasser gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und aufkonzentriert und ergab 736 mg (93%) Verbindung 3 als einen kristallinen Feststoff.

**[0201]** Verbindung 5: Verbindung 3 (61 mg, 0,48 mmol) wurde in 3 ml 30% HBr/HOAc gelöst und das resultierende Gemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und zu diesem Zeitpunkt wurden 5 ml Et<sub>2</sub>O zugegeben. Das Gemisch wurde 1 h tiefgekühlt und dann zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet und ergab das Tetrahydrobromidsalz 4, das in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Zu diesem Gemisch werden 49 mg (0,58 mmol) NaHCO<sub>3</sub> und 3 ml Dioxan gegeben. Mehr NaHCO<sub>3</sub> wird zugegeben, falls erforderlich, um das Gemisch basisch zu machen. Das Gemisch wird auf 0°C gekühlt und 748 mg (2,89 mmol) Bromessigsäureanhydrid werden zugegeben. Das Gemisch wird 2 h gerührt und mit 20 ml 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 20 ml 80/20 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) filtriert und aufkonzentriert, um Rohverbindung 5 zu ergeben, die mittels Silikagelchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) gereinigt wurde, um 5 zu ergeben.

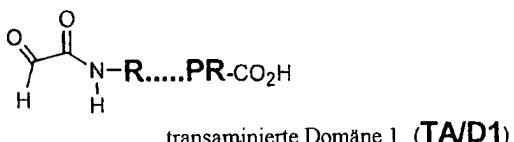
Synthese der AOA/PITG tetrameren Plattform und β<sub>2</sub>GPI- Domäne 1-Polypeptid-Konjugatverbindung 44

**[0202]** Transaminierung von Domäne 1 (TA/D1): Wasser und Natriumacetat-Puffer wurden vor Gebrauch mit Helium durchspült. Domäne 1 (10,55 mg, 1,49 µmol) wurde in 0,5 ml H<sub>2</sub>O in einem Polypropylen-Röhrchen gelöst und 4,0 ml 2 M NaOAc-Puffer, pH 5,5, zugegeben. Eine Lösung von 3,73 mg (14,9 µmol) CuSO<sub>4</sub> in 0,5 ml H<sub>2</sub>O wurde zu dem Gemisch gegeben und anschließend wurde eine Lösung von 2,75 mg (29,9 µmol) Glyoxylsäure in 0,5 ml 2 M NaOAc-Puffer, pH 5,5, zugegeben. Das Gemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre gehalten, vorsichtig 18 h gerührt, zu diesem Zeitpunkt schien die Reaktion vollständig zu sein, wie es mit analytischer HPLC unter Verwendung einer 4,6 mm × 250 mm, 300 Å, 5 µm, Diphenyl-Säule (Vydac) mit Detektion bei 280 nm (1 ml/min; Gradient 25%–45% B, 0–20 min, A = 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1 % TFA/CH<sub>3</sub>CN) gezeigt wurde. Die ungefähren Retentionszeiten sind folgendermaßen: D, 13,2 min; TA/D1, 13,7 min; oxidierte TA/D1, 13,4 min). Das Gemisch wurde auf ein Volumen von 20 ml mit H<sub>2</sub>O verdünnt, filtriert und mittels HPLC (22,4 mm × 250 mm, 300 Å, 10 µm, Diphenyl-Säule (Vydac, Hesperia, CA) (12 ml/min; Gradient 25%–45% B, 0–40 min, A = 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1 % TFA/CH<sub>3</sub>CN) gereinigt. Fraktionen, die reine TA/D1 enthielten, wie es mittels analytischer HPLC gezeigt wurde, wurden vereint und lyophilisiert und lieferten 5,0 mg (48%) TA/D1.



**D1** = H<sub>2</sub>N-GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG  
GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPR-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO: 28)

↓  
 pH 5.5  
 1-2 M NaOAc  
 CuSO<sub>4</sub>  
 Gloylsäure



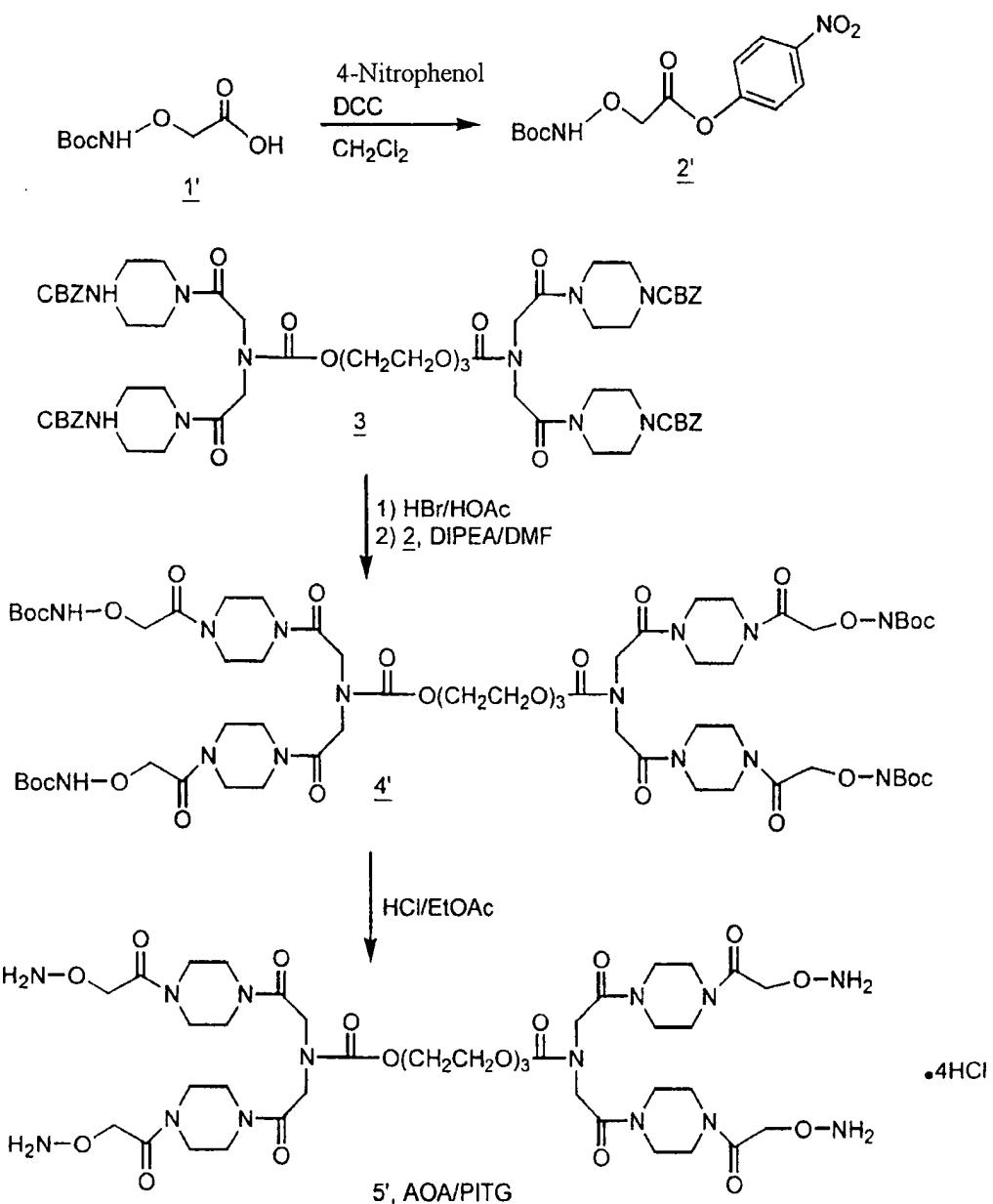
**TA/D1** = glyoxyl-HN-GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG  
GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPR-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO: 29)

#### Synthese der Aminoxyacetyl-(AOA)/PITG-Plattform

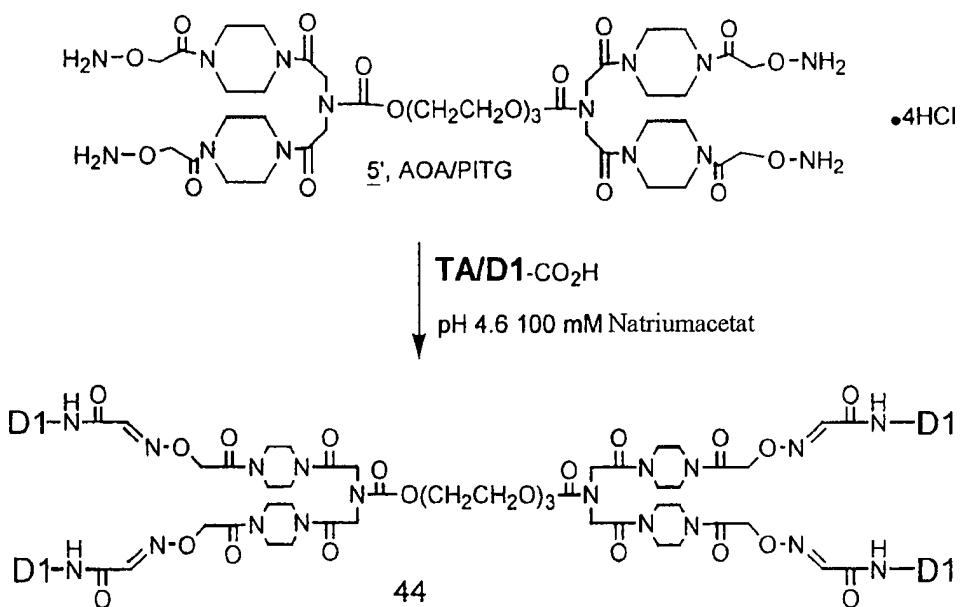
**[0203]** 4-Nitrophenol-N-(tert-butyloxycarbonyl)aminoxyacetat, 2': Zu einer gerührten Lösung von 1,5 g (7,85 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)aminoxyessigsäure (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), Verbindung 1', in 35 ml wasserfreiem THF bei 0°C wurden 1,09 g (7,85 mmol) 4-Nitrophenol und anschließend 1,62 g (7,85 mmol) DCC gegeben. Das Gemisch wurde unter einer Stickstoffatmosphäre 0,5 h bei 0°C und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde filtriert, um Dicyclohexylharnstoff zu entfernen, und das Filtrat wurde aufkonzentriert und mittels Silikagelchromatographie (95/5 CHCl<sub>3</sub>/Isopropylalkohol) gereinigt und ergab 2,30 g (94%) Verbindung 2' als einen weißen Feststoff: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,51 (s, 9H), 4,73 (s, 2H), 7,36 (d, 2H), 7,73 (s, 1H), 8,32 (d, 2H).

**[0204]** Synthese der BOC-geschützten AOA/PITG-Plattform, 4': Verbindung 3 (300 mg, 0,235 mmol) wurde mit 1,5 ml einer 30% Lösung von HBr in Essigsäure 30 min behandelt. Das HBr-Salz des resultierenden Tetraamins wurde durch Zugabe von Diethylether gefällt. Das Gemisch wurde zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Der verbleibende Feststoff wurde mit Ether gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 9 ml DMF gelöst. Zu dem resultierenden Gemisch wurden 294 µl (1,69 mmol) Diisopropylethylamin und anschließend eine Lösung von 410 mg (1,31 mmol) Verbindung 2 in 3 ml DMF gegeben. Das Gemisch wurde unter Stickstoff 4 h gerührt und mit 15/1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH und Saline ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 15/1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH gewaschen und die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und aufkonzentriert, um 680 mg Öl zu ergeben. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient 95/5 auf 75/25 CHCl<sub>3</sub>/MeOH) ergab 215 mg (65%) Verbindung 4' als einen weißen Feststoff: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,49 (s, 36H), 3,40–3,73 (m, 40H), 4,24 (m, 12H), 4,59 (überlappende Singletts, 8H) 8,21 (s, 2H), 8,32 (s, 2H).

**[0205]** AOA/PITG-Plattform, Verbindung 5': HCl-Gas wurde durch eine gerührte Lösung von 67 mg (0,047 mmol) Verbindung 4' in 10/1/1 EtOAc/CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15 min. geleitet und die Mischung weitere 15 min gerührt. Das Gemisch wurde unter Vakuum aufkonzentriert und 16 h unter Vakuum gehalten und ergab 43 mg (78%) Verbindung 5' als einen weißen Feststoff: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO) δ 3,33–3,67 (m, 40H), 4,08 (m, 4H), 4,18 (s, 8H), 4,90 (s, 8H); Massenspektrum (ES) m/z berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>: 1033. Gefunden: 1033.



**[0206]** Synthese der tetravalenten D1-Konjugatverbindung 44: TA/D1 (0,90 mg,  $1,28 \times 10^{-7}$  mol) wurde in 250 µl 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,60, in einem Polypropylen-Röhrchen gelöst. Zu dem Gemisch wurden 16,6 µl (18,9 µg,  $1,60 \times 10^{-8}$  mol) einer 0,97 µmol/ml Lösung von AOA/PITG-Plattform, Verbindung 5', in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,60, gegeben. Das Gemisch wurde unter Stickstoff 6 Tage vorsichtig geschüttelt, zu diesem Zeitpunkt schien die Reaktion vollständig zu sein, wie mit analytischer HPLC unter Verwendung einer 4,6 mm × 250 mm, 300 Å, 5 µm, Diphenyl-Säule (Vydac) mit Detektion bei 280 nm (1 ml/min; Gradient 25%–45% B, 0–20 min, A = 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN) gezeigt. Die ungefähren Retentionszeiten sind folgendermaßen: TA/D1, 13,7 min; Verbindung 44, 17,2 min). Das Gemisch wurde mit 95/5 Wasser/Acetonitril auf ein Volumen von 1 ml verdünnt und mittels HPLC (10 mm × 250 mm, 300 Å, 5 µm, Diphenyl-Säule (Vydac) (3 ml/min; Gradient 25%–45% B, 0–40 min, A = 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN) gereinigt. Fraktionen, die reine Konjugatverbindung 44 enthielten, wie mittels analytischer HPLC nachgewiesen, wurden vereint und lyophilisiert und lieferten 0,4 mg (25%) Verbindung 44: Massenspektrum (ES, durchschnittliches m/z) berechnet für C<sub>1320</sub>H<sub>2092</sub>N<sub>330</sub>O<sub>370</sub>S<sub>20</sub>: 29.198. Gefunden: 29.218.



Synthese von tetramerer AOTEG/DEA/DEG-Plattform und  $\beta_2$ GPI Domäne 1-Polypeptid-Konjugat

**[0207]** 2-[2-(2-Iodethoxy)ethoxy]ethanol, 7: 2-[2-(2-Chlorethoxy)ethoxy]ethanol (12,66 g, 75,1 mmol) und Natriumiodid (33,77 g, 225,3 mmol) wurden in 250 ml Aceton gelöst. Ein Rückflusskühler wurde auf den Kolben gesteckt und das Gemisch unter Rückfluss 18 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch aufkonzentriert und der Rückstand wurde mit 400 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und einem Gemisch aus 300 ml Wasser und 100 ml gesättigter wässriger Natriumbisulfit-Lösung geschüttelt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 400 ml Portionen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen und die vereinigten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 18,3 g (94%) 7 als ein hellgelbes Öl, das im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet wurde:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,43 (brd s, 1H), 3,28 (t, 2H), 3,61 (m, 2H), 3,68 (s, 4H), 3,78 (m, 4H); Massenspektrum (ES) m/z berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Ina}$  ( $M + \text{Na}^+$ ): 283,0. Gefunden: 283,0.

**[0208]** 2-[2-(2-N-(tert-Butyloxycarbonyl)aminoxyethoxy)ethoxy]ethanol, 8: Zu 5,85 g (1,50 mmol) 2-[2-(2-Iodethoxy)ethoxy]ethanol, Verbindung 7, wurden 2,00 g (1,00 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und 3,36 ml (3,42 g, 1,50 mmol) DBU gegeben. Das Gemisch wurde gerührt und ergab eine zähe Flüssigkeit, die heiß wurde und in ein 55°C Ölbad 18 h verbracht wurde, was zur Bildung eines weißen Niederschlags führte, der das Gemisch fest werden ließ. Das Gemisch wurde in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und zu 500 ml gerührtem EtOAc gegeben, was zur Bildung eines Niederschlags führte, der durch Filtration entfernt wurde, und das Filtrat wurde aufkonzentriert und ergab ein braungelbes Öl. Die Reinigung mit Flash-Chromatographie ergab 2,61 g (67%) von 8 als ein Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,50 (s, 9H), 3,65 (t, 2H), 3,70 (brd s, 4H), 3,76 (m, 4H), 4,06 (t, 2H), 7,83 (brd s, 1H),  $^{13}\text{CNMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28,0, 61,3, 68,9, 70,1, 70,3, 72,5, 72,6, 75,1, 81,2, 157,1.

**[0209]** 2-[2-(2-N-(tert-Butyloxycarbonyl)aminoxyethoxy)ethoxy]ethylbromid, Verbindung 9: Brom (ungefähr 0,283 mmol) wurde tropfenweise zu einer Lösung von 50 mg (0,188 mmol) Verbindung 8, 74 mg (0,283 mmol) Triphenylphosphin und 31  $\mu\text{l}$  (30 mg, 0,377 mmol) Pyridin in 2 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gegeben, bis eine Orange-Färbung bestehen blieb. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 0,5 h gerührt und 1 ml gesättigte Natriumbisulfit-Lösung wurde zugegeben, um überschüssiges Brom zu deaktivieren. Das Gemisch wurde dann mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 2  $\times$  15 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit Saline gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert. Die Reinigung des Rückstands mit Silikagelchromatographie (35/65 Aceton/Hexan) ergab 54 mg Verbindung 9 als ein Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,49 (s, 9H), 3,48 (t, 2H), 3,68 (s, 4H), 3,73 (m, 2H), 3,84 (t, 2H), 4,03 (t, 2H), 7,50 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28,3, 30,4, 69,4, 70,6 (zwei Signale), 71,3, 75,5, 81,7, 156,9.

**[0210]** 2-[2-(2-N-(tert-Butyloxycarbonyl)aminoxyethoxy)ethoxy]ethylazid, 10:

Synthese aus Verbindung 9: Eine Lösung von 100 mg (0,305 mmol) Verbindung 9 in 0,25 ml wasserfreiem DMF wurde zu einer Lösung von 159 mg (2,44 mmol) Natriumazid in 0,5 ml wasserfreiem DMF gegeben. Weitere 0,25 ml DMF wurde verwendet, um restliche Verbindung 9 in das Reaktionsgemisch zu spülen, und das Gemisch wurde 3 h auf 115°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Gemisch mit 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 4  $\times$  3 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert, um ein gelbes Öl zu ergeben. Die Reinigung des Rückstands mit Silikagelchroma-

tographie (35/65 Aceton/Hexan) ergab 67 mg (76%) 10 als ein Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 1,47 (s, 9H), 3,41 (t, 2H), 3,69 (brd s, 4H), 3,73 (m, 4H), 4,03 (t, 2H), 7,50 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 28,1, 50,5, 69,1, 70,1, 70,4 (zwei Signale), 75,2, 81,3, 156,7.

**[0211]** Synthese von 10 aus Verbindung 13: Zu einer Lösung von 258 mg (0,69 mmol) Verbindung 13 in 5 ml DMF unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 358 mg (5,50 mmol) Natriumazid gegeben. Das Gemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, 100 ml Wasser zugegeben und das Gemisch wurde mit  $3 \times 50$  ml EtOAc extrahiert. Die EtOAc-Phasen wurden vereinigt und mit 50 ml Wasser gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert, um 294 mg farbloses Öl zu ergeben. Eine Reinigung mit Silikagelchromatographie (30/70 Aceton/Hexan) lieferte Verbindung 10 als ein farbloses Öl.

**[0212]** Verbindung 11: (MR-508-128) Verbindung 10 (1,36 g, 4,70 mmol) und Triphenylphosphin (1,48 g, 5,64 mmol) wurden in 24 ml THF und 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und die resultierende Lösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Ungefähr 160 µl (8 Tropfen) 1 N NaOH wurden zugegeben und das Gemisch wurde 18 h gerührt. Das Gemisch wurde unter Vakuum aufkonzentriert und das Konzentrat wurde mit Silikagelchromatographie (80/8/2  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$  conc.) gereinigt und ergab 1,16 g (94%) von 11 als ein gelbes Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 1,50 (s, 9H), 1,90 (brd s, 2H), 2,88 (t, 2H), 3,56 (t, 2H), 3,65 (m, 4H), 3,71 (m, 2H), 4,01 (m, 2H).

**[0213]** 1,2-Bis(2-Iodethoxy)ethan, Verbindung 12: Eine Lösung von 10,0 g (5,3 mmol) 1,2-bis(2-Chlorethoxy)ethan (Aldrich Chemical Co.) und 16,0 g (107 mmol) Natriumiodid in 110 ml Aceton wurde unter Rückfluss 18 h erhitzt. Das Gemisch wurde aufkonzentriert und der Rückstand wurde mit  $\text{CHCl}_3$  zerrieben, um das Produkt zu lösen, während Salze sich nicht lösten. Das Gemisch wurde filtriert und das Filtrat wurde aufkonzentriert und ergab ein orangefarbenes Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient, 10/90 EtOAc/Hexan auf 15/85 EtOAc/Hexan) lieferte 17,8 mg (90%) orangefarbenes Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,28 (t, 4H), 3,67 (s, 4H), 3,78 (t, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,6 70,5, 72,2.

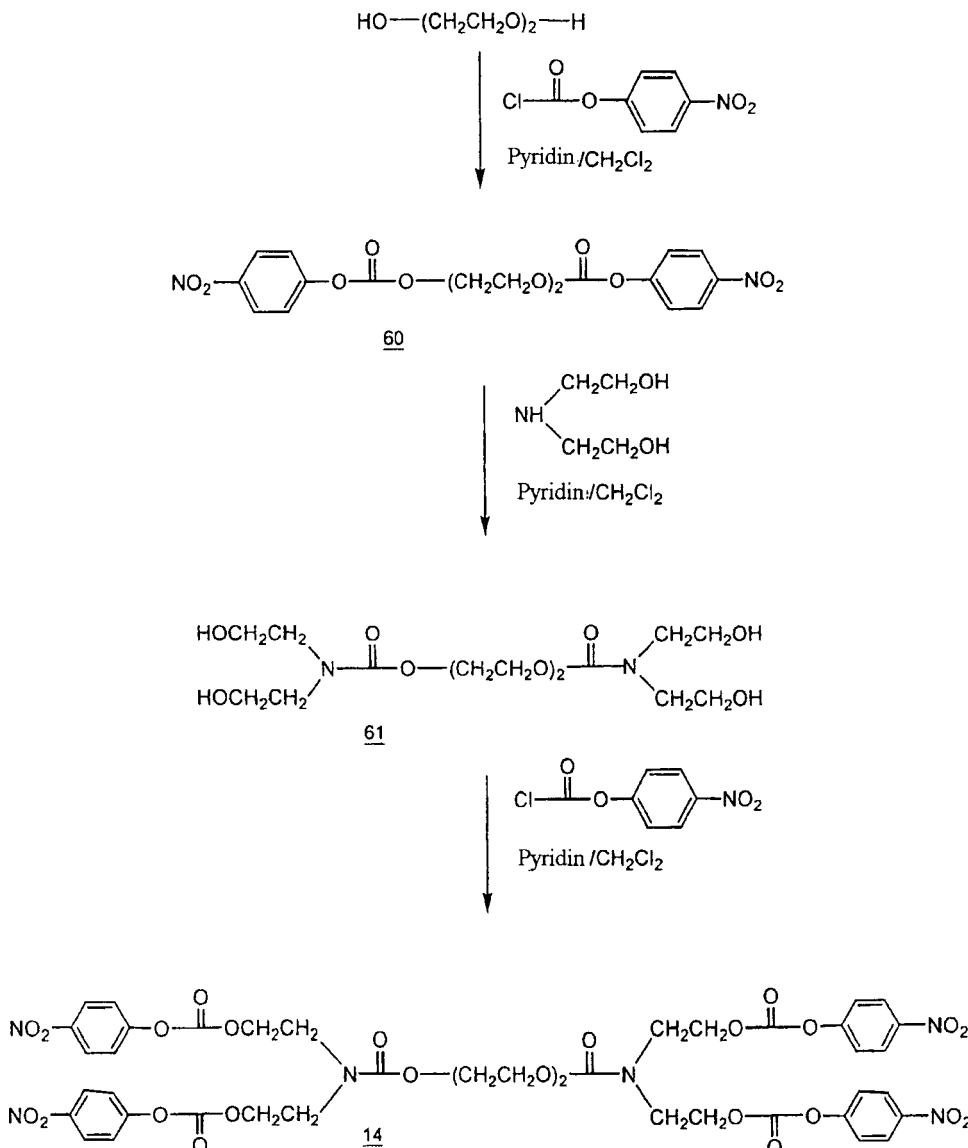
**[0214]** Verbindung 13: DBU (284 µl, 290 mg, 1,90 mmol) wurde zu einem Gemisch aus 266 mg (2,0 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und 2,96 (8,0 mmol) Verbindung 12 gegeben und das Gemisch wurde verschlossen und bis zur Homogenität geschüttelt. Nach 15 Minuten wurde das Gemisch fest und wurde 45 Minuten stehen gelassen. Zu dem Gemisch wurden 5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gegeben und das Gemisch wurde erneut geschüttelt, um die Feststoffe zu lösen. Die resultierende Lösung wurde zu 200 ml EtOAc gegeben. Zusätzliche 50 ml EtOAc wurden zugegeben und das Gemisch wurde zwecks Entfernung der Feststoffe filtriert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und ergab ein Öl, das mit 100 ml EtOAc und  $3 \times 50$  ml 1 N HCl-Lösung ausgeschüttelt wurde. Die EtOAc-Phase wurde mit  $2 \times 50$  ml 1 N NaOH und anschließend  $2 \times 50$  ml 5% Natriumbisulfit-Lösung gewaschen und aufkonzentriert, um 2,6 g gelbes Öl zu liefern. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient, 20/80 EtOAc/Hexan auf 45/55 EtOAc/Hexan) ergab 515 mg (69%) Verbindung 13 als ein gelbes Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 1,50 (s, 9H), 3,28 (t, 2H), 3,68 (s, 4H), 3,72 (m, 4H), 4,02 (t, 2H), 7,72 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 2,9, 28,3, 68,9, 69,4, 70,2, 70,6, 72,0, 75,4, 81,6, 159,9.

