



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 27 237 T2 2007.12.20**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 254 180 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 27 237.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/02924**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 905 198.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/057090**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.01.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 16/42 (2006.01)**

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

179629 P	01.02.2000	US
592998	12.06.2000	US

(73) Patentinhaber:

Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Me., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT, NL

(72) Erfinder:

LAWTON, Robert L., Gorham, ME 04938, US;
AIYAPPA, Ashok P., Scarborough, ME 04074, US;
LIU, Wendy W., Shaker Heights, OH 44122, US;
MERMER, Brion, Cumberland, ME 04092, US;
GUO, Hongliang, Scarborough, ME 04074, US;
KRAH, Eugene R., Portland, ME 04104, US

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHER MONOKLONALER REKOMBINANTER ANTI-IGE ANTIKÖRPER GEGEN HUNDE-ALLERGIE**

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

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

Beschreibung**GEGENSTAND DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren zum Verringern der IgE-Niveaus und zum Lindern allergischer Symptome in Kaninen bereit. Die Zusammensetzungen umfassen chimäre kanine anti-IgE mAb's, und die Verfahren sind zum Behandeln von Allergien in Kaninen verwendbar.

HINTERGRUNDINFORMATIONEN

[0002] Es wird geschätzt, dass bis zu 30% aller Hunde an Allergien oder allergiebezogenen Hauterkrankungen leiden. Es wurde insbesondere geschätzt, dass die allergische Dermatitis zwischen 3% und 15% der gesamten kaninen Population betrifft. Aufgrund der Verbreitung von Allergien in Hunden besteht ein Bedarf für das Entwickeln von Verfahren und Zusammensetzungen zur geeigneten Diagnose und Behandlung kaniner Allergien.

[0003] Die Substanzen, die am wahrscheinlichsten eine allergische Reaktion verursachen, variieren von Art zu Art. Übliche kanine Allergene schließen Flöhe, Pollen, Schimmelpilze und Staub ein. Man glaubt, dass die Allergie gegenüber Flöhen die am weitesten verbreiteste Hundeallergie ist. Für gewöhnlich ist der Flohspeichel das Allergen und ein einzelner Flohbiss kann einen erheblichen Juckreiz verursachen. Eine zusätzliche Form der Allergie in Hunden wird Atopie genannt. Die Atopie ist ein Zustand, in dem der Hund allergisch gegenüber Inhalationssubstanzen ist, wie zum Beispiel Pollen, Schimmelpilze oder mikroskopische Milben, die im Hausstaub zu finden sind. Derzeitige Behandlungen kaniner Allergien konzentrieren sich häufig auf die Verwendung von Steroiden, die unerwünschte Nebenwirkungen oder allergenvermittelte Desensibilisierung verursachen, was eine andere Behandlung für jeden Allergietyp erforderlich macht.

[0004] In Säugetieren werden Antikörpermoleküle nach zahlreichen Isotypen klassifiziert, die als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet werden. Antikörpermoleküle bestehen aus schweren und leichten Kettenkomponenten. Die schweren Ketten der Moleküle eines bestimmten Isotyps haben extensive Bereiche mit Homologie in der Aminosäuresequenz und haben umgekehrt Bereiche mit Unterschieden zu Antikörpern, die zu anderen Isotypen gehören. Die miteinander geteilten Bereiche der schweren Ketten verleihen den Mitgliedern jedes Isotyps die allgemeinen Fähigkeiten an einen bestimmten Zelloberflächenrezeptor oder an andere Makromoleküle, wie zum Beispiel das Komplement, zu binden und dadurch bestimmte Immuneffektorfunktionen zu aktivieren. Daher dient die Trennung von Antikörpermolekülen in Isotypen auch dem Trennen der Antikörper nach verschiedenen Effektorfunktionen, die sie für gewöhnlich aktivieren. Beim Menschen und bei Hunden ist das Immunoglobulin E (IgE) an Allergien beteiligt und erkennt ein Antigen in der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp.

[0005] Darüber hinaus ist IgE ein Antikörpertyp, der als ein wichtiger Vermittler einer allergischen Reaktion in Säugetieren, einschließlich der Typ I Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp, bekannt ist. IgE-Moleküle binden an Rezeptoren auf Mediatorzellen, wie zum Beispiel Mastzellen. Diese Bindung tritt auf, wenn der Fc-Bereich des IgE-Moleküls an Fc-Rezeptoren auf der Mastzelle gebunden wird. Wenn solche zellgebundenen IgE-Antikörper dann an ein Allergen binden, vernetzt das Allergen mehrere IgE-Antikörper auf der Mastzellenoberfläche. Diese Quervernetzung vermittelt die Typ I Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp und verursacht die Freisetzung von Histaminen und anderen Molekülen, die Symptome erzeugen, die mit einer Allergie in Verbindung stehen.

[0006] Beim Menschen dient das Serumniveau des Gesamt-IgE's zur Diagnostik einer allergischen Erkrankung. Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob das Serumniveau an IgE ebenfalls zur Diagnostik für Allergien in Hunden dienen könnte, führten DeBoer und Hill zusätzliche Studien durch. (Hill und DeBoer, Am. J. Vet. Res. 55(7): 944–48 (1994)). Sie verwendeten monoklonale Antikörper ("mAb") D9 in einem ELISA-Assay mit folgender Konfiguration: D9 war an ein Substrat gebunden, die Antikörper wurden durch D9 gefangen und dann wurde D9, der einen Marker aufwies, verwendet, um die gefangenen Antikörper zu markieren.

[0007] Der Hill und DeBoer-ELISA wurde verwendet, um die Gesamtmenge an Serum-IgE von Kaninen zu ermitteln, um kanine Allergien zu diagnostizieren. Man fand jedoch heraus, dass das Quantifizieren von IgE zur Diagnose von Allergien in Hunden nicht geeignet war. (Siehe, z.B., Zusammenfassung und Diskussionsabschnitte von Hill und DeBoer). Dieser Befund stand im direkten Gegensatz zur Situation in der menschlichen Immunologie. Dieses Ergebnis weist auf die Schwierigkeiten jedes Ansatzes hin, Daten zwischen Tieren von zwei verschiedenen Gattungen aufeinander abzustimmen.

[0008] Diese Schwierigkeit wird weiterhin beispielhaft durch die Tatsache verdeutlicht, dass Hunde gegenüber anderen Antigenen allergisch sein können als Menschen. Allergien gegenüber Flöhen zum Beispiel sind ein ernstes Problem für Hunde jedoch nicht für Menschen. Darüber hinaus zeigten Studien der Doktoren Esch und Greer der Greer Laboratories (Lenior, NC) in Beispielen, in denen Hunde und Menschen anscheinend gegenüber den gleichen allergenen Extrakten allergisch sind, dass die spezifischen Allergene in einem Allergenextrakt, die eine kanine Erkrankung erzeugen, nicht notwendigerweise die gleichen Allergene sind, die Erkrankungen beim Menschen erzeugen. Zum Beispiel ist bekannt, dass die immunodominanten Bestandteile von Staubmilbenextrakten bei Hunden anders sind als bei Menschen.

[0009] Zusätzlich zu den Schwierigkeiten beim Studium von allergischen Mechanismen und Reaktionen über Gattungen hinaus, werden Allergien in Hunden hauptsächlich in der Haut exprimiert, während Menschen allergische Symptome primär im Atmungssystem zeigen. Zusätzlich steht Eosinophilie in Korrelation zu Allergien beim Menschen, jedoch nicht bei Hunden.

[0010] Wenn an eine Verabreichung einer therapeutischen Zusammensetzung zum Behandeln eines physiologischen Zustandes gedacht wird, sollte berücksichtigt werden, dass, wenn rekombinante oder chimäre Moleküle in vivo einem Tier verabreicht werden, diese schnell aus dem Tier entfernt werden. Rekombinante IgG-Moleküle sind verwendet worden, um die Halbwertszeit rekombinanter Moleküle zu erhöhen, wenn die Rekombinanten einem Tier verabreicht werden. Z.B. Capon, D., Chamow, S., et al., "Designing CD4 immunoadhesins", *Nature* 337: 525 (1989); Byrn, R., Mordenti, C., et al., "Biological Properties of a CD4 Immunoadhesion", *Nature* 344: 667 (1990); Haak-Frendscho, M., Ridgway, J., et al., "Human IgE Receptor Alpha-Chain IgG Chimera Blocks Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in vitro", *Journal of Immunology* 151: 351-53 (1993); U.S. Patent Nr. 5,116,964, das am 26. Mai 1992 für Capon, D. J., et al., unter dem Titel "Hybrid Immunoglobulins" erteilt wurde.

[0011] Es wird allgemein anerkannt, dass beim Menschen IgG der Immunoglobulinisotyp mit der längsten Halbwertszeit im Serum ist. Bei Hunden ist der Isotyp mit der längsten Halbwertszeit nicht bekannt. Obwohl die Sequenzen, von denen man glaubt, dass sie einem Abschnitt auf dem Exon 1 und 3 von wenigstens zwei und möglicherweise allen vier schweren Ketten der kaninen IgG-Immunoglobulinsequenzen entsprechen, im U.S. Patent Nr. 5,593,861 von Maeda et al. beschrieben worden sind, ist nicht bekannt, welche der Sequenzen dieser schweren Ketten Teil der IgG-Struktur mit der längsten Halbwertszeit in Hunden ist. EP 0 957 111 offenbart spezifische Bindungsproteine zum Behandeln kaniner Allergien, insbesondere offenbart es einen Mäuseantikörper 15A.2, der kanines IgE bindet. Der chimäre Antikörper zeigt keine weiteren vorteilhaften Wirkungen.

[0012] WO 97/20859 beschreibt Verfahren und Zusammensetzungen, die Allergien bei Hunden betreffen. Es werden monoklonale Antikörper offenbart, z.B. D9, 14K2, 1B1 oder 11B11, die für das Binden an kanines IgE spezifisch sind.

[0013] IgE-Niveaus sind bei menschlichen Patienten, die eine allergische Erkrankung durchlaufen, erhöht und man glaubt, dass IgE allergische Symptome vermittelt. Obwohl die Niveaus von Serum-IgE nicht mit einer allergischen Erkrankung in Hunden korrelieren, kann es nichtsdestotrotz wünschenswert sein, IgE-Niveaus als Mechanismus zum Lindern allergischer Symptome zu verringern.

[0014] Darüber hinaus gibt es einen Bedarf für Zusammensetzungen und Verfahren zum Behandeln von kaninen Allergien, die die Nachteile herkömmlicher Zusammensetzungen und Verfahren vermeiden, und dennoch eine wirksame Behandlung kaniner Allergien ermöglichen.

[0015] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist das Bereitstellen der Verwendung eines Antikörpers für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung kaniner Allergien mit im Wesentlichen weniger Nebenwirkungen als die, die man von Behandlungen mit Steroiden kennt.

[0016] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist das Bereitstellen der Verwendung eines Antikörpers für die Herstellung eines Arzneimittels zum Lindern von kaninen Allergiesymptomen, die unabhängig von der Art des Allergens wirksam sind, und Zusammensetzungen und Verfahren, bei denen die Behandlung eher auf das Vorhandensein einer allergischen Reaktion als einem spezifischen Allergen beruht.

[0017] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist das Bereitstellen der Verwendung eines Antikörpers für die Herstellung eines Arzneimittels zum Lindern kaniner Allergiesymptome durch das Beeinflussen der IgE-Synthese.

[0018] Diese und andere Ziele werden dem Fachmann anhand der folgenden Offenbarung und der angehängten Ansprüche deutlicher gemacht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren zum Behandeln von Allergien bei Hunden. Insbesondere stellt die Erfindung Verfahren und Zusammensetzungen zum Verabreichen an Hunde bereit, wobei die Zusammensetzungen die Immunoglobulin E Moleküle der Hunde binden, so dass das Binden des freien seralen IgE's das Binden dieses IgE's an die hoch affinen IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen verhindert. Die Zusammensetzungen und Verfahren, die bereitgestellt werden, können die Niveaus an freiem seralen IgE verringern oder das IgE beseitigen. Niedrige freie serale IgE-Niveaus können die Synthese und Expression des hoch affinen IgE-Rezeptors auf Basophilen und Mastzellen herabregulieren. Das Ergebnis kann die Verringerung oder Eliminierung von freiem und/oder des gesamten seralen IgE's und die Verringerung oder Eliminierung der IgE-Reaktion gegenüber dem Allergen auf Hautmastzellen sein. Mit "freiem Serum-IgE" ist das IgE gemeint, das an den hoch affinen IgE-Rezeptor binden kann und ungebundenes IgE im Serum ist.

[0020] Wir haben dargestellt, dass die fortwährende Eliminierung von detektierbarem freiem und/oder dem gesamten Serum-IgE für 7 Tage und einem möglicherweise kürzeren Zeitraum zu einer negativen Feedbackschleife führt, die nachfolgend die IgE-Synthese supprimiert. Die fortwährende Supprimierung der IgE-Synthese wird zur Eliminierung einer Hautreaktion gegenüber dem Allergen führen.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Spezifität und Struktur eines chimären Anti-IgE-Moleküls der vorliegenden Erfindung das direkte Ansteuern der IgE+ B-Zelle ermöglichen. Diese Bindung kann entweder durch negative Stimulation der reifen B-Zelle oder durch Zerstören der B-Zelle durch Apoptose oder komplementvermittelte Lyse zu einer Verringerung oder Eliminierung der IgE-Synthese führen.

[0022] Die vorliegende Erfindung kann daher ein IgE-Rezeptormolekül umfassen, das eine Chimäre umfasst und das kanines IgE spezifisch bindet. Das Rezeptormolekül kann ein Antikörpermolekül sein, bevorzugt ein monoklonaler Antikörper ("mAb") und das mAb sollte bevorzugt eine Affinität zum Exon 3 des kaninen IgE's aufweisen. Die Chimäre kann Kanines und Mäuse-Immunoglobulin umfassen. Die Chimäre kann weiter kanine konstante schwere und leichte Domänen umfassen, die mit variablen Bereichen schwerer und leichter Ketten von Mäusen fusioniert sind. Rezeptoren und Antikörpermoleküle der vorliegenden Erfindung können auch Sequenzen der schweren Ketten von IgE umfassen.

[0023] Die Rezeptoren und Antikörpermoleküle der vorliegenden Erfindung können das Binden von IgE an einen zweiten IgE-Rezeptor verhindern und der zweite IgE-Rezeptor kann auf einer oder mehreren Mastzellen oder Basophilen angeordnet sein. Die Rezeptoren und Antikörpermoleküle der vorliegenden Erfindung können Proteine, Peptide oder andere organische Moleküle umfassen.

[0024] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung eines Antikörpers für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung kaniner Allergien bereit, die das Verabreichen eines Rezeptors oder monoklonalen Antikörpers, der eine Chimäre der vorliegenden Erfindung umfasst, und spezifisch an kanines IgE bindet, umfassen. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können zu einem Verringern des seralen IgE-Niveaus in behandelten Kaninen führen, oder zum Binden von IgE an B-Zellen und die nachfolgende Eliminierung einer klonalen Population von B-Zellen. Die Verfahren können auch zum Binden von seralen IgE im Plasma oder zu einer Inhibierung der IgE Produktion in behandelten Kaninen führen. Das Verringern des Serum-IgE-Niveaus nach den vorliegenden Verfahren kann durch ein Zerstören der Blockierung der Interaktion zwischen IgE und Rezeptoren für IgE, die auf Mastzellen oder Basophilen angeordnet sein können, verursacht werden.

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt weiter pharmazeutische Formulierungen bereit, die therapeutische Mengen der Rezeptoren der vorliegenden Erfindung umfassen.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0026] [Fig. 1](#) beschreibt die Fähigkeit von chimären 15A.2 die Bindung des IgE mit dem rekombinanten kaninen IgE-Rezeptor zu inhibieren.

