

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
06. Februar 2020 (06.02.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/025801 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: **HESSE, Christina**; Gilgenburger Straße 20, 37520 Osterode (DE).
CI2N 1/20 (2006.01) *CI2N 15/74* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/070910 (74) **Anwalt: ALTMANN STÖSSEL DICK PATENTANWÄLTE PARTG MBB**; Dr. Alexander Dick, Dudenstraße 46, 68167 Mannheim (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 02. August 2019 (02.08.2019)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2018 213 030.2
03. August 2018 (03.08.2018) DE
- (71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).
- (72) Erfinder: **OELKRUG, Christopher**; Gerhart Hauptmann Str. 10, 59387 Aschenberg (DE). **WAGNER, Daniel Christoph**; Beuthener Str. 10, 55131 Mainz (DE). **BRAUN, Armin**; Lilienweg 36, 30916 Isernhagen (DE).

(54) **Title:** TREATMENT OF IMMUNE DISEASES BY MEANS OF THE ANTIBODY-MEDIATED NEUTRALIZATION OF SPECIFIC INTESTINAL BACTERIA

(54) **Bezeichnung:** BEHANDLUNG VON IMMUNERKRANKUNGEN DURCH DIE ANTIKÖRPERVERMITTELTE NEUTRALISIERUNG SPEZIFISCHER DARMBAKTERIEN

(57) **Abstract:** The invention relates to antibodies or an antigen-binding fragment thereof, wherein the antibody or the antigen-fragment binds to an antigen of the bacterium *Candidatus Savagella* and (i) inhibits the adhesion of the bacterium to intestinal epithelial cells, preferably human intestinal epithelial cells, and/or (ii) depletes the bacterium. The invention additionally provides a medicament comprising the antibody according to the invention or an antigen-binding fragment thereof or comprising an antibody which is produced using the method according to the invention. The invention additionally relates to a kit comprising an antibody according to the invention or an antigen-binding fragment thereof for reducing the Th17 cell proliferation, Th17 cell differentiation, or Th17 cell activity and/or inhibiting the formation of antibodies against endogenous antigens by means of B cells. The kit according to the invention optionally contains an antibiotic. The invention additionally relates to a method for producing an antibody according to the invention, having the steps of: a) immunizing chickens using an immunogenic peptide from an antigen of the bacterium *Candidatus Savagella*; and b) obtaining and purifying the antibodies formed in the chickens or in an egg laid by said chickens. The invention finally relates to a method for producing a medicament according to the invention, having the steps of: a) producing an antibody according to the invention or an anti-binding fragment thereof; and b) formulating the antibody or an antigen-binding fragment thereof as a medicament.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella* bindet und (i) die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen, vorzugsweise humane Darmepithelzellen, inhibiert, und/oder (ii) das Bakterium depletiert. Die Erfindung stellt ferner ein Arzneimittel zur Verfügung, umfassend den erfindungsgemäßen Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon oder umfassend einen Antikörper, der durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt ist. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein Kit umfassend einen erfindungsgemäßen Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon zur Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität, und/oder Hemmung der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen. Optional enthält das erfindungsgemäße Kit ein Antibiotikum. Außerdem stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Verfügung, wobei das Verfahren umfasst: a) Immunisierung von Hühnern mit einem immunogenen Peptid aus einem Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella*; und b) Gewinnung und Aufreinigung der in den Hühnern oder in einem von diesen Hühnern gelegten Ei gebildeten Antikörper. Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, umfassend: a) Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon; und b) Formulierung des Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon als Arzneimittel.

WO 2020/025801 A1

RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

5

Behandlung von Immunerkrankungen durch die antikörpervermittelte Neutralisierung spezifischer Darmbakterien

10 Die vorliegende Erfindung betrifft die Behandlung von Immunerkrankungen sowie weiterer
Erkrankungen durch die antikörpervermittelte Neutralisierung spezifischer Darmbakterien.
Insbesondere betrifft die Erfindung Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon,
wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Antigen des Bakteriums
Candidatus Savagella bindet und (i) die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen,
15 vorzugsweise humane Darmepithelzellen, inhibiert, und/oder (ii) das Bakterium depletiert. Die
Erfindung stellt ferner ein Arzneimittel zur Verfügung, umfassend den erfindungsgemäßen
Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon, oder umfassend einen Antikörper, der
durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt ist. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein
Kit umfassend einen erfindungsgemäßen Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon
20 zur Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität,
und/oder Hemmung der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen.
Optional enthält das erfindungsgemäße Kit ein Antibiotikum. Außerdem stellt die Erfindung ein
Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Verfügung, wobei das
Verfahren umfasst: a) Immunisierung von Hühnern mit einem immunogenen Peptid aus einem
25 Antigen des Bakteriums *Candidatus* Savagella; und b) Gewinnung und Aufreinigung der in den
Hühnern oder in einem von diesen Hühnern gelegten Ei gebildeten Antikörper. Schließlich
betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels,
umfassend: a) Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder eines antigen-bindenden
Fragments davon; und b) Formulierung des Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments
30 davon als Arzneimittel.

Jeder Mensch beherbergt mehr als 100 Trillionen Bakterien, die in ihrer Gesamtheit als
Mikrobiom bezeichnet werden. Die meisten dieser Bakterien besiedeln den Darm und nutzen
dem Menschen bei der Verdauung von Pflanzenfasern, der Bereitstellung von Vitaminen und der
35 Verdrängung von schädlichen Mikroorganismen. Für das menschliche Immunsystem stellt diese
Symbiose eine tägliche Belastungsprobe dar: Lediglich eine einschichtige Barriere aus
Epithelzellen trennt den Menschen von seinem Mikrobiom. Die Immunzellen der Darmwand
müssen ständig zwischen Toleranz gegenüber nützlichen und Abwehr gegenüber schädlichen
Bakterien entscheiden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Zusammensetzung des

Mikrobioms einen direkten und signifikanten Einfluss auf das Immunsystem und somit auf die Gesundheit des Menschen hat [1].