**[0215]** Diethylenglycol-bis-4-nitrophenylcarbonat, Verbindung 60: Pyridin (30,5 ml, 377 mmol) wurde langsam zu einer 0°C Lösung von 5,0 g (47,11 mmol) Diethylenglycol und 23,74 g (118 mmol) 4-Nitrophenylchlorformiat in 500 ml THF gegeben. Das Kühlbad wurde entfernt und das Gemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde wieder auf 0°C gekühlt, mit 6 N HCl angesäuert und mit 400 ml 1 N HCl und  $2 \times 400$  ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 24,3 g weißen Feststoff. Die Kristallisierung aus Hexan/EtOAc ergab 16,0 g (78%) Verbindung 37 als ein weißes Pulver: Sp. 110°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,89 (t, 4H), 4,50 (t, 4H), 4,50 (t, 4H), 7,40 (d, 4H), 8,26 (d, 4H).

**[0216]** Verbindung 61: Eine Lösung von 2,5 g (5,73 mmol) Verbindung 37 in 17 ml Pyridin wurde zu einer 0°C Lösung von 1,8 g (17,2 mmol) Diethanolamin in 3 ml Pyridin gegeben. Das Kühlbad wurde entfernt und das Gemisch wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um Verbindung 38 zu ergeben, die nicht isoliert wurde, sondern so, wie sie vorlag, im nächsten Schritt verwendet wurde.

**[0217]** Verbindung 14: Das Gemisch aus dem vorhergehenden Schritt wurde wieder auf 0°C gekühlt, 40 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und anschließend eine Lösung von 11,55 g (57,3 mmol) 4-Nitrophenylchlorformiat in 60 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurden zugegeben und das Gemisch wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde wieder auf 0°C gekühlt, mit 1 N HCl angesäuert, und mit 300 ml 1 N HCl und  $2 \times 200$  ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 13,6 g gelben Feststoff. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  und EtOAc/Hexan) lieferte 4,91 g (83%) Verbindung 39 als einen klebrigen amorphen Feststoff:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,72 (m, 12H), 4,31 (t, 4H),

4,48 (m, 8H), 7,40 (m, 8H), 8,29 (m, 8H).

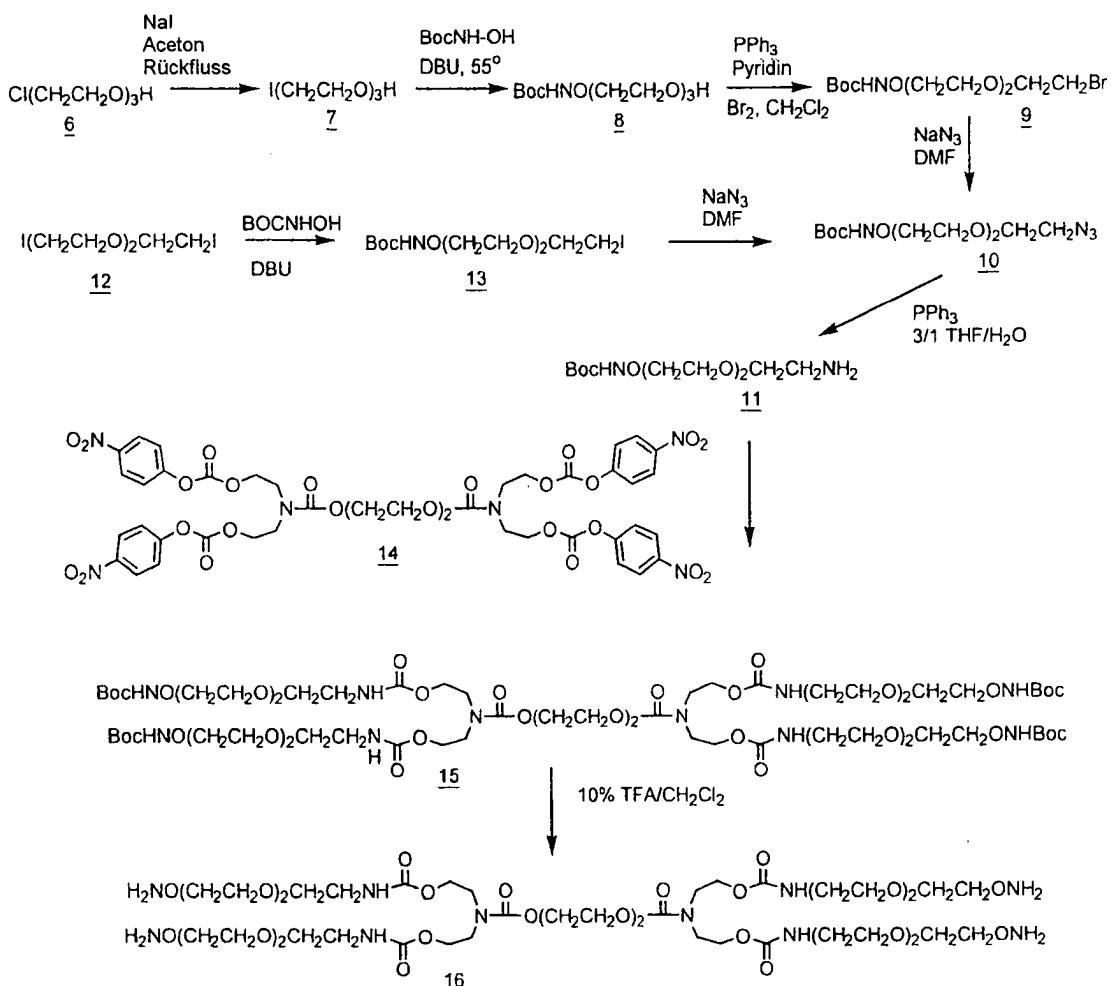


**[0218]** BOC-geschützte AOTEG/DEA/DEG-Plattform, Verbindung 15: Triethylamin (157 µl, 114 mg, 1,13 mmol) wurde zu einer gerührten Lösung von 193 mg (0,188 mmol) Verbindung 14 (wie oben und in U.S. Nr. 60/111.641, am 9. Dezember 1998 eingereicht, beschrieben dargestellt) gegeben und anschließend wurden 298 mg (1,13 mmol) Verbindung 11 zugegeben. Das Gemisch durfte sich auf Raumtemperatur erwärmen und wurde über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde auf 0°C gekühlt, mit 1 N HCl angesäuert und mit 20 ml 1 N HCl und 4 × 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 279 mg gelbes Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (97/3 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) lieferte 138 mg (48%) von 15 als ein Öl: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,49 (s, 36H), 3,35 (m, 8H), 3,46–3,78 (m, 44H), 4,04 (t, 8H), 4,21 (m, 12H), 5,80 (m, 4H), 7,91 (s, 4H); Massenspektrum (ES) m/z berechnet für C<sub>62</sub>H<sub>117</sub>N<sub>10</sub>O<sub>33</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 1528,8. Gefunden: 1528,5.

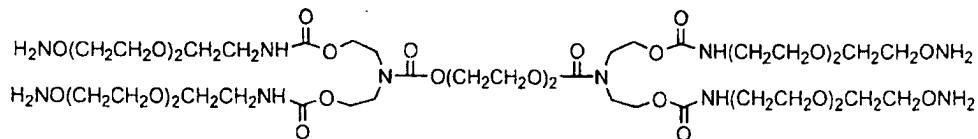
**[0219]** Verbindung 16: Verbindung 15 (60 mg, 39,2 µmol) wurde in 10 ml 1/9 Trifluoressigsäure/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gehalten. Das Lösemittel wurde mit einem schwachen Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand wurde in einer minimalen Menge an Chromatographie-Lösemittel (5/7,5/87,5 NH<sub>4</sub>OH conc./H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) gelöst, das für das Auftragen des Gemisches auf eine Silikagelsäule verwendet wurde. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient 5/7,5/87,5 auf 5/10/85 97/3 conc. NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) lieferte 36 mg (82%) von 16 als ein farbloses Öl: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,37 (m, 8H), 3,58 (m, 16H), 3,67 (s, 16H), 3,71 (m, 12H), 3,86 (m, 8H), 4,17–4,29 (m, 12H), 4,93 (brd, 8H), 5,91 (m, 4H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 40,9, 47,7, 48,2, 62,9, 64,7, 69,4, 69,6, 70,2, 70,3, 70,5, 74,8, 156,1, 156,6; Massenspektrum (ES) m/z berechnet für C<sub>42</sub>H<sub>85</sub>N<sub>10</sub>O<sub>25</sub> (M + H): 1129. Gefunden: 1129.

**[0220]** Zur Kontrolle der Reinheit mit analytischer HPLC wurde das Tetraacetonoxim folgendermaßen darge-

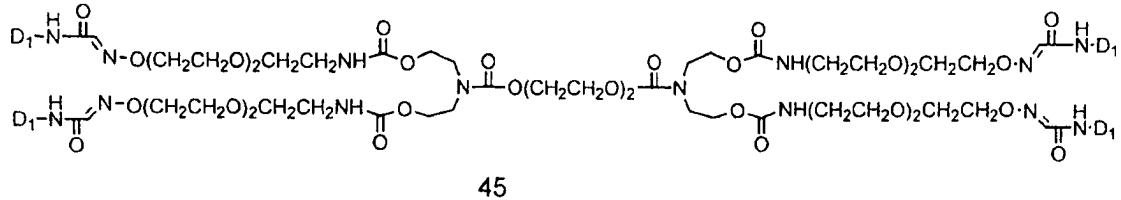
stellt. Verbindung 16 (0,38 mg, 0,34 µmol) wurde in 240 µl 0,1 M NaOAc-Puffer in einem HPLC-Probengefäß gelöst. Zu der Lösung wurden 10 µl Lösung aus 49 µl Aceton in 2,0 ml 0,1 M NaOAc-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde 1 h stehen gelassen und ein Aliquot wurde mit HPLC analysiert (4,6 mm C<sub>18</sub>-Säule, 1 ml/min, Detektion bei 210 nm, Gradient 10–60% B über 20 min, A = 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1 % TFA/CH<sub>3</sub>CN, t<sub>R</sub> = 19 min); Massenspektrum des gesammelten Eluenten (ES) m/z berechnet für C<sub>54</sub>H<sub>101</sub>N<sub>10</sub>O<sub>25</sub> (M + H): 1289. Gefunden: 1289.



**[0221]** Synthese der tetravalenten D1-Konjugatverbindung 45: TA/D1 (5,20 mg, 7,37 × 10<sup>-7</sup> mol) wurde in 2,0 ml He-durchspültem 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,60, in einem Polypropylen-Röhrchen gelöst. Zu dem Gemisch wurden 15,07 µl (139 µg, 1,23 × 10<sup>-7</sup> mol) 8,147 µmol/ml Lösung von AOTEG/DEA/DEG-Plattform, Verbindung 16, in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,60, gegeben. Das Gemisch wurde vorsichtig unter Stickstoff 23 Stunden gerührt, zu diesem Zeitpunkt schien die Reaktion vollständig zu sein, wie mittels analytischer HPLC unter Verwendung von 4,6 mm × 250 mm, 300 Å, 5 µm, Diphenyl-Säule (Vydac) mit einer Detektion bei 280 nm (1 ml/min; Gradient 25%–45% B, 0–20 min, A = 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN) gemessen. Die ungefähren Retentionszeiten sind folgendermaßen: TA/D1, 13,7 min; Konjugatverbindung 45, 17,2 min). Das Gemisch wurde mit Wasser auf ein Volumen von 5 ml verdünnt und mit HPLC (10 mm × 250 mm, 300 Å, 5 µm, Diphenyl-Säule (Vydac) (3 ml/min, Gradient 25–45% B, 0–40 min, A = 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, B = 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN) gereinigt. Fraktionen, die reine Konjugatverbindung 45 enthielten, wurden vereint und lyophilisiert und lieferten 1,73 mg (48%) Konjugatverbindung 45; Massenspektrum (ES, durchschnitt m/z) berechnet für C<sub>1322</sub>H<sub>2048</sub>N<sub>334</sub>O<sub>377</sub>S<sub>20</sub>: 29.294. Gefunden: 29.294.

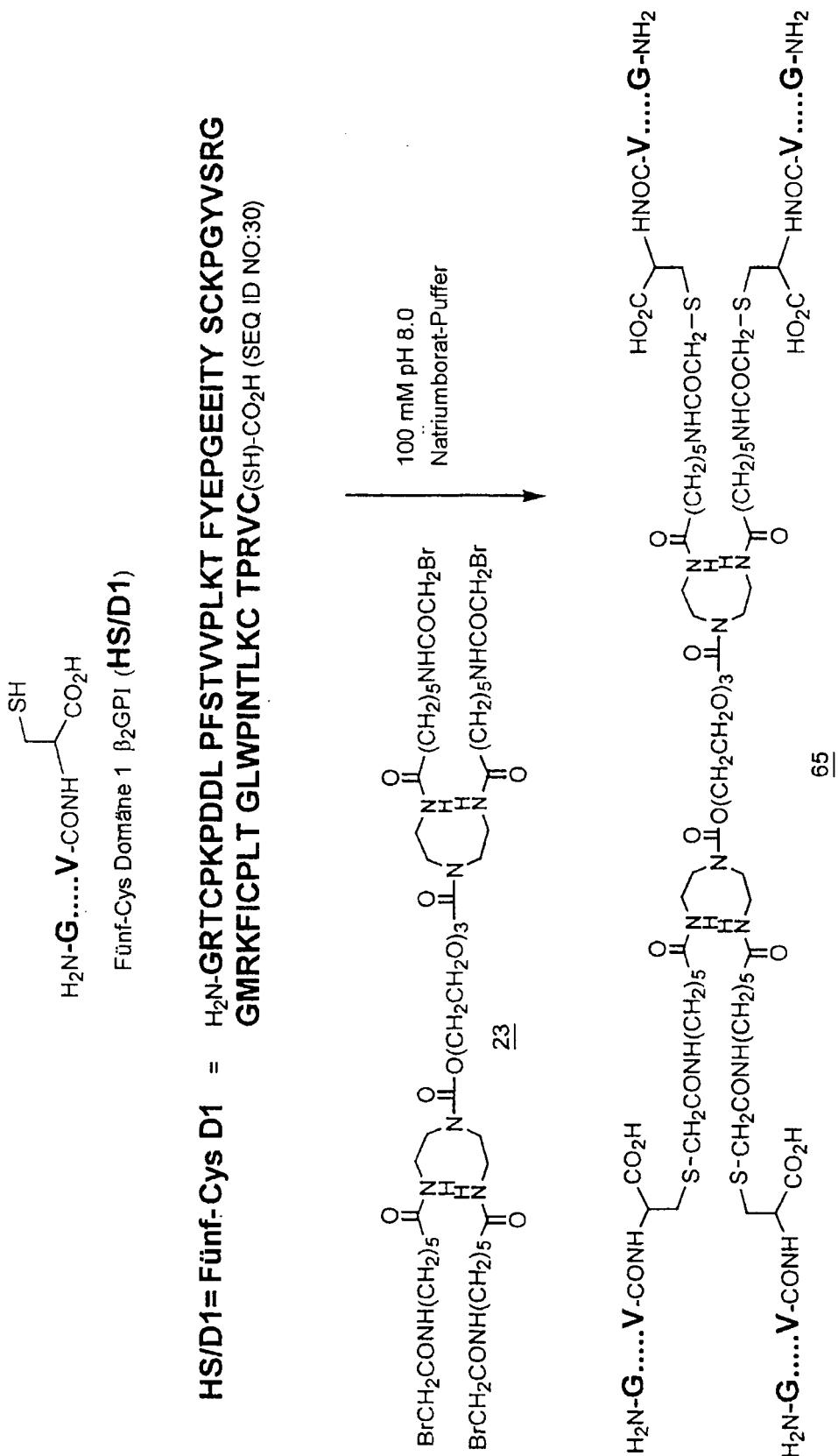
Compound 16, AOTEG/DEA/DEG Plattform

↓  
TA/D1-CO<sub>2</sub>H  
pH 4.6 100 mM Natriumacetat

45

**[0222]** Darstellung des tetravalenten D1-Konjugats über eine Alkylierung des fünften Cysteins mit einer Alkylhalogenid-Plattform, Verbindung 65: Domäne 1 besitzt vier Cysteine, die in oxidiertener Form vorliegen, und eine korrekt gefaltete Domäne 1 besitzt zwei Disulfidbindungen. Ein fünftes Cystein kann an einer beliebigen Position am N-Terminus oder C-Terminus in einiger Entfernung von den nativen Cysteinen mit enthalten sein. In diesem Beispiel ist ein fünftes Cystein enthalten, das für die zweite Domäne von  $\beta_2$ GPI nativ ist. Ein fünftes Cystein kann aufgrund seiner freien Sulfhydrylgruppe verwendet werden, um mit einer Plattform zu reagieren, die für eine Reaktion mit Sulfhydrylgruppen gestaltet ist. Eine derartige Plattform ist eine Halogenacetyl-Plattform wie die Verbindung 23.

**[0223]** Die 5-Cys D1 (vier Äquivalente) wird in Helium durchgespültem 100 mM Natriumborat-Puffer, pH 8,0, gelöst. Die Lösung wird unter Stickstoffatmosphäre gehalten und eine Lösung der Brom-acetylierten Plattform, Verbindung 23 (ein Äquivalent), wird zugegeben. Das Gemisch wird bis zur Vollständigkeit der Reaktion gerührt und die Reinigung des Gemisches mittels präparativer HPLC liefert ein tetravalentes Konjugat, Verbindung 65.

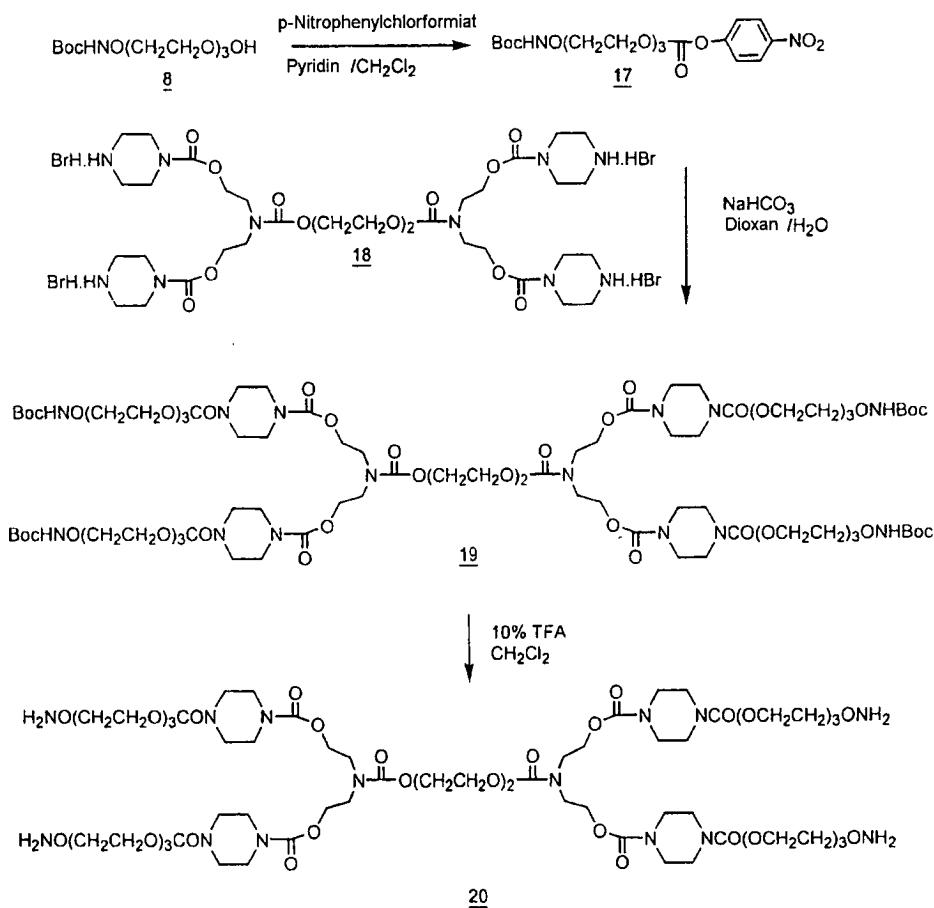


**[0224]** Synthese der AOTEG/PIZ/DEA/DEG-Plattform, Verbindung 17: Pyridin (610 µl, 596 mg, 7,54 mmol) wurde langsam zu einer gerührten Lösung von 500 mg (1,88 mmol) Verbindung 8 und 760 mg (3,77 mmol) p-Nitrophenylchlorformiat in 14 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Das Gemisch wurde auf 0°C gekühlt und mit wässriger 1 N HCl angesäuert. Das resultierende Gemisch wurde mit 100 ml wässriger 1 N HCl und 3 × 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und aufkonzentriert und ergaben 1,05 g klebrigen Feststoff. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (6/4 Hexan/EtOAc) ergab 505 mg (62%) Verbindung 17 als leicht gelbliches Öl: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,47 (s, 9H), 3,67–3,78 (m, 6H), 3,80 (m, 2H), 4,02 (m, 2H), 4,48 (m, 2H), 7,40 (d,

2H), 7,50 (s, 1H), 8,29 (d, 2H); Massenspektrum (ES) m/z berechnet für  $C_{18}H_{26}N_2O_{10}Na$  ( $M + Na$ ): 453,1. Gefunden: 453,0.

**[0225]** BOC-geschützte AOTEG/PIZ/DEA/DEG-Plattform, Verbindung 19: Zu einer Lösung von Verbindung 18 (dargestellt wie in U.S. Nr. 60/111.641 beschrieben, am 9. Dezember 1998 eingereicht) in einer Mischung aus wässrigem Natriumbicarbonat und Dioxan wird eine Lösung von vier Äquivalenten Verbindung 17 in Dioxan gegeben. Nach Vollendung der Reaktion wird das Gemisch mit Wasser und  $CH_2Cl_2$  ausgeschüttelt. Die  $CH_2Cl_2$ -Phase wird aufkonzentriert, getrocknet und mit Silikagelchromatographie gereinigt, um die Verbindung 19 zu liefern.