[0027] [Fig. 2A-1](#) bis [Fig. 2A-3](#) und [Fig. 2B-1](#) bis [Fig. 2B-2](#) zeigen die Daten zum zeitlichen Verlauf für (freies und Gesamt-IgE) im Kreislauf befindliche IgE-Niveaus in 2 Kontroll- und 3 Versuchshunden nach der Verab-

reichung eines rekombinanten chimären Anti-IgE mAb, der c15A.2 genannt wird. Der mAb 15A.2 und seine Spezifität werden in U.S. 6,734,287, die am 30. März 1999 angemeldet worden ist, offenbart.

[0028] [Fig. 3](#) stellt die Daten für den zeitlichen Verlauf der c15A.2 Aktivität in Hunden nach dem Verabreichen eines chimären Antikörpers dar.

[0029] [Fig. 4](#) stellt die Daten zum zeitlichen Verlauf für im Kreislauf befindliches IgE, das mit c15A.2 komplexiert ist, in drei Hunden nach 8 Verabreichungszyklen mit chimären Antikörpern dar.

[0030] [Fig. 5](#) stellt die Daten für den zeitlichen Verlauf der Aktivität des anti-chimären 15A.2 dar, die im Serum von Versuchshunden für den Verabreichungszyklus der chimären Antikörper beobachtet wurden.

[0031] [Fig. 6](#) stellt Daten zur Durchflusszytometrie von einem Hund dar, doppelt gefärbt mit PE-markiertem anti-Exon 4 kaninem IgG mAb 14K.2 und FITC-markiertem anti-kaninen IgE-Rezeptor mAb 9L.4, vier Tage nach einem ersten Behandlungszyklus, und drei Tagen nach einem zweiten Behandlungszyklus und fünf Tagen nach einem fünften Behandlungszyklus der Verabreichung mit chimärem Anti-15A.2 mAb.

[0032] [Fig. 7A–Fig. 7B](#) zeigen Daten zum zeitlichen Verlauf der Traubenkraut Hauttestreaktivität in Hunden, vor, und 3 Tage und 7 Tage nach acht Verabreichungszyklen mit c15A.2 mAb.

[0033] [Fig. 8](#) stellt die Menge an c15A.2 dar, die erforderlich ist, um IgE im Serum von drei Hunden, die mit 2002, 2003 und 2103 bezeichnet wurden, zu neutralisieren, wie es durch ein Serumneutralisierungsassay bestimmt wurde.

[0034] [Fig. 9](#) zeigt Daten zum zeitlichen Verlauf für im Kreislauf befindliche IgE-Niveaus in den Hunden 1001 und 1002 nach dem Verabreichen eines rekombinanten Rezeptor-IgG Antagonisten, der mit cRclg bezeichnet wurde.

[0035] [Fig. 10A–E](#) zeigen die DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 8) des rekombinanten IgE-Rezeptors cRclg mit der entsprechenden Translation (SEQ ID NO: 9).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Definitionen:

[0036] Affinität: eine Anziehungskraft oder Bindungsstärke zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor oder zwischen zwei Bindungsresten. Die Affinität hält das Bindungspaar im Gleichgewicht gebunden.

[0037] Aminosäuren: Organische Moleküle, die eine Aminogruppe enthalten, die in linearen Arrays kombiniert werden können, um Polypeptide, Peptide oder Proteine zu bilden. Die zwanzig üblichen Aminosäuren sind Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Der Fachmann wird feststellen, dass in Ausführungsformen der Erfindung mit konservativen Varianten sowohl alle üblichen Aminosäuren als auch solche, die nicht aufgelistet worden sind, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

[0038] Kaniner IgE-Rezeptor: Ein hierin definierter rekombinanter oder chimärer Rezeptor, der eine Affinität für kanines IgE zeigt oder auf andere Art dazu führt das IgE aus dem kaninen Serum in vivo oder in vitro entfernt wird.

[0039] cDNA Klon: Eine Duplex-DNA-Sequenz, die eine RNA darstellt, die in einem Klonierungsvektor getragen wird.

[0040] Chimäres mAb: Ein Immunoglobulinmolekül mit einer Hybridaminosäuresequenz, die sich aus der Kombination von Aminosäuren aus wenigstens zwei verschiedenen kaninen Ig-Quellen ergab. Im Allgemeinen findet man die Aminosäuresequenzen normalerweise in der Natur nicht zusammen. "mRb" zeigt einen monoklonalen Antikörper an.

[0041] Klonierungsvektor: Ein Plasmid, Phagen-DNA oder eine andere DNA-Sequenz, die sich in einer Wirtszelle replizieren kann und die exogen zugegebene DNA-Sequenz zum Zwecke der Amplifikation oder Expres-

sion der zugegebenen DNA-Sequenz tragen kann.

[0042] Konservative Variante: Konservative Varianten von Nukleotidsequenzen schließen sowohl Nukleotidsubstitutionen ein, die zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führen, als auch Nukleotidsubstitutionen, die zu konservativen Aminosäuresubstitutionen führen oder Aminosäuresubstitutionen, die den Charakter des Polypeptids, das sich aus diesen Nukleotiden ergibt, nicht wesentlich beeinflussen. Zum Beispiel wird der Polypeptidcharakter nicht wesentlich beeinflusst, wenn die Substitutionen nicht die spezifische Bindung des Peptids an den kaninen IgE-Rezeptor oder an andere kanine IgE-Liganden ausschließt.

[0043] Konservative Varianten von Aminosäuresequenzen schließen Aminosäuresubstitutionen oder Deletionen ein, die den Charakter des abgeänderten Polypeptids relativ zum Ausgangszeptid nicht wesentlich beeinflussen. Zum Beispiel wird der Polypeptidcharakter nicht wesentlich beeinflusst, wenn die Substitutionen oder Deletionen die spezifische Bindung des abgeänderten Peptids an einen spezifischen Bindungspartner des Ausgangszeptids nicht wesentlich beeinflussen. Von dieser Definition eingeschlossen werden auch glykosylierte und andere Varianten und Derivate, die dem Fachmann bekannt sind und die als in dem Schutzzumfang dieser Erfindung fallend erachtet werden. Von dieser Definition eingeschlossen werden auch Aminosäureinsertionen, -substitutionen, -deletionen und -abänderungen, die den Polypeptidcharakter relativ zum Ausgangszeptid im Wesentlichen nicht beeinflussen.

[0044] Expressionskontrollsequenz: Eine DNA-Sequenz von Nukleotiden, die die Expression von Strukturgenen kontrolliert und reguliert, wenn sie mit diesen Genen operativ verknüpft sind.

[0045] Exon: Eine benachbarte DNA-Region, die für einen Abschnitt eines Polypeptids kodiert. Die Bezugnahme auf irgendein Exon, z.B. "DNA-Sequenz des Exons 6" bezieht sich auf das ganze Exon oder irgendeinen Abschnitt davon.

[0046] Freies IgE oder Serum-IgE: Im Kreislauf eines Patienten befindliches IgE, das nicht mit einem nativen oder verabreichten Rezeptor, der eine Affinität für IgE oder andere IgE-Moleküle aufweist, komplexiert oder gebunden ist.

[0047] Genom: Die gesamte DNA einer Substanz. Es schließt neben anderen Dingen die Strukturgene ein, die für die Polypeptide der Substanz als auch den Operator, Promoter oder die ribosomalen Bindungs- und Wechselwirkungssequenzen, wie zum Beispiel die Shine-Dalgarno-Sequenzen, kodieren.

[0048] Spezifische Bindung: Binden einer Substanz an eine andere mit größerer Bindungsaffinität als die Hintergrundbindung. Zwei Substanzen, die eine spezifische Bindung ausüben, werden als spezifische Bindungspartner oder als ein spezifisches Bindungspaar bezeichnet. Ein Antikörper und sein Antigen sind ein Beispiel für ein spezifisches Bindungspaar.

[0049] Strukturgen: Eine DNA-Sequenz, die durch ihre Matrize oder messenger-RNA ("mRNA") für eine Sequenz von Aminosäuren kodiert, die für ein spezifisches Polypeptid charakteristisch sind.

[0050] Therapeutische Menge: Eine "therapeutische Menge" ist die Menge eines mAb, die Serum-IgE-Niveaus verringert, oder die IgE Herstellung oder Aktivität in dem behandelten Tier supprimiert und die Wirkung hat Symptome einer Erkrankung oder eines physiologischen Zustandes zu lindern oder ihnen vorzubeugen.

[0051] Gesamt-IgE: Mit "Gesamt-IgE" ist das gesamte Serum-IgE gemeint, ob durch ein anderes Molekül gebunden oder nicht.

[0052] Wie hierin offenbart wurde ein neuer chimärer kaniner Anti-IgE mAb erzeugt und an mit Traubenkraut ("Ragweed") sensibilisierte Hunde verabreicht. Dieses chimäre Molekül, das als c15A.2 bezeichnet wird, besteht aus kaninen konstanten schweren und leichten Domänen, das mit schweren und leichten variablen Bereichen aus Mäusen fusioniert wurde. In allen Fällen führte das Verabreichen zu einer fortwährenden Verringerung der freien IgE-Niveaus im Kreislauf unter das detektierbare Niveau. Zusätzlich wurde das Gesamt-IgE, einschließlich dem, das mit chimären 15A.2 komplexiert war und sich immer noch im Kreislauf befand und sofort nach der Verabreichung von c15A.2 detektierbar war, über die Zeit verringert. Nach 28 Tagen der Verabreichung war freies c15A.2 im Serum detektierbar, jedoch waren sowohl freies als auch das gesamte IgE aus dem Serum nicht detektierbar. Die Verwendung eines humanisierten anti-IgE monoklonalen Antikörpers als therapeutisches Agens für humane Allergien war im U.S. Patent Nr. 5,593,861 von Maeda et al. offenbart. Es wird geglaubt, dass das Entfernen von IgE durch Verabreichen von rekombinantem Anti-IgE mAb in Hunden

bisher nicht gezeigt worden ist. Der Fachmann wird feststellen, dass die vorliegende Erfindung und die Diskussion hierin, die den mAb betreffen, gleichermaßen auf Rezeptoren anwendbar ist, die Teile von Antikörpermolekülen umfassen. Daher ist mit der hierin gegebenen Diskussion beabsichtigt auf Zusammensetzungen von Rezeptoren und nicht nur auf Antikörper Bezug zu nehmen.

[0053] Die kaninen anti-IgE mAb Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können rekombinante oder chimäre Strukturen von Kaninen und Mäuseimmunoglobulinen sein. Die Moleküle können Chimären umfassen, die aus konstanten schweren und leichten Domänen des kaninen IgE's und schweren und leichten variablen Bereichsdomänen von murinem Immunoglobulin, die eine Affinität für das Exon 3 des kaninen IgE's aufweisen, erzeugt wurden.

[0054] Die hierin verwendeten Begriffe anti-kaniner IgE mAb, chimärer mAb, rekombinanter mAb und Rezeptor umfassen irgendeine und alle konservative Varianten davon und werden als im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung liegend erachtet.

[0055] Es ist ein Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass das Verabreichen des chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptor's im Verfahren zum Behandeln von kaninen Allergien nützlich ist. Es ist auch ein Merkmal der Erfindung, dass das Verabreichen von Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung die Serum IgE Niveaus in Kaninen verringert.

[0056] Die chimären kaninen anti-IgE mAb's und Rezeptoren der vorliegenden Erfindung können die Wechselwirkung zwischen IgE und seinen Rezeptoren zerstören oder blockieren. Im Allgemeinen ist die Interferenz zwischen IgE und seinen Rezeptoren unabhängig vom Typ des Allergens, das allergische Symptome verursacht oder wahrscheinlich verursacht.

[0057] In Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können chimäre kanine anti-IgE mAb's und Rezeptoren der vorliegenden Erfindung durch Blockieren der Bindung von IgE an seine Rezeptoren auf Mastzellen oder Basophilen, durch Blockieren der Bindungsstelle an IgE-Molekülen oder anderweitig durch stören der Bindung von IgE mit seinen Rezeptoren wirken. Die chimären kaninen anti-IgE mAb's und Rezeptoren der vorliegenden Erfindung können auch durch das Binden löslichen IgE's im Plasma wirken, wobei der Komplex dann aus dem Kreislauf durch die körpereigenen normalen Mechanismen entfernt wird. In anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können die chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptoren durch Binden von IgE an B-Zellen und Eliminieren von klonalen Populationen von IgE+ B-Zellen wirken. Die chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptoren der vorliegenden Erfindung können auch durch Inhibieren der IgE-Produktion wirken. Obwohl nicht gewünscht wird durch irgendeine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird geglaubt, dass der mAb oder der Rezeptor an B-Zellen binden kann und ein Vernetzungsereignis induzieren kann, das die Apoptose von Zellen induzieren kann oder zu inhibitorischen Signalen führen kann, die die IgE-Synthese herabregulieren und eliminieren. Zusätzlich kann das Binden von IgE aus dem Serum, das freies IgE ist, es einem anderen regulatorischen Molekül, das normalerweise IgE aus dem Serum im Exon 3 Bereich bindet, ermöglichen IgE auf der B-Zelle zu binden und nachfolgend durch negative Signale, die von einer solchen Bindung verursacht werden oder damit in Zusammenhang stehen, die IgE-Synthese zu bewirken.

[0058] In einer anderen Ausführungsform können die chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptoren der vorliegenden Erfindung mit schweren Kettensequenzen des IgG's formuliert werden oder diese umfassen, um die Halbwertszeit der Moleküle in vivo zu erhöhen oder ihre Aktivität zu steigern.

[0059] Das Verfahren zum Behandeln von Hunden, die unter allergischen Symptomen leiden oder das Verhindern von allergischen Symptomen bei Hunden kann im Allgemeinen das Verabreichen einer therapeutischen Menge eines chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptor's an die behandelten Tiere umfassen. Präzise Dosierungen von chimärem kaninen anti-IgE mAb oder Rezeptor und Verabreichungsparametern werden auf eine Art und Weise etabliert, die mit der übereinstimmt, die dem Fachmann bekannt sind. Dies kann das Berücksichtigen eines oder mehrerer der folgenden Faktoren einschließen, obwohl diese Liste nur als Beispiel gedacht ist und andere Parameter, die dem Fachmann bekannt sind oder diesem bekannt werden könnten, ausschließen sollen: Die Gegenwart oder Schwere der allergischen Symptome, die Hundart, der Zustand des individuellen Patienten, die Verabreichungsart, das Verfahren und die Länge der Verabreichung und andere Faktoren, die dem Fachmann bekannt sind oder diesen in der Zukunft bekannt werden.

[0060] Vergleichsweise kann die Dosierung des chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptors, der verabreicht wird, von der Betrachtung der Eigenschaften der verwendeten schweren Kettenisotope des IgE und anderer Faktoren abhängen. Zum Beispiel können diese Betrachtungen die Bindungsaktivität und in vivo Plas-

mahalbwerthszeit, die Konzentration des chimären kaninen anti-IgE mAb's oder des Rezeptors in der Formulierung, den Verabreichungsweg, die Art und Rate der Dosierung, und die klinische Toleranz des involvierten Patienten einschließen. Diese Liste soll keine begrenzende Funktion haben und der Fachmann wird erkennen, dass andere Faktoren ebenfalls zur Berücksichtigung relevant und vorteilhaft sein können.

[0061] Die therapeutische Menge des derzeitigen chimären kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptors kann in Dosierungen und über einen Zeitraum verabreicht werden, die zum Lindern oder Supprimieren allergischer Symptome und/oder zum Verringern der Serum-IgE Niveaus und/oder Supprimieren der IgE Herstellung oder Aktivität ausreichend ist.