In den vergangenen Jahrzehnten ist in allen Industrieländern ein deutlicher Anstieg von immunvermittelten Erkrankungen zu verzeichnen. Dazu gehören unter anderem die häufigen Diagnosen Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ 1 und multiple Sklerose, aber auch atopische Erkrankungen, wie Neurodermitis und allergisches Asthma. Die Geschwindigkeit mit der diese Erkrankungen zunehmen ist so schnell, dass genetische Veränderungen nicht ursächlich sein können. Beispielsweise stieg die Häufigkeit des allergischen Asthmas in den USA zwischen 1980 und 1994 um 75%, während im selben Zeitraum die Häufigkeit in Entwicklungsländern unverändert blieb [6]. Es drängt sich die Frage auf, welcher Umwelteinfluss diesen rasanten Anstieg immunvermittelter Erkrankungen erklären kann. Möglicherweise bedingen veränderte Ernährungsgewohnheiten, vor allem die vermehrte Aufnahme von Salz, Fett, Zucker und pestizid- und antibiotika-belasteten Nahrungsmitteln, aber auch das Fehlen von immunmodulierenden, parasitischen Darmwürmern eine gestörte Homöostase zwischen Mikrobiom und Immunsystem (Dysbiose). Weitere Ursachen für eine Dysbiose können in einer veränderten Darmkolonialisierung nach der Geburt, zum Beispiel nach Kaiserschnitt, und durch eine gesteigerte Hygiene im Lebensumfeld liegen. Das menschliche Mikrobiom hat jedoch einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung von Immunreaktionen [1]. Bestimmte Bakterien, die *per se* nichtpathologisch wirken, können trotzdem einen immunregulatorischen oder immunstimulierenden Einfluss haben. Die Beeinflussung des Mikrobioms mit dem Ziel der therapeutischen Immunmodulation stellt daher Inzidenz ausgewählter Immunerkrankungen [7] einen interessanten Therapieansatz für zahlreiche sozioökonomisch-relevante Erkrankungen dar. Bisherige Ansätze wie probiotische [8], präbiotische [9] und antibiotische [10] Therapien sind zwar teilweise erfolgreich, aber zu unspezifisch, um die gewünschten immunologischen Effekt zu erreichen.

Ein fadenförmiges Bakterium mit dem Namen *Candidatus* *Savagella* (Englisch „segmented filamentous bacteria“, SFB) weist eine besonders interessante Interaktion mit seinem Wirt auf: Im Säuglingsalter ist es wesentlich an der Entstehung und Reifung des Immunsystems beteiligt, in späteren Lebensabschnitten stimuliert es bestimmte Effektorzellen des erworbenen Immunsystems, die Th17 Zellen, die wiederum schädliche Darmbakterien bekämpfen können. Dieselben Immunzellen sind jedoch auch für die Entstehung und Progression von immunvermittelten Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen und Atopien verantwortlich. Tatsächlich weisen Versuchstiere ohne SFB Besiedelung deutlich geringere Symptome in Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis, multiplen Sklerose und des allergischen Asthmas auf [2-4].

Das Bakterium *Candidatus* *Savagella* (SFB) erzeugt eine andauernde physiologische Entzündungsreaktion in der Darmschleimhaut, die insgesamt zu einer Stärkung der

5 Immunabwehr gegen pathologische Darmkeime führt. Dieses evolutionär konservierte Konzept kann im Übermaß (z.B. bei einer Dysbiose) schädlich sein und zu immunvermittelten Erkrankungen im übrigen Körper führen [1]. Dieser Zusammenhang ist in den letzten Jahren vermehrt grundlagenwissenschaftlich aufgegriffen und hochrangig publiziert worden [2; 3; 11-13].

US 2012/276149 beschreibt die Applikation von SFB, um die Immunkompetenz gegenüber Darminfektionen zu stärken.

10 WO 2011/047153 beschreibt eine Modulation der Th17 Immunantwort unter anderem durch die Beeinflussung der Adhärenz und Proliferation von SFB.

Ein konkretes therapeutisches Konzept ist bisher jedoch nicht beschrieben.

15 Als der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Aufgabe kann daher die Bereitstellung eines solchen Therapieansatzes angesehen werden.

Die technische Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen und nachfolgend beschriebenen Ausführungsformen gelöst.

20 Die Erfindung betrifft somit einen Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus* *Savagella* bindet und (i) die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen, vorzugsweise humane Darmepithelzellen, inhibiert und/oder (ii) das Bakterium depletiert.
25 Bevorzugt bindet der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus* *Savagella* und inhibiert die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen, vorzugsweise humane Darmepithelzellen, und depletiert das Bakterium.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon bindet spezifisch
30 an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus* *Savagella* (Englisch „segmented filamentous bacteria“, SFB), vorzugsweise an ein Bakterienwandprotein.

Das Antigen ist hierbei so gewählt, dass die Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers oder des antigen-bindenden Fragments davon die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen
35 inhibiert oder das Bakterium depletiert. Die Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers oder des antigen-bindenden Fragments davon an das Antigen kann auch die Proliferation des Bakteriums inhibieren. Umfasst im Sinne der Erfindung sind auch Kombinationen dieser Mechanismen. Beispielsweise kann das Antigen dergestalt ausgewählt sein, dass der erfindungsgemäße Antikörper das Antigen des Bakteriums *Candidatus* *Savagella* bindet und die
40 Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen inhibiert und das Bakterium depletiert.