**[0226]** AOTEG/PIZ/DEA/DEG-Plattform, Verbindung 20: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 19 auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung der Darstellung von Verbindung 16 ähnelt, um Verbindung 20 zu liefern.



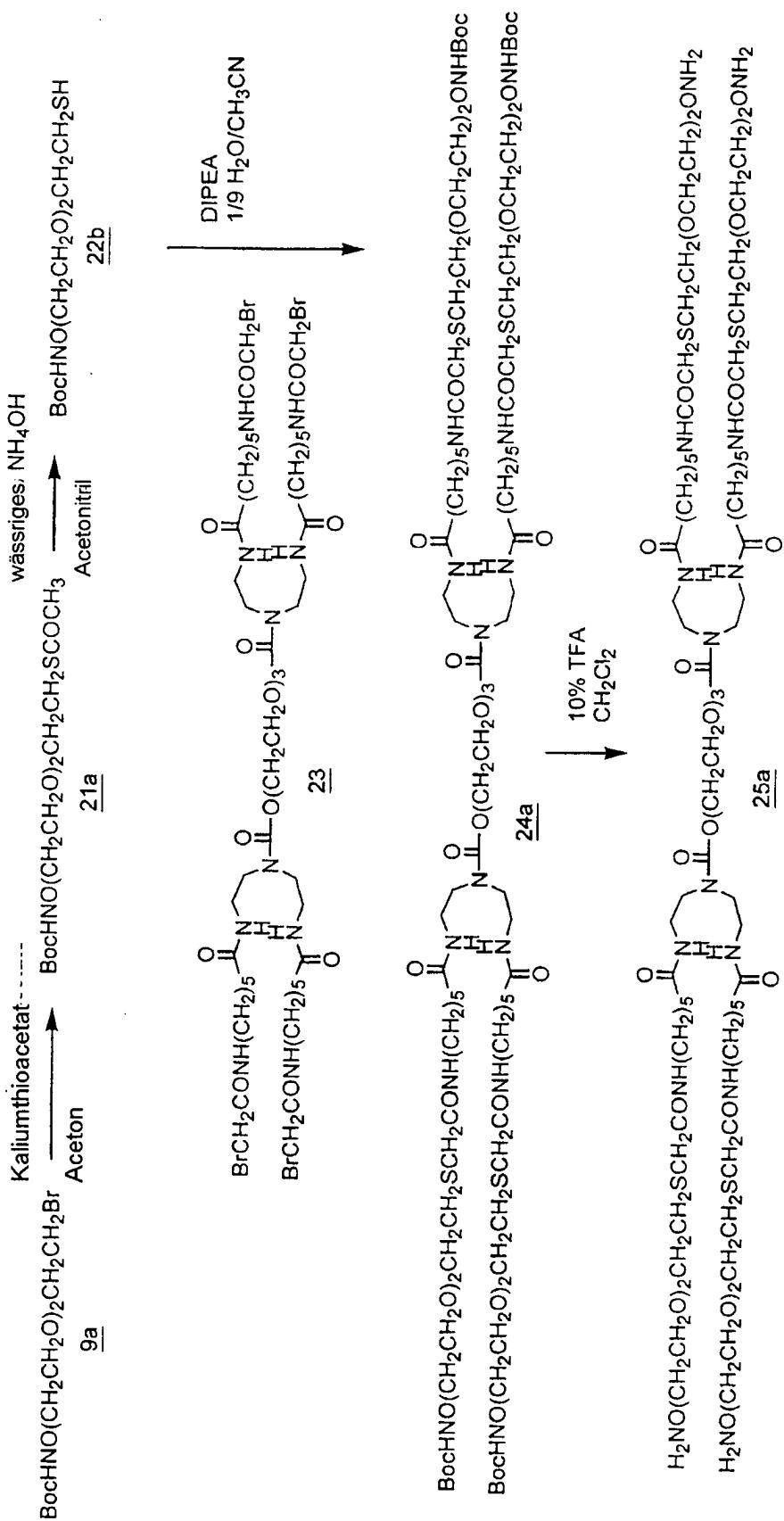
**[0227]** Synthese der AOTEG/SA/AHAB/TEG-Plattform, S-Acetyl-2-[2-(2-N-tert-butyloxycarbonylaminoxyethoxy)ethoxy]-ethylmercaptan, Verbindung 21a: Zu einer Lösung von 500 mg (1,52 mmol) Verbindung 9a in 30 ml Aceton wurden 191 mg (1,68 mmol) Kaliumthioacetat (Aldrich Chemical Co.) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt und der resultierende Niederschlag wurde mittels Filtration entfernt. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und mit 300 ml EtOAc und 2 × 80 ml Saline ausgeschüttelt. Die EtOAc-Phase wurde getrocknet ( $Na_2SO_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergab 460 mg (93%) Verbindung 21a als ein hellbraunes Öl:  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1,48 (s, 9H), 2,35 (s, 3H), 3,12 (t, 2H), 3,61 (t, 2H), 3,64 (m, 4H), 3,73 (m, 2H), 4,02 (m, 2H), 5,52 (s, 1H);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  28,3, 28,8, 30,6, 69,3, 69,8, 70,2, 70,5, 75,3, 81,5, 156,8, 195,3.

**[0228]** 2-[2-(2-N-tert-Butyloxycarbonylaminoxyethoxy)ethoxy]-ethylmercaptan, Verbindung 22a: Verbindung 21a wird mit einer Stickstoff-durchspülten Lösung von 4/1 6 N  $NH_4OH/CH_3CN$  in einer Stickstoffatmosphäre 1 Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Das Gemisch wird unter Vakuum aufkonzentriert, um Verbindung 22a zu liefern, die ohne weitere Reinigung verwendet werden kann.

**[0229]** BOC-geschützte AOTEG/SA/AHAB/TEG-Plattform, 24a: Verbindung 23 (dargestellt, wie von Jones et al. J. Med. Chem. 1995, 38, 2138–2144, beschrieben) wird zu einer Lösung von vier Äquivalenten Verbindung 22a in Stickstoff-durchspültem 10/90  $H_2O/CH_3CN$  gegeben. Zu der resultierenden Lösung werden vier Äquiva-

lente Diisopropylethylamin gegeben. Nach Vollendung der Reaktion wird das Gemisch in Wasser und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase wird aufkonzentriert, getrocknet und mit Silikagelchromatographie gereinigt und liefert Verbindung 24a.

**[0230]** AOTEG/SA/AHAB/TEG-Plattform, 25a: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 24a auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung für die Darstellung von Verbindung 16 ähnelt, um Verbindung 25a zu liefern.



**[0231]** Synthese der AOHEX/SA/AHAB/TEG-Plattform, 1-Iod-6-(N-tert-butyloxycarbonyl)aminoxyhexan, Verbindung 9b: Zu einem heterogenen Gemisch aus 140 mg (1,05 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und 658 µl (1,35 mg, 4,0 mmol) Verbindung 12 wurden 149 µl (152 mg, 1,0 mmol) DBU gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 30 Sekunden gerührt, zu diesem Zeitpunkt wurde das Reaktionsgemisch fest. Die feste Masse wurde über Nacht stehen gelassen und wurde in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Die Lösung wurde mit 2 × 25 ml 1 N NaOH und 3 × 25 ml 1 N HCl gewaschen. Die vereinigten basischen

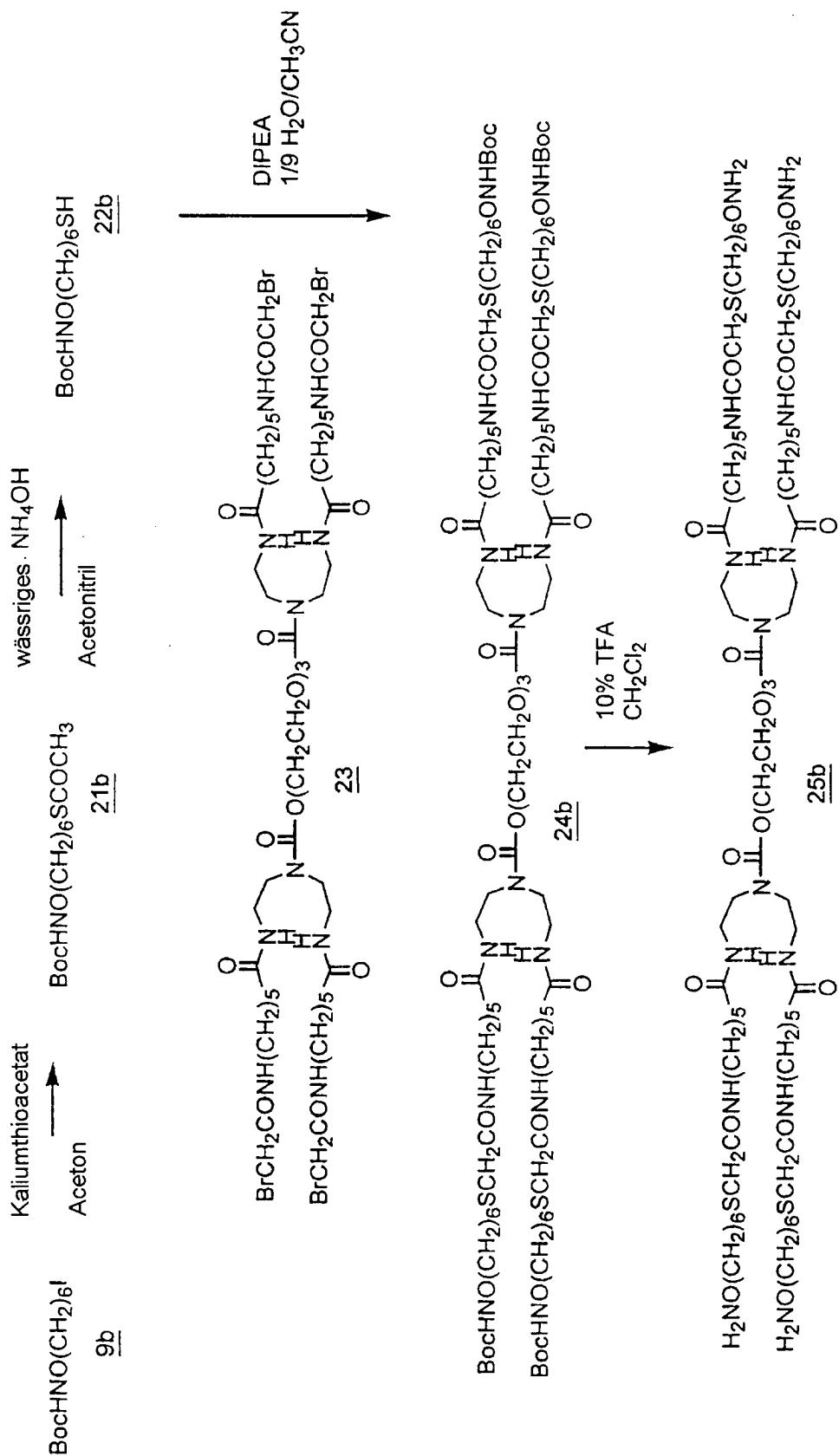
wässrigen Phasen wurden mit 25 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten sauren wässrigen Phasen wurden mit 25 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phasen wurden getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergaben ein gelbes Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient 1/99/0,1 auf 15/85/0,1 EtOAc/Hexan/MeOH) lieferte 216 mg (68%) von 9b als ein gelbes Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,40 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,62 (m, 2H), 1,83 (m, 2H), 3,20 (t, 2H), 3,84 (t, 2H), 7,10 (s, 1H).

**[0232]** S-Acetyl-6-(N-tert-butyloxycarbonyl)aminoxyhexan-1-thiol, Verbindung 21 b: Verbindung 9b (209 mg, 0,61 mmol) wurde zu einer Lösung von Kaliumthioacetat in 15 ml Aceton gegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Das Aceton wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 3 × 25 ml NaOH ausgeschüttelt. Die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergab ein braunes Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (15/85 EtOAc/Hexan) lieferte 116 mg (94%) Verbindung 21 b als ein farbloses Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,39 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,59 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,86 (t, 2H), 3,82 (t, 2H), 7,10 (s, 1H).

**[0233]** 6-(N-tert-Butyloxycarbonyl)aminoxyhexan-1-thiol, Verbindung 22b: Eine gereinigte Probe von 22b wurde folgendermaßen präpariert. Verbindung 21 b (50 mg, 172  $\mu\text{mol}$ ) und 22  $\mu\text{l}$  (17,4 mg, 85,8  $\mu\text{mol}$ ) Tri-n-butylphosphin wurden unter Stickstoff verbracht und 2 ml Stickstoff-durchspülte 1 M NaOH-Lösung in MeOH wurden zu dem Gemisch gegeben. Das Gemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und 172  $\mu\text{l}$  (180 mg, 3 mmol) Trifluoressigsäure wurden zugegeben. Das Gemisch wurde mit 25 ml EtOAc und 3 × 25 ml 1 N HCl ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 25 ml EtOAc extrahiert, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergaben ein Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (15/85/0,1 EtOAc/Hexan/MeOH) lieferte 28 mg von 22b als ein farbloses Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,32 (t, 1H), 1,40 (m, 4H), 1,49 (s, 9H), 1,62 (m, 4H), 2,53 (d von t, 2H), 3,84 (t, 2H), 7,09 (s, 1H).

**[0234]** BOC-geschützte AOHEX/SA/AHAB/TEG-Plattform, 24b: Verbindung 21b (13 mg, 45  $\mu\text{mol}$ ) und 6  $\mu\text{l}$  (4,5 mg, 22,3  $\mu\text{mol}$ ) Tri-n-butylphosphin wurden unter Stickstoff verbracht und 3 ml Stickstoff-durchspülte Lösung von 4/1 6 N  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$  wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und unter Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 3 ml Stickstoff-durchspülter Lösung von 10/90 Wasser/ $\text{CH}_3\text{CN}$  gelöst. Zu der resultierenden Lösung, die unter Stickstoff gehalten wurde, wurden 10 mg (7,44  $\mu\text{mol}$ ) Verbindung 23 und anschließend 8  $\mu\text{l}$  (5,77 mg, 44,6  $\mu\text{mol}$ ) Diisopropylethylamin zugegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und unter Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wurde mit Silikagelchromatographie (Mehrstufengradient 1/99 auf 5/95 auf 7,5/92,5 auf 10/90 auf 15/85 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gereinigt und lieferte 14 mg (93%) von 24b als ein farbloses Öl: DC (10/90 MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),  $R_f$  = 0,3; Massenspektrum (ES) m/z berechnet für  $\text{C}_{92}\text{H}_{173}\text{N}_{14}\text{O}_{26}\text{S}_4$  ( $M + H$ ): 2018. Gefunden: 2018.

**[0235]** AOHEX/SA/AHAB/TEG-Plattform, 25b: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 24b auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung für die Darstellung von Verbindung 16 ähnelt.



**[0236]** Synthese der AOHOC/DT/TEG-Plattform, 6-(tert-Butyloxycarbonylaminoxy)hexan-1-ol, 27: Zu einer Lösung von 179 µl (183 mg, 1,2 mmol) DBU in 1 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden 133 mg (1,0 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und 157 µl (217 mg, 1,2 mmol) 6-Bromhexan-1-ol (Aldrich Cemical Co.) gegeben und das Gemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde aufkonzentriert und ergab ein gelbes Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (35/5/65 EtOAc/MeOH/Hexan) ergab 180 mg (77%) Verbindung 27 als ein farbloses Öl: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,39 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,59 (m, 4H), 3,63 (t, 2H), 3,85 (t, 2H), 7,42 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 25,6, 25,8, 28,1, 28,4, 62,8, 76,8, 81,7,

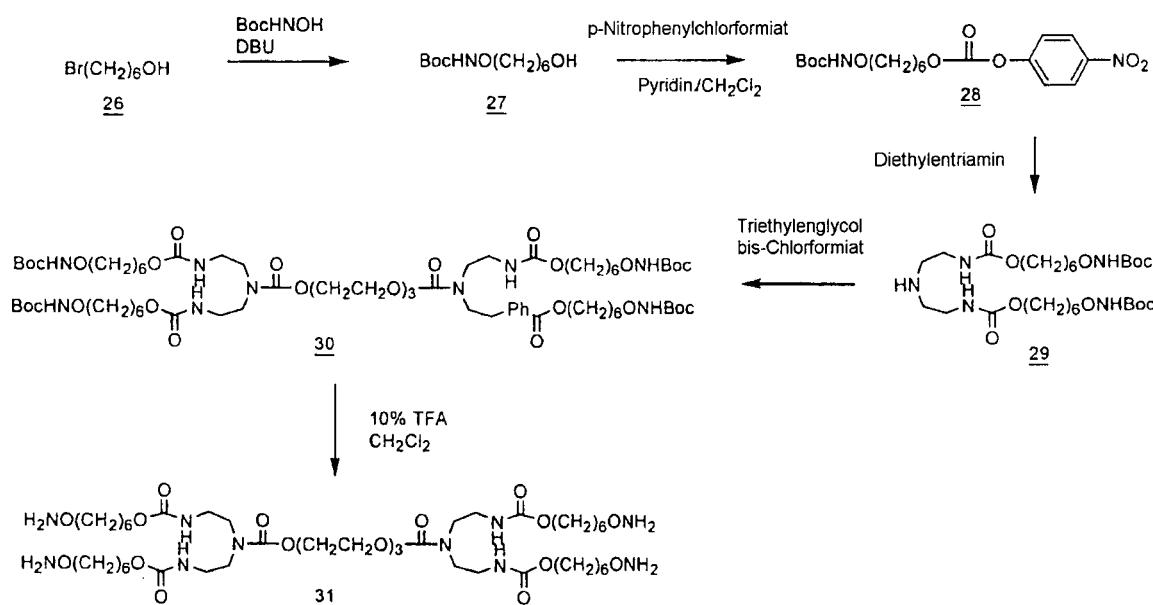
157,2.

**[0237]** Verbindung 28: Zu einer Lösung von 100 mg (0,428 mmol) Verbindung 27 in 2 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 0°C wurden 90 µl (88,1, 1,11 mmol) Pyridin und anschließend 113 mg (0,557 mg) p-Nitrophenylchlorformiat (Aldrich Chemical Co.) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden gerührt, auf 0°C gekühlt, mit 1 N HCl angesäuert und mit 20 ml 1 N HCl und 3 × 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die vereinigten CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phasen wurden mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und aufkonzentriert. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie lieferte Verbindung 28.

**[0238]** Verbindung 29: Zu einer Lösung von Diethylentriamin in EtOAc werden zwei Äquivalente Diisopropyl-ethylamin und anschließend zwei Äquivalente Verbindung 28 gegeben. Das Gemisch wird gerührt, bis die Reaktion vollständig ist. Die Lösemittel werden entfernt und das Produkt, Verbindung 29, wird mit Silikagelchromatographie gereinigt.

**[0239]** BOC-geschützte AOHOC/DT/TEG-Plattform, 30: Zu einer Lösung von Triethylenglycol-bis-chlorformiat (Aldrich Chemical Co.) in Pyridin werden zwei Äquivalente Verbindung 29 gegeben. Das Gemisch wird gerührt, bis die Reaktion vollständig ist und mit 1 N HCl und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase wird getrocknet und aufkonzentriert und das Produkt wird mit Silikagelchromatographie gereinigt und ergibt Verbindung 30.

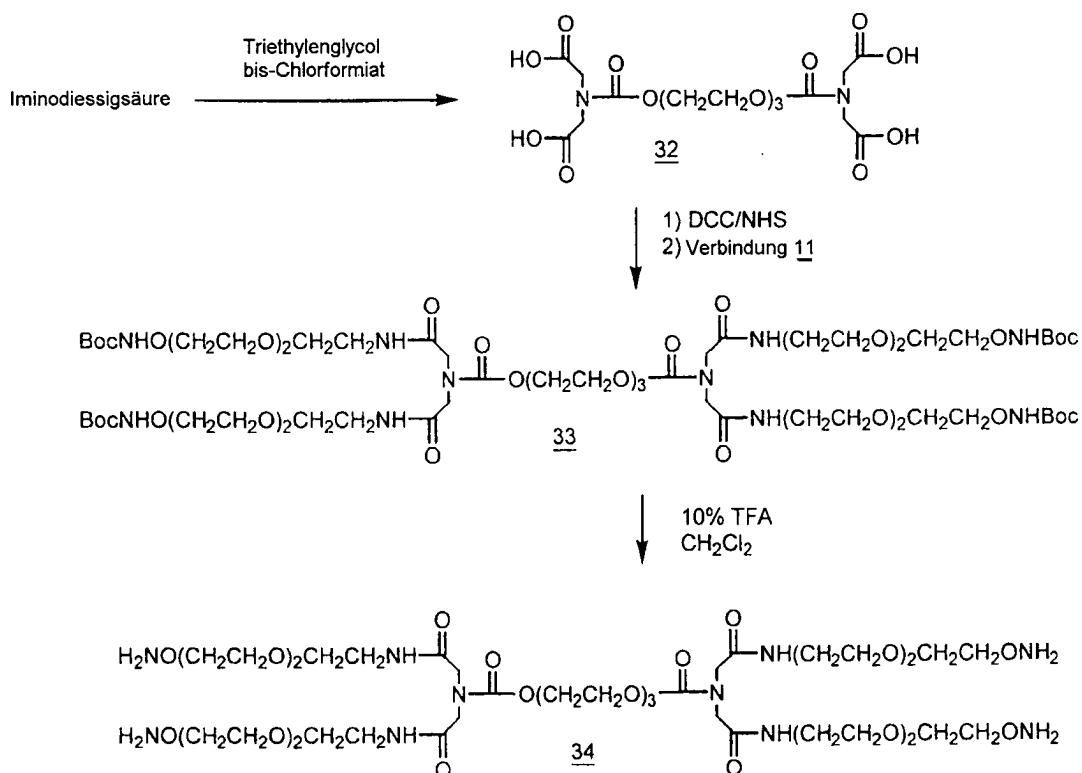
**[0240]** AOHOC/DT/TEG-Plattform, 31: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 30 auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung für die Darstellung von Verbindung 16 ähnelt.



**[0241]** Synthese der AOTEG/IDA/TEG-Plattform, Verbindung 32: Zu einer Lösung von Triethylenglycol-bis-chlorformiat (Aldrich Chemical Co.) in Pyridin werden zwei Äquivalente Iminodiessigsäure (Aldrich Chemical Co.) gegeben. Das Gemisch wird gerührt, bis die Reaktion vollständig ist und mit 1 N HCl und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase wird getrocknet und aufkonzentriert und das Produkt wird mit Silikagelchromatographie gereinigt und ergibt Verbindung 32.

**[0242]** Verbindung 33: Eine Lösung von Verbindung 32 in THF wird mit 6 Äquivalenten NHS und 6 Äquivalenten DCC 1 Stunde behandelt. Zu dem Gemisch werden 4 Äquivalente Verbindung 11 gegeben und das Gemisch wird gerührt, bis die Reaktion vollständig ist. Essigsäure wird zugegeben, um überschüssiges DCC zu deaktivieren, und die resultierenden Feststoffe werden mittels Filtration entfernt. Das Filtrat wird aufkonzentriert und mit Silikagelchromatographie gereinigt und liefert Verbindung 33.

**[0243]** Verbindung 34: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 33 auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung für die Darstellung von Verbindung 16 ähnelt.



**[0244]** Synthese der AOTEGO/LEV/PITG-Plattform, p-Nitrophenyllevulinat, 35: Zu einer Lösung von 800 mg (6,89 mmol) Levulinsäure (Aldrich Chemical Co.) in 4,25 ml Pyridin wurden 1,78 g (7,58 mmol) 4-Nitrophenyltrifluoracetat (Aldrich Chemical Co.) gegeben. Die resultierende Lösung wurde 15 min gerührt und mit 28 ml Wasser und 2 × 28 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die vereinigten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert. Die Reinigung des Konzentrats mit Silikagelchromatographie (Stufengradient, 25/75 auf 30/70 EtOAc/Hexan) lieferte 1,06 g (74%) Verbindung 35:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 2,28 (s, 3H), 2,87 (m, 4H), 7,29 (d, 2H), 8,28 (d, 2H).