[0062] Im Allgemeinen kann die Formulierung der vorliegenden Erfindung andere Bestandteile in Mengen enthalten, die nicht mit der Herstellung von stabilen und wirksamen Formen des kaninen anti-IgE mAb's oder Rezeptors interferieren. Alle zusätzlichen Bestandteile, die mit dem chimären kaninen anti-IgE mAb oder Rezeptor verabreicht werden, können in Mengen vorhanden sein, die für die wirksame, sichere pharmazeutische Verabreichung geeignet sind. Pharmazeutische Hilfsstoffe, die dem Fachmann bekannt sind, können einen Teil der entsprechenden Zusammensetzungen bilden. Zum Beispiel können solche Hilfsstoffe Salz und andere parenterale Lösungen, Puffer und Stabilisatoren als auch eines der vielen verschiedenen geeigneten Bulkmittel, Pufferagenzien, Antioxydantien, Verschnittmittel und andere Bestandteile, die dem Fachmann für das mit Aufnehmen als vorteilhaft bekannt sind, einschließen. In einer bevorzugten Ausführungsform kann der kanine Anti-IgE mAb oder Rezeptor als eine Lösung von Proteinen in sterilem PBS formuliert werden.

[0063] Der chimäre kanine anti-IgE mAb oder Rezeptor der vorliegenden Erfindung kann auf eine Art verabreicht werden, die für das Zerstören, Blockieren oder sonstige Interferieren mit der Bindung zwischen IgE und seinem Rezeptor oder auf eine Art, die die Bindung zwischen dem verabreichten mAb oder Rezeptor und IgE erhöht, wirksam ist. Diese Verfahren werden für den Fachmann offensichtlich sein. In bevorzugten Ausführungsformen kann der kanine anti-IgE mAb oder Rezeptor subkutan, intramuskulär oder intravenös verabreicht werden. Alternativ dazu kann der mAb oder Rezeptor über Suspensionen, Tabletten, Kapseln oder Zäpfchen für die orale, rektale oder vaginale Verabreichung formuliert werden.

[0064] Die folgenden Beispiele illustrieren weiter das Klonieren, Exprimieren und Reinigen des 15A.2 mAbs und sind nicht zur Begrenzung gedacht.

Beispiel I: Klonieren des variablen Bereich des 15A.2 von der Maus

[0065] Der variable Bereich des 15A.2 von der Maus wurde durch RT-PCR von 15A.2 Hybridomazellen kloniert. Ein kommerziell erhältliches Kit (Novagen, Madison, WI, Ig-Prime Kit), das aus einem Satz von degenerierten PCR-Primern für die reverse Transkription und Amplifikation von IgVh und IgV1 mRNA's von Mäusehybridomazelllinien besteht, wurde als Quelle für Primer verwendet, um die 15A.2 mRNA's, die für die leichten und schweren variablen Domänen kodieren, zu klonieren. Die 5' und 3'-Primer für die IgVh-Domäne waren MulgVh5'-B bzw. MulgMvh3'-1. MulgVh5'-B ist eine Mischung aus zwei Primern in einem Röhrchen (bereitgestellt von Novagen), mit den Sequenzen

GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT (SEQ. ID NO: 1) und
ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCT (SEQ. ID NO: 2)

MulgMvh3'-1 hat die Sequenz

CCCAAGCTTACGAGGGGAAGACATTTGGGAA (SEQ ID NO: 3)

Die 5' und 3'-Primer der IgV1-Domäne waren MulgλV15'-A bzw. MulgλV13'-1. Die mRNA, die für die 15A.2 IgVh und IgV1 variablen Domänen kodieren, wurde revers transkribiert, amplifiziert und kloniert. Mulg(lambda)V15'-A hat die Sequenz

GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT (SEQ ID NO: 4)

Mulg(lambda)V13'-1 hat die Sequenz

CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGGAIGGYGGRAA (SEQ ID NO: 5)

[0066] Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

	Enzym:	Taq-Polymerase	
1)	94 °C	20 Sekunden	35 Zyklen
	60 °C	58 Sekunden	
	72 °C	20 Sekunden	
2)	4 °C	Lagerung	

[0067] Geeignete Klone der variablen Domänen von 15A.2 IgVh und IgV1 wurden unter Verwendung von Restriktionsendonukleaseanalysen und DNA-Sequenzanalysen identifiziert. Der Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit bekannten Mäuse IgVh- und IgV1-Genen bestätigte, dass sie für die variablen Domänen eines monoklonalen Antikörpers von der Maus kodieren.

Beispiel II: Klonieren von konstanten Bereich des kaninen IgG

[0068] Die leichten und schweren konstanten Bereiche von kaninen Immunoglobulinen wurden durch RT-PCR aus Hundelymphozytenzellen kloniert. PCR-Primer, die auf der Sequenz der konstanten Domäne von kaninem IgG aufbauten, wurden für die reverse Transkription und PCR-Amplifikation von mRNA, die für die konstanten Domänen von Immunoglobulinen (offenbart im U.S. Patent Nr. 5,593,861 von Maeda et al.) kodieren, verwendet. Die PCR-Reaktion war die gleiche wie weiter oben aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden kloniert und einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Geeignete Klone der konstanten Domänen von Immunoglobulinen wurden unter Verwendung von Restriktionsendonukleaseanalysen und DNA-Sequenzanalysen identifiziert. Der Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit bekannten Immunoglobulingenen bestätigte, dass sie für die konstanten Domänen eines kaninen Immunoglobulins kodieren.

Beispiel III: Klonieren von Vollängen Maus/Kanin chimäre 15A.2

[0069] Das herkömmliche Verfahren zum Herstellen von chimären monoklonalen Antikörpern wurde verwendet, um Vollängen Maus/Kanin chimäre 15A.2 monoklonale Antikörpergene herzustellen. Die Sequenz, die für den variablen Bereich des 15A.2 der Maus kodiert, und die kanine Sequenz, die für den konstanten Bereich kodiert, wurden mittels PCR miteinander verknüpft und kloniert. Nach dem Verifizieren der chimären Gene durch DNA-Sequenzanalysen wurde ein geeignetes Gen einer leichten Kette vom chimären Maus/Kanin 15A.2 und ein Gen einer schweren Kette vom chimären Maus/Kanin 15A.2 für die Expression und Proteinproduktion des chimären Proteins ausgewählt.

Identifikation funktionaler Klone

[0070] Funktionale Klone der schweren und leichten Kette von chimärem 15A.2 wurden unter Verwendung eines COS-zelltransienten Expressionssystems identifiziert. Die Volllänge der schweren Kette und die Volllänge der leichten Kette wurden stromabwärts in korrekter Orientierung des CMV-Promotors auf den pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert. Die Immunoglobulinführungssignale auf den Proteinen würden bei den Proteinen dazu führen, dass diese aus den Zellen in den Kulturüberstand sekretiert werden. Die Kotransfektion beider DNA's in COS-Zellen ermöglicht die transiente Genexpression, Proteinproduktion und Zusammensetzung funktionaler chimärer Antikörper in der Zelle. IgE bindendes ELISA und ein anti-kanines IgG ELISA wurden verwendet, um die funktionale Antikörperaktivität in Zellkulturüberständen zu detektieren. Die Klone, die die beste Bindungsaktivität ergaben, wurden verwendet, um Vektoren für die chimäre monoklonale Antikörperproduktion in einem Bakulovirus-Expressionssystem zu konstruieren. Die Sequenzen sowohl für die schwere Kette als auch für die leichte Kette werden wie folgt dargestellt:

ATGAAATGGA GCTGGGTTTT TCTCTTCTC CTGTCAGTAA
 CTGCGGGTGT GTTCTCTQAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG
 ACCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GAAGATATCC
 TGCAAGGCTT CTGOTTACTC ATTTACTQAC TACTTTATGA
 ACTGGGTGAT GCAGAGCCAT GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT
 TGGTCGTATT AATCCTTTCA ATGGTGATCC TTTCTACAAC
 CAGAAGTTCA AGGGCAAGGC CACATTGACT GTAGACAAAT
 CCTCTAGCAG AGCCACATG GAGCTCCGGA GCCTGGCATC
 TGAGGACTCT GCAGTCTATT ATTGTGCAAG ATTCTACTAC
 GGACGTTACT ATGCTATGGA CTACTGGGGT CAAGGAACCT
 CAGTCACCGT CTCCTCAGCC TCCACCACGG CCCCCTCGGT
 TTTCCCACTG GACCCACGCT GCGGGTCCAC TTCCGGCTCC

ACGGTGGCCC TGGCCTGCCT GGTGTCAGGC TACTTCCCCG
 AGCCTGTAAC TGTGTCCTGG AATTCCGGCT CCTTGACCAQ
 CGGTGTGCAC ACCTTCCCGT CCGACCTGCA GTCCTCAGGG
 CTCTACTCCC TCAGCAGCAT GGTGACAGTG CCCTCCAGCA
 GGTGGTCCAG CGAGACCTTC ACCTGCAACG TGGCCCACCC
 GGCCAGCAAA ACTAAAGTAG ACAAGCCAGT GCCCAAAGA
 GAAAATGGAA GAGTTCCTCG CCCACCTGAT TGTCCCAAAT
 GCCCAGCCCC TGAATGCTG GGAGGGCCTT CCGTCTTCAT
 CTTTCCCCCG AAACCCAAGG ACACCCTCTT GATTGCCCGA
 ACACCTGAGG TCACATGTGT GGTGGTGGAT CTGGGACCAG
 AAGACCCTGA GGTGCAGATC AGCTGGTTCC TGGACGGTAA
 GCAGATGCAA ACAGCCAAGA CTCAGCCTCG TGAGGAGCAG
 TTCAATGGCA CCTACCOTGT GGTCAGTGTC CTCCCCATTG
 GGCACCAGGA CTGGCTCAAG GGAAGCAAGT TCACGTGCAA
 AGTCAACAAC AAAGCCCTCC CATCCCCGAT CGAGAGGACC
 ATCTCCAAGG CCAGAGGGCA GGCCCATCAG CCCAGTGTGT
 ATGTCCTGCC GCCATCCCGG GAGGAGTTQA GCAAGAACAC
 AGTCAGCTTG ACATGCCTGA TCAAAGACTT CTTCCCACCT
 GACATTGATG TGGAGTGGCA GAGCAATGGA CAGCAGGAGC
 CTGAGAGCAA GTACCGCACG ACCCCGCCCC AGCTGGACGA
 GGACGGGTCC TACTTCCTGT ACAGCAAGCT CTCTGTGGAC
 AAGAGCCGCT GGCAOCGGGG AOCACCTTC ATATGTGCGG
 TGATGCATGA AGCTCTACAC CACAGAAATC CCTCTCCCAT
 TCTCCGGGTA AATGA

Chimäre DNA-Sequenz der leichten Kette von 15A.2 (SEQ ID NO: 7)

ATGGCCTGGA TTCTACTCTT ATTCTCTCTC CTGGCTCTCA
 GCTCAGGGGC CATTCCCAG GCTGTTGTGA CTCAGGAATC
 TGCACTCACC ACATCACCTG GTGAAACAGT CACACTCACT
 TGTCGCTCAA GTACTGGGGC TGTTACAACT AGTAACTATG
 CCAACTGGGT CCAAGAAAAA CCAGATCATT TATTCCTGG
 TCTAATAGGT GGTCCCAACA ACCGAGCTCC AGGTGTTCTT
 GCCAGATTCT CAGGCTCCCT GATTGGAGAC AAGGCTGCCC
 TCACCATCAC AGGGGCACAG ACTGAGGATG AGGCAATATA
 TTTCTGTGCT CTATGGTACA GCAACCATTG GGTGTTCGGT
 GGAGGAACCA AACTGACTGT CCTAGGCCAG CCCAAGGCCT
 CCCCCTCGGT CACACTCTTC CCGCCCTCCT CTGAGGAGCT
 CGGCGCCAAC AAGGCCACCC TGGTGTGCCT CATCAGCGAC
 TTCTACCCCA GCGGCGTGAC GGTGGCCTGG AAGGCAAGCG
 GCAGCCCCGT CACCCAGGGC GTGGAAGACCA CCAAGCCCTC
 CAAGCAGAGC AACAAACAAGT ACGCGGCCAG CAGCTACCTG
 AGCCTGACGC CTGACAAGTG GAAATCTCAC AGCAGCTTCA
 GCTGCCTGGT CACGCACGAG GGOAGCACCG TGGAGAAGAA
 GGTGGCCCCC GCAGAGTGCT CTTAG

Beispiel IV: Expression von chimärem 15A.2 in Insektenzellen

[0071] Ein Bakulovirusexpressionssystem wurde für die Produktion des chimären Maus/Kanin 15A.2 monoklonalen Antikörpers im größeren Maßstab verwendet. Die Bakulovirusexpression ist eine übliche Technik und die Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt. Die DNA der schweren Kette von 15A.2 wurde in den Pharmingen's (San Diego, CA) pAc LIC Bakulovirusübertragungsvektor für die Rekombination in Bakuloviren kloniert. Die DNA der leichten Kette des chimären 15A.2 wurde in den Pharmingen's pAcHis NT-A™ Bakulovirusübertragungsvektor für die Rekombination in Bakuloviren kloniert. Rekombination und Amplifikation beider Viruskonstrukte wurde in Insekten sf-9-Zellen amplifiziert. Das chimäre 15A.2 wurde unter Verwendung von Insekten High Five-Zellen exprimiert. Die Infektionsbedingungen waren die folgenden:

Hi Five-Zellendichte für die Infektion:	1,5 × 10 ⁶ /ml
MOI für die Virusinfektion mit der schweren Kette:	10
MOI für die Virusinfektion mit der leichten Kette:	3
Zeit für die Proteinexpression:	72 Stunden

15A.2 wurde exprimiert und in das Zellkulturmedium sekretiert.

Reinigung des chimären 15A.2 Proteins

[0072] Das allgemeine Reinigungsschema war das Folgende:

1. Zellklärung:

[0073] Der Zellkulturüberstand, der das 15A.2 Protein enthielt, wurde 72 Stunden nach der Infektion gewonnen. Der Überstand wurde durch Millipore's (Bedford, MA) MILLIGUARD™ – Kassettenfiltrationssystem für die Zellklärung gefiltert. Andere Filtrationssysteme, die eine Porengröße von 0,2 µm aufweisen, die hoch kapazi-

tive Filter mit niedriger Proteinbindung sind und in der Lage sind hohen Drücken zu widerstehen, sind ebenfalls geeignet. Der geklärte Überstand wurde dann für die Säulenchromatographie aufkonzentriert.

2. Protein A Säulenchromatographie:

[0074] Die konzentrierte Probe wurde auf eine Protein A Säule geladen und mit PBS-Puffer äquilibriert. Das 15A.2 Protein wurde mittels eines pH-Gradienten eluiert, der durch Mischen von 4% Glycerol, PBS, pH 7,2 und 4% Glycerol, 25 mM Natriumcitratpuffer, pH 2,5 erzeugt wurde. Das Protein wurde bei etwa pH 4 eluiert.

3. Ionenaustausch Säulenchromatographie:

[0075] Das Protein A gereinigte 15A.2 wurde auf die Q Sepharose™ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Säule geladen, und mit 4% Glycerol, PBS, pH 7,2 äquilibriert, um kontaminierte Proteine, DNA, RNA, Viren etc. zu entfernen. ein vergleichbares Ionenaustauschharz zum Entfernen von DNA, RNA, Endotoxinen und anderen negativ geladenen Materialien von gereinigten Proteinen wurden ebenfalls verwendet. Der Durchfluss wurde gesammelt.

4. Sterilisierung:

[0076] Das Q Durchfluss 15A.2 wurde aufkonzentriert und durch Filtern durch eine 0,2 µm Filtereinheit sterilisiert. Die letztendliche Pufferzusammensetzung ist die folgende:

0,7 × PBS

6,5 mM Natriumcitrat

4% Glycerol

pH: ~7, 0

[0077] Das Protein hat mindestens eine Reinheit von 95%, die durch SDS-PAGE Proteingel angegeben wurde, und wurde bei -80°C für die weitere Verwendung gelagert.