Alternativ kann das Antigen so gewählt sein, dass der erfindungsgemäße Antikörper das Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella* bindet und die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen inhibiert und die Proliferation des Bakteriums inhibiert. Außerdem umfasst ist eine Kombination aller dreier Mechanismen, so dass das Antigen so bestimmt ist, dass der erfindungsgemäße der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an das Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella* bindet und die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen inhibiert, die Proliferation des Bakteriums inhibiert, und das Bakterium depletiert.

10 In einer am Fraunhofer IZI und ITEM durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die Besiedlungsdichte von SFB durch eine orale Antikörperbehandlung reduziert werden kann, und dass diese spezifische Korrektur des Mikrobioms zu einer Immuntoleranz im Rahmen immunvermittelter Erkrankungen führt. Die SFB-spezifischen Antikörper wurden aus den Eiern von mit SFB-Proteinen immunisierten Hühnern gewonnen; diese Methode erlaubt die schnelle und sehr kostengünstige Generierung von bindungsstarken Antikörpern, die darüber hinaus eine besondere Säurestabilität aufweisen und somit gut für eine orale Behandlung geeignet sind [5].

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Konzept ist in Figur 1 illustriert: Fadenförmige *Candidatus Savagella* Bakterien („segmented filamentous bacteria“, SFB) besiedeln die Darmwand und aktivieren über dendritische Zellen Th17 Zellen, die zur Autoimmunität und Atopie beitragen. Zuerst werden geeignete Bakterienwandproteine des genannten Bakteriums identifiziert, synthetisiert und in Hühner injiziert. Die Hühner bilden hochspezifische, neutralisierende anti-SFB Antikörper, die aus den Eiern isoliert werden können und für die orale Antikörpertherapie zur Verfügung stehen. Eine Reduktion der SFB Keimzahl im Darm kann zu einer Reduktion der Th17 Effektorzellaktivität und somit zur Immuntoleranz führen.

Eine spezifische Neutralisierung von SFB mit oral applizierten Antikörpern hat den großen Vorteil, dass es praktisch nicht zu einem Übertritt der Antikörper in die Zirkulation kommt und somit häufige Nebenwirkungen einer Antikörpertherapie vermieden werden können, oder Nebenwirkungen wie sie etwa bei Dexamethason für die allergische Atemwegserkrankung beobachtet werden. Beispiele für die erfolgreiche orale Nutzung von Antikörpern für die Reduktion darmpathogener Viren [14], Pilze [15] und Bakterien [16; 17] sind bereits beschrieben. Orale Antikörpertherapien mit dem Ziel der Immunmodulation sind bisher jedoch nur mit dem direkten Ziel Immunsystem durchgeführt worden. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür ist die Nutzung von Antikörpern gegen das T Zell Oberflächenprotein CD3 ([18]; US 7,883,703 B2).

Ein wesentlicher Vorteil dieser Erfindung ist der Einsatz therapeutischer IgY Antikörper aus den Eiern von immunisierten Hühnern. Diese Methode bietet zahlreiche Vorteile: Neben einer sehr

kostengünstigen Herstellung können die Antikörper schnell und in großen Mengen produziert werden. IgY sind säurebeständiger als IgG und sind daher besonders gut für die orale Applikation geeignet. Ein Huhn kann pro Jahr bis zu 30 g reinen Antikörper produzieren, der zudem eine hohe Bindungsstärke aufweist. Schließlich weisen IgY eine andere Fc Region auf als Säugetier IgG; es kommt daher nicht zu Nebenwirkungen wegen einer Aktivierung des Empfänger-Komplementsystems [5].

In einem „proof-of-concept“ Experiment konnte bereits nachgewiesen werden, dass die orale Gabe von anti-SFB IgY Antikörpern zu einer deutlichen Reduktion der SFB Ausscheidung - als Korrelat der intestinalen SFB Besiedelung - führt. Hinweise für die therapeutische Relevanz dieser Mikrobiomveränderung wurde schließlich im Tiermodell der allergischen Atemwegserkrankung beobachtet (Fraunhofer ITEM): Die Reduktion der intestinalen SFB Besiedelung führte zu einer Abschwächung der Entzündungszellinfiltration in die Lunge, in einem vergleichbaren Maße wie das Standardtherapeutikum Dexamethason.

Eine IgY antikörpervermittelte Inhibierung des Bakteriums *Candidatus Savagella* (SFB) kann einen direkten Einfluss auf immunvermittelte Erkrankungen haben. Immunerkrankungen wie multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und allergisches Asthma werden hierbei wesentlich von der Aktivität von Th17 Immunzellen bestimmt. Aber auch andere, durch die Th17 Aktivität bestimmte Immunerkrankungen oder onkologische Erkrankungen können durch eine Depletion von SFB vorbeugend bzw. therapeutisch behandelt werden.

Der Einsatz dieser IgY Antikörper ist denkbar als Medikament zur Vorbeugung bzw. Therapie immunvermittelter Erkrankungen, insbesondere Th17 abhängiger Erkrankungen. Hierbei soll es sich um ein Therapeutikum zur Mikrobiomkorrektur handeln. Dieses kann auch als „Functional Food“ bzw. „Nutrazeutika“ eingesetzt werden, so dass gegebenenfalls Möglichkeiten für eine stark vereinfachte Zulassung bestehen, zum Beispiel als „Novel Food“.

Ein Einsatz der erfindungsgemäßen Antikörper ist bevorzugt für eine orale Applikation im Menschen vorgesehen.

Das Bakterium „*Candidatus Savagella*“ (englisch „segmented filamentous bacteria“, SFB) ist beispielsweise von Schnupf et al. (Curr Opin Microbiol. 2017 Feb; 35: 100-109. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.004. Epub 2017 Apr 25; Semin Immunol. 2013 Nov 30; 25(5): 342-51. doi: 10.1016/j.smim.2013.09.001. Epub 2013 Oct 31) sowie in US 2012/276149 und WO 2011/047153 beschrieben.