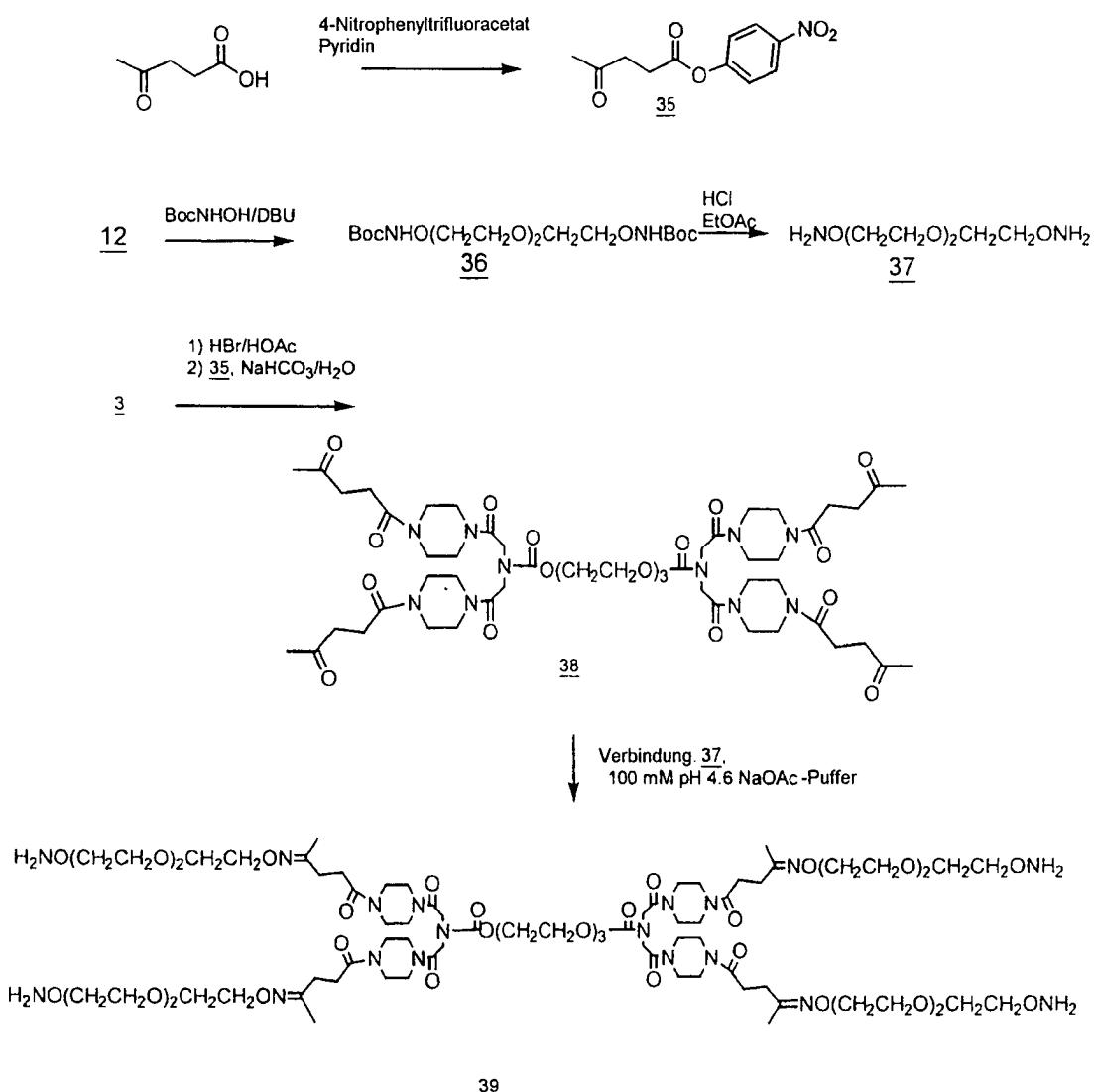
**[0245]** 1,2-Bis(2-(tert-butyloxycarbonyl)aminoxyethoxy)ethan, Verbindung 36: Zu 243 mg (0,66 mmol) Verbindung 12 wurden 219 mg (1,64 mmol) N-(tert-Butyloxycarbonyl)-hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und anschließend 246 µl (250 mg, 1,64 mmol) DBU gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis es fest wurde (ungefähr 1 Stunde). Nach einer weiteren Stunde Ruhen wurde das Gemisch in 2 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und die resultierende Lösung wurde zu 100 ml EtOAc gegeben, um das Iodwasserstoff-Salz von DBU zu fällen. Weitere 50 ml EtOAc wurden zugegeben und das Gemisch wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit 2 × 50 ml 1 N HCl, 2 × 50 ml 5% Natriumbisulfit-Lösung und 25 ml Saline gewaschen. Die EtOAc-Phase wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und ergab ein Öl. Die Reinigung mit Silikagelchromatographie (Stufengradient, 40/60 auf 50/50 auf 80/20 EtOAc/Hexan) ergab 164 mg Verbindung 36 als ein farbloses Öl:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 1,48 (s, 18H), 3,65 (s, 4H), 3,72 (t, 4H), 4,02 (t, 4H), 7,80 (s, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 28,2, 69,0, 70,3, 75,2, 81,3, 156,8.

**[0246]** 1,2-Bis(2-aminoxyethoxy)ethan, Verbindung 37: Verbindung 36 (559 mg, 1,47 mmol) wurde in 15 ml EtOAc gelöst und HCl-Gas durchströmte 30 Minuten die Lösung. Das Gemisch wurde unter Vakuum aufkonzentriert und lieferte 72 mg (90%) Verbindung 37 als das HCl-Salz als einen klebrigen Rückstand:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 3,75 (s, 4H), 3,87 (m, 4H), 4,27 (m, 4H); Massenspektrum (ES) m/z berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M} + \text{H}$ ): 181,1. Gefunden: 181,1.

**[0247]** Verbindung 38: Verbindung 3 wird mit einer 30% Lösung von HBr in Essigsäure behandelt, um CBZ-Schutzgruppen zu entfernen und ein Tetraamin-Bromwasserstoffsalt zu liefern. Das Tetraamin wird in einer Natriumbicarbonat-Lösung in Wasser und Dioxan gelöst und die resultierende Lösung wird zu vier Äquivalenten Verbindung 35 gegeben. Nach Vollendung der Reaktion wird das Gemisch mit Wasser und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase wird aufkonzentriert, getrocknet und mit Silikagelchromatographie gereinigt, um Verbindung 38 zu liefern.

**[0248]** AOTEGO/LEV/PITG-Plattform, Verbindung 39: Zu einer Lösung von Verbindung 38 in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,6, werden 20 Äquivalente von Verbindung 37 gegeben. Nach Vollendung der Reaktion wird

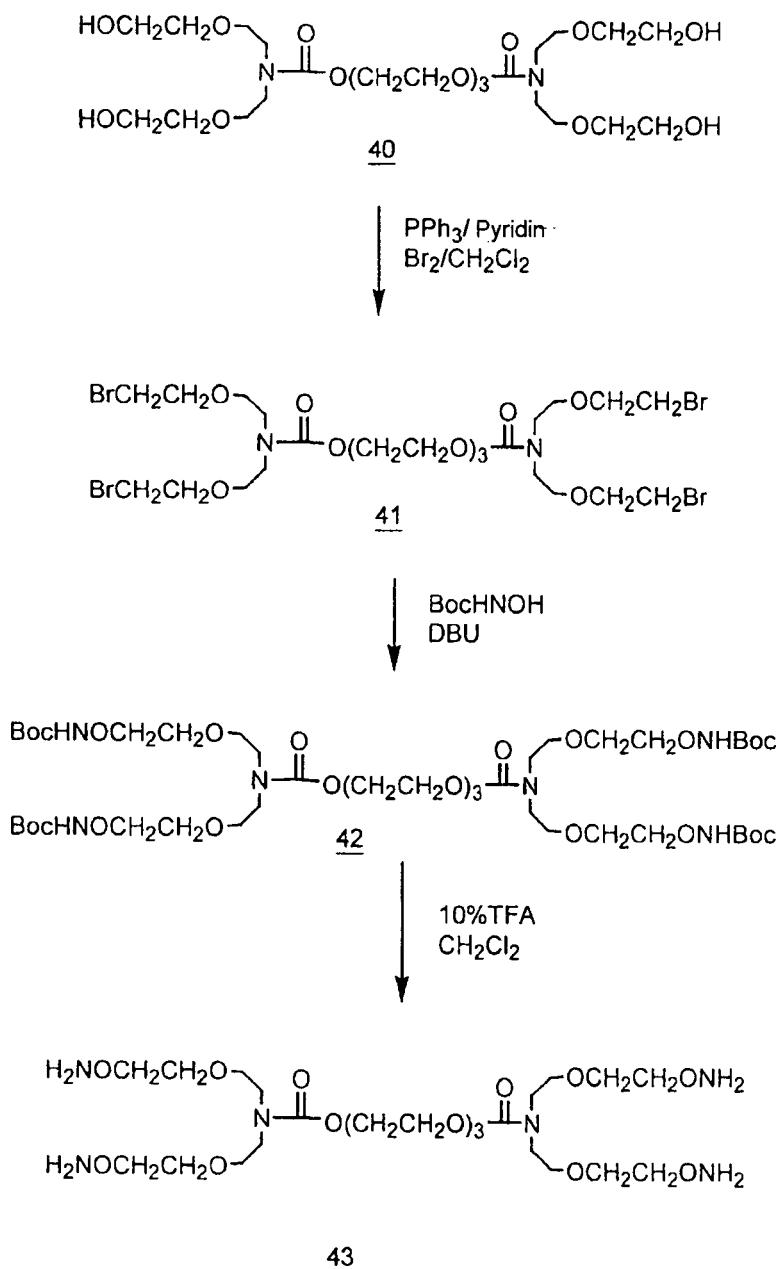
das Gemisch mit Wasser und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt. Die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase wird aufkonzentriert, getrocknet und mit Silikagelchromatographie gereinigt, um Verbindung 39 zu liefern.



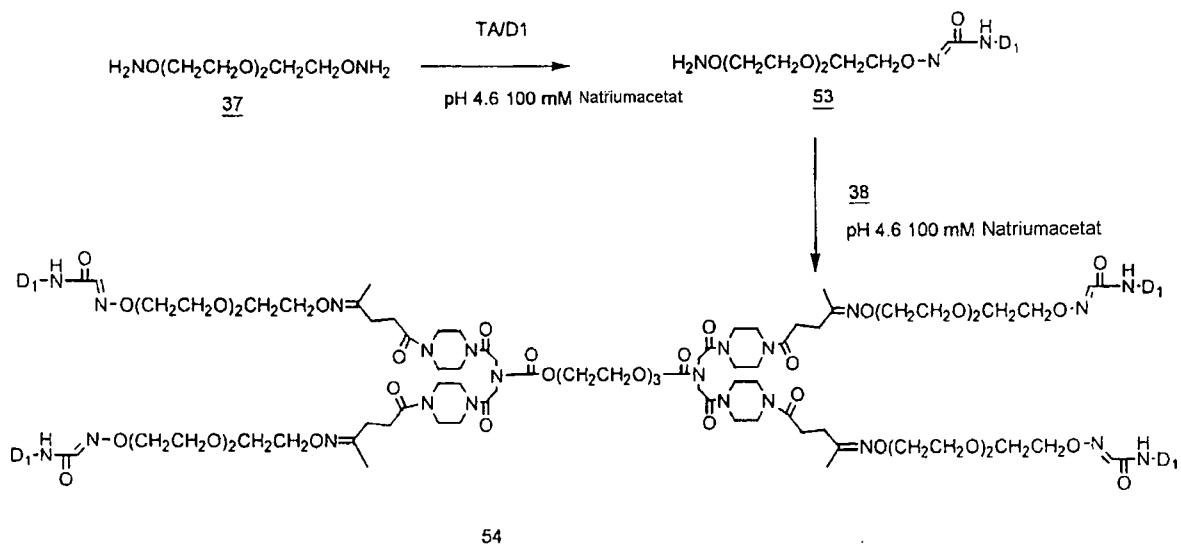
**[0249]** Synthese der AO/DEGA/DEG-Plattform, Verbindung 41: Brom (ungefähr sechs Äquivalente) wird tropfenweise zu einer Lösung von Verbindung 40, sechs Äquivalenten Triphenylphosphin und 8 Äquivalenten Pyridin in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gegeben, bis eine orangefarbene Färbung bestehen bleibt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 0,5 h oder bis zur Vollendung der Reaktion gerührt und eine gesättigte Natriumbisulfit-Lösung wird zugegeben, um überschüssiges Brom zu zerstören. Das Gemisch wird dann mit  $\text{H}_2\text{O}$  und EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Saline gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und aufkonzentriert und mit Silikagelchromatographie gereinigt, um Verbindung 41 zu liefern.

**[0250]** Verbindung 42: Zu Verbindung 41 werden sechs Äquivalente N-(tert-Butyloxycarbonyl)hydroxylamin (Aldrich Chemical Co.) und sechs Äquivalente DBU gegeben. Das Gemisch wird, wie es für eine Vollendung der Reaktion erforderlich ist, für eine hinreichende Zeit erhitzt. Nach Abkühlen wird das Gemisch in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und die resultierende Lösung wird zu EtOAc gegeben, was zur Bildung eines Niederschlags führt, der mittels Filtration entfernt wird und das Filtrat wird aufkonzentriert. Die Reinigung mit Flash-Chromatographie liefert 8.

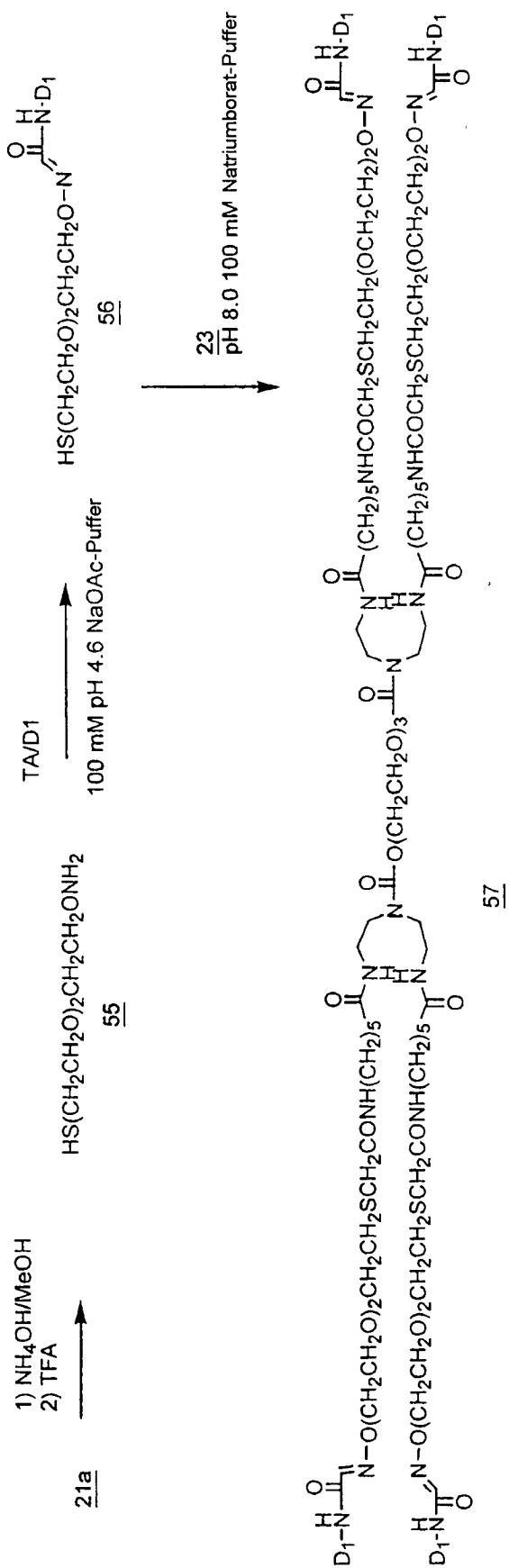
**[0251]** Verbindung 43: Die BOC-Schutzgruppen werden von Verbindung 42 auf eine Weise entfernt, die im Wesentlichen der Beschreibung für die Darstellung von Verbindung 16 ähnelt.



**[0252]** Alternatives Verfahren zur Darstellung eines tetravalenten Konjugats unter Verwendung von Verbindung 37 als einem bifunktionellen Linker: Als eine Alternative zur direkten Umsetzung eines transaminierte Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polyptides mit einer tetravalenten Aminoxy-Plattform kann eine transaminierte Domäne 1 mit einem Überschuss an Verbindung 37 in 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4,6, umgesetzt werden, um Verbindung 53 zu liefern, in der ein Aminoxy-Linker an ein  $\beta_2$ GPI-Polypeptid über eine Oxim-Bindung gebunden ist. Verbindung 53 wird von überschüssigem Linker abgetrennt und vier Äquivalente Verbindung 53 werden mit Plattform 38 in 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4,6, umgesetzt, um weitere zwei Oxim-Bindungen zu bilden und ein tetravalentes Konjugat, Verbindung 54, zu liefern.



**[0253]** Alternatives Verfahren zur Darstellung eines tetravalenten Konjugats unter Verwendung von Verbindung 21a als einer Vorstufe für einen bifunktionellen Linker: Behandlung von Verbindung 21a mit Ammoniumhydroxid, um die Acetylschwefel-Schutzgruppe zu entfernen, dann Behandlung mit Trifluoressigsäure, um die BOC-Schutzgruppen zu entfernen, liefert Linker 55. Ein Glyoxyl-haltiges Polypeptid, in diesem Falle TA/D1, wird mit Verbindung 55 umgesetzt, um Verbindung 56, Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid mit dem über eine Oxim-Bindung gebundenen Sulfhydryl-Linker zu liefern. Vier Äquivalente Verbindung 56 können mit Plattform 23 reagieren, um ein tetravalentes Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid-Konjugat, Verbindung 57, zu liefern.



Beispiel 6: Bindungseigenschaften von tetramerer Domäne 1- $\beta_2$ -GPI-Polypeptid-Konjugatverbindung 44

**[0254]** Das Binden der tetrameren Konjugatverbindung 44 an zwei affinitätsgereinigte humane 1  $\beta_2$ GPI-Antikörper wurde mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz untersucht.

**[0255]** Reagenzien. CM5-Chips, NHS und EDC und HBS-EP-Puffer waren von BIACore. Vereintes normales humanes IgG (Zymed) war in einer separaten Durchflusszelle auf dem Chip immobilisiert und wurde als negative Kontrolle eingesetzt. Affinitätsgereinigte spezifische Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Antikörper von 2 Patienten (6701 und 6626) waren in separaten Durchflusszellen immobilisiert.

**[0256]** Oberflächen-Plasmonresonanz. Sämtliche Experimente wurden mit einem BIACore™ 2000 Instrument bei 25°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/Minute ausgeführt. Die Chip-Äquilibrierung und Bindungsuntersuchungen wurden mit entgastem HBS-EP-Puffer durchgeführt, der aus 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 M ED-TA und 0,005% (v/v) Detergents P20 bestand. Das kovalente Koppeln von Proteinliganden über ihre freien Aminogruppen an den CM5-Chip wurde erreicht, indem 40 µl 0,05 M NHS/ 0,2 M EDC über den Chip geleitet wurden, um den Chip zu aktivieren, und anschließende Exposition des Chips an geeigneten Proteinliganden. Affinitätsgereinigte Antikörper und normales IgG wurden mittels Leiten von 100 µl einer 100 µg/ml Lösung in 10 mM Acetat, pH 4,8, über den NHS-aktivierten CM5-Chip immobilisiert. Die überschüssigen reaktiven Gruppen auf dem Chip werden dann mit 40 µl 1 M Ethanolamin (pH 8,5) deaktiviert.

**[0257]** Titrationen. Baculovirus exprimiertes Domäne 1- $\beta_2$ GPI und die tetramere Verbindung 44 wurden mit HBS-EP verdünnt, über den Chip geleitet und die Antwortwerte wurden 780 Sekunden gesammelt. Die Chips wurden zwischen den Probenexpositionen mit 80 µl 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,1), 0,1 M NaCl regeneriert. Eine Reihe von 5 Titrationen wurde für jede Probe durchgeführt. Da das Bindungsgleichgewicht während des Messzeitraums nur näherungsweise erreicht wurde, wurde der Wert des Bindungsgleichgewichts ( $R_{eq}$ ) durch Anpassung der Assoziationskurven an die folgende Gleichung mit Hilfe der Hersteller-Software (BiaEvaluation, Version 2.2, Uppsala, Schweden):

$$R_1 = R_{eq}(1 - e^{-ks(t-t_0)}) + R_0$$

bestimmt, wo  $R_1$  die gemessene BIACore Antwort zum Zeitpunkt  $t$  ist,  $R_{eq}$  das Gleichgewichtsplateau der Antwort ist,  $t$  die Zeit ist,  $t_0$  die Anfangszeit ist,  $k_s$  eine scheinbare Assoziationskonstante ist ( $k_s = k_a C + k_{dis}$ , wo  $K_a$  die Assoziationskonstante ist,  $C$  die Analyt-Konzentration ist und  $k_{dis}$  die Dissoziationskonstante ist) und  $R_0$  ein Antwortausgleich ist, (Marquart-Levenberg Algorithmus).

**[0258]** Jede Titrationsassoziationskurve hat als die negative Kontrolle (normales IgG) einen Zellhintergrund der von dieser Titration zu subtrahieren ist. Der berechnete  $R_{eq}$  wurde gegen die Konzentration mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 2.01 aufgetragen. Die Daten werden an eine Bindungsstelle angepasst (rechteckige Hyperbel:  $Y = B_{max} * X / [K_d + X]$ ) und Kd-Werte in molaren Einheiten berechnet. Die molaren Konzentrationen von Domäne 1 und Verbindung 44 wurden mit Hilfe der Absorption bei 280 nm und einem Extinktionskoeffizienten von 1,85 ermittelt.

### Ergebnisse und Diskussion

**[0259]** Affinitätsgereingte Antikörper von Patienten 6701 und 6626 wurden in separaten Mikrodurchflusskammern immobilisiert und verschiedenen Konzentrationen an humanem Domäne 1- $\beta_2$ GPI oder Verbindung 44 exponiert. Der Gleichgewichtsbindungswert wurde für jede Konzentration bestimmt und aufgetragen, um die scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu bestimmen. Die Bindungskurven sind in Fig. 10 und 11 gezeigt (Extinktionskoeffizient = 1,85; 100 µg/ml immobilisierter Antikörper) und die Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 8 angegeben.

**[0260]** Diese Experimente zeigen, dass affinitätsgereinigte Antiphospholipid-Antikörper an Domäne 1 von  $\beta_2$ GPI binden. Zusätzlich zeigen sie, dass tetramere Konjugate eines an eine Plattform gebundenen Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptids ebenso fähig sind, diese Antikörper mit Affinitäten zu binden, die der molaren Konzentration von Domäne 1, die im Tetramer vorliegt, entsprechen oder größer sind.