Beispiel V: Rekombinanter kaniner Anti-IgE mAb (c15A.2): Wirkungen auf die IgE Aktivität in vitro und in vivo

[0078] Das gemäß Beispiel V erhaltene gereinigte c15A.2 wurde auf seine Fähigkeit getestet, die Bindung des kaninen IgE an den kaninen IgE Rezeptor in vitro ([Fig. 1](#)) zu verhindern. Die zum Neutralisieren von IgE im Serum von drei Hunden, die mit 2002, 2003 und 2103 bezeichnet wurden, erforderliche Menge von c15A.2 wurde durch das Serumneutralisierungsassay bestimmt und wird in [Fig. 8](#) dargestellt. Der zeitliche Verlauf und die Ereignisse des 40-tägigen experimentellen Zeitraums werden in den [Fig. 2a](#) und [2b](#) zusammengefasst. Die Hunde wurden bei der Geburt am Lovelace Respiratory Research Institute (Albuquerque, MNM) gegenüber Traubenkraut sensibilisiert und in Studien zum Testen der Wirksamkeit, die durch die Fähigkeit eines Hundes eine subkutane Hautreaktion nach der Verabreichung eines Allergens zu entwickeln, abgeschätzt wird, verwendet.

[0079] Das c15A.2 wurde den Hunden 2002, 2003 und 2103 alle fünf Tage für acht aufeinander folgende Behandlungen verabreicht. Die Menge des verabreichten c15A.2 in der ersten Behandlung entsprach 10-fachen Konzentration der messbaren Konzentration an freiem Serum-IgE drei Tagen vor dem Beginn der Verabreichung. Die Dosen 1 und 2 erhielten die 10-fache freie Serum-IgE Konzentration. Alle nachfolgenden Dosierungen wurden auf 5-fache freie Serum IgE-Konzentration eingestellt. Der Testgegenstand wurde in sterilem PBS bei der Konzentration, die für das Zuführen des 10-fachen oder 5-fachen der Serum IgE-Konzentration durch intravenöse Infusion über eine 30-minütige Periode erforderlich ist, verdünnt.

[0080] [Fig. 2A-1](#) bis [Fig. 2A-3](#) folgt dem Niveau des freien und gesamten Serum-IgE's in jedem Hund gegen die Zeit, basierend auf der Dosierung des verabreichten c15A.2 mAb. Zusätzlich wurde c15A.2 dann alle fünf Tage für insgesamt 40 aufeinander folgende Tage verabreicht. Serum-IgE-Niveaus werden durch Standard ELISA-Techniken untersucht, die dem Fachmann gut bekannt sind. IgE-Niveaus werden in der ELISA-Technik bei etwa unter 1 ng/ml im Allgemeinen als undetektierbar erachtet.

[0081] [Fig. 2A-1](#) bis [Fig. 2A-3](#) zeigen auch, dass freies IgE in den Versuchshunden innerhalb von 60 Minuten auf undetektierbare Niveaus abfiel und sich während der gesamten 40-tägigen Behandlungsperiode nicht wieder erhob. Die Niveaus an freiem Serum-IgE in den Versuchshunden 1101 und 1102, die nur Salzlösung erhielten, veränderten sich nicht signifikant während dieses Zeitraums ([Fig. 2B-1](#) bis [Fig. 2B-2](#)). Das in diesem Experiment verwendete Assay stammt aus einem ELISA Festphaseneinfangreaktion mit einem 15A.2 Antikör-

per von der Maus und Detektion mit einem anderen HRPO-konjugierten mAb, 14K.2, der das Exon 4 des kaninen IgE erkennt. Das Assay detektiert das gesamte Serum IgE, das nicht an c15A.2 gebunden ist.

[0082] Das durch c15A.2 gebundene Gesamt-IgE fiel in den Versuchshunden langsamer ab als das freie IgE, wahrscheinlich weil es wieder in den Kreislauf gelangte und letztendlich aus dem Kreislauf entfernt wurde. Das hier verwendete Assay bestand aus einer ELISA-Einfangreaktion mit dem mAb 14K.2 und der Detektion mit einem anderen anti-kaninen IgE mAb, der durch c15A.2 nicht an der Bindung gehindert wird. In den Hunden 2003 und 2103 blieb das freie und das gesamte Serum-IgE in Assays für mehr als 60 Tage nach der letzten Verabreichungsdosis von rekombinantem Antikörper undetektierbar. Im Hund 2002 war 30 Tage nach Beendigung der Verabreichung des chimären Antikörpers freies Serum-IgE mit etwa 20 ng/ml detektierbar und verblieb auf diesem Niveau für die restlichen 30 Tage der Beobachtung.

[0083] Diese Daten zeigen die Wirkungen eines rekombinanten Antikörpers auf die vorliegende Erfindung: (1) Entfernen von im Kreislauf befindlichem IgE aus dem Serum; (2) Bereitstellen eines Verfahrens zum Beeinflussen des Prozesses durch das IgE wieder aufgefüllt wird. Diese Ergebnisse sind überraschend, wenn man bedenkt, dass bei Serum-IgE bekannt ist, dass es eine kurze Halbwertszeit hat, vermutlich in einer Größenordnung von etwa 2 Tagen, und dass rekombinante oder chimäre Moleküle ebenfalls relativ kurze Halbwertszeiten in vivo zeigen. Bei unbehandelten Tieren nimmt man an, dass sich im Kreislauf befindliches Serum IgE alle 4 bis 5 Tage erneuert, wohingegen nach der Verabreichung eines kaninen anti-IgE mAb's 15A.2 der vorliegenden Erfindung 18 Tage nach der Verabreichung des chimären Antikörpers die Serum-IgE Niveaus unterhalb der detektierbaren Mengen supprimiert blieben.

Beispiel VI: Entfernen des c15A.2

[0084] Die Anwesenheit von freiem chimären 15A.2 im Serum der Hunde 2002, 2003 und 2103 wurde mittels eines ELISA unter Verwendung einer rekombinanten kaninen IgE Festphase und der Detektion mit einem polyklonalen anti-kaninen IgE Konjugat von der Ziege bestimmt. [Fig. 3](#) zeigt, dass die Niveaus von c15A.2 im Serum mit dem Beginn und dem Ende jedes 5-tägigen Verabreichungszeitraums fortwährend ansteigen und fallen. Freies c15A.2 ist im Serum von Versuchshunden 24 Tage nach der Infusion immer noch detektierbar (X µg/ml).

[0085] Die Immunkomplexe von c15A.2 und kaninem IgE wurden durch einen ELISA auf einer 14K.2 Festphase gemessen und durch ein polykloales anti-Hunde IgGfc-Konjugat detektiert. Diese in [Fig. 4](#) zusammengefassten Daten zeigen, dass komplexiertes IgE in hoher Konzentration zu einem frühen Zeitpunkt im Behandlungszyklus detektiert wurde, dass jedoch das Niveau der Komplexe fortwährend abfällt. Am 28 Tag wurden in den Hunden, die c15A.2 erhielten, keine Immunkomplexe gemessen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Komplexe aus dem Pool des Kreislaufsystems für Serumimmunoglobulin entfernt wurden, und dass die Synthese von neuen IgE in diesem Zeitrahmen verringert oder eliminiert wurde. Es wurden keine Veränderungen bei den Versuchshunden beobachtet. Es wurde keine Immunantwort auf den chimären monoklonalen Antikörper c15A.2 in den Hunden 2003 und 2103 beobachtet. Nach 28 Tagen der primären Infusion wurde eine Immunantwort auf den Testgegenstand im Hund 2002 beobachtet. Die Daten in [Fig. 5](#) zeigen, dass diese Reaktion zunimmt, wenn mehr chimäres 15A.2 verabreicht wird und kann eine Rolle bei der kürzeren Serumhalbwertszeit des c15A.2 im Hund 2002 ([Fig. 3](#)) spielen.

Beispiel VII: Wirkung auf das Expressionsniveau des hoch affinen IgE-Rezeptors auf Basophile nach der Verabreichung von kaninem Anti-IgE mAb 15A.2 (c15A.2)

[0086] Am fünften Tag, 14. Tag und 29. Tag nach dem Beginn der c15A.2 Verabreichung wurden 10 ml Gesamtblut entnommen. Halb gereinigte Populationen peripherer Blutleukozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation hergestellt und mit Reagenzien für die zweidimensionale Durchflusszytometrie-analyse angefärbt. Die in diesen Experimenten verwendeten Reagenzien waren der FITC-konjugierte, anti-kanine, hoch affine IgE-Rezeptor mAb 9L.4 und PE-konjugierter 14K.2. Die Zellendoppelfärbung für diese Antikörper und die Residenten im Quadranten vier (oberer rechter Quadrant) des Dotplot-Diagramms in [Fig. 6](#) sind Basophile.

[0087] Die Daten in [Fig. 6](#) sind für den Hund 2002 und sind repräsentativ. Die Anzahl von doppelgefärbten Zellen im Quadranten verringert sich über den Zeitraum der Verabreichung von c15A.2. Die Daten legen nahe, dass das Expressionsniveau der hoch affinen IgE-Rezeptoren in Basophilen nach 29 Tagen der Verabreichung von c15A.2 beim Versuchshund 2002 um über 90% verringert wird. Das Eliminieren von Serum-IgE über die Zeit führt zu einer Verringerung der Expression der Rezeptoren für IgE auf Basophilen und könnte eine vergleichbare Reaktion in Hautmastzellen widerspiegeln. Eine verringerte Mastzellenexpression für hoch affine

IgE-Rezeptoren wird zu einer Verringerung oder Eliminierung der Hauttestreaktivität gegenüber Allergen führen.

Beispiel VIII: Wirkung der Traubenkraut Hauttestreaktivität bei Verabreichung von kaninem Anti-IgE mAb 15A.2

[0088] Mit Traubenkraut sensibilisierten Hunden wurde eine 0,5% Lösung von Evans Blue Dye in PBS bei 0,2 ml/kg infusiert und dann 10 Minuten später mit dem Allergen konfrontiert. Fünf und 10-fache Verdünnungsreihen des Traubenkraut Allergens in PBS, das bei 1000 PMU/ml beginnt, wurden hergestellt und 100 µl davon subkutan in den rasierten Abschnitt des Torsos injiziert. Die Salzlösung (PBS) diente als Negativkontrolle und Histamin (100 µl einer 0,275 µg/ml Verdünnung von Histamin in PBS) diente als Positivkontrolle. Die Reaktivität wurde 10 Minuten später im Vergleich zur Histaminkontrolle als Anschwellen und blaue Farbstoffdiffusion in der Haut gemessen. Eine Bewertung von Zwei wurde für eine Allergenverdünnung vergeben, bei der die Reaktion in Größe und Farbe zur Histaminreaktion äquivalent war. Eine Bewertung von Eins wurde vergeben für eine Reaktion, die der Hälfte der Reaktion bei der Histaminkontrolle entsprach und eine Bewertung von Null wurde vergeben, wenn die Reaktion äquivalent zur Negativkontrolle mit der Salzlösung war. Es wurde die Haut von drei Versuchs-, 2002, 2003 und 2103 und zwei Kontroll-, 1101 und 1102, Hunden getestet, wie weiter oben beschrieben, eine Woche vor der Verabreichung von c15A.2 und dann 3 Tage und 7 Tage nach der letzten Verabreichung. [Fig. 7A–B](#) zeigen, dass in den Kontrollhunden die Hautreaktion gegenüber dem Traubenkrautallergen über den Verlauf der gesamten Studie vergleichbar war. Beim Kontrollhund 1102 verstärkte sich die Traubenkraut Hautreaktion im Verlaufe der Zeit. Bei den Versuchshunden 2003 und 2103 war die Traubenkraut Sensibilisierung nach der Verabreichung von c15A.2 über 40 Tage für wenigstens 7 Tage vollständig verschwunden. Nur der Hund 2002 zeigte irgendeine Traubenkraut Sensibilisierung bei der höchsten Traubenkraut Konzentration am dritten Tag nach der Infusion und für diese Reaktion wurde aufgrund der Verteilung des Farbstoffs eine Bewertung von 1 vergeben. Es hatte nicht die charakteristische Schwellung, die bei einer Einswertung für die Kontrollhunde beobachtet und aufgenommen wurde. Am 7 Tag nach der Infusion wurde für den Hund 2002 eine Reaktionswertung von 1 für die Spots mit 1000 PMU/ml, 100 PMU/ml und 10 PMU/ml vergeben. Es gab wiederum nur eine Farbverteilung und keine Schwellung. Aufgrund der Tatsache, dass der Hund 2002 kein detektierbares, freies oder Gesamt-IgE während dieser Hauttestperiode aufwies, scheint es wahrscheinlich, dass die Hautreaktionen, die beobachtet wurden, nicht die Folge der Querverknüpfung von IgE auf den Mastzellen hoch affiner IgE-Rezeptoren war. Sie können das Ergebnis einer anderen Hautreaktion gewesen sein, die mit dem Testverfahren in Zusammenhang steht.

Beispiel IX: Chimärer kaniner anti-IgE mAb, der für eine langanhaltende Stabilität im Serum entworfen wurde, Verlust der Immunogenität und der IgE+ B-Zellen Ansteuerungsfähigkeit

[0089] Der Fachmann wird erkennen, dass man den kaninen anti-IgE mAb der vorliegenden Erfindung auch in einer Form bereitstellen kann, die einen größeren Abschnitt des Moleküls aufweist als das Ig, das von der Hundesequenz stammt, und daher eine größere Serumstabilität aufweisen, an Immunogenität verlieren und wirksamer Ziel-IgE+ B-Zellen ansteuern sollte.

[0090] Daher wurde in einem anderen Beispiel ein chimärer kaniner anti-IgE mAb, der für eine langanhaltendere Stabilität im Serum und mit einem Unvermögen zur Induktion einer Immunreaktion entworfen wurde, einem Hund verabreicht. Dieser mAb bindet IgE im Serum und an IgE auf der Oberfläche von IgE-erzeugenden B-Zellen, jedoch nicht an IgE auf Mastzellen von Basophilen. Die IgE-Synthese wird konsequenterweise verringert oder eliminiert. Die sich daraus ergebenden verringerten IgE-Niveaus verursachen eine Verringerung bei der Mastzellen-IgE-Rezeptor-Expression und eine Verringerung in der damit in Verbindung stehenden allergischen Reaktivität.

Beispiel X: Rekombinanter kaniner IgE-Rezeptor, der mit cRclg bezeichnet wurde – Klonierung und Expression in Insektenzellen

[0091] Die Sequenz, von der man ausgeht, dass sie zumindest einen Teil der α-Untereinheit des kaninen IgE-Rezeptors entspricht, wird in der GENBANK-Datenbank unter der Zugangsnr. D16413 geführt.

[0092] Der cRclg-Rezeptor besteht aus der alpha-Domäne des Rezeptors, die IgE bindet, das mit den Exons 2 und 3 des kaninen IgE's verbunden ist. Die schweren Kettenabschnitte des IgE vom Rezeptor sind die gleichen wie die Exons 2 und 3 des c15A.2.

[0093] DNA, die für den chimären IgE-Rezeptor cRclg (SEQ ID NO: 8) kodiert, wurde unter Verwendung von Standardverfahren in einem Baculovirusgenom eingebracht. High Five-Insektenzellkulturen wurde mit Baculo-

virus-erzeugendem cRclg infiziert. Das cRclg-Protein wurde aus dem Zellkulturmedium durch Chromatographie auf Protein A gereinigt, anschließend wurden die kontaminierenden Proteine durch Ionenaustauschchromatographie entfernt. Die DNA-Sequenz des rekombinanten IgE-Rezeptors cRclg mit der entsprechenden Translation wird in **Fig. 10** (SEQ ID NO: 8 und 9) dargestellt.