Das „Antigen“ des Bakteriums *Candidatus Savagella*, das vom erfindungsgemäßen Antikörper oder dem antigen-bindenden Fragment des Antikörpers spezifisch gebunden wird, ist involviert in die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen, vorzugsweise humane

Darmepithelzellen, die Proliferation des Bakteriums, und/oder vermittelt eine Depletion, also eine Abtötung des Bakteriums. Ein geeignetes Antigen aus *Candidatus* Savagella Bakterien wird aus der Gruppe von funktionsbestimmenden und „segmented filamentous bacteria“ (SFB)-spezifischen Proteinen selektioniert. Ein solches Protein ist etwa dadurch charakterisiert, dass es bakterienwandständig ist (Bakterienwandprotein) und eine wesentliche oder gar unikale Rolle für Adhärenz an das intestinale Epithel und/oder das Überleben von *Candidatus* Savagella oder „segmented filamentous bacteria“ (SFB) innehat.

Ein geeignetes Antigen aus dem genannten Bakterium ist beispielsweise das in der Folge näher beschriebene „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein, dessen Aminosäuresequenz in der SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist. Spezifische Epitope aus dem „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein umfassen z.B. die Aminosäuresequenz SVLDEFYWLDDKKDPYSL (SEQ ID Nr. 2), PDFKAVRFTRRNQYESMI (SEQ ID Nr. 3), oder QATSIKILRDGKEEEIKL (SEQ ID Nr. 4).

„Spezifische Bindung“ des erfindungsgemäßen Antikörpers oder eines Fragmentes davon an ein Antigen aus dem Bakterium *Candidatus* Savagella umschreibt die Bindeeigenschaften des Antikörpers, wie etwa, Bindungsaffinität, Bindspezifität und Bindungsavidität; siehe z.B. David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998). Detaillierte Analysen von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen sind beispielsweise mit Oberflächen Plasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) möglich. Die kinetische Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern und deren Antigenen ist eine wesentliche Voraussetzung, um ihre Anwendbarkeit für verschiedene Methoden bewerten zu können. Neben der Bindungsstärke (Affinität, KD-Wert) werden auch die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation (k_{ass}) und Dissoziation (k_{diss}) bestimmt. Damit sind auch Aussagen über die Geschwindigkeit der Komplexbildung und des Komplexzerfalls möglich. Diese Informationen helfen, die Effizienz der erfindungsgemäßen Antikörper in diagnostischen, biotechnologischen oder therapeutischen Anwendungen beurteilen und Prozesse in deren Anwendung optimieren zu können. Die genannten Begriffe und Abkürzungen in Bezug auf die spezifische Bindung werden mit ihren Standardbedeutungen verwendet.

Der Begriff „Antikörper“ umfasst sowohl einen polyklonalen als auch monoklonalen Antikörper (mAb), der verändert sein kann, wie in der Folge beschrieben. Der Antikörper bindet spezifisch an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus* Savagella und ist vorzugsweise ein neutralisierender Antikörper.

„Neutralisierender Antikörper“ bezeichnet dabei die Inhibierung der Anhaftung oder Bindung des Bakteriums *Candidatus* Savagella an (vorzugsweise humane) Darmepithelzellen, die Inhibierung der Proliferation des genannte Bakteriums, und/oder dessen Depletion oder Abtötung, durch den Antikörper.

"Neutralisierung" des Bakteriums *Candidatus Savagella* bezeichnet mindestens 50 %, 60 %, 70 % oder 75 %, bevorzugt 80 % oder 85 %, besonders bevorzugt 90 % oder 95 % Inhibierung der Anhaftung oder Bindung des genannten Bakteriums an Darmepithelzellen, oder der Inhibierung der Proliferation des Bakteriums, oder dass mindestens 50 %, 60 %, 70 % oder 75 %, bevorzugt 80 % oder 85 %, besonders bevorzugt 90 % oder 95 % der Gesamtzahl oder Population des Bakteriums depletiert werden, gemessen in in-vitro-Untersuchungen.

"Veränderter Antikörper" bezeichnet ein durch eine veränderte Immunglobulin-codierende Region codiertes Protein, das durch Expression in einer ausgewählten Wirtszelle erhalten werden kann. Solche veränderten Antikörper schließen gentechnisch hergestellte Antikörper (z.B. chimäre, umgeformte, humanisierte oder vektorisierte Antikörper) oder Antikörperfragmente ein, denen die gesamte oder ein Teil einer konstanten Immunglobulinregion fehlt, z.B. Fv, Fab oder F(ab)₂ und dergleichen.

"Veränderte Immunglobulin-codierende Region" bezeichnet eine Nukleinsäuresequenz, die einen veränderten Antikörper codiert. Wenn der veränderte Antikörper ein CDR-grafted oder humanisierter Antikörper ist, werden die Sequenzen, die die Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDRs) aus einem nicht-humanen Immunglobulin, etwa einem Hühner Antikörper, codieren, in einen ersten Immunglobulinpartner inseriert, der humane variable Gerüstsequenzen umfaßt. Gegebenenfalls ist der erste Immunglobulinpartner operativ mit einem zweiten Immunglobulinpartner verbunden, etwa um einen bispezifischen Antikörper herzustellen.

"Erster Immunglobulinpartner" bezeichnet eine Nukleinsäuresequenz, die eine humane Gerüstregion oder variable Region eines humanen Immunglobulins codiert, worin die nativen (oder natürlich vorkommenden) CDR-codierenden Regionen durch die CDR-codierenden Regionen eines Donor-Antikörpers, z.B. eines Hühner Antikörpers, ersetzt sind. Die humane variable Region kann eine schwere Kette, eine leichte Kette (oder beide Ketten) eines Immunglobulins, ein Analogon oder funktionelle Fragmente davon sein. Solche CDR-Regionen, die sich innerhalb der variablen Region von Antikörpern (Immunglobulinen) befinden, können durch fachbekannte Verfahren bestimmt werden. Zum Beispiel offenbaren Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. Aufl., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)) Regeln zur Lokalisierung von CDRs. Zusätzlich sind Computerprogramme bekannt, die zur Identifizierung von CDR-Regionen/Strukturen nützlich sind.