Tabelle 8: Scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante für Domäne 1 und Verbindung 44 für das Binden an affinitätsgereinigten Antiphospholipid-Antikörper

Patient	Domäne 1	Verbindung 44
6626	$333 \pm 18 \text{ nM}$	$66 \pm 23 \text{ nM}$
6701	$417 \pm 36 \text{ nM}$	$24 \pm 9 \text{ nM}$

Beispiel 7: Test der Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid-Konjugate auf ein kompetitives Binden von Antikörpern in vitro

**[0261]** Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten (Nalge Nunc International, Dänemark) wurden mit 2,5  $\mu\text{l}/\text{ml}$   $\beta_2$ GPI in PBS mit 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung beschichtet und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit 250  $\mu\text{l}$ /Vertiefung 2% fettfreier Milch mit 0,4% Tween-80 (Sigma Chemical Co.) 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach fünfmal Waschen mit TBS wurde zu jeder Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  Lösung gegeben, die keine Stunde zuvor angesetzt wurde, um eine 1:200 Endverdünnung Plasma von Patient 6501 und verschiedene Mengen an tetrameren Domäne 1-Konjugaten von Verbindung 44 und Verbindung 45 oder monomeres Domäne 1-Protein als Kontrolle, alle in 2% fettfreier Milch mit 0,4% Tween-80 gelöst, in jede Vertiefung zu geben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten fünfmal mit TBS gewaschen. Zu jeder Vertiefung wurden 100  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase-konjugiertes antihumanes IgG, spezifisch für die gamma-Kette (Zymed) und 1:1000 in 2% fettfreier Milch verdünnt mit 0,4% Tween-80, gegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Platten fünfmal mit TBS gewaschen. Zu jeder Vertiefung wurden 100  $\mu\text{l}$  PPMP chromogenes Substrat für eine Farbentwicklung bei Raumtemperatur gegeben. Die optische Absorption pro Vertiefung wurde bei  $A_{550\text{nm}}$  in einem handelsüblichen Mikroplattenleser (Bio-Tek Instruments EL311) bestimmt. Die in [Fig. 12](#) gezeigten Ergebnisse zeigen, dass sowohl Verbindung 44 als auch Verbindung 45 um den im Plasma (Patient 6501) vorhandenen Antiphospholipid-Antikörper wirksam konkurrieren. Eine reduzierte und alkylierte Domäne 1 zeigt keine derartige Kompetition und stellt eine Negativkontrolle dar. Eine normale monomere Domäne 1 zeigt ebenfalls ein kompetitives Binden und wird als eine Positivkontrolle mit eingeschlossen.

Beispiel 8: Immunisiertes Maus-Modell zum Testen von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid-Konjugaten.

**[0262]** Die Anforderungen an ein immunisiertes Modell zum Testen auf eine Toleranz für Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptide sind: (1) die Immunisierung muss zur Bildung von Antikörpern führen, die Domäne 1 erkennen, und (2) die Immunisierung darf zu keiner Bildung von T-Zellen führen, die Domäne 1 erkennen. Die Immunisierung mit Domäne 1-Polypeptiden-KLH-Konjugat führt zur Bildung von T-Zellen, die KLH erkennen, aber nicht zu einer nachweisbaren Reaktivität gegen Domäne 1. Zu diesem Zweck haben wir mit dem Insektenzellsystem ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid hergestellt, das ein fünftes Cystein am Carboxyl-Terminus (Aminosäure 1 bis Aminosäure 66 von SEQ ID NR. 1) enthält. Dieses Molekül ist an KLH über das fünfte Cystein kovalent gebunden worden. Diese Konjugat ist für eine Immunisierung von Mäusen verwendet worden. Die Immunisierung mit dem Domäne 1-KLH-Konjugat führt zur Bildung von T-Zellen, die KLH erkennen, aber nicht zu einer nachweisbaren Reaktivität gegen Domäne 1. Andererseits führt die Immunisierung mit Domäne 1-KLH-Konjugat zur Bildung von Domäne 1-spezifischen Antikörpern.

#### Material und Methoden

##### ELISA zum Nachweis von anti-Domäne 1-Antikörpern

**[0263]** NUNC-Mikrotiterplatten wurden mit 50  $\mu\text{l}$  mit 5  $\mu\text{g}$   $\beta_2$ GPI/ml in 0,1 M Bicarbonat (pH 9,5) über Nacht beschichtet. Die Vertiefungen wurden mit PBS gewaschen und dann eine Stunde mit 2% fettfreier Trockenmilch (NFDM) blockiert. Die Vertiefungen wurden gewaschen und 50  $\mu\text{l}$  einer Verdünnungsreihe eines individuellen Mausserums in 2% NFDM wurden zugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und 50  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase konjugiertes anti-Maus IgG wurden zugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und 50  $\mu\text{l}$  Substrat zugegeben. Die OD bei 550 nm wurde nach 30 Minuten abgelesen. Ein Pool des Serums von Mäusen wurde hergestellt, die mit 50  $\mu\text{g}$  Konjugat immunstimuliert worden waren. Dieser Pool wurde in allen Assays getestet und die Ergebnisse sind als Prozentsatz dieses Standardpools ausgedrückt.

## Kompetitiver Inhibitions-ELISA

**[0264]** NUNC-Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl mit 5 µg rekombinantern  $\beta_2$ GPI/ml in 0,1 M Bicarbonat (pH 9,5) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal mit PBS (pH 7,2) gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur mit 75 µl 2% fettfreier Trockenmilch (NFDM) in PBS blockiert. Testinhibitoren wurden in 2% NFDM verdünnt und 25 µl von jeder Verdünnung oder nur NFDM wurden zu den beschichteten Vertiefungen gegeben. Monoklonaler Antikörper wurde in 2% NFDM verdünnt und 25 µl mit einer konstanten Konzentration wurden zu den Vertiefungen gegeben. Die Inhalte der Vertiefungen wurden gemischt und die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Platten dreimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden 50 µl alkalische Phosphatase konjugiertes anti-Maus IgG, das spezifisch für die gamma-Kette war und in ungefähr 2% NFDM verdünnt war, zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platten dreimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden 50 µl chromogenes Substrat zugegeben und die Platten 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Die  $A_{550}$  wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die prozentuale an Inhibition wurde folgendermaßen bestimmt: [(durchschnittliche  $A_{550}$ , die von den Kontrollvertiefungen ohne Inhibitor erhalten wurde, minus  $A_{550}$  des Hintergrunds) – (durchschnittliche  $A_{550}$ , die mit Inhibitor erhalten wurde, minus  $A_{550}$  des Hintergrunds)]/(durchschnittliche  $A_{550}$ , die von den Kontrollvertiefungen ohne Inhibitor erhalten wurde, minus  $A_{550}$  des Hintergrunds)] mal 100.

## Immunisiertes Maus-Modell für anti-Domäne 1-Antikörper

**[0265]** Gruppen von 5 C57B1/6-Mäusen wurden entweder mit 10, 50 oder 100 µg KLH-Domäne 1-Konjugat, das an Alaun adsorbiert war, plus  $2 \times 10^9$  Pertussis Organismen als Adjuvans immunstimuliert. Drei Wochen später erhielten alle Mäuse eine Booster-Injektion von 10 µg Konjugat in Saline. Sieben Tage nach der Booster-Injektion wurde den Tieren Blut entnommen, Serum geerntet und auf anti-Domäne 1-Aktivität getestet. Die Ergebnisse sind in [Fig. 14](#) gezeigt. Die Immunisierung mit Domäne 1-KLH erzeugte keine Domäne 1-spezifische Antikörperantwort.

## Maus-Immunisierung und T-Zellproliferationsassay

**[0266]** C57B1/6-Mäusen wurde in den Fußballen des Hinterlaufs 25 µg Domäne 1-(D1)-Konjugat, das in komplettem Freunds Adjuvans (CFA) emulgiert war, injiziert. Eine andere Gruppe von Mäusen wurde emulgiertes CFA (ohne Antigen) in den Fußballen des Hinterlaufs injiziert. Sieben Tage später wurden die poplitealen Lymphknoten von 5 Mäusen von jeder Gruppe entnommen. Knoten von gleichen Immunisierungen wurden vereint und davon Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden, wie oben für die humanen Zellen beschrieben, kultiviert, außer dass die Testantigene D1-KLH, KLH und Domäne 1 (nicht konjugiert) waren. PPD wurde als Positivkontrolle verwendet. An Tag 4 wurden 25 µl  $^3$ H-Thymidin, das 1 µCi enthielt, zu jeder Vertiefung gegeben. An Tag 5 wurden die Inhalte der Vertiefungen geerntet und die Menge an Radioaktivität in jeder Vertiefung bestimmt. Ein Stimulationsindex (SI) wurde für jede Vertiefung berechnet, indem die CPM der Vertiefung durch die durchschnittliche CPM der Negativkontrolle dividiert wurde. Der durchschnittliche (und Standardabweichung) SI für jeden der doppelten Ansätze wurde bestimmt.

## Ergebnisse und Diskussion

**[0267]** Die Spezifität des polyklonalen Maus-anti-KLH-Domäne 1-Konjugats wurde durch einen kompetitiven Inhibitions-ELISA bestimmt. Verschiedene rekombinante Formen von  $\beta_2$ GPI wurden mit limitierenden Mengen an Antikörper in den Vertiefungen gemischt, die mit  $\beta_2$ GPI beschichtet worden waren. Die Menge an Antikörper, die an den Vertiefungen gebunden verblieb, wurde dann mit alkalische Phosphatasekonjugiertem zweiten Antikörper bestimmt. Die prozentuale Inhibition wurde bestimmt, wie es im Abschnitt „Methoden“ beschrieben ist, und gegen die mikromolare Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 15](#) gezeigt. Eine Immunisierung mit der gleichen Konjugat-Dosis erzeugt eine Antikörperantwort, die für die Domäne 1 spezifisch ist ([Fig. 15](#)).

**[0268]** Bezuglich der T-Zellproliferation zeigen die in [Fig. 13](#) gezeigten Ergebnisse, dass die Zellen von Domäne 1-KLH-immunstimulierten Mäuse als Reaktion sowohl auf Domäne 1-KLH als auch auf KLH wie auch auf die Positivkontrolle PPD proliferierten. Sie reagierten nicht auf Domäne 1 (nicht konjugiert). Andererseits reagierten die Zellen von Mäusen, die nur mit CFA immunstimuliert wurden, nicht auf die Testantigene, reagierten aber auf die Positivkontrolle PPD.

**[0269]** Für ein immunisiertes Maus-Modell, nämlich dass die Immunstimulierung keine T-Zellen immunstimulieren darf, die ein gegebenes Toleragen erkennen, aber Gedächtnis-B-Zellen erzeugen muss, die das Tolera-

gen erkennen, sind beide dieser beiden Grundanforderungen an ein immunisiertes Maus-Modell mit dem hier dargestellten immunisierten Maus-Modell erfüllt worden.

Beispiel 9: In vivo Test von Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid als ein Toleragen

**[0270]** Mäuse sind mit einem an Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) konjugiertem Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid, das an Alaun adsorbiert war, plus Pertussis als ein Adjuvans immunstimuliert worden, wie es oben beschrieben ist. Drei Wochen später sind die Mäuse mit verschiedenen Dosen an Toleragen behandelt worden, das an eine Plattform konjugiert sein kann oder nicht. Eine Gruppe wird nicht behandelt und dient als Kontrollgruppe. Fünf Tage später erhalten alle Mäuse, einschließlich der Kontrollgruppe, eine Booster-Injektion von 10 µg Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid, an KLH konjugiert, und sieben Tage später wird ihnen Blut entnommen. Ihre Seren werden auf anti- $\beta_2$ GPI-Domäne 1-Antikörper mit einem beliebigen bekannten Verfahren, einschließlich beispielsweise ELISA, untersucht, wie es in den vorhergehenden Beispielen beschrieben ist. Diese Werte werden dann verwendet, um einen Durchschnitt und die Standardabweichung für alle Individuen einer Gruppe zu bestimmen.

Beispiel 10: Testen der T-Zellreakтивität

**[0271]** Der Nachweis einer fehlenden T-Zellreaktivität auf ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid würde anzeigen, dass dieses als ein Toleragen keine Epitope für ein zweites Signal an B-Zellen von T-Zellen bereitstellt. Im Gegenteil, wenn das Toleragen ein Proliferationssignal (Aktivierungssignal) für T-Zellen bereitstellen würde, wäre es möglich, dass das Toleragen eine B-Zellantwort verstärken würde.

**[0272]** Um die T-Zellaktivierung zu bestimmen, werden zirkulierende Lymphozyten gesammelt und in Gewebekultur gehalten. Zu testende(s) Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid(e) wird zu der Kultur ungefähr eine Woche gegeben. Am Ende der Woche werden die T-Zellen mit  $^3$ H-Thymidin gepulst, um zu bestimmen, ob eine Zellproliferation stattgefunden hat. Gegebenenfalls werden auch im Zellüberstand vorhandene Zytokine bestimmt.

Beispiel 11: Anti- $\beta_2$ GPI-Antikörper tragen zur Hyperkoagulation durch Verzögerung der Inaktivierung von Faktor Va bei

Methoden

**[0273]** Levels des aktivierte Faktors V (Faktor Va) wurden in normalem humanen Plasma nach Beginn der Blutgerinnung in Anwesenheit oder Abwesenheit von affinitätsgereinigten Antikörpern oder Gesamt-IgG-Präparaten von Patienten bestimmt, bei denen ein Antiphospholipid-Syndrom (APS) diagnostiziert worden war. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden als anti- $\beta_2$ GPI Domäne 1 charakterisiert. Das Gesamt-IgG wurde, wie oben beschrieben, aus Patientenserum präpariert.

**[0274]** Messungen von Levels von Faktor Va wurden in einem modifizierten zweistufigen Gerinnungsassay mit Hilfe eines Amelung KC4-Microcoagulometers folgendermaßen durchgeführt. 50 µl Faktor V defizientes humanes Plasma (Chromogenix) wurden eine Minute bei 37°C in einer Zentrifugationsmikroküvette vorinkubiert. Die Proben wurden 1:10 mit vorgewärmten (37°C) Owrens Puffer (Sigma) verdünnt. 50 µl der verdünnten Probe wurden zu 50 µl V-defizientem Plasma gegeben. 100 µl 37°C ThromboMAX plus Calcium (Sigma) wurden zwecks Auslösung der Gerinnung zugegeben. Die Gerinnungszeit wurde aufgezeichnet. Eine Einheit der Va-Aktivität ist als die Zeit definiert, die das V-defiziente Plasma mit einer 1:10 Verdünnung von normalem humanen Referenzplasma für die Gerinnung benötigt. Eine Einheit der Aktivität von Faktor V entspricht in diesem Versuchssystem einer Gerinnungszeit von 30 Sekunden.

**[0275]** Um die Menge an Faktor Va zu bestimmen, die über die Zeit bei Anwesenheit oder Abwesenheit von Antiphospholipid-Antikörper oder IgG gebildet werden, wurde das folgende System zur Bildung von Proben eingesetzt, die mit dem obigen Standardassay getestet werden sollen. Die folgenden Reagenzien wurden gemischt und bei 37°C inkubiert: ein Teil normales humanes Referenzplasma (Accuclot, Sigma), ein Teil 25 mM CaCl<sub>2</sub> und ein Teil, bestehend aus Phosphatidyl-Serin-Reagenz (125 µl/ml), und Tris-gepufferte Saline (TBS) und Antikörper oder IgG (falls bei der erwünschten Konzentration anwendbar). TBS wurde zur Korrektur der variierenden Volumina von Antikörper oder IgG verwendet. Das normale Plasma, Phosphatidyl-Serin, Antikörper oder IgG (falls vorhanden) und TBS wurden gemischt und 2 Minuten bei 37°C vor Zugabe von 37°C CaCl<sub>2</sub> inkubiert, um die Gerinnung auszulösen und das Gerinnsel wurde per Hand bei der Entstehung entfernt. Das Gesamtvolumen der Probenmischung war von der Anzahl der getesteten Zeitpunkte abhängig. Zu jedem Zeitpunkt wurden 12,5 µl der inkubierten Probe entnommen, 1:10 in Owrens Puffer verdünnt und in dem obigen

Faktor Va Standardassay getestet. Die über die Zeit in der Probe gebildeten Va-Levels spiegeln sich in einer Korrektur der Gerinnungszeit des Faktor Va-defizienten Plasmas wider. Die Va-Peaklevel treten 4–5 Minuten nach Beginn der Gerinnung auf und die Level liegen in einem Bereich von 4–7 Einheiten der Aktivität von Faktor Va. Dies entspricht einer Gerinnungszeit von ungefähr 5–6 Sekunden in dem Standardassay für dieses Versuchssystem.

**[0276]** In Fällen, wo IgG vom APS-Patienten zu dem Assay gegeben wurde, wurde IgG aus humanen Serumproben durch Vereinigung von 100 µl Serum (mit Pierce Immunopure IgG Bindungspuffer 1:1 verdünnt) mit 100 µl Agarose-immobilisierten Protein G-Kügelchen (Pierce Immunopure Plus) hergestellt.

**[0277]** Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten langsam geschüttelt. Protein G bindet die F<sub>c</sub>-Region aller Unterklassen von humanem Immunglobulin G. Nach 10 Minuten wurde das Gemisch kurz zentrifugiert, um die Kügelchen zu pelletieren. Der Überstand des Serumgemisches wurde verworfen.

**[0278]** Die Kügelchen mit gebundenem IgG wurden dann dreimal mit 200 µl IgG-Bindungspuffer gewaschen, um die adsorbierten Proteine zu entfernen. Das gebundene IgG wurde dann von den Protein G-Kügelchen mit dreimal 100 µl IgG-Elutionspuffer eluiert (Pierce, Immunopure IgG-Elutionspuffer). Das eluierte IgG wurde sofort mit 100 µl 1 M NaPO<sub>4</sub>, pH 7,5, auf ein Gesamtendvolumen von 400 µl IgG-Präparat von der 100 µl Plasmaprobe neutralisiert. Neutralisierte IgG-Präparate wurden bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt.

**[0279]** Die Proteinkonzentration der IgG-Präparate wurden mit dem Bradford Mikroplatten-Standardverfahren (Bio-Rad Reagent) bestimmt. 5 µl jeder Probe wurden dreifach mit einer Eichkurve von bovinem Serumalbumin auf jeder Platte getestet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittel KC4 Software berechnet.

**[0280]** Für eine Analyse in dem Faktor Va Gerinnungsassay wurden 100 µl des IgG-Präparats auf 25 µl mit einer Microcon-Zentrifugenfiltervorrichtung (Amicon, Molekulargewichtsgrenze 30.000) aufkonzentriert. Die gesamten 25 µl werden für einen einzigen Zeitpunkt des Faktor Va-Assays verwendet.

### Ergebnisse

**[0281]** Die Wirkung von Gesamt-IgG von Antiphospholipid-Patienten und von affinitätsgereinigten Antikörpern von normalen Kontrollen wurde auf ihre Fähigkeit verglichen, die Inaktivierung des Faktors Va in einem *in vitro* Koagulations-Assay zu verzögern. Die Ergebnisse für Gesamt-IgG und affinitätsgereinigte Antikörpern sind in Tabelle 9 beziehungsweise [Fig. 16](#) gezeigt. IgG und affinitätsgereinigte Antikörper von normalen Kontrollpersonen hatten keinen Einfluss auf die Inaktivierung des Faktors Va, die 20 Minuten nach Beginn der Koagulation beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu verzögerte die IgG-Fraktion von Antiphospholipid-Patienten die Inaktivierung des Faktors Va ( $p < 0,05$  mit t-Test nach Student). Ähnliche Wirkungen auf die Inaktivierung des Faktors Va wurden für die affinitätsgereingten Antikörper beobachtet. Diese Daten lassen vermuten, dass humane anti-β<sub>2</sub>GPI-Antikörper einen hyperkoagulativen Zustand durch Verzögerung der Inaktivierung des Faktors Va schaffen können.

Tabelle 9

## APS-Patienten IgG

I.D.	20 <sup>th</sup> Va (Einheiten)	IgG (mg)	Aktivität (Einheiten/mg)
7308	0,98	0,08	12,25
7309	0,85	0,06	14,17
7310	0,85	0,06	14,17
7311	0,84	0,07	12,00
7312	0,92	0,06	15,33
7313	0,82	0,06	13,67
7314	1,13	0,06	18,83
7315	0,99	0,07	14,14
7316	0,87	0,06	14,50
7317	0,92	0,08	11,50
7318	0,081	0,08	10,13
7319	0,95	0,10	9,50
7320	0,83	0,05	16,60
7321	0,84	0,07	12,00
7322	0,81	0,06	13,50
7323	0,83	0,09	9,76
7301	0,83	0,05	16,60
7302	0,87	0,05	17,40
7303	1,05	0,08	13,13
7304	1,44	0,07	20,57
7305	0,79	0,08	9,88
7306	0,90	0,07	12,86
7307	1,10	0,07	15,71
6501	1,16	0,06	19,33
6636	1,21	0,05	24,20
6625	0,86	0,10	8,60
6646	0,72	0,05	14,40
6623	1,17	0,07	16,71
6510	0,70	0,05	14,00

Mittelwert	0,93	0,07	14,33
STD	0,17	0,01	3,55

## Normal IgG

I.D.	20" Va (Einheiten)	IgG (mg)	Aktivität (Einheiten/mg)
N260F	0,77	0,06	12,83
N712M	0,69	0,07	9,86
N266F	0,78	0,09	8,67
N199F	0,79	0,08	9,88
N280M	0,76	0,07	10,86

---

Mittelwert	0,76	0,07	10,42
STD	0,039623	0,011402	3,55

**[0282]** Obwohl die voranstehende Erfindung mit Hilfe von Erläuterungen und Beispielen zum Zwecke des eindeutigen Verstehens ziemlich detailliert beschrieben worden ist, ist es für den Fachmann offensichtlich, dass bestimmte Änderungen und Modifikationen vorgenommen werden können. Deshalb sollten die Beschreibung und die Beispiele nicht als eine Begrenzung des Rahmens der Erfindung, die durch die anhängigen Ansprüche definiert ist, betrachtet werden.