[0094] Der in dieser Studie verwendete IgE-Rezeptor war ein rekombinanter chimärer Rezeptorkörper, genannt cRclg, der aus der löslichen hoch affinen IgE-Rezeptor alpha-Untereinheit bestand, die mit der kaninen IgG CH2- und CH3-Domäne fusioniert war. Die lösliche alpha-Untereinheit, der die Transmembrandomäne fehlt, wurde unter Verwendung der Information, die in GeneBank erhältlich ist, durch PCR kloniert. Die IgG CH2- und CH3-Domäne waren Teil der Sequenz von DE94, der durch das Chemo-Sero Patent beansprucht wird. Der lösliche Rezeptor von DE94 CH2/CH3 wurden durch PCR miteinander verbunden, um das Vollängen cRclg zu bilden.

[0095] Das Vollängen cRclg wurde in den PharMingen Baculovirus pAcHisTNA-Vektor kloniert. Der Virus wurde mittels sf-9-Zellen amplifiziert. Das cRclg-Protein wurde in einer Sekretionsform erzeugt und wurde in High Five-Zellen für 48 Stunden mit einer MOI (Vielzahl der Infektion) von 5 exprimiert. Das Protein wurde aufbauend auf der Bindung der CH2/CH3-Domäne an Protein A auf der Säule gereinigt. Das detaillierte Reinigungsschema ist das gleiche wie das für 15A.2, wie es im Beispiel IV dargestellt wird.

[0096] Das gereinigte cRclg wurde auf 2,9 mg/ml aufkonzentriert und durch Filtern durch eine 0,2 µm Filtereinheit sterilisiert. Die letztendliche Pufferzusammensetzung ist die folgende:

0,7 × PBS

6,5 mM Natriumcitrat

15% Glycerol

pH: etwa 7,0

[0097] Das Protein weist eine Reinheit von wenigstens 95% auf, wie es durch das SDS-PAGE Proteingel angezeigt wurde und wird bei -80°C für die weitere Verwendung gelagert.

Beispiel XI: Wirkung des rekombinanten kaninen IgE-Rezeptors auf die IgE-Aktivität in vitro und in vivo

[0098] Die Serum-IgE-Niveaus wurden wie zuvor bereits beschrieben durch einen ELISA bestimmt. Das gereinigte cRclg, wie nach Beispiel X erhalten, wurde auf seine Fähigkeit getestet die Bindung von kaninem IgE an den kaninen IgE-Rezeptor in vitro zu verhindern. Die Menge an erforderlichem cRclg zum Neutralisieren des Serum-IgE's wurde durch Titration von gereinigtem cRclg gegen das Hundeserum in vitro gemessen. Das gereinigte cRclg wurde dann durch I.V. Injektion als Bolus verabreicht.

[0099] Der rekombinante kanine IgE-Rezeptor cRclg wurde demnach intravenös als Bolus den Hunden 1001 und 1002 verabreicht. Diese Menge an cRclg war zum 10-fachen (141 mg, 7,08 ml mit 2 mg/ml bei Hund 2001) oder 20-fachen (220 mg; 11,04 ml mit 2 mg/ml bei Hund 1001) der Menge, die für die 50% Neutralisation der rekombinanten Rezeptorbindung in vitro erforderlich ist, äquivalent. Zusätzliches cRclg wurde dann bei einer Dosis von 5 ml mit 2 mg/ml als Bolus jedem Hund für fünf aufeinander folgende Tage, an den Tagen 13–17, verabreicht. **Fig. 9** folgt dem Niveau des freien Serum-IgE's in jedem Hund gegen die Zeit. In beiden Hunden kehrte IgE nach der anfänglichen Dosis von cRclg am Tag 0 schnell in das Kreislaufsystem zurück. Die Serum-IgE-Niveaus werden im Allgemeinen durch Standard-ELISA-Techniken, die dem Fachmann gut bekannt sind, untersucht. Man geht allgemein davon aus, dass IgE-Niveaus bei der unten beschriebenen ELISA-Technik bei weniger als etwa 1 ng/ml undetektierbar sind.

[0100] Beim Hund 1001 war das Serum-IgE durch das Assay für mehr als zwei Monate nach der letzten Dosis des rekombinanten IgE-Rezeptors undetektierbar. Beim Hund 1002 kehrten die Serum-IgE-Niveaus über einen Zeitraum von Tagen nach der letzten Verabreichung des rekombinanten Rezeptors auf detektierbare Niveaus zurück. Es sollte jedoch festgestellt werden, dass, obwohl die Serum-IgE-Niveaus sich im Hund 1002 erhöhten, sie jedoch nicht auf die erhöhten Niveaus zurückkehrten, die vor der Verabreichung des rekombinanten Rezeptors am Tag 0 vorhanden waren. **Fig. 9** zeigt die Gesamt- und freien Serum IgE-Niveaus in jedem der Hunde während des Verabreichungszeitraums. Diese Daten zeigen, dass im Kreislauf befindliches IgE nicht sofort aus dem Serum entfernt wurde. Freies Serum IgE ist nicht zugänglich, jedoch befand sich das Gesamt-IgE, vermutlich das mit cRclg komplexierte, immer noch im Kreislaufsystem.

[0101] Diese Daten dokumentieren die Wirkungen eines rekombinanten Rezeptors der vorliegenden Erfindung bei: (1) Entfernen des im Kreislauf befindlichen IgE's aus dem Serum; (2) Bereitstellen eines Verfahrens

zum Beeinflussen des Prozesses durch den IgE wieder aufgefüllt wird.

Beispiel XII: Peptide, die an kanines IgE binden und das Binden an den IgE-Rezeptor verhindern und/oder an IgE auf B-Zellen binden und die Synthese von IgE beeinflussen

[0102] Der Fachmann wird erkennen, dass Peptide aus kombinatorischen Peptidbibliotheken erhalten werden können und Sequenzen von Aminosäuren umfassen, die, wenn sie mit IgE kombiniert werden, die Bindung des IgE-Rezeptors verhindern. Sie sind dann Peptide von irgendeiner Sequenz von Aminosäuren, die an IgE binden, bevorzugt Exon 3 von IgE, und die Bindung an den IgE-Rezeptor verhindern können. Sie können auch an IgE auf B-Zellen binden.

[0103] Daher werden in einem anderen Beispiel Peptide, die kanines IgE binden, einem Hund verabreicht. Die Peptide binden IgE im Serum und IgE auf der Oberfläche der IgE-erzeugenden B-Zellen, jedoch nicht IgE auf Mastzellen oder Basophilen. Die IgE-Synthese wird verringert oder eliminiert. Die sich daraus ergebenden verringerten IgE-Niveaus verursachen eine Verringerung in der Mastzellen IgE-Rezeptorexpression und eine Verringerung der damit in Verbindung stehenden allergischen Reaktivität.

Beispiel XIV: Kleine Moleküle, die kanines IgE binden, und die Bindung an den IgE-Rezeptor verhindern, und/oder an IgE auf B-Zellen binden und die Synthese von IgE beeinflussen

[0104] Der Fachmann wird erkennen, dass kleine organische Moleküle aus kombinatorischen Bibliotheken ableitbar sind und mit Assays untersuchbar sind, wobei die kleinen organischen Moleküle aufgrund ihrer Fähigkeit, das IgE vor der Bindung an den IgE-Rezeptor zu hindern, isoliert werden. Sie können daher an IgE binden, bevorzugt an einen Bereich innerhalb des Exons 3, und Bindung an den IgE-Rezeptor inhibieren.

[0105] In einem anderen Beispiel wird einem Hund ein kleines Molekül verabreicht. Das kleine Molekül bindet IgE im Serum und das IgE auf der Oberfläche der IgE-erzeugenden B-Zellen, jedoch nicht das IgE auf Mastzellen oder Basophilen. Die IgE-Synthese wird konsequenterweise verringert oder eliminiert. Die sich daraus ergebenden verringerten IgE-Niveaus verursachen eine Verringerung in der Mastzellen-IgE-Rezeptor-Expression und eine Verringerung in der damit in Verbindung stehenden allergischen Reaktivität.

SEQUENZPRQTOKOLL

<110> IDEXX LABORATORIES, INC.

<120> KANINE ALLERGIE, THERAPEUTISCHER REKOMBINANTER
CHIMÄRER ANTI-IgE MONOKLONALER ANTIKÖRPER

<130> 036040036PC01

<140> ZU VERGEBEN

<141> 2001-01-30

<150> 09/592,998

<151> 2000-06-12

<160> 10

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Maus

<400> 1

gggaattcat graattgsac tgggtywtgc tctt

34

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Maus

<400> 2

actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcct

39

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Maus

<400> 3

cccaagctta cgaggggggaa gacatttggg aa

32

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Maus

<400> 4

gggaattcat ggcttggayt ycwctywtmy tct

33

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Murin

<400> 5

cccaagctta gctcytcw gw ggatggyggy ggrraa

35

<210> 6

<211> 1425

<212> DNA

<213> Maus

<400> 6

atg aaa tgg agc tgg gtt ttt ctc ttt ctc ctg tca gta act gcg ggt	48
gtg ttc tct gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt	144
act gac tac ttt atg aac tgg gtg atg cag agc cat gga aag agc ctt	192
gag tgg att ggt cgt att aat cct ttc aat ggt gat cct ttc tac aac	240
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct agc	288
aca gcc cac atg gag ctc cgg agc ctg gca tct gag gac tct gca gtc	336
tat tat tgt gca aga ttc tac tac gga cgt tac tat gct atg gac tac	384
tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc acg gcc	432
ccc tcg gtt ttc cca ctg gac ccc agc tgc ggg tcc act tcc ggc tcc	480
acg gtg gcc ctg gcc tgc ctg gtg tca ggc tac ttc ccc gag cct gta	528
act gtg tcc tgg aat tcc ggc tcc ttg acc agc ggt gtg cac acc ttc	576
ccg tcc gac ctg cag tcc tca ggg ctc tac tcc ctc agc agc atg gtg	624
aca gtg ccc tcc agc agg tgg tcc agc gag acc ttc acc tgc aac gtg	672
gcc cac ccg gcc agc aaa act aaa gta gac aag cca gtg ccc aaa aga	720
gaa aat gga aga gtt cct cgc cca cct gat tgt ccc aaa tgc cca gcc	768
cct gaa atg ctg gga ggg cct tcg gtc ttc atc ttt ccc ccg aaa ccc	816
aag gac acc ctc ttg att gcc cga aca cct gag gtc aca tgt gtg gtg	864
gtg gat ctg gga cca gaa gac cct gag gtg cag atc agc tgg ttc gtg	912
gac ggt aag cag atg caa aca gcc aag act cag cct cgt gag gag cag	960
ttc aat ggc acc tac cgt gtg gtc agt gtc ctc ccc att ggg cac cag	1008
gac tgg ctc aag ggg aag cag ttc acg tgc aaa gtc aac aac aaa gcc	1056
ctc cca tcc ccg atc gag agg acc atc tcc aag gcc aga ggg cag gcc	1104
cat cag ccc agt gtg tat gtc ctg ccg cca tcc ccg gag gag ttg agc	1152
aag aac aca gtc agc ttg aca tgc ctg atc aaa gac ttc ttc cca cct	1200
gac att gat gtg gag tgg cag agc aat gga cag cag gag cct gag agc	1248
aag tac cgc acg acc ccg ccc cag ctg gac gag gac ggg tcc tac ttc	1296
ctg tac agc aag ctc tct gtg gac aag agc cgc tgg cag ccg gga gac	1344
acc ttc ata tgt gcg gtg atg cat gaa gct cta cac aac cac tac aca	1392
cag aaa tcc ctc tcc cat tct ccg ggt aaa tga	1425

<210> 7

<211> 705

<212> DNA

<213> Maus

<400> 7

atggcctgga tttcactctt attctctctc ctggctctca gctcaggggc catttcccag	60
gctgttgtga ctcaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtgaaacagt cacactcact	120
tgctcgtcaa gtactggggc tgttacaact agtaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa	180
ccagatcatt tattcactgg tctaataagg ggtcccaaca accgagctcc aggtgttcct	240
gccagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag	300
actgaggatg aggcaatata tttctgtgct ctatggtaca gcaaccattg ggtgttcggt	360
ggaggaacca aactgactgt cctaggccag cccaaggcct cccctcgggt cacactcttc	420
ccgccctcct ctgaggagct cggcgccaac aaggccaccc tgggtgtgcct catcagcgac	480
ttctacccca gcggcggtgac ggtggcctgg aaggcaagcg gcagccccgt caccaggggc	540

```

gtggagacca ccaagccctc caagcagagc aacaacaagt acgcgccag cagctacctg 600
agcctgacgc ctgacaagtg gaaatctcac agcagcttca gctgcttgg cagcgacgag 660
gggagcaccg tggagaagaa ggtggccccc gcagagtgtt cttag 705

```

```

<210> 8
<211> 1300
<212> DNA
<213> Baculovirus

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (8)...(1300)
<223> Kanines IgE

```

```

<400> 8

```

```

ccgcgag atg cct gct tcc atg gga ggc cct gcc ctg ctg tgg cta gcg 49
Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala
1 5 10

```

```

ctg ctg ctc tcc tct cca ggt gtc atg tca tca gat acc ttg aaa cct 97
Leu Leu Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro
15 20 25 30

```

```

aca gtg tcc atg aac ccg cca tgg aat aca ata ttg aag gat gac agt 145
Thr Val Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser
35 40 45

```

```

gtg act ctt aca tgt act cgg aac aac tcc ctt gaa gtc gac tct gct 193
Val Thr Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala
50 55 60

```

```

gtg tgg ctc cac aac aac act act tgg caa gag acc act tca cgt ttg 241
Val Trp Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu
65 70 75

```

```

gac atc aat aaa gcc caa atc cag gac agt ggg gag tac agg tgt cgg 289
Asp Ile Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg
80 85 90

```

```

gaa aat aga tcc atc ctg agt gat cct gtg tac cta aca gtc ttc aca 337
Glu Asn Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr
95 100 105 110

```

```

gag tgg ctg atc ctt caa gcc tct gcc aac gtg gtg atg gag ggt gag 385
Glu Trp Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu
115 120 125

```

```

agc ttc ctc atc agg tgc cat agt tgg aag aat ttg agc ctc aca aag 433
Ser Phe Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys
130 135 140

```

```

gtg acc tac tac aag gat ggc atc ccc atc agg tac tgg tac gag aac 481
Val Thr Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn
145 150 155

```

```

ttc aac atc tcc att agc aac gtc aca acc aaa aac agc ggc aac tat 529
Phe Asn Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr

```

160	165	170	
tcc tgc tca ggc cag atc cag cag aaa ggc tac acc tct aaa gtc ctc			577
Ser Cys Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu			
175	180	185	190
aac att att gtg aaa aaa gag ccc acc aag caa aac aag tac tcc ggg			625
Asn Ile Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly			
	195	200	205
cta cac cgc cca cct gat tgt ccc aaa tgc cca gcc cct gaa atg ctg			673
Leu His Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu			
	210	215	220
gga ggg cct tcg gtc ttc atc ttt ccc ccg aaa ccc aag gac acc ctc			721
Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	225	230	235
ttg att gcc cga aca cct gag gtc aca tgt gtg gtg gtg gat ctg gac			769
Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp			
	240	245	250
cca gaa gac cct gag gtg cag atc agc tgg ttc gtg gac ggt aag cag			817
Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln			
	255	260	265
atg caa aca gcc aag act cag cct cgt gag gag cag ttc aat ggc acc			865
Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr			
	275	280	285
tac cgt gtg gtc agt gac ctc ccc att ggg cac cag gac tgg ctc aag			913
Tyr Arg Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys			
	290	295	300
ggg aag cag ttc acc tgc aaa gtc aac aac aaa gcc ctc cca tcc ccg			961
Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro			
	305	310	315
atc gag agg acc atc tcc aag gcc aga ggg ctg gcc ata gcc agt gtg			1009
Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser Val			
	320	325	330
tat gtc ctg ccg cca tcc cgg gag gag ttg agc aag aac aca gtc agc			1057
Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser			
	335	340	345
ttg aca tgc ctg atc aaa gac ttc ttc ccc cct gac att gat gtg gag			1105
Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu			
	355	360	365
tgg cag agc aat gga cag cag gag cct gag agt aag tac cgc acg acc			1153
Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr			
	370	375	380
ctg ccc cag ctg gac gag gac ggg tcc tac ttc ctg tac agc aag ctc			1201
Leu Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
	385	390	395

tct gtg gat aag agc cgc tgg cag cgg gga gac acc ttc ata tgt gcg 1249
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala
 400 405 410

gtg atg cat gaa gct cta cac aac cac tac aca cag aaa tcc ctc tcc 1297
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 415 420 425 430

cat 1300
 His

<210> 19
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Kanines IgE

<400> 9
 Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro Thr Val
 20 25 30
 Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser Val Thr
 35 40 45
 Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala Val Trp
 50 55 60
 Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg Glu Asn
 85 90 95
 Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr Glu Trp
 100 105 110
 Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu Ser Phe
 115 120 125
 Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys Val Thr
 130 135 140
 Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 165 170 175
 Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu Asn Ile
 180 185 190
 Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly Leu His
 195 200 205
 Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Leu Asp Pro Glu
 245 250 255
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln
 260 265 270
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys

290 295 300
 Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 305 310 315 320
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser Val Tyr Val
 325 330 335
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr
 340 345 350
 Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln
 355 360 365
 Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro
 370 375 380
 Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val
 385 390 395 400
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met
 405 410 415
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser His
 420 425 430

<210> 10
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Maus

<400> 10
 Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro Thr Val
 20 25 30
 Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser Val Thr
 35 40 45
 Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala Val Trp
 50 55 60
 Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg Glu Asn
 85 90 95
 Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr Glu Trp
 100 105 110
 Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu Ser Phe
 115 120 125
 Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys Val Thr
 130 135 140
 Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 165 170 175
 Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu Asn Ile
 180 185 190
 Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly Leu His
 195 200 205
 Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Leu Asp Pro Glu
 245 250 255
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln

	260		265		270										
Thr	Ala	Lys	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Gln	Phe	Asn	Gly	Thr	Tyr	Arg	
	275		280		285										
Val	Val	Ser	Asp	Leu	Pro	Ile	Gly	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys
	290		295		300										
Gln	Phe	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu
305			310						315						320
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Ile	Ala	Ser	Val	Tyr	Val
			325						330					335	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Ser	Leu	Thr
			340						345					350	
Cys	Leu	Ile	Lys	Asp	Phe	Phe	Pro	Pro	Asp	Ile	Asp	Val	Glu	Trp	Gln
	355						360					365			
Ser	Asn	Gly	Gln	Gln	Glu	Pro	Glu	Ser	Lys	Tyr	Arg	Thr	Thr	Leu	Pro
	370					375					380				
Gln	Leu	Asp	Glu	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val
385					390					395					400
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Arg	Gly	Asp	Thr	Phe	Ile	Cys	Ala	Val	Met
			405						410					415	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	His	
		420						425					430		

Patentansprüche

1. Ein monoklonaler chimärer Maus/Kanine Antikörper, der spezifisch an kanines IgE bindet, der durch die DNA-Sequenz für die schwere Kette mit der SEQ ID NO: 6 und der DNA-Sequenz für die leichte Kette mit der SEQ ID NO: 7 kodiert wird.
2. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 für die Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Kaninen Allergien.
3. Die Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament eine Verringerung der Serum-IgE-Niveaus im behandelten Kaninen verursacht.
4. Die Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Erniedrigen der Serum-IgE-Niveaus durch Zerstören oder Blockieren von Wechselwirkungen zwischen IgE und den Rezeptoren von IgE verursacht wird.
5. Die Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Rezeptoren von IgE auf Mastzellen oder Basophilen angeordnet sind.
6. Die Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament das Binden von IgE an B-Zellen und die nachfolgende Eliminierung von klonalen Populationen von B-Zellen verursacht.
7. Die Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament das Binden von IgE im Plasma verursacht.
8. Die Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament eine Inhibierung der IgE-Herstellung im Kaninen verursacht.
9. Eine pharmazeutische Formulierung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Antikörpers, wie in Anspruch 1 definiert, umfasst.
10. Die pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 9, die weiter einen oder mehrere Komponenten umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt werden, die besteht aus: Salzlösung oder anderen parenteralen Lösungen, Pufferagenzien, Stabilisierungsmitteln, Bulkagenzien, Antioxidantien und Verschnittmittel.
11. Die pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 9 oder 10 in einer Form, die für die Verabreichung durch eines oder mehrere der folgenden Verfahren geeignet ist: intravenöse Verabreichung, subkutane Verabreichung und intramuskuläre Verabreichung.
12. Der Antikörper nach Anspruch 1, wobei der Antikörper freies kanines IgE und IgE, das an eine B-Zelle

gebunden ist, bindet.

13. Die pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 9, wobei der Antikörper freies kanines IgE und IgE, das an eine B-Zelle gebunden ist, bindet.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

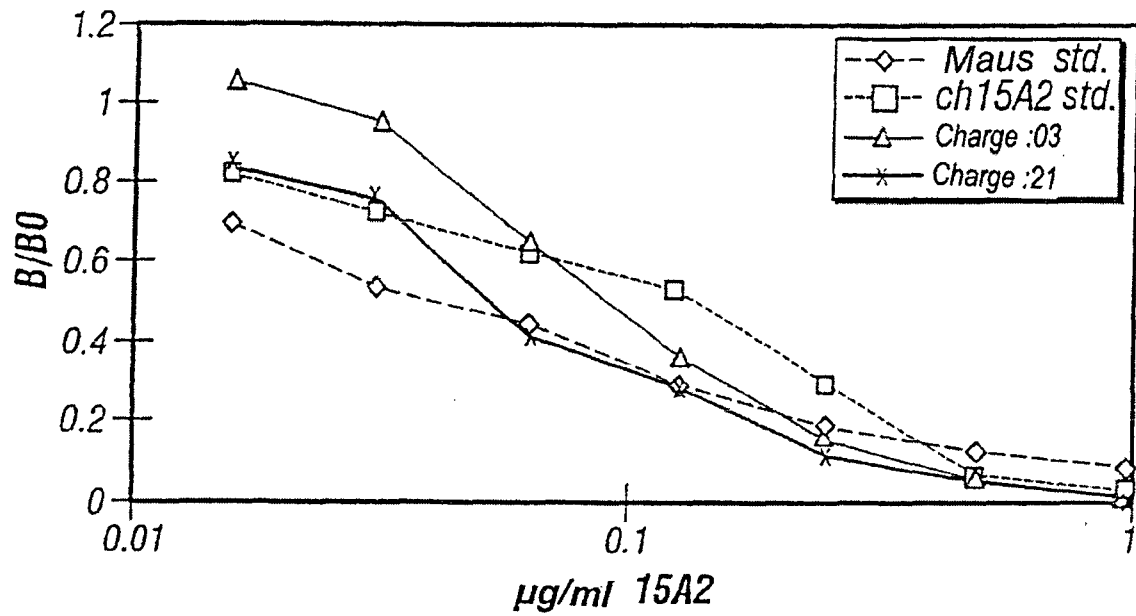
Neutralisierung von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ rIgE durch chimäres 15A2

FIG. 1

Chimärer 15A2 Antikörper behandelter Hund 2001

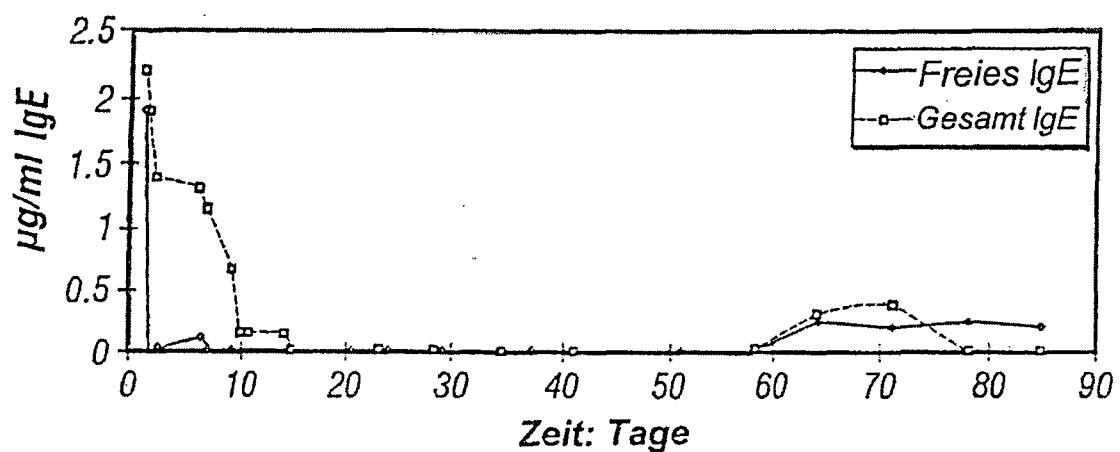


FIG. 2A-1

Chimärer 15A2 Antikörper behandelter Hund 2002

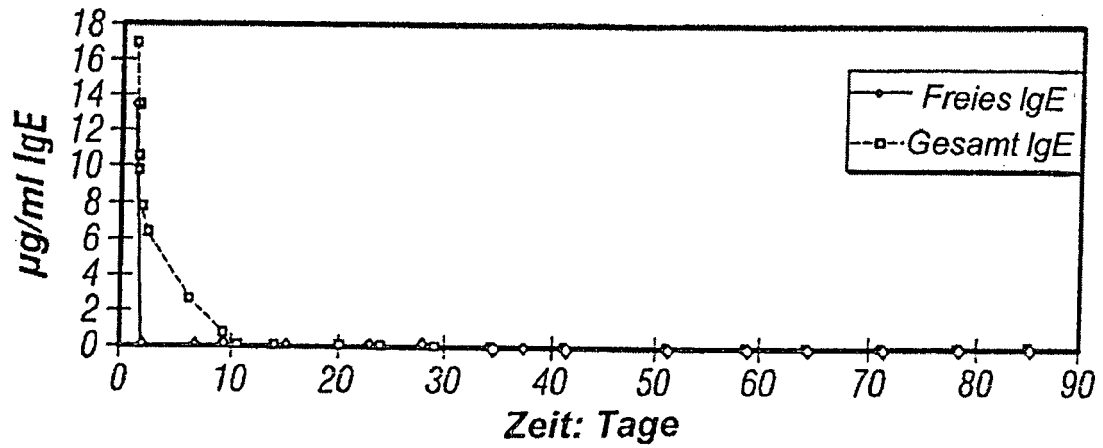


FIG. 2A-2

Chimärer 15A2 Antikörper behandelter Hund 2103

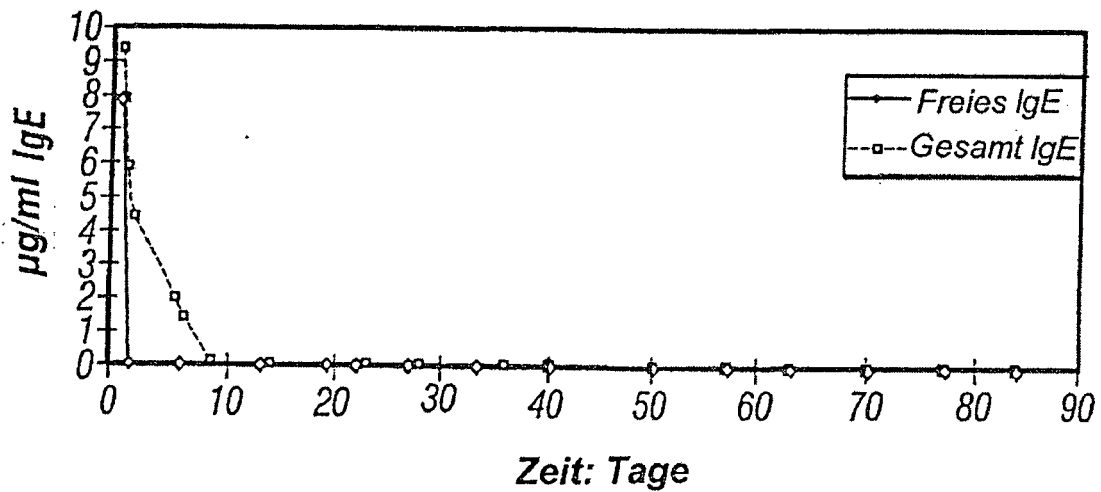
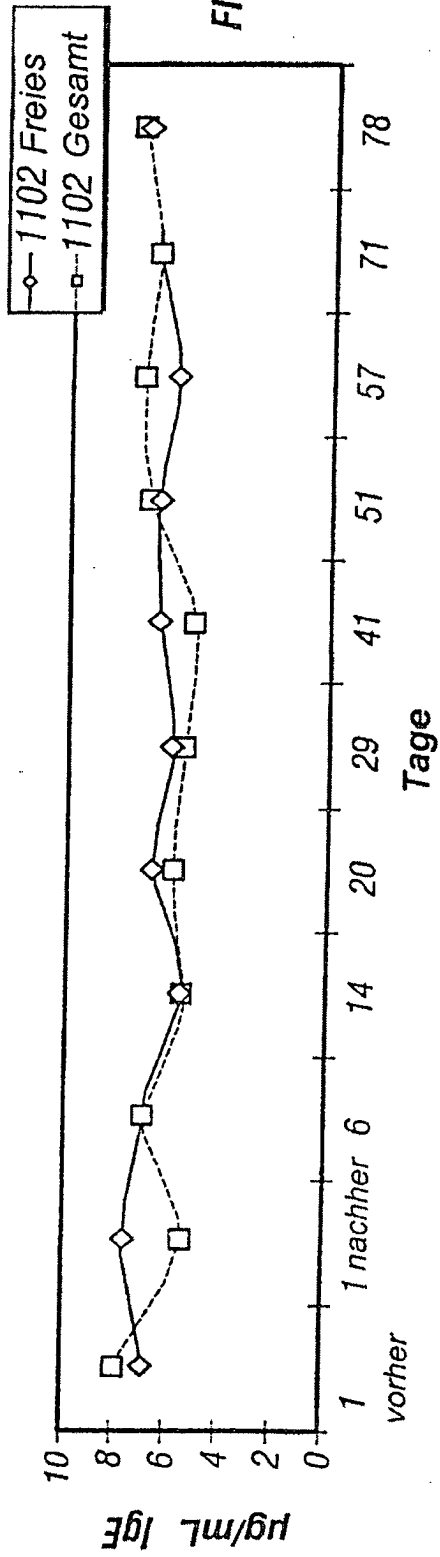
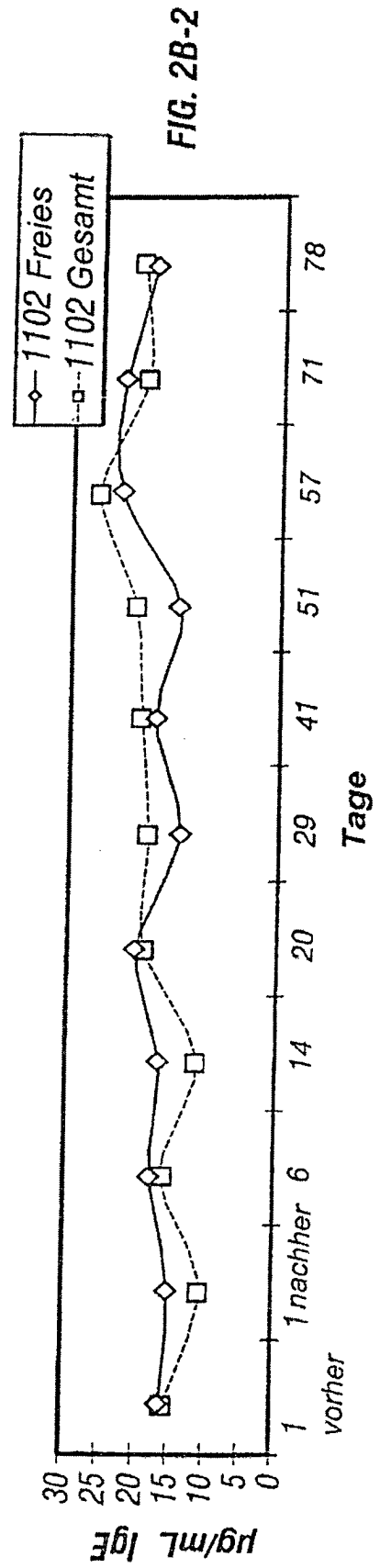