"Zweiter Immunglobulinpartner" bezeichnet eine andere Nukleotidsequenz, die ein Protein oder Peptid codiert, an das der erste Immunglobulinpartner im Raster oder mittels einer optionalen herkömmlichen Linker-Sequenz fusioniert ist, d.h. operativ gebunden ist. Bevorzugt ist er ein Immunglobulin-Gen. Der zweite Immunglobulinpartner kann eine Nukleinsäuresequenz einschließen, die die gesamte konstante Region für den gleichen (d.h. homologen – der erste und

der zweite veränderte Antikörper stammen aus der gleichen Quelle) oder einen zusätzlichen (d.h. heterologen) Antikörper von Interesse codiert. Er kann eine schwere Kette oder leichte Kette eines Immunglobulins sein (oder beide Ketten als Teil eines einzelnen Polypeptids). Der zweite Immunglobulinpartner ist nicht auf eine besondere Immunglobulinklasse oder einen Isotyp
5 beschränkt. Zusätzlich kann der zweite Immunglobulinpartner einen Teil einer konstanten Region eines Immunglobulins umfassen, wie er in einem Fab oder F(ab)₂ gefunden wird, d.h. ein diskreter Teil einer humanen konstanten Region oder Gerüstregion. Ein solcher zweiter Immunglobulinpartner kann auch eine Sequenz umfassen, die ein integrales Membranprotein codiert, das an der äußeren Oberfläche einer Wirtszelle exponiert ist, zum Beispiel als Teil einer
10 Phagen-Display-Bibliothek, oder eine Sequenz, die ein Protein für den analytischen oder diagnostischen Nachweis codiert, z.B. Meerrettichperoxidase, β-Galactosidase etc.

Die Begriffe Fv, Fc, Fd, Fab oder F(ab)₂ werden mit ihren Standardbedeutungen verwendet (siehe z.B. Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory
15 (1988)).

Wie hier verwendet beschreibt ein "gentechnisch hergestellter Antikörper" einen Typ von verändertem Antikörper, d.h. einen synthetischen Antikörper voller Länge (z.B. einen chimären, ungeformten oder humanisierten Antikörper im Gegensatz zu einem Antikörperfragment), in dem ein Teil der variablen Domänen der leichten und/oder schweren Kette eines ausgewählten
20 Akzeptorantikörpers durch analoge Teile aus einem oder mehreren Donor-Antikörpern (z.B. Hühner Antikörper) ersetzt ist, die Spezifität für das ausgewählte Epitop haben. Zum Beispiel können solche Moleküle Antikörper einschließen, die durch eine humanisierte schwere Kette charakterisiert sind, die mit einer unmodifizierten leichten Kette oder (oder chimären leichten
25 Kette) assoziiert sind, oder umgekehrt. Gentechnisch hergestellte Antikörper können auch durch Veränderung der Nukleinsäuresequenzen gekennzeichnet sein, die die Gerüstregionen der leichten und/oder schweren variablen Domäne des Akzeptor-Antikörpers codieren, um die Donor-Antikörper-Bindungsspezifität, z.B. eines Hühner Antikörpers, beizubehalten. Diese Antikörper können einen Austausch eines (z.B. CDR-H3) oder mehrerer CDRs (bevorzugt aller
30 CDRs, d.h. CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, und CDR-H3) aus dem Akzeptor-Antikörper gegen CDRs aus einem hier beschriebenen Donor-Antikörper, d.h. einem Hühner Antikörper, umfassen.

Ein "chimärer Antikörper" bezeichnet einen Typ von gentechnisch hergestelltem Antikörper, der
35 eine natürlich vorkommende variable Region (leichte Kette und schwere Ketten), die aus einem Donor-Antikörper (z.B. einem Hühner Antikörper) stammt, in Verbindung mit konstanten Regionen der leichten und schweren Kette enthält, die aus einem Akzeptor-Antikörper stammen.

Ein "humanisierter Antikörper" bezeichnet einen Typ von gentechnisch hergestelltem
40 Antikörper, dessen CDRs aus einem nicht-humanen Donor-Immunglobulin, etwa einem Hühner

Antikörper, stammen, wobei die verbleibenden aus Immunglobulin stammenden Teile des Moleküls aus einem (oder mehreren) humanen Immunglobulinen stammen. Zusätzlich können Gerüstträgerreste verändert sein, um die Bindungsaffinität zu bewahren (siehe z.B. Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029–10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

An den Antikörper kann ein Mittel gebunden werden, beispielsweise um den Transport in den Darm zu verbessern. Dabei können beispielsweise durch das am Antikörper gebundene Mittel aktiv oder passiv Transporterproteine im Darm beeinflusst werden. Die Anbringung kann chemisch sein, oder alternativ kann die Einheit gentechnisch in den Antikörper eingebaut werden.

Der Begriff "Donor-Antikörper" bezeichnet einen Antikörper (monoklonal oder rekombinant), der die Nukleinsäuresequenzen seiner variablen Regionen, CDRs oder andere funktionale Fragmente oder Analoga davon für einen ersten Immunglobulinpartner beiträgt, um die veränderte Immunglobulin-codierende Region und den resultierenden exprimierten veränderten Antikörper mit der antigenen Spezifität und neutralisierenden Aktivitätseigenschaft des Donor-Antikörpers, z.B. des Hühner Antikörpers, zu versehen.