## SEQUENZLISTE

<110> Marquis, M. David  
 Iverson, M. Gilbert  
 Victoria, J. Edward  
 Jones, S. David  
 Linnik, Matthew

<120> DOMÄNE 1 BETA2-GPI POLYPEPTIDE UND DEREN  
 DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE VERWENDUNG

<130> 252312006900

<140> Nicht zugeordnet  
 <141> 1999-06-08

<150> 60/088, 656  
 <151> 1998-06-09

<150> 60/103, 088  
 <151> 1998-10-05

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1  
 <211> 978  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(978)

<400> ]

gga	cgg	acc	tgt	ccc	aag	cce	gat	gat	tta	cca	ttt	tcc	aca	gtg	gtc		48
Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val		
1																15	

ccg	tta	aaa	aca	tcc	tat	gag	ccg	gaa	qag	att	acg	tat	tcc	tgc		96
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys		
20															30	

aag	ccg	ggc	tat	gtg	tcc	cga	gga	ggg	atg	aga	aag	ttt	atc	tgc	cct		144
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro		
35															45		

ctc	aca	gga	ctg	tgg	ccc	atc	aac	act	ctg	aaa	tgt	aca	ccc	aga	gta		192
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val		
50															60		

tgt	cct	ttt	gct	gga	atc	tta	gaa	aat	gga	gcc	gta	cgc	tat	acg	act		240
Cys	Pro	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Val	Arg	Tyr	Thr	Thr		
65															80		

ttt	gaa	tat	ccc	aac	acg	atc	agt	ttt	tct	tgt	aac	act	ggg	ttt	tat		284

## DE 699 34 228 T2 2007.10.04

Phe Glu Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr Gly Phe Tyr		
85	90	95
ctg aat ggc gct gat tct gcc aag tgc act gag gaa gga aaa tgg agc		336
Leu Asn Gly Ala Asp Ser Ala Lys Cys Thr Glu Glu Gly Lys Trp Ser		
100	105	110
ccg gag ctt cct gtc tgt gct ccc atc atc tgc cct cca cca tcc ata		384
Pro Glu Leu Pro Val Cys Ala Pro Ile Ile Cys Pro Pro Pro Ser Ile		
115	120	125
cct acg ttt gca aca ctt cgt gtt tat aag cca tca gct gga aac aat		432
Pro Thr Phe Ala Thr Leu Arg Val Tyr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Asn		
130	135	140
tcc ctc tat cgg gac aca gca gtt ttt gaa tgt ttg cca caa cat gcg		480
Ser Leu Tyr Arg Asp Thr Ala Val Phe Glu Cys Leu Pro Gln His Ala		
145	150	155
atg ttt gga aat gat aca att acc tgc acg aca cat gga aat tgg act		526
Met Phe Gly Asn Asp Thr Ile Thr Cys Thr Thr His Gly Asn Trp Thr		
165	170	175
aaa tta cca gaa tgc agg gaa gta aaa tgc cca ttc cca tca aga cca		576
Lys Leu Pro Glu Cys Arg Glu Val Lys Cys Pro Phe Pro Ser Arg Pro		
180	185	190
gac aat gga ttt gtg aac tat cct gca aaa cca aca ctt tat tac aag		624
Asp Asn Gly Phe Val Asn Tyr Pro Ala Lys Pro Thr Leu Tyr Tyr Lys		
195	200	205
gat aaa gcc aca ttt ggc tgc cat gat gga tat tct ctg gat ggc ccg		672
Asp Lys Ala Thr Phe Gly Cys His Asp Gly Tyr Ser Leu Asp Gly Pro		
210	215	220
gaa gaa aata gaa tgt acc aaa ctg gga aac tgg tct gcc atg ~ca agt		720
Glu Glu Ile Glu Cys Thr Lys Leu Gly Asn Trp Ser Ala Met Pro Ser		
225	230	235
240		
tgt aaa gca tct tgt aaa tta cct gtg aaa aaa gcc act gtg gtg tac		768
Cys Lys Ala Ser Cys Lys Leu Pro Val Lys Lys Ala Thr Val Val Tyr		
245	250	255
caa gga gag aga gta aag att cag gaa aaa ttt aag aat gga atg cta		816
Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu		
260	265	270
cat ggt gat aac gtt tct ttc ttc tgc aaa aat aag gaa aag aag aag tgt		864
His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys		
275	280	285
agc tat aca gag gat gct cag tgt ata gat ggc act atc gaa gtc ccc		912
Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro		
290	295	300
aaa tgc ttc aag gaa cac agt tct ctg gct ttt tgg aaa act gat gca		960
Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala		
305	310	315
		320

tcc gat gta aag cca tgc  
 Ser Asp Val Lys Pro Cys  
 325

<210> 2  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys  
 20 25 30  
 Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro  
 35 40 45  
 Leu Thr Ser Leu Asp Ala Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Ile Arg Val  
 50 55 60  
 Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg Tyr Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Phe Glu Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr Gly Phe Tyr  
 85 90 95  
 Leu Asn Gly Ala Asp Ser Ala Lys Cys Thr Glu Glu Gly Lys Trp Ser  
 100 105 110  
 Pro Glu Leu Pro Val Cys Ala Pro Ile Ile Cys Pro Pro Pro Ser Ile  
 115 120 125  
 Pro Thr Phe Ala Thr Leu Arg Val Tyr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Asn  
 130 135 140  
 Ser Leu Tyr Arg Asp Thr Ala Val Phe Glu Cys Leu Pro Gln His Ala  
 145 150 155 160  
 Met Phe Gly Asn Asp Thr Ile Thr Cys Thr Thr His Gly Asn Trp Thr  
 165 170 175  
 Lys Leu Pro Glu Cys Arg Glu Val Lys Cys Pro Phe Pro Ser Arg Pro  
 180 185 190  
 Asp Asn Gly Phe Val Asn Tyr Pro Ala Lys Pro Thr Leu Tyr Tyr Lys  
 195 200 205  
 Asp Lys Ala Thr Phe Gly Cys His Asp Gly Tyr Ser Leu Asp Gly Pro  
 210 215 220  
 Glu Glu Ile Glu Cys Thr Lys Leu Gly Asn Trp Ser Ala Met Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Ala Ser Cys Lys Leu Pro Val Lys Lys Ala Thr Val Val Tyr  
 245 250 255  
 Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu  
 260 265 270  
 His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys  
 275 280 285  
 Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
 290 295 300  
 Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Val Lys Pro Cys  
 325

.

<210> 3  
 <211> 192  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(192)

&lt;400&gt; 3

gga	cgg	acc	tgt	ccc	aag	cca	gat	gat	tta	cca	ttt	tcc	aca	gtg	gtc		48
Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val		
1				5					10						15		

ccg	tta	aaa	aca	ttc	tat	gag	cca	gga	gaa	gag	att	acg	tat	tcc	tgc		96
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys		
				20				25						30			

aag	ccg	ggc	tat	gtg	tcc	cga	gga	ggg	atg	aga	aag	ttt	atc	tgc	cct		144
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro		
				35			40				45						

ccg	aca	gga	cty	tcg	ccg	ata	ttt	ttg	aaa	tgt	ata	tcc	ttt	gtt	gtt		188
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val		
				50			55				60						

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val	
1					5				10				15			
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys	
				20			25				30					
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro	
				35			40				45					
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val	
				50			55				60					

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Cys	Thr	Pro	Arg	Val	Cys										
1				5											

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Phe	Ser	Thr	Val	Val	Pro										
1				5											

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 7  
 Lys Pro ~~Asp~~ Asp Asp Leu Pro  
 1 ~~A~~ 5

<210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Gly Arg Thr Cys Pro Lys  
 1 5

<210> 9  
 <211> 0  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Thr Leu Lys Cys Thr Pro  
 1 5

<210> 10  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 Ile Cys Pro Leu Thr Gly  
 1 5

<210> 11  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 Phe Ile Cys Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 12  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Ile Thr Tyr Ser Cys Lys  
 1 5

<210> 13  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Synthetisches Konstrukt

<400> 13

aaaccacacctt aatgggtgatg gtgatggtgg ccacatggct ttaca  
45

<210> 14  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 14  
gacataactct ggggtgtccgt cctgcaatag c  
31

<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 15  
tggaggcgcag atgatccgtc ctgcaatagc  
30

<210> 16  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 16  
gaatggcat ttacttccc gtcctgcaat agc  
33

<210> 17  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 17  
aggtaattta caagatgcc gtcctgcaat agc  
33

<210> 18  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 18  
 atggtgatgg tggccacaac ttggcatggc  
 30

<210> 19  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Synthetisches Konstrukt

<400> 19  
 atggtgatgg tggccgcatt ctggtaattt ag  
 20

<210> 20  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Aminosäuren 3-60 waren von  $\beta_2$ GPI (SEQ ID NR. 2) deletiert

<400> 20  
 Gly Arg Thr Pro Arg  
 1 5

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Aminosäuren 3-120 waren von  $\beta_2$ GPI (SEQ ID NR. 2) deletiert

<400> 21  
 Gly Arg Ile Ile Cys  
 1 5

<210> 22  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Aminosäuren 3-182 waren von  $\beta_2$ GPI (SEQ ID NR. 2) deletiert

<400> 22  
 Gly Arg Glu Val Lys  
 1 5

<210> 23  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Aminosäuren 3-242 waren von  $\beta_2$ GPI (SEQ ID NR. 2) deletiert

<400> 23  
Gly Arg Ala Ser Cys  
1 5

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Aminosäuren 242-326 waren deletiert oder  
Aminosäuren 182-326 waren deletiert oder  
Aminosäuren 165-326 waren deletiert oder  
Aminosäuren 123-326 waren von  $\beta_2$ GPI (SEQ ID NR. 2) deletiert

<400> 24  
Gly Arg Thr Cys Pro  
1 5

<210> 25  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 25  
ctataaatac ggatccggg aattcg  
26

<210> 26  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Synthetisches Konstrukt

<400> 26  
gcagctggcc aactctgggt gtacatttca gagtg  
35

<210> 27  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

&lt;223&gt; Synthetisches Konstrukt

&lt;400&gt; 27

gcagctggcc aatgatggga gcacagagag gaag  
34

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val
1				5					10				15		
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys
				20				25				30			
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro
				35			40				45				
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	
				50			55				60				

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val	Pro
1					5				10				15		
Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys	Lys
				20				25			30				
Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro	Leu
				35			40			45					
Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg		
				50			55			60					

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 65

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetisches Konstrukt

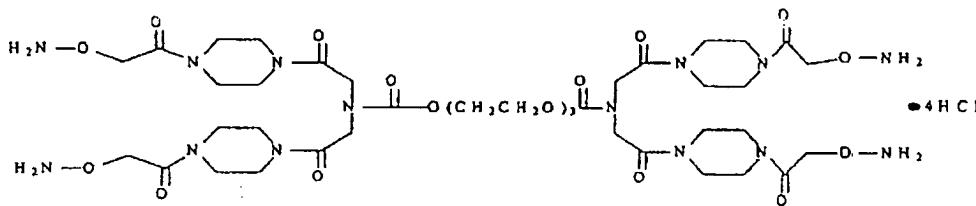
&lt;400&gt; 30

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val
1					5				10				15		
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys
				20				25			30				
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro
				35			40			45					
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val
				50			55			60					

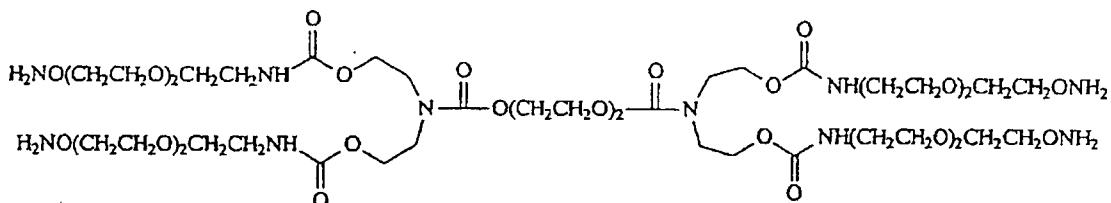
Cys  
65**Patentansprüche**

- Konjugat, welches ein Valenzplattformmolekül (valency platform molecule) und ein Polypeptid umfasst, das wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NR. 4 umfasst, das weniger als 100 Aminosäuren lang ist und das spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörper bindet.

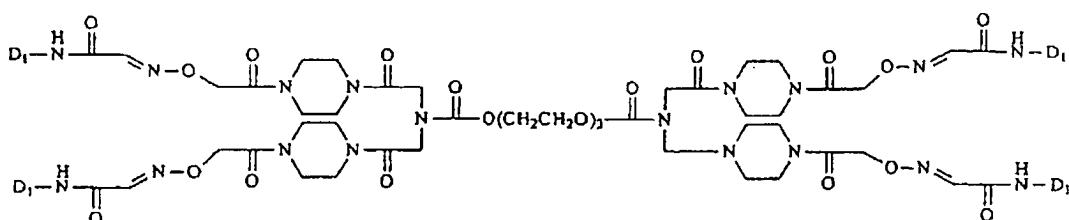
2. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Polypeptid das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid der SEQ ID NR. 4 umfasst.
3. Konjugat nach Anspruch 1, worin die sechs aufeinander folgenden Aminosäuren ausgewählt sind aus SEQ ID NRN. 5 bis 12.
4. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Polypeptid Aminosäure 4 bis Aminosäure 60 der SEQ ID NR. 4 umfasst.
5. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Polypeptid wenigstens fünfzehn aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NR. 4 umfasst.
6. Konjugat nach Anspruch 5, worin das Polypeptid wenigstens dreißig aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NR. 4 umfasst.
7. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Polypeptid weniger als 75 Aminosäuren lang ist.
8. Konjugat nach Anspruch 7, worin das Polypeptid weniger als 50 Aminosäuren lang ist.
9. Konjugat nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Polypeptid Teil eines Fusionsprotein ist, das ein oder mehrere dieser Polypeptide und eine andere Aminosäuresequenz umfasst, die nicht an das/die Polypeptid(e) im nativen Molekül gebunden ist.
10. Konjugat nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin dem Polypeptid ein T-Zellepitop fehlt, welches T-Zellepitop zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörpern fähig ist.
11. Konjugat nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Plattformmolekül proteinartig ist.
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Plattformmolekül nicht-proteinartig ist.
13. Konjugat nach Anspruch 12, worin das Plattformmolekül Polyethylenglycol ist.
14. Konjugat nach Anspruch 13, worin das Polyethylenglycol ein Molekulargewicht von 200 bis 8.000 aufweist.
15. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Molekulargewicht einer Population von Valenzplattformmolekülen homogen ist.
16. Konjugat nach Anspruch 15, worin das Plattformmolekül derivatisiertes 2,2'-Ethylendioxydiethylamin oder Triethylenglycol ist.
17. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Plattformmolekül an das Polypeptid durch eine Thioetherbindung gebunden ist.
18. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Plattformmolekül an das Polypeptid durch eine Oximbindung gebunden ist.
19. Konjugat nach Anspruch 18, welches durch Umsetzen eines besagten Polypeptids, das eine Carbonylgruppe aufweist, mit einem besagten Plattformmolekül, das eine Aminooxy-reaktive Gruppe aufweist, gebildet worden ist.
20. Konjugat nach Anspruch 19, worin die Aminooxy-reaktive Gruppe eine Aminooxy-, Aminooxyacetyl- oder Aminooxyalkylgruppe ist.
21. Konjugat nach Anspruch 20, worin das Plattformmolekül ist:



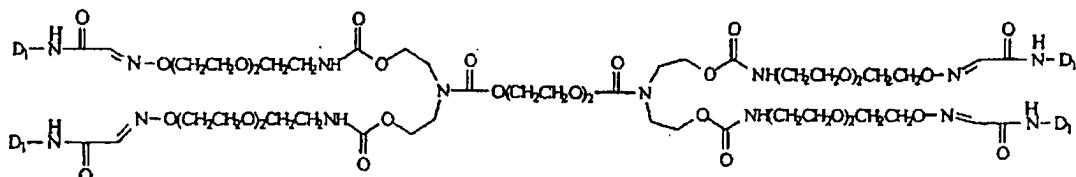
oder



22. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Konjugat ist:



worin D1 das besagte Polypeptid ist; oder



worin D1 das besagte Polypeptid ist.

23. Polypeptid, das spezifisch an einen  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörper bindet, welches weniger als 75 Aminosäuren lang ist und welches wenigstens 30 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NR. 4 umfasst, oder welches, wenn es weniger als 30 Aminosäuren lang ist, wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren, ausgewählt aus SEQ ID NRN. 5, 9, 10, 11 und 12, umfasst.

24. Polypeptid nach Anspruch 23, welches das Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid der SEQ ID NR. 4 umfasst.

25. Polypeptid nach Anspruch 23, welches wenigstens sechs aufeinander folgende Aminosäuren, ausgewählt aus SEQ ID NRN. 5 bis 12, umfasst.

26. Polypeptid nach Anspruch 23, welches Aminosäure 4 bis Aminosäure 60 der SEQ ID NR. 4 umfasst.

27. Polypeptid nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dem ein T-Zellepitop fehlt, welches T-Zellepitop zur Aktivierung von T-Zellen in einem Individuum mit  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörpern fähig ist.

28. Fusionspolypeptid, umfassend ein Polypeptid, wie in einem der Ansprüche 23 bis 27 definiert.

29. Isoliertes natürlich vorkommendes Polynukleotid oder nicht-natürlich vorkommendes Polynukleotid, das ein Polypeptid codiert, wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 oder 23 bis 28 definiert.

30. Expressions- oder Klonierungsvektor, umfassend ein Polynukleotid, wie in Anspruch 29 definiert.

31. Wirtszelle, transformiert mit einem Polynukleotid, wie in Anspruch 29 definiert.

32. Kit zum Nachweisen

(a) eines Antikörpers, der spezifisch an ein Domäne 1- $\beta_2$ GPI-Polypeptid bindet, oder

(b) von Koagulation,

welcher Kit ein Konjugat umfasst, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, oder ein Polypeptid, wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 und 23 bis 28 definiert, in geeigneter Verpackung.

33. Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge eines Konjugats, wie in Anspruch 10 definiert, oder eine Polypeptids, wie in Anspruch 10 oder 27 definiert, wobei eine wirksame Menge eine Menge ist, die zum Induzieren von Toleranz ausreichend ist.

34. Zusammensetzung nach Anspruch 33, wobei Toleranz durch eine Stabilisierung oder Reduktion der  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipantikörper-Produktion angezeigt ist.

35. Zusammensetzung nach Anspruch 33 oder 34, außerdem umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten.

36. Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge eines Konjugats, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, oder eine Polypeptids, wie in einem der Ansprüche 1 oder 10 oder 23 bis 28 definiert, wobei eine wirksame Menge eine Menge ist, die zum Nachweisen eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipantikörpers ausreichend ist.

37. Verfahren zum Nachweisen eines Antikörpers, der spezifisch an ein Polypeptid, wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 und 23 bis 28 definiert, bindet, in einer Probe, umfassend (a) Kontaktieren des Antikörpers in der Probe mit einem Konjugat, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, oder mit einem besagten Polypeptid, unter Bedingungen, die die Bildung eines stabilen Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und (b) Nachweisen des in Schritt (a) gebildeten stabilen Komplexes, sofern vorhanden.

38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei der Antikörper ein  $\beta_2$ GPI-abhängiger Antiphospholipantikörper ist.

39. Verfahren zum Reinigen eines  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipantikörpers, umfassend das Kontaktieren einer biologischen Probe mit einem Konjugat, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, oder eines Polypeptids, wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 und 23 bis 28 definiert, unter Bedingungen, die die Bildung eines stabilen Antigen-Antikörper-Komplexes erlauben; und Gewinnen des gebildeten Komplexes, sofern vorhanden.

40. Polypeptid, wie in Anspruch 10 oder 27 definiert, oder ein Konjugat, wie in Anspruch 10 definiert, zur Verwendung bei einem Verfahren zum Induzieren von Toleranz in einem Individuum.

41. Polypeptid oder Konjugat nach Anspruch 40, worin Toleranz durch eine Stabilisierung oder Reduktion der  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipantikörper-Produktion angezeigt ist.

42. Polypeptid oder Konjugat nach Anspruch 40 oder 41, wobei das Individuum ein Mensch ist.

43. Konjugat nach Anspruch 10, worin das Polypeptid aus der Sequenz von Aminosäure 1 bis Aminosäure 60 der SEQ ID NR. 4 besteht, zur Verwendung bei einem Verfahren nach Anspruch 40.

44. Verfahren zum Nachweisen der  $\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipantikörper-Vermittlung von Koagulation, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Durchführen eines ersten Koagulations-Assays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum, wobei ein Konjugat, wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert, oder ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und 23 bis 28 dem Assay zugegeben wird;

(b) Durchführen eines zweiten Koagulations-Assays unter Verwendung einer geeigneten biologischen Probe von einem Individuum in Abwesenheit des Polypeptids; und

(c) Vergleichen der Assay-Ergebnisse aus Schritten (a) und (b), wobei ein Unterschied bei den Ergebnissen eine  $\beta_2$ GPI-abhängige Antiphospholipantikörper-Vermittlung von Koagulation anzeigen.

45. Verwendung eines Polypeptids, wie in Anspruch 10 oder 27 definiert, oder eines Konjugats, wie in Anspruch 10 definiert, für die Herstellung eines Medikaments zum Induzieren von Toleranz in einem Individuum.

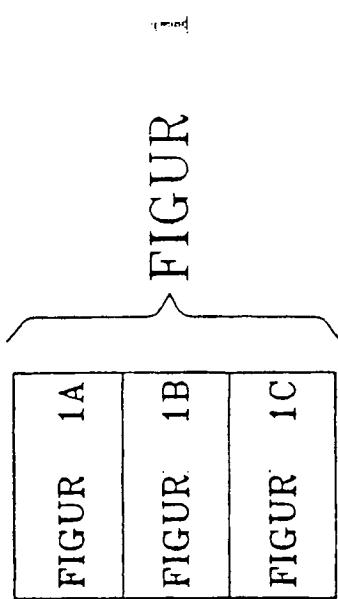
46. Verwendung nach Anspruch 45, wobei Toleranz durch eine Stabilisierung oder Reduktion der

$\beta_2$ GPI-abhängigen Antiphospholipidantikörper-Produktion angezeigt ist.

47. Verwendung nach Anspruch 45 oder 46, wobei das Individuum ein Mensch ist.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1A

1

GGA	CGG	ACC	TGT	CCC	AAG	CCA	GAT	TAA	CCA	TTT	TCC	ACA	GTC	GTC	CCG	TTA	AAA	ACA	
gly	arg	thr	cys	pro	lys	pro	asp	asp.	leu	pro	phe	ser	thr	val	val	pro	leu	lys	thr
																			40
TTC	TAT	GAG	CCA	GGA	GAA	GAG	ATT	ACG	TAT	TCC	TGC	AAG	CCG	GGC	TAT	GTC	TCC	CGA	GGA
phe	tyr	glu	pro	gly	glu	glu	ile	thr	tyr	ser	cys	lys	pro	gly	tyr	val	ser	arg	gly
																			60
GGG	ATG	AGA	AAG	TTT	ATC	TGC	CCT	CTC	ACA	GGG	CTG	TGG	CCC	ATC	AAC	ACT	CTG	AAA	TGT
gly	met	arg	lys	phe	ile	cys	pro	leu	thr	gly	leu	trp	pro	ile	asn	thr	leu	lys	cys
																			80
ACA	CCC	AGA	GTA	TGT	CCT	TTT	GCT	GGA	ATC	TAA	GAA	AAI	GGA	GCC	GTA	CCG	TAT	ACG	ACT
thr	pro	arg	val	cys	pro	phe	ala	gly	ile	leu	glu	asn	gly	ala	val	arg	tyr	thr	thr
																			100
TTT	GAA	TAT	CCC	AAC	ACG	ATC	AGT	TTT	TCT	TGT	AAC	ACT	GGG	TTT	TAT	CTG	AAT	GGC	GCT
phe	glu	tyr	pro	asn	thr	ile	ser	phe	ser	cys	asn	thr	gly	phe	tyr	leu	asn	gly	ala
																			-