FIG. 2A-3

Freies und Gesamtserum IgE im Kontrollhund 1102



Freies und Gesamtserum IgE im Kontrollhund



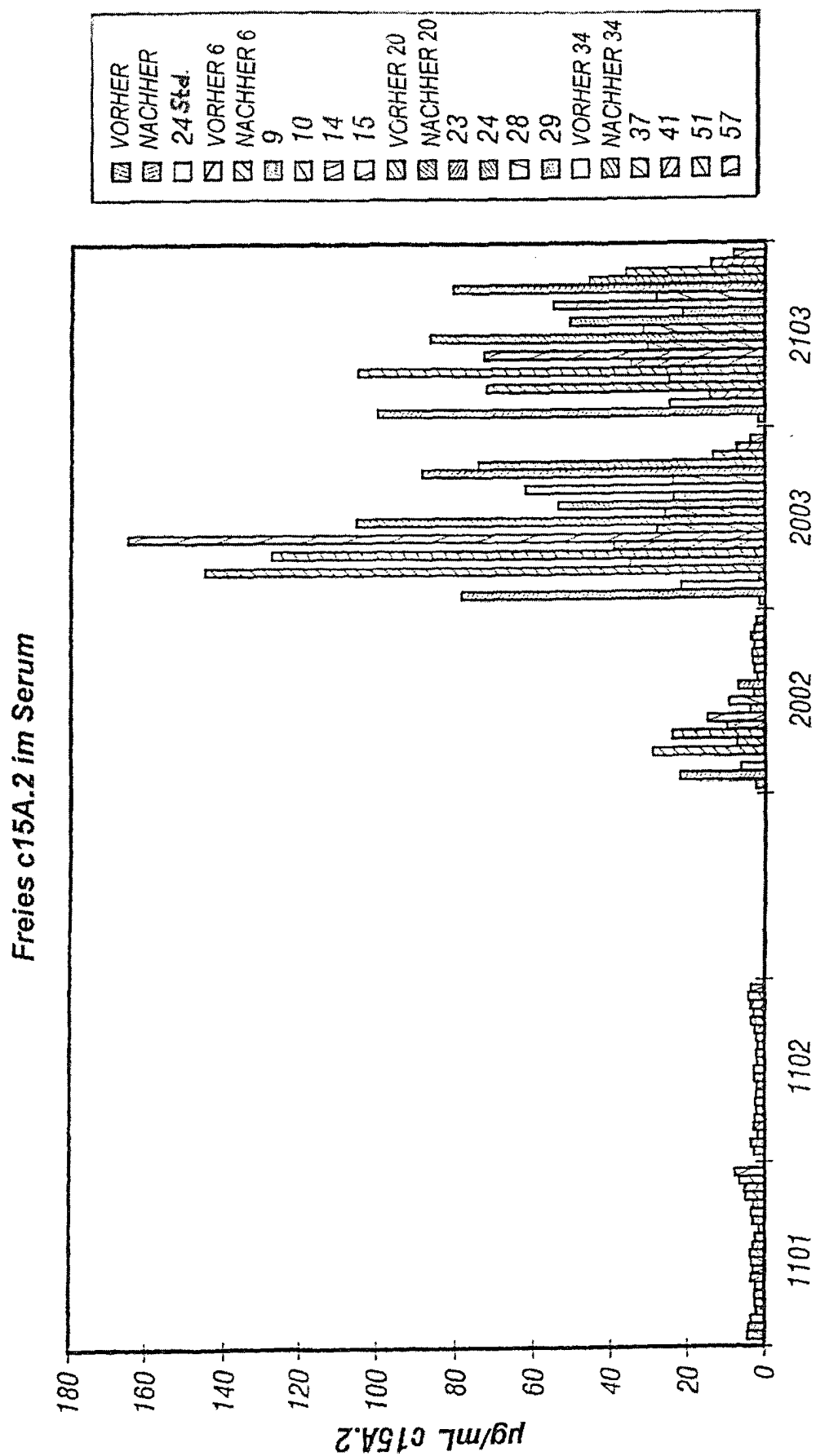


FIG. 3

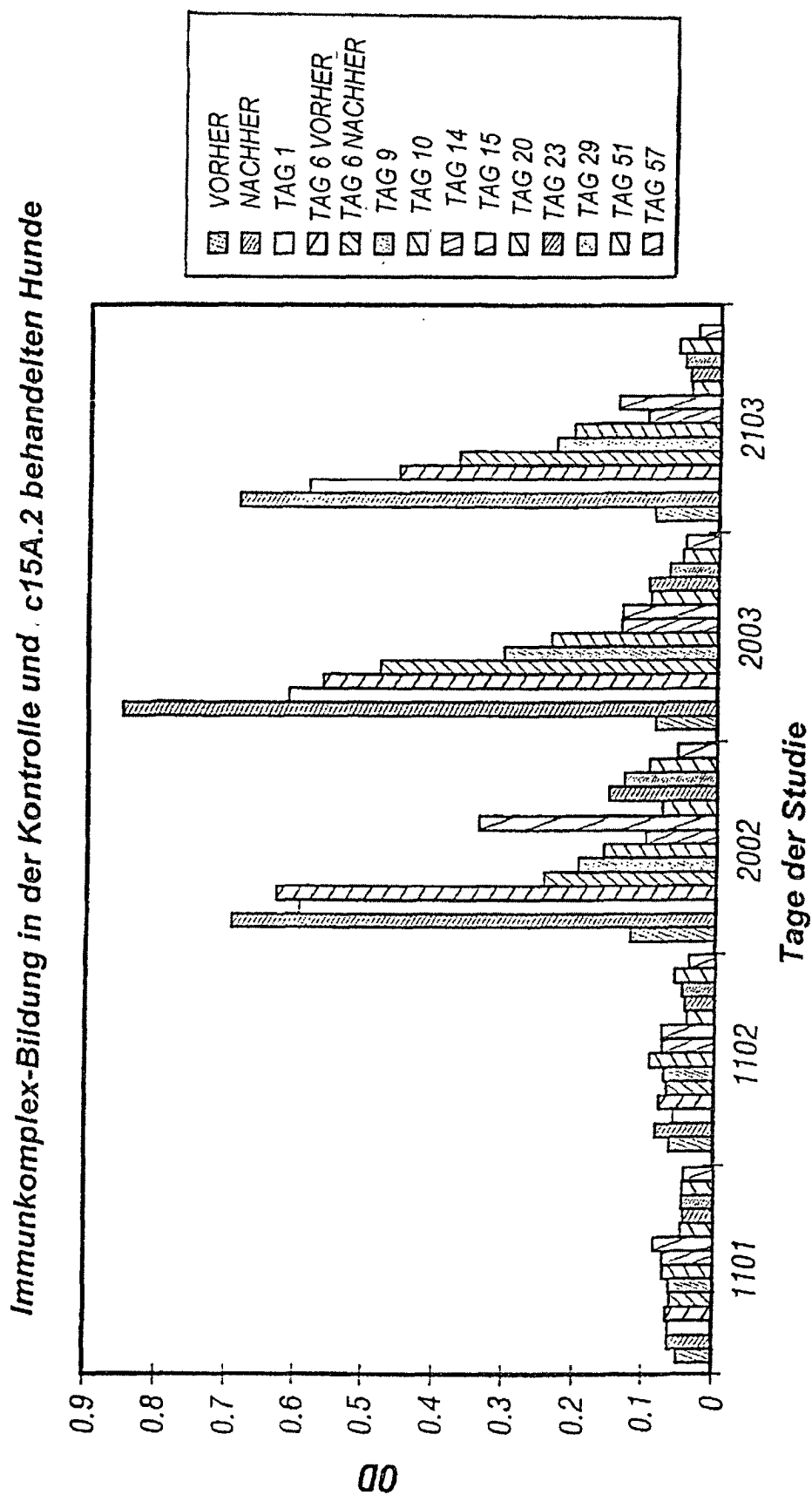


FIG. 4

Anti c15A.2 Reaktivität in den Kontroll- und c15A.2 behandelten Hunde

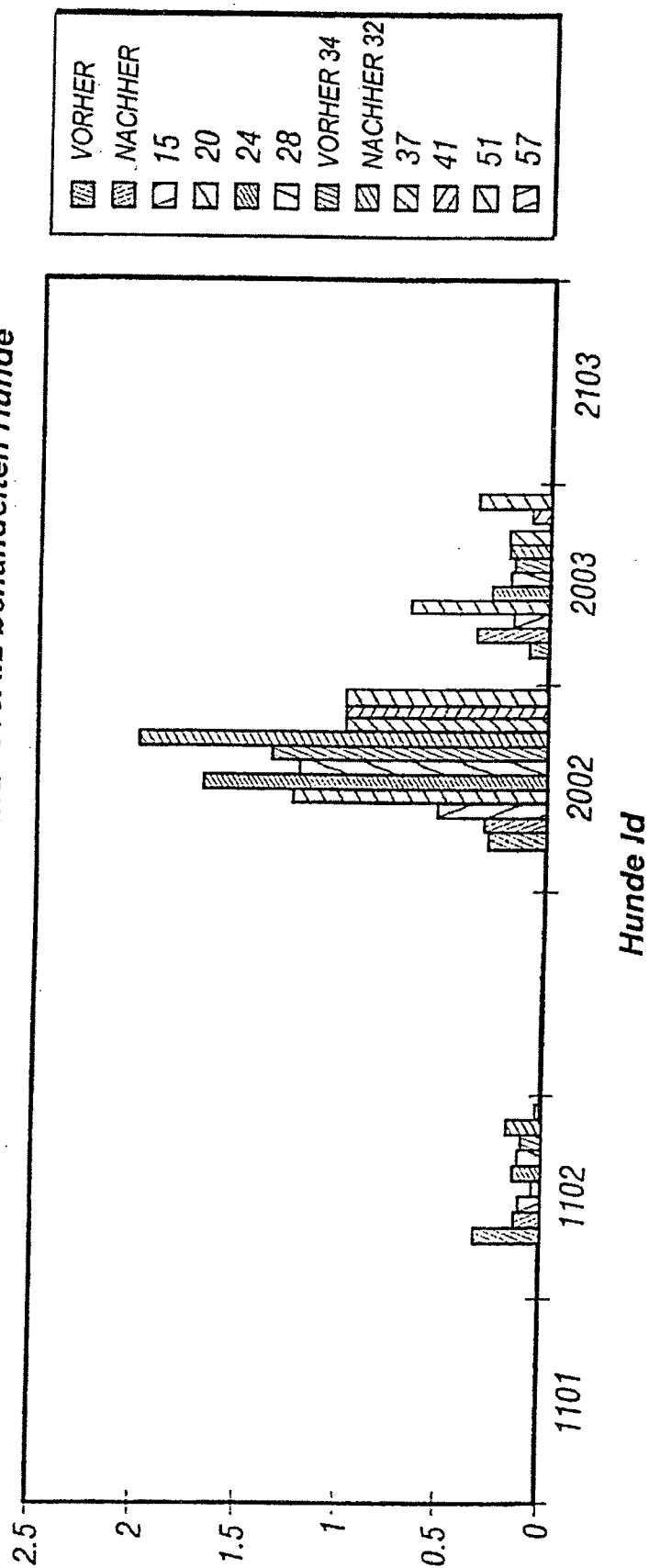
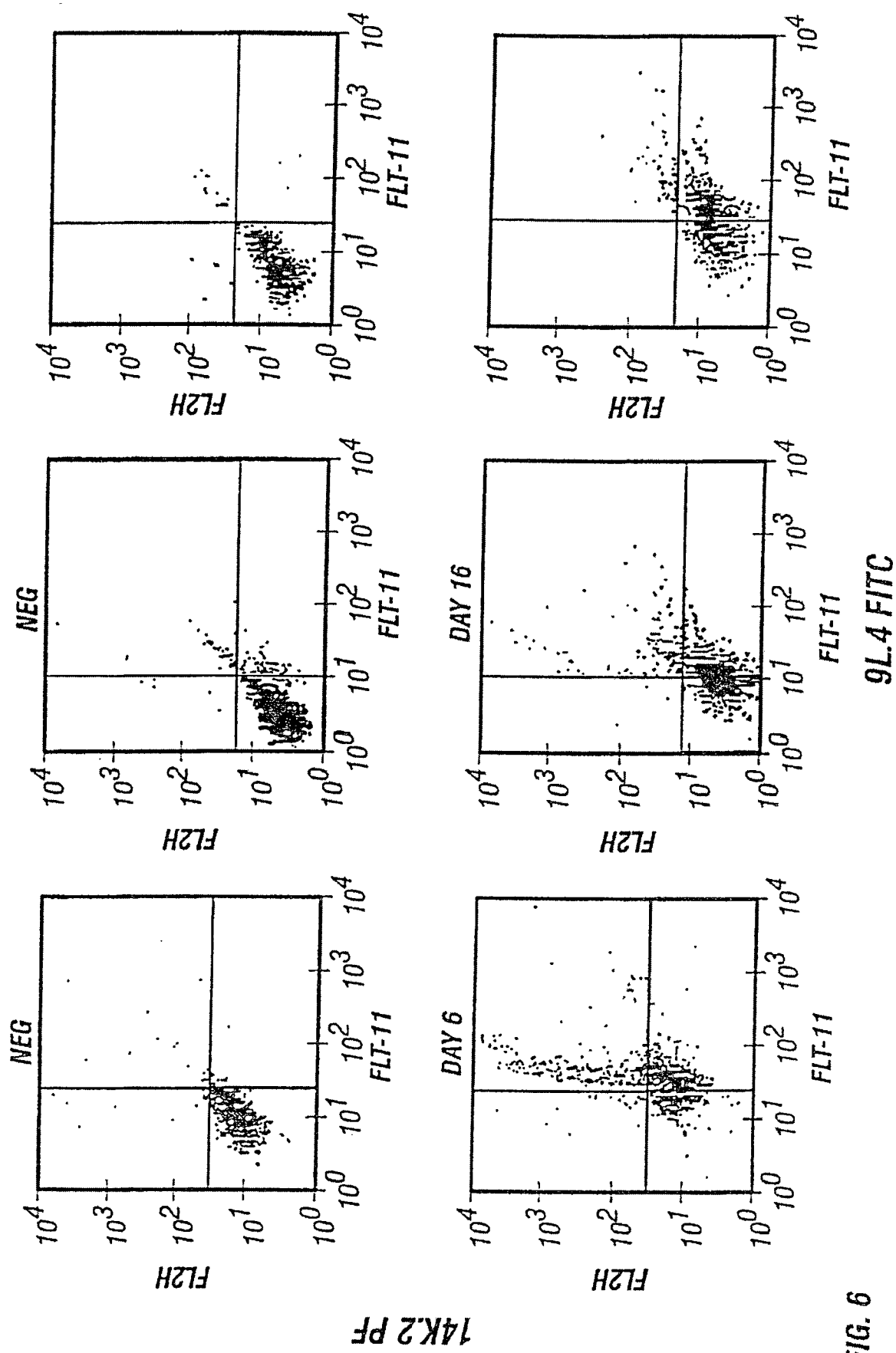