Der Begriff "Akzeptor-Antikörper" bezeichnet einen Antikörper (monoklonal oder rekombinant), der heterolog für den Donor-Antikörper ist und alle (oder einen Teil, aber bevorzugt alle) Nukleinsäuresequenzen, die seine Gerüstregionen der schweren und/oder leichten Kette und/oder seine konstanten Regionen der schweren und/oder leichten Kette codieren, für den ersten Immunglobulinpartner beiträgt. Bevorzugt ist ein humaner Antikörper der Akzeptor-Antikörper.

"CDRs" werden als die Aminosäuresequenzen der Komplementarität bestimmenden Region eines Antikörpers definiert, die die hypervariablen Regionen der schweren und leichten Ketten eines Immunglobulins sind. Siehe z.B. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. Aufl., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Es gibt drei CDRs der schweren Kette (CDR-H1, -2 und -3) und drei CDRs der leichten Kette (CDR-L1, -2 und -3) (oder CDR-Regionen) im variablen Teil eines Immunglobulins. So bezeichnet "CDRs" wie hier verwendet alle drei CDRs der schweren Kette oder alle drei CDRs der leichten Kette (oder sowohl alle CDRs der schweren und alle der leichten Kette, falls passend). Die Struktur und Proteinfaltung des Antikörpers kann bedeuten, dass andere Reste als Teil der Antigen-Bindungsregion betrachtet werden, und sie würden so von einem Fachmann verstanden werden. Siehe zum Beispiel Chothia et al. (1989), Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, S. 877–883.

CDRs liefern die Mehrzahl der Kontaktreste für die Bindung des Antikörpers an das Antigen oder Epitop. CDRs von Interesse in dieser Erfindung stammen aus den Sequenzen der variablen schweren und leichten Kette des Donor-Antikörpers, z.B. eines Hühner Antikörpers, und schließen Analoga der natürlich vorkommenden CDRs ein, wobei die Analoga die gleiche Antigen-Bindungsspezifität und/oder neutralisierende Fähigkeit wie der Donor-Antikörper teilen oder beibehalten, aus dem sie abgeleitet wurden.

Ein "funktionales Fragment" ist eine partielle variable Sequenz der schweren oder leichten Kette (z.B. geringfügige Deletionen am Amino- oder Carboxy-Terminus der variablen Region des Immunglobulins), die die gleiche Antigen-Bindungsspezifität und/oder neutralisierende Fähigkeit wie der Antikörper beibehält, aus dem das Fragment abgeleitet wurde.

Ein "Analogon" ist eine mit wenigstens einer Aminosäure modifizierte Aminosäuresequenz, worin die Modifikation chemisch oder eine Substitution oder Umlagerung einiger weniger Aminosäuren (d.h. vorzugsweise nicht mehr als 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 oder 1 Aminosäurerest(e)) sein kann, wobei die Modifikation der Aminosäuresequenz erlaubt, die biologischen Eigenschaften, zum Beispiel Antigen-spezifität und hohe Affinität, der unmodifizierten Sequenz zu bewahren. Zum Beispiel können (stumme) Mutationen über Substitutionen konstruiert werden, wenn bestimmte Endonuklease-Restriktionsorte innerhalb oder umgebend um CDR-codierende Regionen geschaffen werden. Die vorliegende Erfindung erwägt die Verwendung von Analoga des Antikörpers der Erfindung. Es ist allgemein bekannt, dass geringfügige Veränderungen von Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzen zum Beispiel zu einer allelischen Form des ursprünglichen Proteins führen können, die im Wesentlichen ähnliche Eigenschaften beibehalten. Somit schließen Analoga des Antikörpers der Erfindung diejenigen ein, in denen die CDRs in der hypervariablen Region der schweren und leichten Ketten wenigstens 80 % homolog, bevorzugt wenigstens 85%, wenigstens 90 % homolog und besonders bevorzugt wenigstens 95 %, 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu den CDRs wie oben definiert als CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 und CDR-L3 sind und die spezifische Bindung an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella* und neutralisierende Aktivität beibehalten. Aminosäuresequenzen sind wenigstens 80 % homolog, falls sie 80 % identische Aminosäurereste in einer ähnlichen Position haben, wenn die Sequenzen optimal angeglichen sind, wobei Lücken oder Insertionen als nicht-identische Reste gezählt werden. Algorithmen zur Bestimmung der Sequenzidentität und Programme zum Sequenzvergleich sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt.

Analoga können auch als allelische Variationen auftreten. Eine "allelische Variation oder Modifikation" ist eine Veränderung in der Nukleinsäuresequenz. Solche Variationen oder Modifikationen können auf der Degeneriertheit des genetischen Codes beruhen oder können absichtlich gentechnisch oder rekombinant hergestellt werden, um die gewünschten

Eigenschaften zu liefern. Diese Variationen und Modifikationen können oder können nicht zu Veränderungen in einer codierten Aminosäuresequenz führen.

Der Begriff "Effektormittel" bezeichnet Nicht-Protein-Trägermoleküle, an die die veränderten Antikörper und/oder natürliche oder synthetische leichte oder schwere Ketten des Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers, oder andere Fragmente des Donor-Antikörpers durch herkömmliche Mittel assoziiert werden können. Solche Nicht-Proteinträger können herkömmliche Träger einschließen, die auf dem diagnostischen Gebiet verwendet werden, zum Beispiel Polystyrol oder andere Kunststoffkügelchen, Polysaccharide, z.B. wie im BIAcore-System [Pharmacia] verwendet, oder andere Nicht-Proteinsubstanzen, die auf dem medizinischen Gebiet nützlich und sicher zur Verabreichung an Menschen und Tiere sind. Andere Effektormittel können einen Makrozyklus zur Komplexierung eines Schwermetallatoms oder Radioisotope einschließen. Solche Effektormittel können auch nützlich zur Erhöhung der Halbwertszeit der veränderten Antikörper sein, z.B. Polyethylenglykol (PEG).