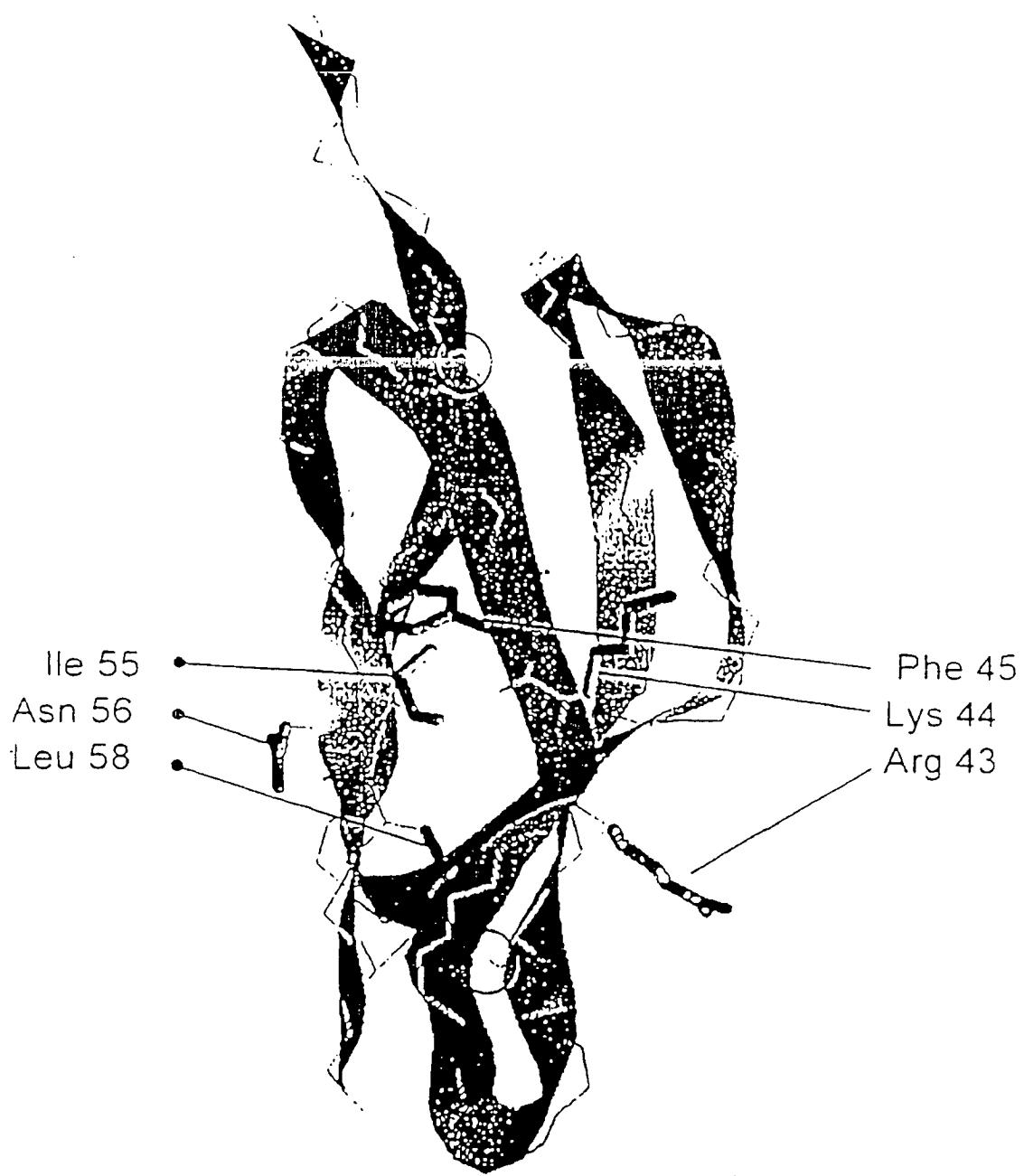
GAT	TCT	GCC	AAG	TGC	ACT	GAG	GAA	GGA	AAA	TGG	AGC	CCG	GAG	CTT	CCT	GTC	TGT	GCT	CCC	
asp	ser	ala	lys	cys	thr	glu	glu	gly	lys	trp	ser	pro	glu	leu	pro	val	cys	ala	pro	120
ATC	ATC	TGC	CCT	CCA	CCA	TCC	ATA	CCT	ACG	TTT	GCA	ACA	CTT	CGT	GTT	TAT	AAG	CCA	TCA	
ile	ile	cys	pro	pro	pro	ser	ile	pro	thr	phe	ala	thr	leu	arg	val	tyr	lys	pro	ser	140
GCT	GGA	AAC	AAT	TCC	CTC	TAT	CGG	GAC	ACA	GCA	GTT	TTT	GAA	TGT	TTG	CCA	CAA	CAT	GCG	
ala	gly	asn	asn	ser	leu	tyr	arg	asp	thr	ala	val	phe	glu	cys	leu	pro	gln	his	ala	160
ATG	TTT	GGA	AAT	GAT	ACA	ATT	ACC	TGC	ACG	ACA	CAT	GGA	AAT	TGG	ACT	AAA	TTA	CCA	GAA	
met	phe	gly	asn	asp	thr	ile	thr	cys	thr	thr	his	gly	asn	trp	thr	lys	leu	pro	glu	180
TGC	AGG	GAA	GTA	AAA	TGC	CCA	TTC	CCA	TCA	AGA	CCA	GAC	AAT	TGG	ACT	AAA	TTA	CCA	GAA	
cys	arg	glu	val	lys	cys	pro	phe	pro	ser	arg	pro	asp	asn	gly	phe	val	asn	tyr	pro	200
GCA	AAA	CCA	ACA	CTT	TAT	TAC	AAG	GAT	AAA	GCC	ACA	TTT	GGC	TGC	CAT	GAT	GGA	TAT	CCT	
ala	lys	pro	thr	leu	tyr	tyr	lys	asp	lys	ala	thr	phe	gly	cys	his	asp	gly	tyr	ser	220
CTG	GAT	GGC	CCG	GAA	GAA	ATA	GAA	TGT	ACC	AAA	CTG	GGA	AAC	TGG	TCT	GGC	ATG	CCA	AGT	
leu	asp	gly	pro	glu	glu	ile	glu	cys	thr	lys	leu	gly	asn	trp	ser	ala	met	pro	ser	240

FIGUR. 1B

TGT	AAA	GCA	TCT	TGT	AAA	TTA	CCT	GTG	AAA	AAA	GCC	ACT	GTG	TAC	CAA	GGA	GAG	AGA	
cys	lys	ala	ser	cys	lys	leu	pro	val	lys	lys	ala	thr	val	val	tyr	gln	gly	glu	arg
																			280
GTA	AAG	ATT	CAG	GAA	AAA	TTT	AAG	AAT	GGA	ATG	CTA	CAT	CGT	CAT	AAA	CTT	TCT	TTC	260
val	lys	ile	gln	glu	lys	phe	lys	asn	gly	met	leu	his	gly	asp	lys	val	ser	phe	phe
																			300
TGC	AAA	AAT	AAG	GAA	AAG	TGT	AGC	TAT	ACA	GAG	GAT	GCT	CAG	TGT	ATA	GAT	GGC	ACT	
cys	lys	asn	lys	glu	lys	cys	ser	tyr	thr	glu	asp	ala	gln	cys	ile	asp	gly	thr	
																			320
ATC	GAA	GTC	CCC	AAA	TGC	TTC	AAG	GAA	CAC	AGT	TCT	CTG	GCT	TTT	TGG	AAA	ACT	GAT	GCA
ile	glu	val	val	lys	cys	phe	lys	glu	his	ser	ser	leu	ala	phe	trp	lys	thr	asp	ala
																			83/98
TCC	GAT	GTA	AAG	CCA	TGC														
ser	asp	val	lys	pro	cys														