FIG. 5



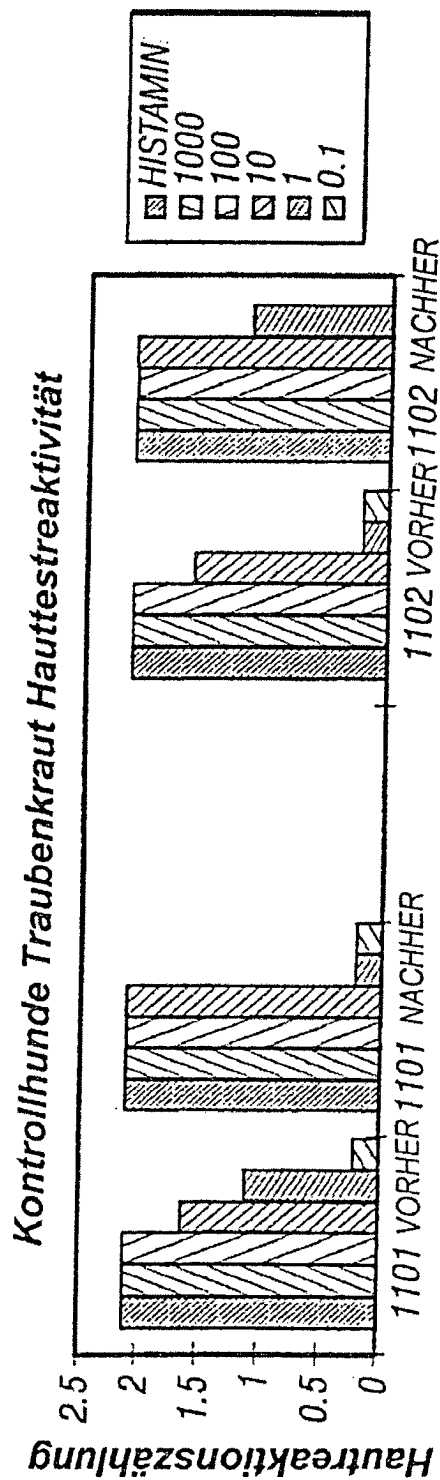


FIG. 7A

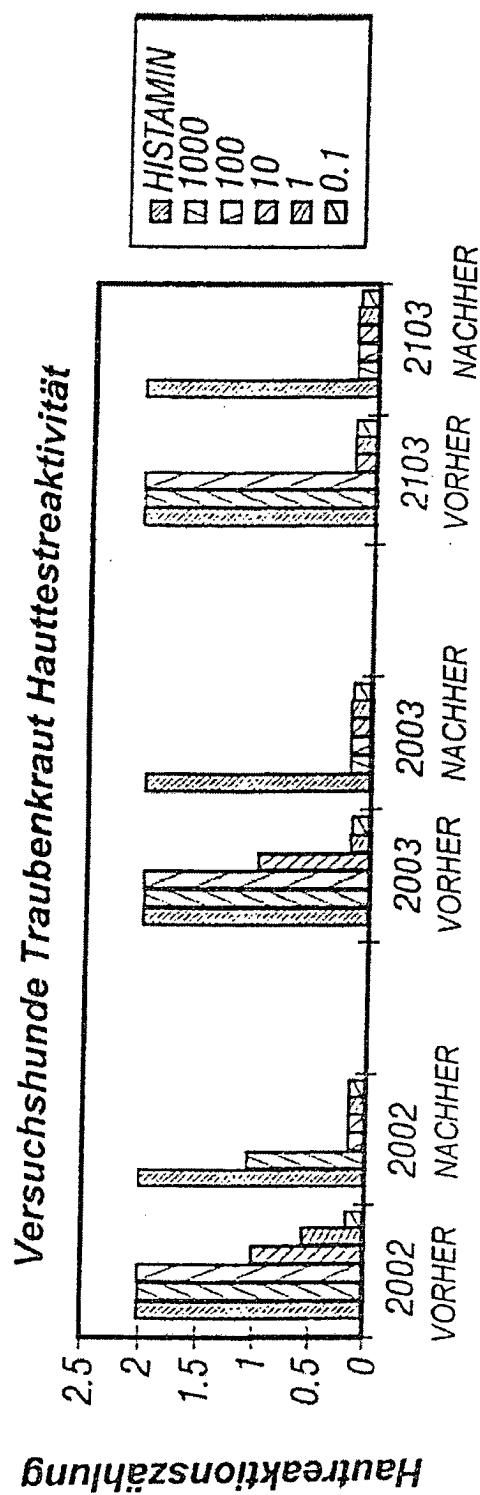


FIG. 7B

HUNDE ID	GEWICHT (g)	BLUT VOL. (ml)	IgE NIVEAU (ug/ml)	GESAMTES FREIES IgE (mg)	10X c15A2 (mg)
2002	9,300g	558 ml	1.61	0.898mg	8.98mg
2003	12,200g	732ml	9.71	7.11mg	71.1mg
2103	8,000g	480ml	8.14	3.91mg	39.1mg
GESAMT					119.18mg
**HUNDEBLUTVOLUMEN: 6% DES KÖRPERGEWICHTES					

FIG. 8

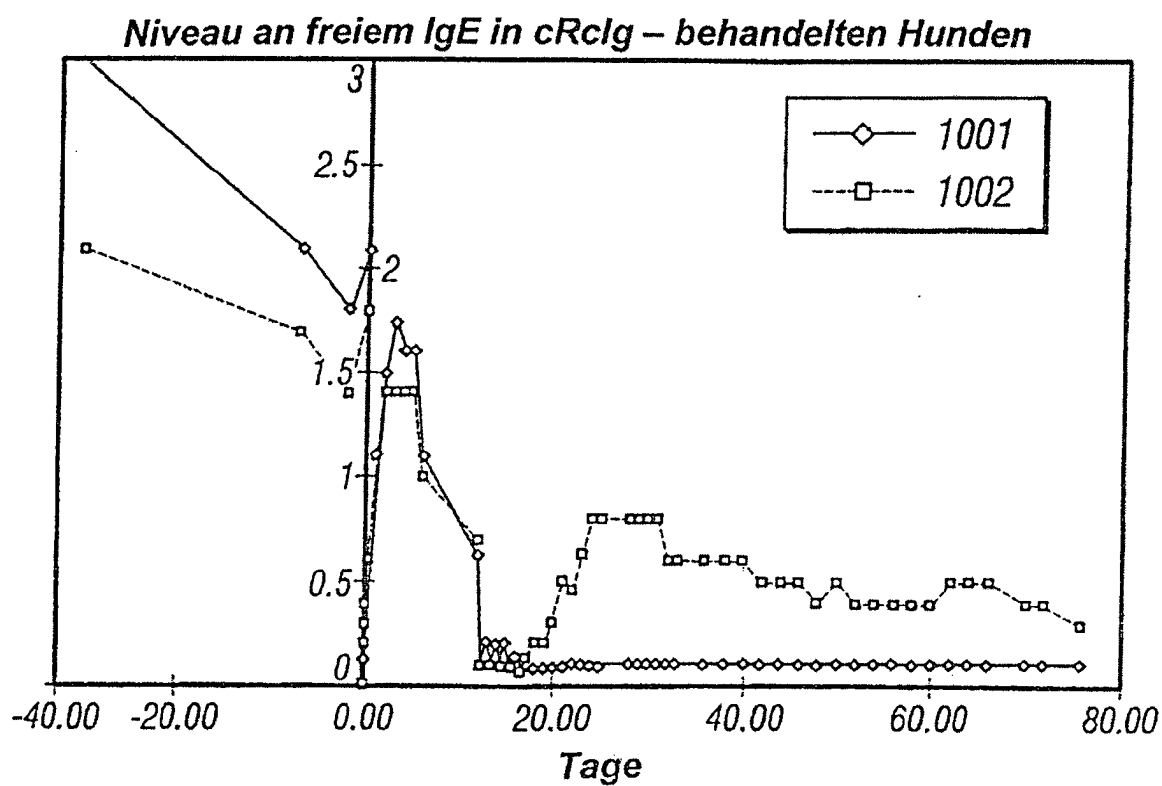


FIG. 9

5401	CCGCGAGATG	CCTGCTTCCA	TGGGAGGCC	TGCCCTGCTG	TGGCTAGCGC
	GGCGCTCTAC	GGACGAAGGT	ACCCTCCGGG	ACGGGACGAC	ACCGATCGCG
	L L L S	S P G	V M S	S D T L	K P T
5451	TGCTGCTCTC	CTCTCCAGGT	GTCATGTCAT	CAGATACCTT	GAAACCTACA
	ACGACGAGAG	GAGAGTCCA	CAGTACAGTA	GTCATGGAA	CTTTGGATGT
	V S M	N P P W	N T I	L K D	D S V T
5501	GTGTCCATGA	ACCCGCCATG	GAATACAATA	TTGAAGGATG	ACAGTGTGAC
	CACAGGTACT	TGGCGGTAC	CTTATGTTAT	AACTTCCTAC	TGTCACACTG
	L T C	T G N	N S L E	V D S	A V W
5551	TCTTACATGT	ACTGGGAACA	ACTCCCTTGA	AGTCGACTCT	GCTGTGTGGC
	AGAATGTACA	TGACCCCTGT	TGAGGGAACT	TCAGCTGAGA	CGACACACCG
	L H N N	T T W	Q E T	T S R L	D I N
5601	TCCACAACAA	CAC TACTTGG	CAAGAGACGA	CTTCACGTTT	GGACATCAAT
	AGGTGTTGTT	GTGATGAACC	GTTCTCTGCT	GAAGTGCAAA	CCTGTAGTTA
	K A Q	I Q D S	G E Y	R C R	E N R S
5651	AAAGCCCCAA	TCCAGGACAG	TGGGGAGTAC	AGGTGTCGGG	AAAATAGATC
	TTTCGGGGTT	AGGTCCTGTC	ACCCCTCATG	TCCACAGCCC	TTTATCTAG

FIG. 10A

```

5701  I L S D P V Y L T V F T E W L I
      CATCCTGAGT GATCCTGTGT ACCTAACAGT CTTACACAGAG TGGCTGATCC
      GTAGGACTCA CTAGGACACA TGGATTGTCA GAAGTGCTC ACCGACTAGG

5751  L Q A S A N V V M E G E S F L I R
      TTCAAGCCTC TGCCAACGTG GTGATGGAGG GTGAGAGCTT CCTCATCAGG
      AAGTTCGGAG ACGGTTGCAC CACTACCTCC CACTCTCGAA GGAGTAGTCC

5801  C H S W K N L R L T K V T Y Y K D
      TGCCATAGTT GGAAGAATT GAGGCTCACA AAGGTGACCT ACTACAAGGA
      ACGGTATCAA CCTTCTTAA CTCCGAGTGT TTCCACTGGA TGATGTTCTT

5851  G I P I R Y W Y E N F N I S I S
      TGGCATCCCC ATCAGGTACT GGTACGAGAA CTTCAACATC TCCATTAGCA
      ACCGTAGGGG TAGTCCATGA CCATGCTCTT GAAGTTGTAG AGGTAATCGT

5901  N V T T K N S G N Y S C S G Q I Q
      ACGTCACAAC CAAAACAGC GGCAACTATT CCTGCTCAGG CCACATCCAG
      TGCAGTGTG GTTTTGTG CCGTTGATAA GGACGAGTCC GGTCTAGGTC

5951  Q K G Y T S K V L N I I V K K E P
      CAGAAAGGCT ACACCTCTAA AGTCCCTCAAC ATTATTGTGA AAAAAGAGCC
      GTCTTTCCGA TGTGGAGATT TCAGGAGTTG TAATAACACT TTTTCTCTCGG

```

FIG. 10B

```

        T K Q N K Y S G L H R P P D C P
6001 CACCAAGCAA AACAACTACT CCGGGCTACA CCGCCACCT GATTGTCCCA
      GTGGTTCGTT TTGTTTCATGA GGCCCGATGT GCGGGTGGA CTAACAGGGT

        K C P A P E M L G G P S V F I F P
6051 AATGCCCCAGC CCCTGAAATG CTGGGAGGGC CTTGGTCTT CATCTTTCCC
      TTACGGGTCG GGGACTTTAC GACCTCTCCG GAAGCCAGAA GTAGAAAGGG

        P K P K D T L L I A R T P E V T C
6101 CCGAAACCCA AGACACCCT CTTGATTGCC CGAACACCTG AGTCACATG
      GGCTTTGGGT TCCTGTGGGA GAACTAACGG GCTTGTGGAC TCCAGTGTAC

        V V V D L D P E D P E V Q I S W
6151 TGTGGTGGTG GATCTGGACC CAGAAGACCC TGAGGTGCAG ATCAGCTGGT
      ACACCACCAC CTAGACCCTGG GTCTTCTGGG ACTCCACGTC TAGTCGACCA

        F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E
6201 TCGTGACGG TAAGCAGATG CAAACAGCCA AGACTCAGCC TCGTGAGGAG
      AGCACCTGCC ATTCGTCTAC GTTTGTCTGG TCTGAGTCGG AGCACTCCTC

        Q F N G T Y R V V S D L P I G H Q
6251 CAGTTCAATG GCACCTACCG TGTGGTCAGT GACCTCCCCA TTGGGCACCA
      GTCAAGTTAC CGTGGATGGC ACACCAGTCA CTGGAGGGGT AACCCGTGGT

```

FIG. 10C

```

        D W L K G K Q F T C K V N N K A
6301  G G A C T G G C T C A A G G G A A G C A G T T C A C C T G C A A G T C A A C A A C A A G C C C
      C C T G A C C G A G T T C C C C T T C G T C A A G T G G A C G T T C A G T T G T T G T T C G G G

        L P S P I E R T I S K A R G L A I
6351  T C C C A T C C C C G A T C G A G A G G A C C A T C T C C A A G C C A G A G G G C T G G C C A T A
      A G G T A G G G C T A G C T C T C C T G G T A G A G G T T C C G G T C T C C C G A C C G G T A T

        A S V Y V L P P S R E E L S K N T
6401  G C C A G T G T G T A T G T C C T G C C G C C A T C C C G G G A G G A G T T G A G C A A G A A C A C
      C G G T C A C A C A T A C A G G A C G G C G G T A G G G C C C T C C T C A A C T C G T C T T G T G

        V S L T C L I K D F F P P D I D
6451  A G T C A G C T T G A C A T G C C T G A T C A A A G A C T T C T C C C C C C T G A C A T T G A T G
      T C A G T C G A A C T G T A C G G A C T A G T T T C T G A A G A A G G G G G A C T G T A A C T A C

        V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T
6501  T G G A G T G G C A G A G C A A T G G A C A G C A G A G C C T G A G A G T A A G T A C C G C A C G
      A C C T C A C C G T C T C G T T A C C T G T C G T C C T C G G A C T C A T T C A T G G C G T G C

        T L P Q L D E D G S Y F L Y S K L
6551  A C C C T G C C C C A G C T G G A C G A G G A C G G G T C C T A C T T C C T G T A C A G C A A G C T
      T G G A C G G G G T C G A C C T G C T C C T G C C C A G G A T G A A G G A C A T G T C G T T C G A

```

FIG. 10D

	S	V	D	K	S	R	W	Q	R	G	D	T	F	I	C	A
6601	CTCTGTGGAT	AAGAGCCGCT	GGCAGCGGG	AGACACCTTC	ATATGTGCGG											
	GAGACACCTA	TTCTCGGCGA	CCGTCGCCC	TCTGTGGAAG	TATACACGCC											
	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S
6651	TGATGCATGA	AGCTCTACAC	AACCACTACA	CACAGAAATC	CCTCTCCCAT											
	ACTACGTACT	TCGAGATGTG	TTGGTGATGT	GTGCTTTTAG	GGAGAGGGTA											
	S	P	G	K												

FIG. 10E