Ein für das Bakterium *Candidatus Savagella* spezifischer neutralisierender Antikörper wurde bislang noch nicht im Stand der Technik beschrieben und wird erstmals durch die vorliegende Erfindung zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die einen erfindungsgemäßen Antikörper zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmittel oder Träger umfasst.

Wie dem Fachmann geläufig, kann man Antikörper, veränderte Antikörper und Fragmente durch Immunisieren einer nicht-humanen Art (zum Beispiel Rind, Schaf, Affe, Huhn, Nagetier (z.B. Maus, Hamster und Ratte) etc.) konstruieren, um ein wünschenswertes Immunglobulin bei Präsentation mit nativem oder rekombinanten Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* aus jeder Art zu erzeugen, gegen die Antikörper, die kreuzreaktiv gegenüber dem nativem oder rekombinanten Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* sind, erzeugt werden können, z.B. Mensch oder Huhn. Herkömmliche Hybridomtechniken werden eingesetzt, um eine Hybridom-Zelllinie bereitzustellen, die einen nicht-humanen monoklonalen Antikörper, etwa einen Hühner Antikörper, gegen das native Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* sezerniert. Solche Hybridome werden dann auf Bindung unter Verwendung von auf Platten mit 384 oder 96 Vertiefungen aufgetragenem nativem oder rekombinanten Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella*, wobei biotinyliertes natives oder rekombinantes Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* an eine Streptavidin-beschichtete Platte gebunden ist, oder in einem homogenen Europium-APC-gekoppelten Immunoassay unter Verwendung von biotinyliertem nativem oder rekombinantem Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* durchmustert.

Ein nativer humaner Antikörper kann z.B. in einer humanen Antikörper-Maus wie der "Xenomouse" (Abgenix) erzeugt werden, worin die Immunglobulin-Gene der Maus entfernt und Gene, die die humanen Immunglobuline codieren, in das Maus-Chromosom inseriert wurden. Die Mäuse werden normal immunisiert und entwickeln eine Antikörperreaktion, die aus den
5 humanen Genen stammt. Somit erzeugt die Maus humane Antikörper unter Umgehung der Notwendigkeit zur Humanisierung nach Selektion positiver Hybridome (siehe L.L. Green, J. Immunol. Methods, 10. Dez. 1999; 231 (1–2):11–23).

Ein Fab-Fragment enthält die gesamte leichte Kette und den Amino-terminalen Teil der
10 schweren Kette; und ein F(ab')₂-Fragment ist das durch zwei Fab-Fragmente, die durch Disulfidbindungen gebunden sind, gebildete Fragment. Fab-Fragmente und F(ab')₂-Fragmente können durch herkömmliche Mittel, z.B. Spaltung von monoklonalen Antikörpern (mAb) mit den geeigneten proteolytischen Enzymen, Papain und/oder Pepsin, oder durch rekombinante Verfahren erhalten werden. Die Fab- und F(ab')₂-Fragmente sind selbst als Therapeutikum oder
15 Prophylaktikum und als Donoren für Sequenzen nützlich, die die variablen Regionen und CDR-Sequenzen einschließen, die nützlich in der Bildung von rekombinanten oder humanisierten Antikörpern wie hier beschrieben sind.

Die Fab- und F(ab')₂-Fragmente können auch über eine kombinatorische Phagen-Bibliothek
20 konstruiert werden (siehe z.B. Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433–455 (1994)), oder über Immunglobulin-Kettenaustausch ("chain shuffling") (siehe z.B. Marks et al., Bio Technology, 10:779–783 (1992)).

So können humane Antikörperfragmente (Fv, scFv, Fab), die für ein natives oder rekombinantes
25 Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* spezifisch sind, unter Verwendung humaner Antikörperfragment-Phagen-Display-Bibliotheken isoliert werden. Eine Bibliothek von Bakteriophagenpartikeln, die die humanen Antikörperfragmentproteine darstellen, wird gegen das native oder rekombinante Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* getestet. Diejenigen Phagen, die Antikörperfragmente darstellen, die das native oder rekombinante
30 Antigen aus dem Bakterium *Candidatus Savagella* binden, werden aus der Bibliothek zurückbehalten und klonierend amplifiziert. Die humanen Antikörper-Gene werden dann aus dem spezifischen Bakteriophagen ausgeschnitten und in humane IgG-Expressionskonstrukte inseriert, die die konstanten Regionen von humanem IgG enthalten, um das intakte humane IgG-Molekül mit den variablen Regionen aus dem für natives oder rekombinantes Antigen aus dem
35 Bakterium *Candidatus Savagella* spezifischen, isolierten Bakteriophagen zu bilden.

Die Donor-Antikörper können Sequenzen, wie z.B. Peptidsequenzen der variablen schweren und/oder leichten Kette, Gerüstsequenzen, CDR-Sequenzen, funktionale Fragmente und Analoga davon, und die sie codierenden Nukleinsäuresequenzen beitragen, die nützlich in der

Konstruktion und im Erhalt verschiedener veränderter Antikörper sind, die durch die Antigen-Bindungsspezifität des Donor-Antikörpers, z.B. eines Hühner Antikörpers, gekennzeichnet sind.

5 Unter Berücksichtigung der Degeneriertheit des genetischen Codes können verschiedene codierende Sequenzen konstruiert werden, die die Aminosäuresequenzen der variablen schweren und leichten Kette codieren, und CDR-Sequenzen sowie funktionale Fragmente und Analoga davon, die die Antigen-spezifität des Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers, teilen. Isolierte Nukleinsäuresequenzen oder Fragmente davon, die die Peptidsequenzen der variablen Kette oder CDRs codieren, können zur Erzeugung veränderter Antikörper, zum Beispiel
10 chimärer oder humanisierter Antikörper, oder anderer gentechnisch hergestellter Antikörper verwendet werden, wenn sie operativ mit einem zweiten Immunglobulinpartner kombiniert werden.