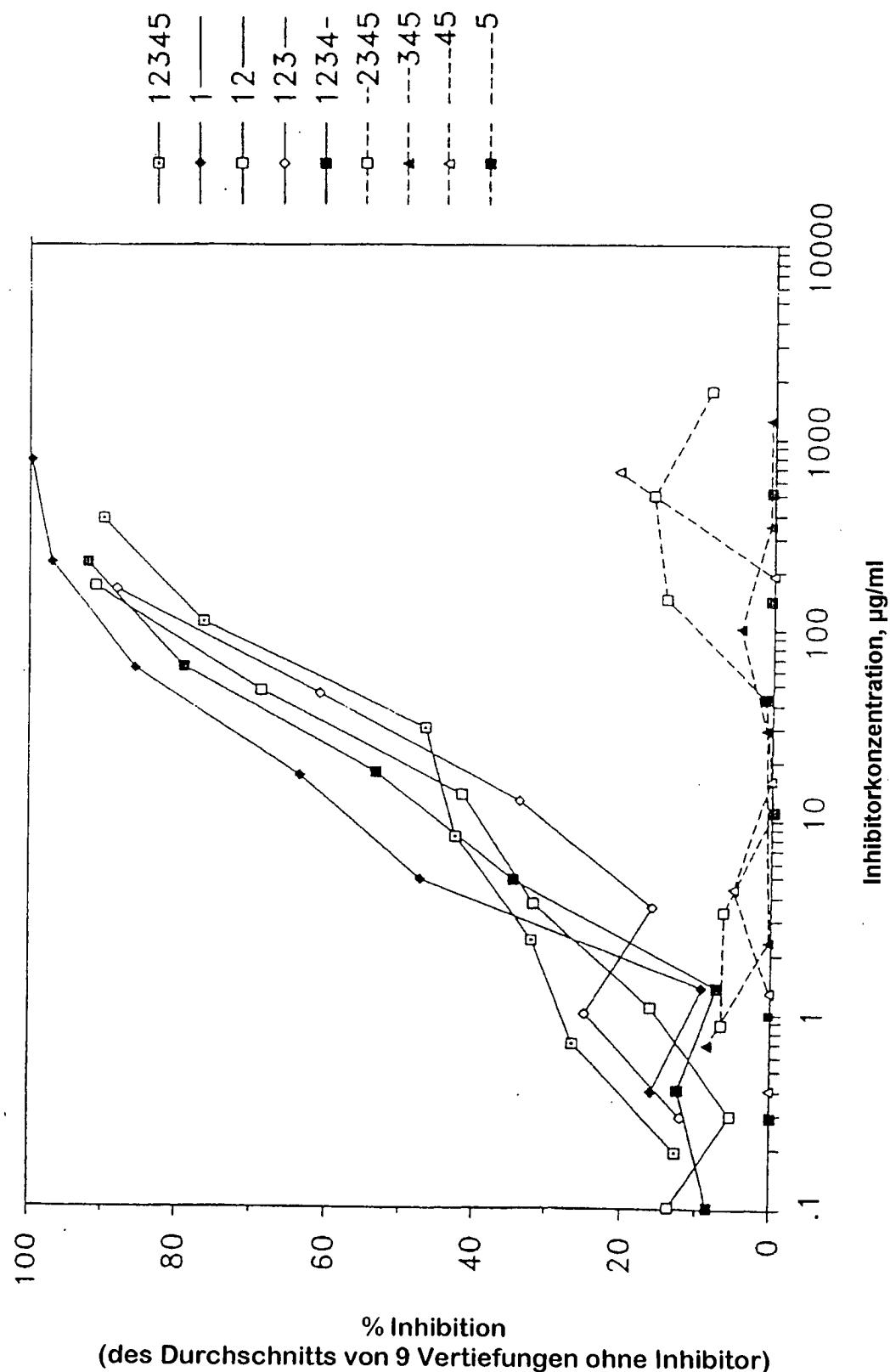
FIGUR 1C

FIGUR 2

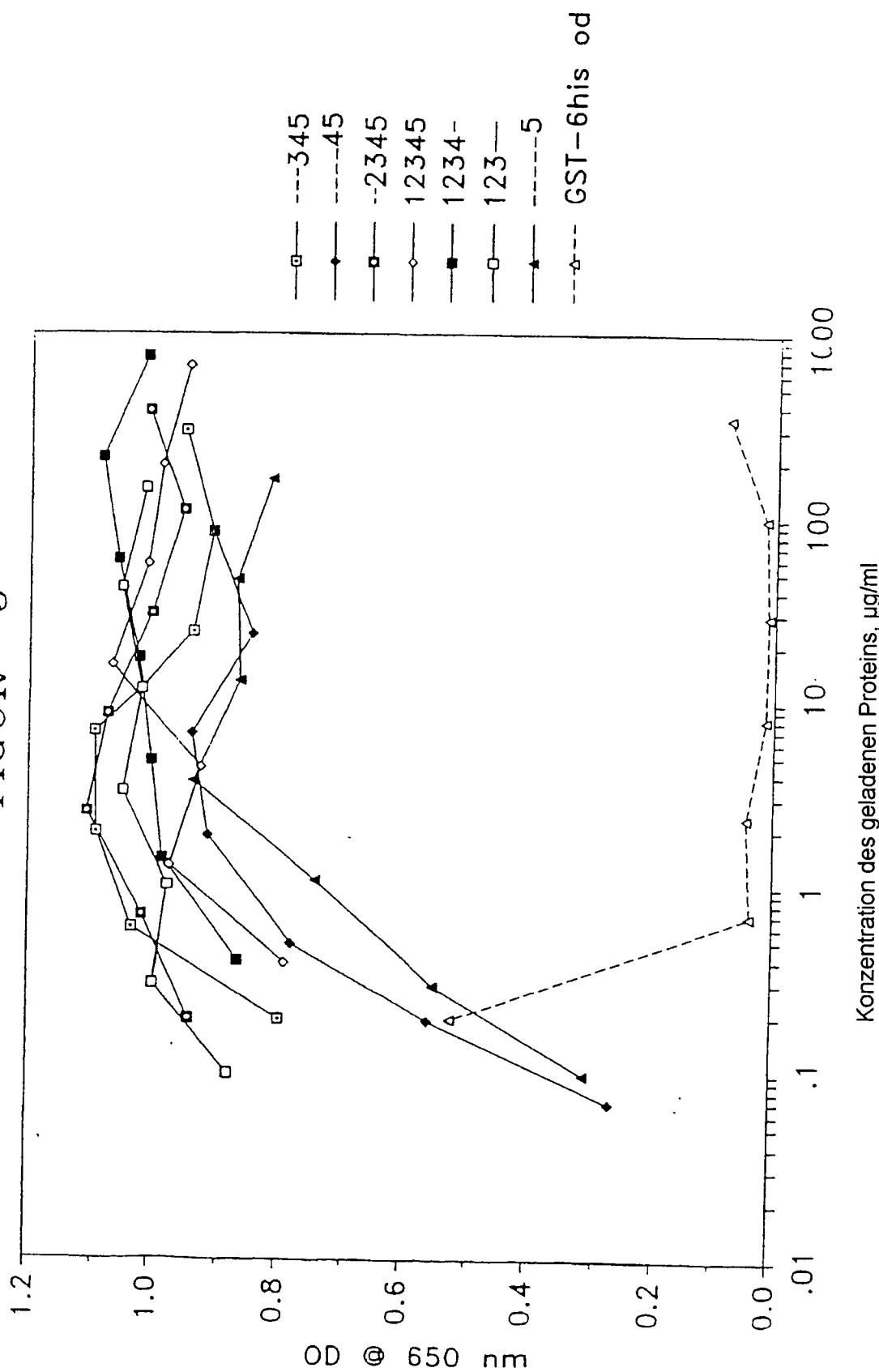


FIGUR 3

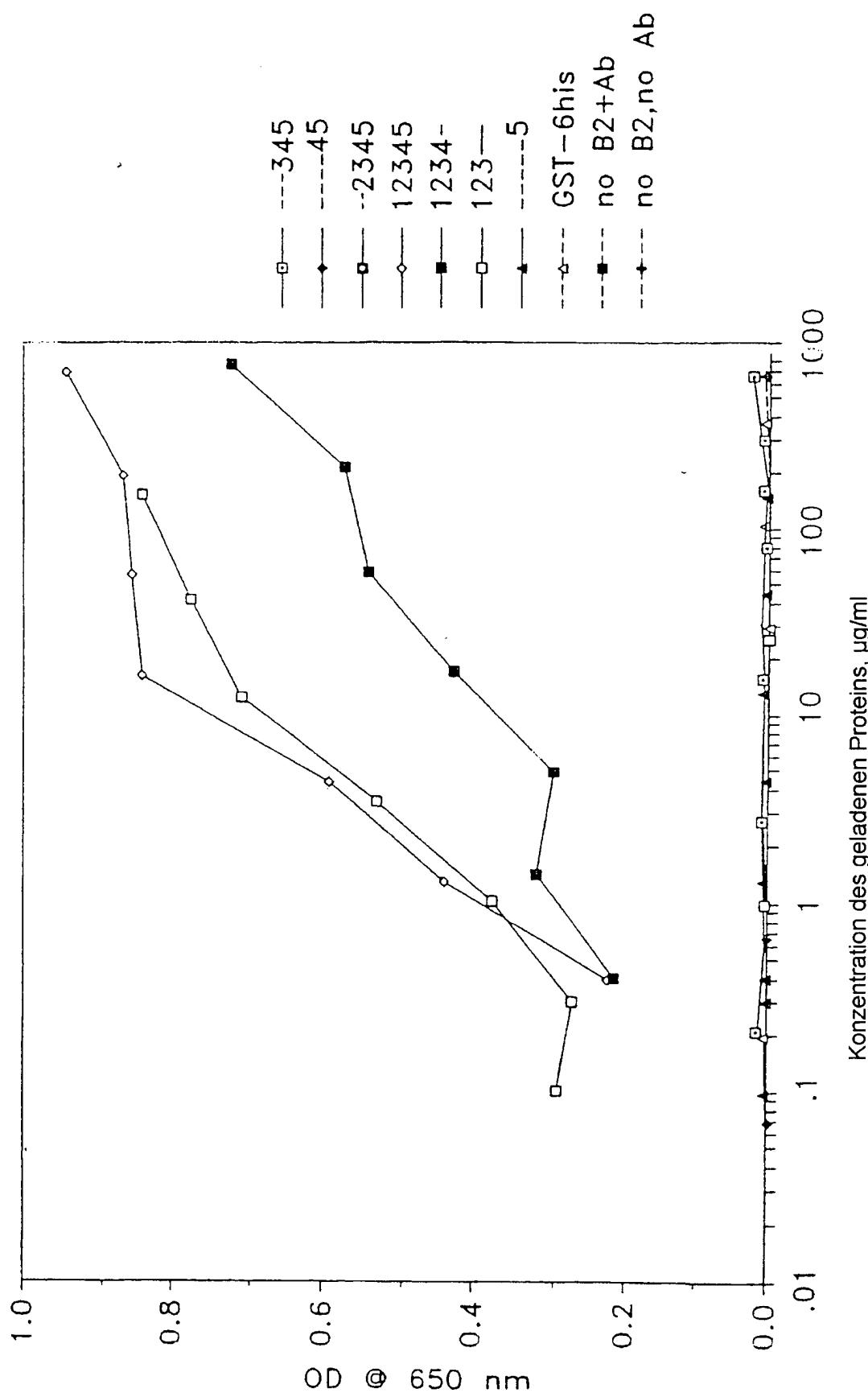
FIGUR 4



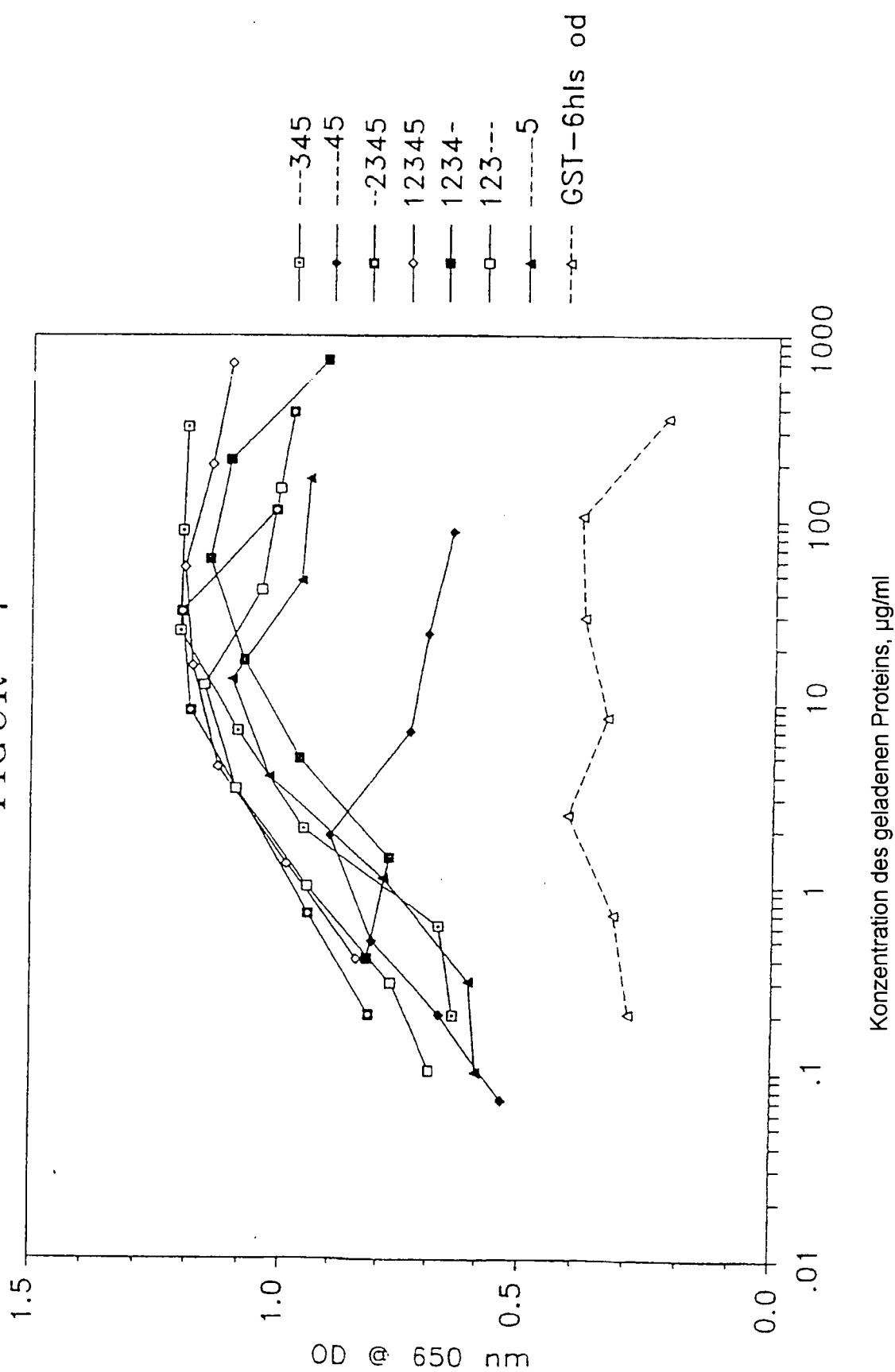
FIGUR 5



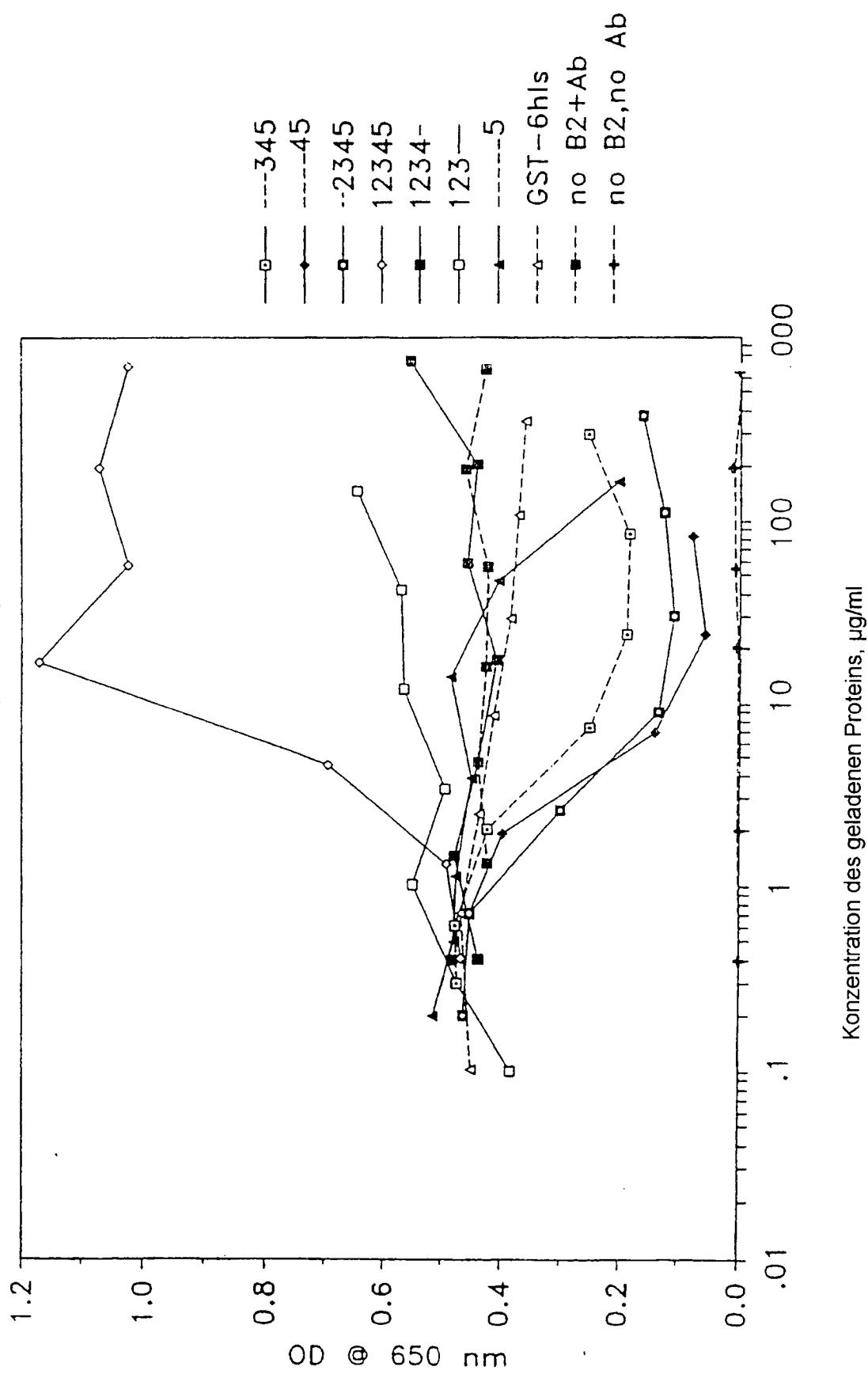
FIGUR 6



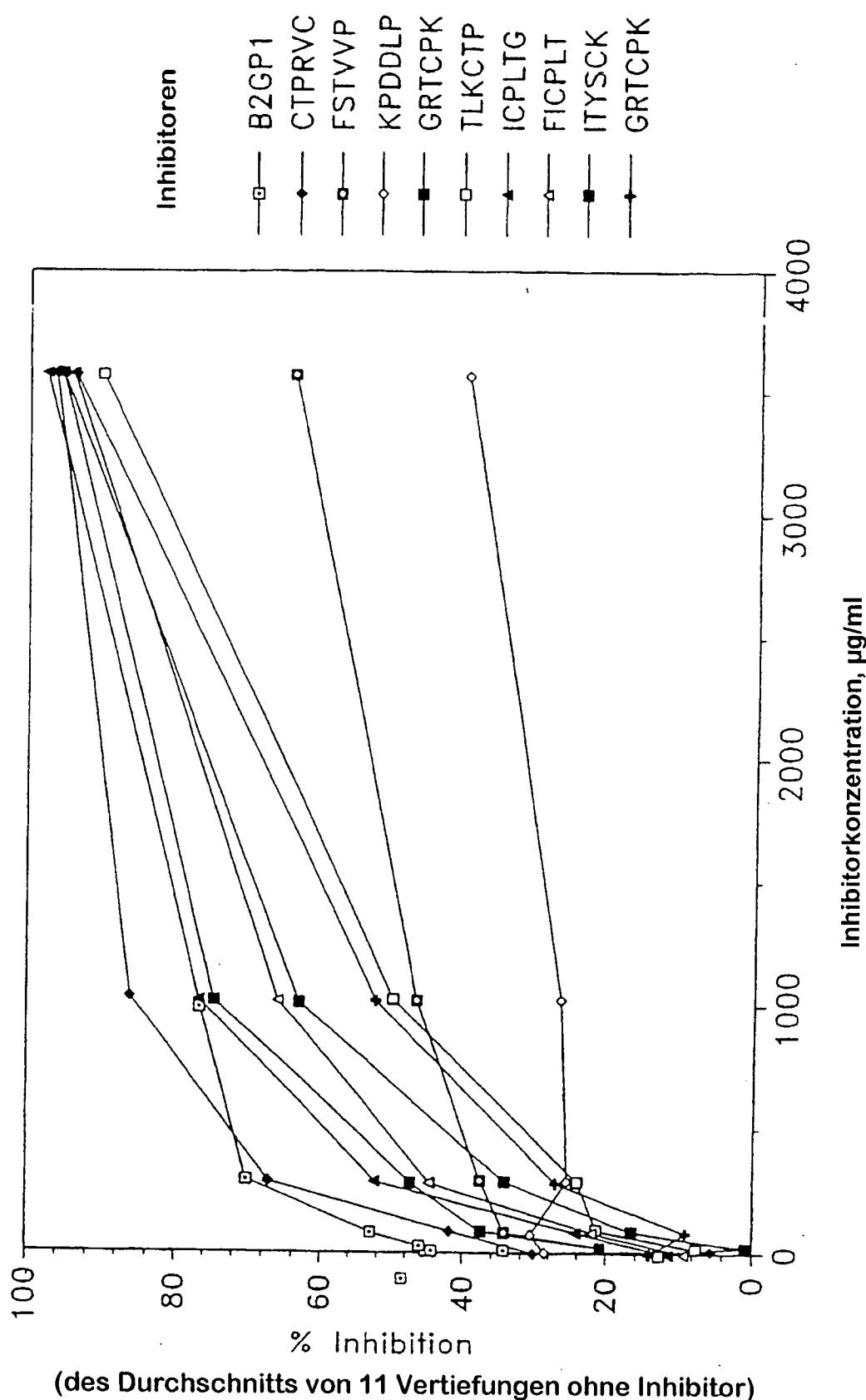
FIGUR 7

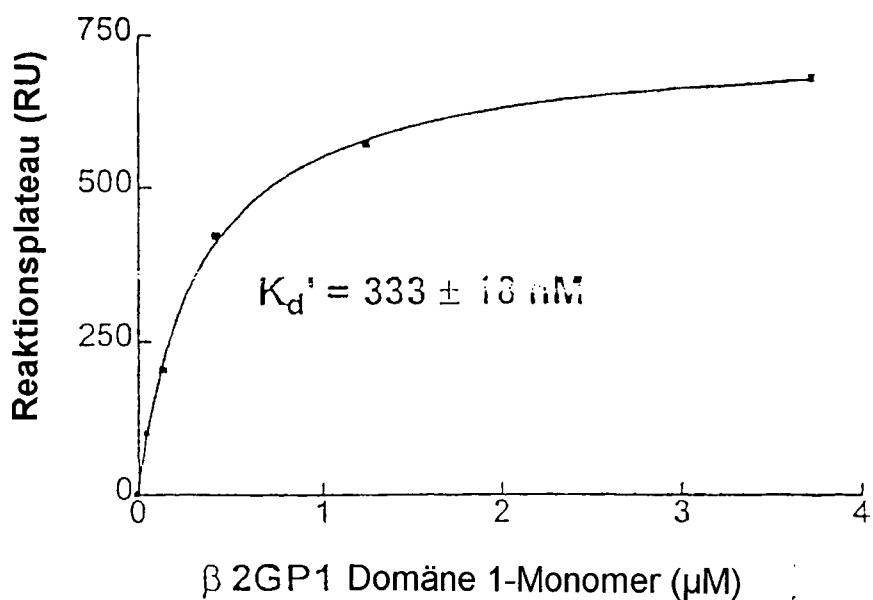


FIGUR. 8

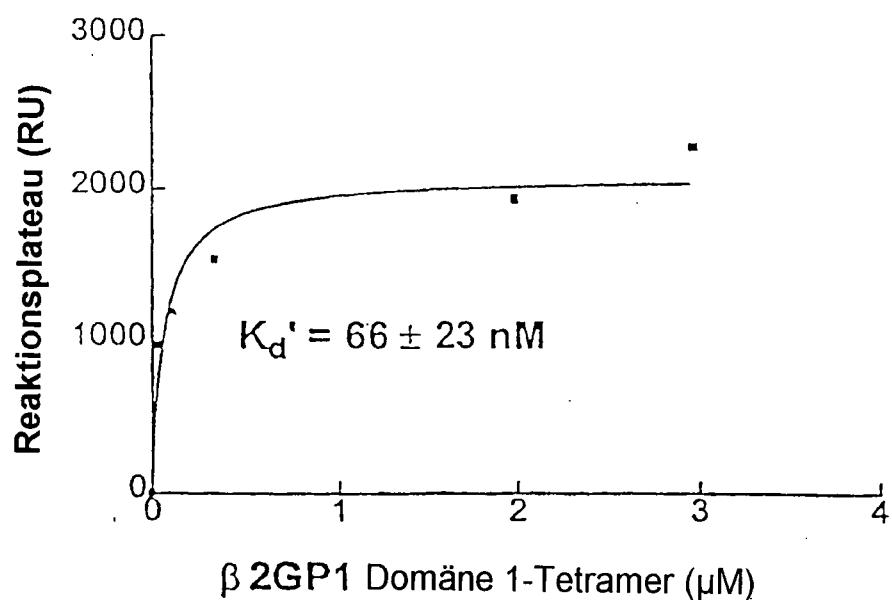


FIGUR 9

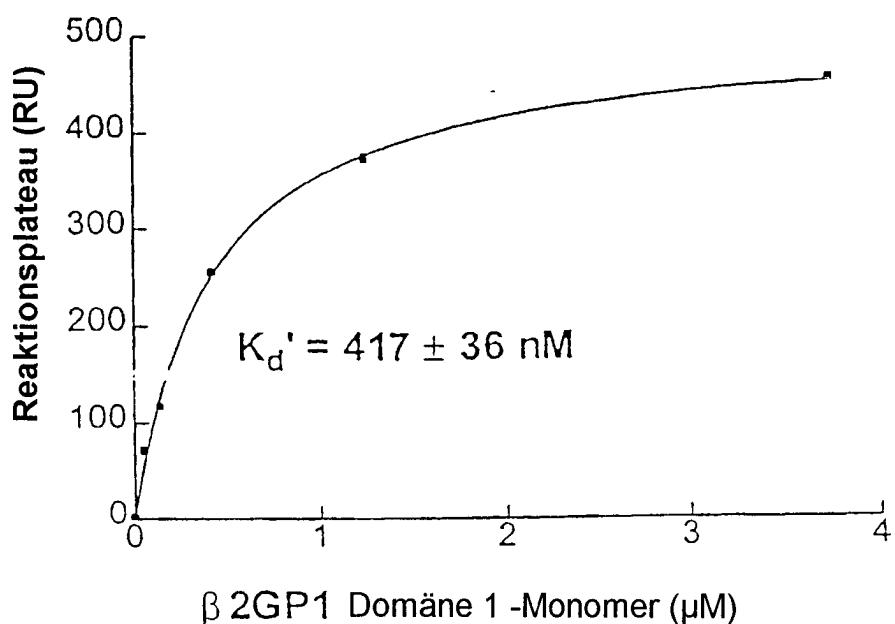




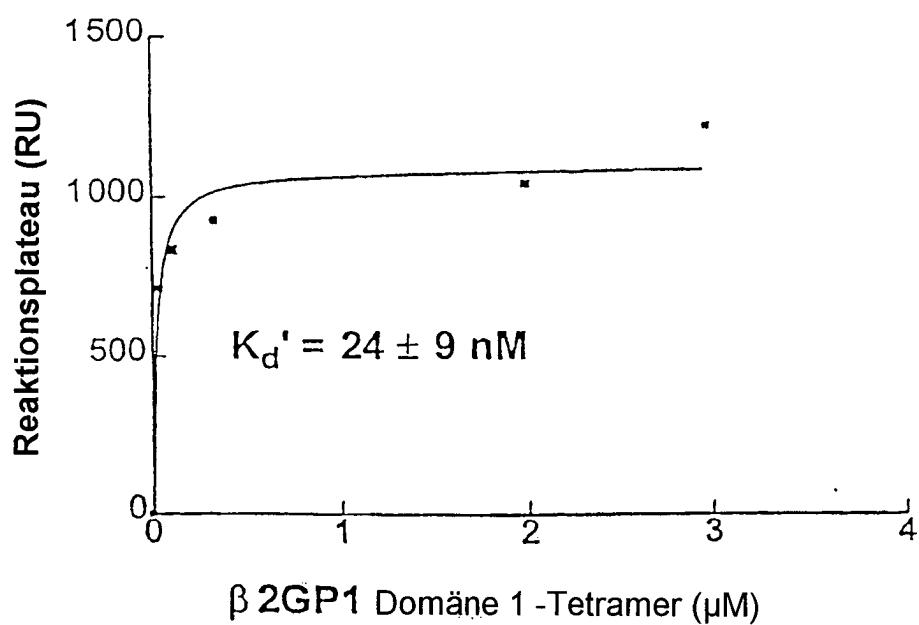
FIGUR 10A



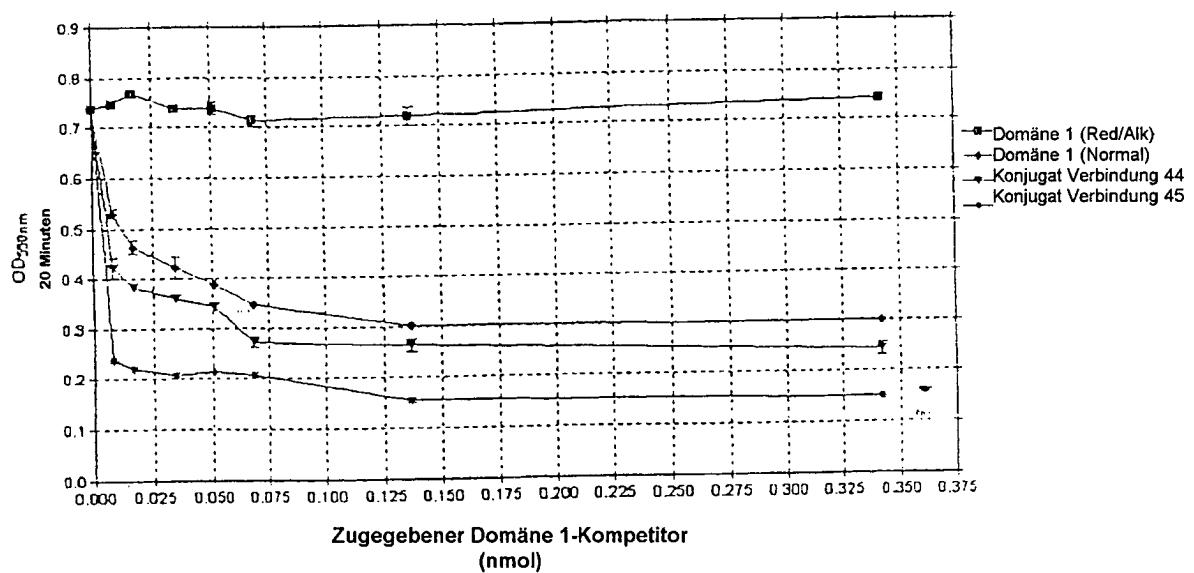
FIGUR 10B



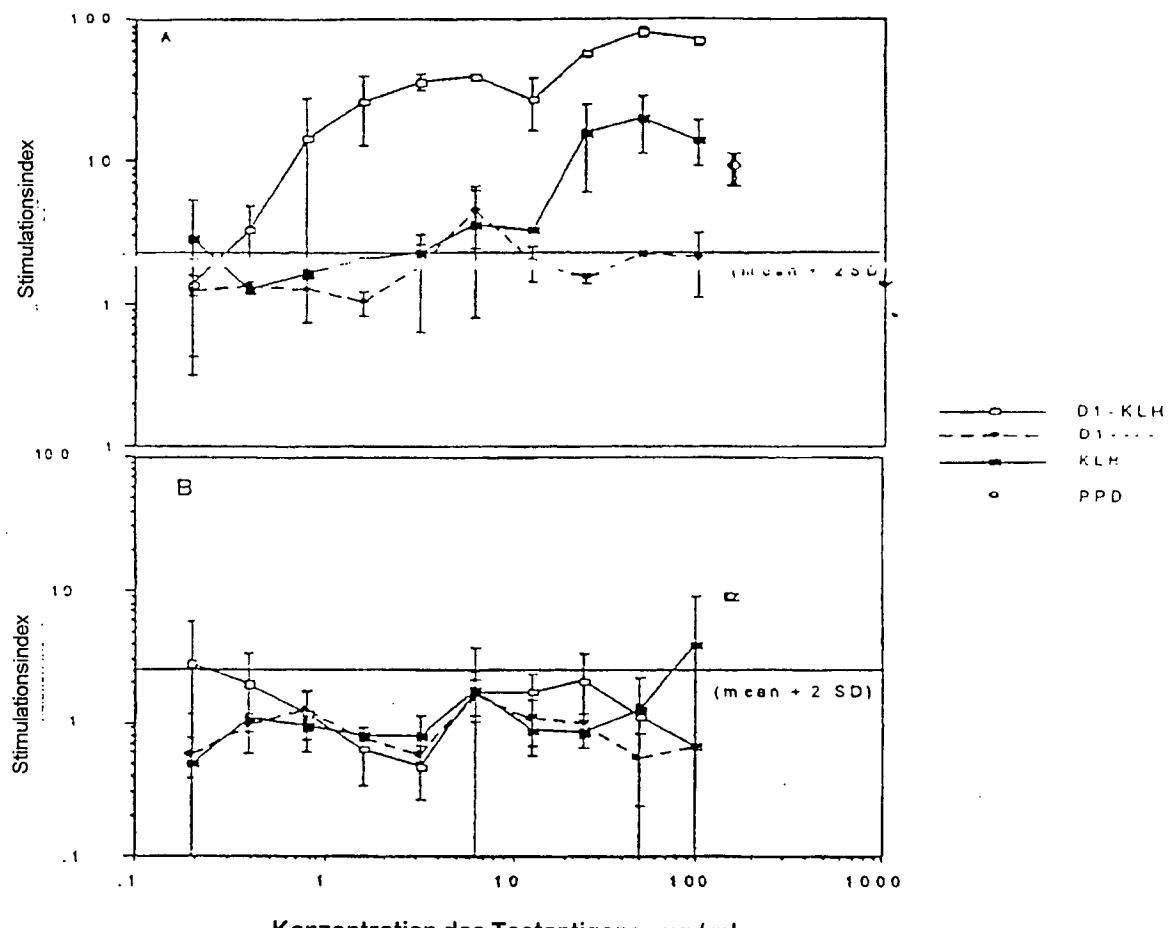
FIGUR 11A



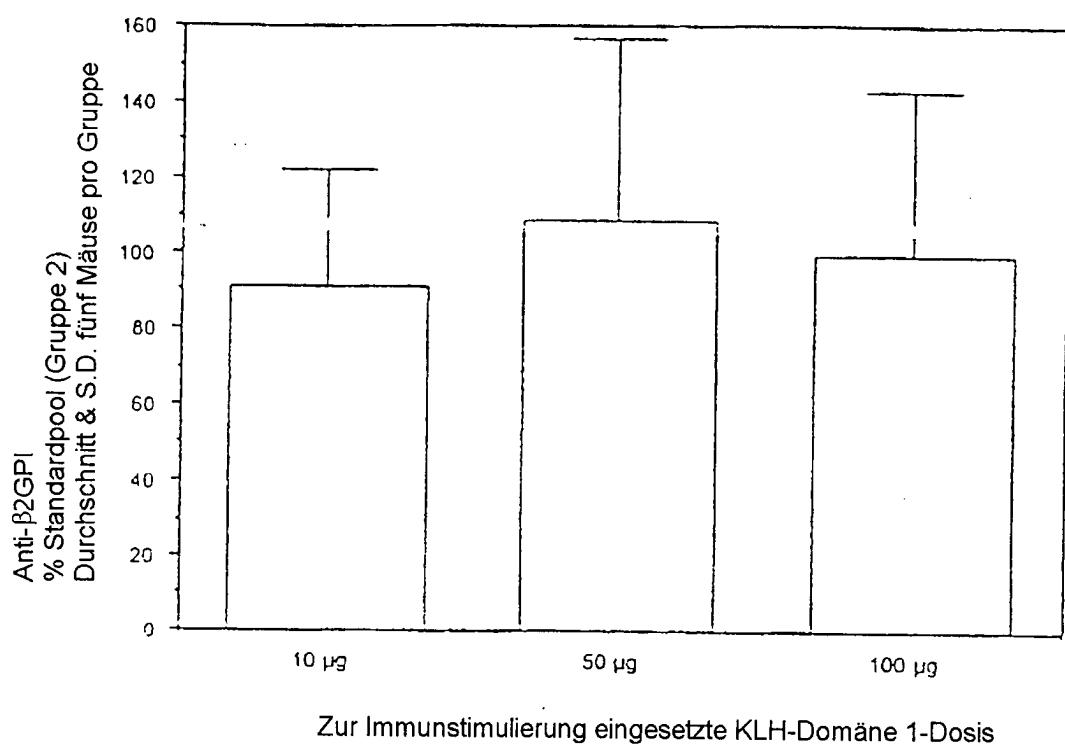
FIGUR 11B



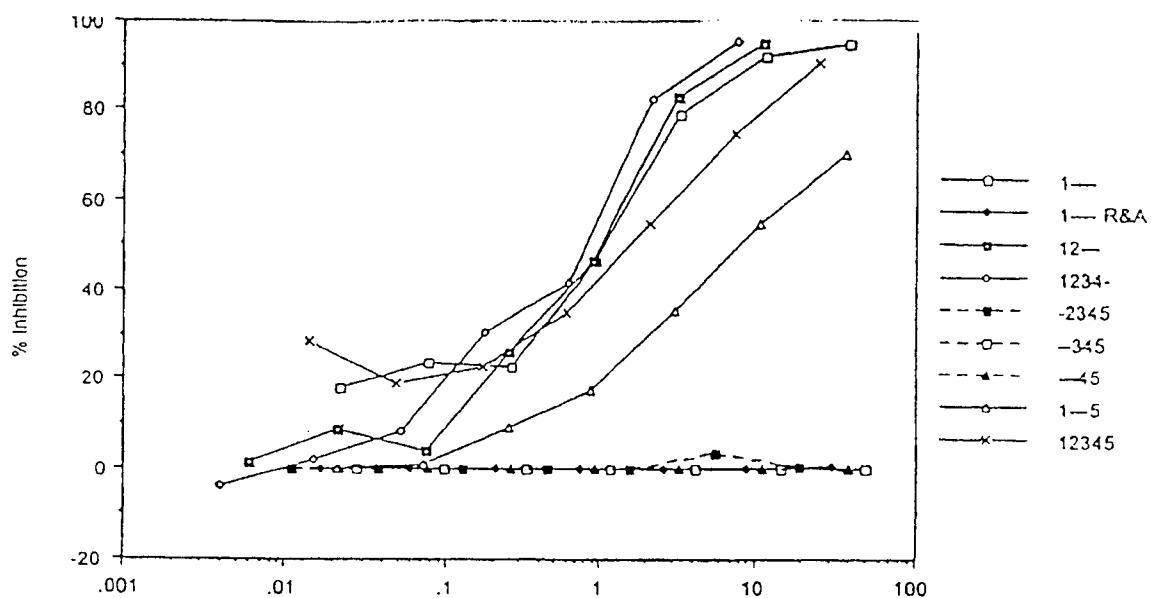
FIGUR 12



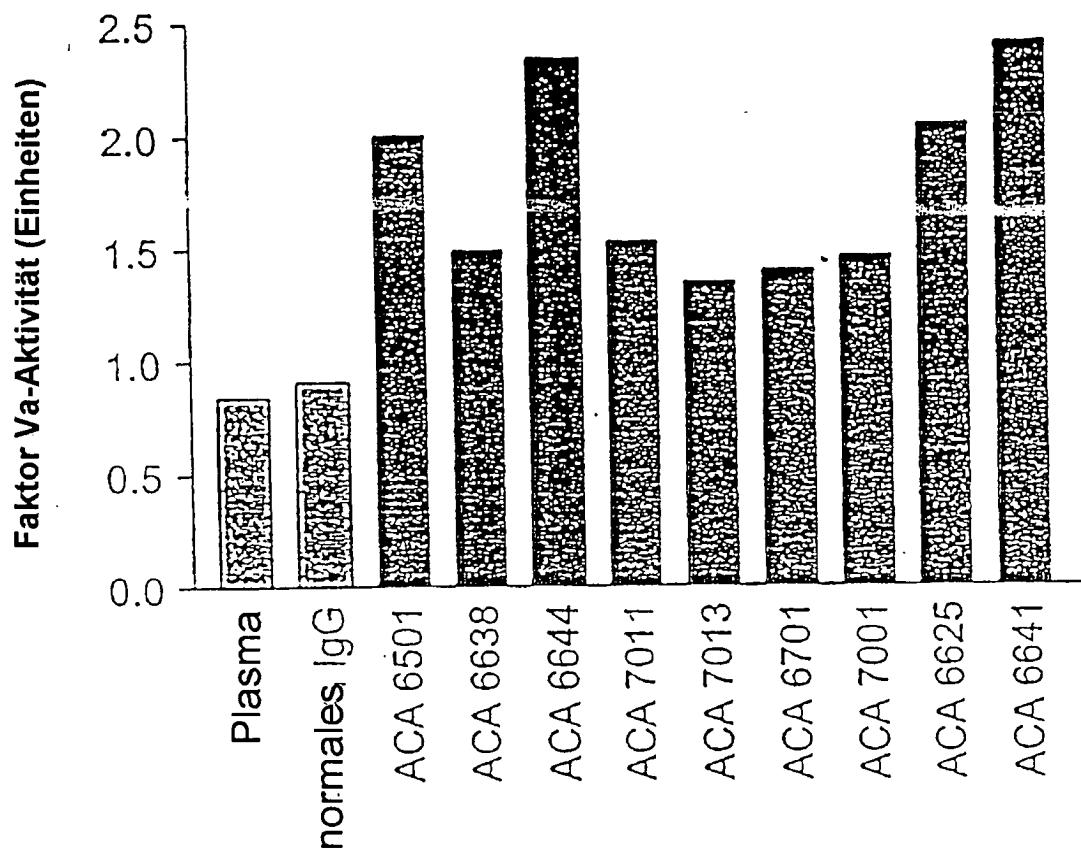
FIGUR 13



**FIGUR 14**



FIGUR 15



FIGUR 16