Veränderte Immunglobulinmoleküle können veränderte Antikörper codieren, die gentechnisch
15 veränderte Antikörper wie chimäre Antikörper und humanisierte Antikörper einschließen. Eine gewünschte veränderte Immunglobulin-codierende Region enthält CDR-codierende Regionen, die Peptide mit der Antigen-spezifität eines anti-*Candidatus* Savagella Antigen-Antikörpers codieren, bevorzugt eines hochaffinen Antikörpers, inseriert in einen ersten Immunglobulinpartner (eine humane Gerüstregion oder variable Region eines humanen
20 Immunglobulins).

Bevorzugt ist der erste Immunglobulinpartner operativ mit einem zweiten Immunglobulinpartner verbunden. Der zweite Immunglobulinpartner ist oben definiert und kann eine Sequenz einschließen, die eine zweite Antikörperregion von Interesse codiert, z.B. eine Fc-Region.
25 Zweite Immunglobulinpartner können auch Sequenzen einschließen, die ein anderes Immunglobulin codieren, an das die konstante Region der leichten oder schweren Kette im Raster oder mittels einer Linker-Sequenz fusioniert ist. Gentechnisch hergestellte Antikörper, die gegen funktionale Fragmente oder Analoga von nativem oder rekombinantem Antigen aus dem Bakterium *Candidatus* Savagella gerichtet sind, können zur Hervorrufung einer gesteigerten
30 Bindung konstruiert werden.

Der zweite Immunglobulinpartner kann auch mit Effektormitteln wie oben definiert assoziiert sein, einschließlich von Nicht-Protein-Trägermolekülen, an die der zweite Immunglobulinpartner operativ durch herkömmliche Mittel gebunden sein kann.
35

Die Fusion oder Bindung zwischen den zweiten Immunglobulinpartnern, zum Beispiel Antikörpersequenzen, und dem Effektormittel kann durch jedes geeignete Mittel erfolgen, zum Beispiel durch herkömmliche kovalente oder ionische Bindungen, Proteinfusionen oder heterobifunktionelle Vernetzer, z.B. Carbodiimid, Glutaraldehyd und dgl. Solche Techniken sind
40 fachbekannt und allgemein in herkömmlichen Chemie- und Biochemietexten beschrieben.

Zusätzlich können herkömmliche Linker-Sequenzen, die einfach eine gewünschte Menge an Raum zwischen dem zweiten Immunglobulinpartner und dem Effektormittel vorsehen, auch in die veränderte Immunglobulin-codierende Region konstruiert werden. Die Konstruktion solcher Linker ist den Fachleuten allgemein bekannt.

5

In noch einer weiteren Ausführungsform kann der Antikörper ein zusätzliches Mittel daran angebracht aufweisen. Zum Beispiel kann das Verfahren der rekombinanten DNA-Technik verwendet werden, um einen gentechnisch hergestellten Antikörper zu erzeugen, in dem das Fc-Fragment oder die CH₂-CH₃-Domäne eines kompletten Antikörpermoleküls durch ein Enzym
10 oder ein anderes detektierbares Molekül (d.h. einen Polypeptid-Effektor oder ein Reporter-molekül) ersetzt wurde.

Der zweite Immunglobulinpartner kann auch operativ mit einem Nicht-Immunglobulinpeptid, -protein oder -fragment davon verbunden sein, das heterolog zur CDR-haltigen Sequenz mit der
15 Antigen-spezifität von anti-*Candidatus* Savagella Antigen-Antikörpern ist. Das resultierende Protein kann sowohl Anti-*Candidatus* Savagella-Antigen-spezifität als auch Eigenschaften des Nicht-Immunglobulins bei der Expression aufweisen. Die Eigenschaft des Fusionspartners kann z.B. eine funktionale Eigenschaft wie eine andere Bindungs- oder Rezeptordomäne oder eine therapeutische Eigenschaft, falls der Fusionspartner selbst ein therapeutisches Protein ist, oder
20 zusätzliche antigene Eigenschaften sein.

Ein anderes wünschenswertes Protein dieser Erfindung kann ein komplettes Antikörpermolekül mit schweren und leichten Ketten voller Länge oder jedes diskrete Fragment davon wie die Fab- oder F(ab')₂-Fragmente, ein Dimer der schweren Kette oder beliebige minimale rekombinante
25 Fragmente davon wie ein Fv oder ein einkettiger Antikörper (SCA) oder jedes andere Molekül mit der gleichen Spezifität wie der ausgewählte Donor-Antikörper, etwa ein Hühner Antikörper, sein. Ein solches Protein kann in Form eines veränderten Antikörpers verwendet werden oder kann in seiner unfusionierten Form verwendet werden.

30 Immer wenn der zweite Immunglobulinpartner aus einem Antikörper stammt, der sich vom Donor-Antikörper, etwa einem Hühner Antikörper, unterscheidet, resultiert ein gentechnisch oder rekombinant hergestellter Antikörper. Gentechnisch oder rekombinant hergestellte Antikörper können konstante Regionen des Immunglobulins (Ig) und variable Gerüstregionen aus einer Quelle, z.B. dem Akzeptor-Antikörper, und ein oder mehrere (bevorzugt alle) CDRs
35 aus dem Donor-Antikörper, etwa einem Hühner Antikörper, umfassen. Zusätzlich können Veränderungen, z.B. Deletionen, Substitutionen oder Additionen, der Gerüstregion der leichten und/oder schweren variablen Domäne des Akzeptor-monoklonalen Antikörpers (mAb) auf der Nukleinsäure- oder Aminosäureebene oder der Donor-CDR-Regionen durchgeführt werden, um die Antigen-Bindungsspezifität des Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers,
40 beizubehalten.

Solche gentechnisch oder rekombinant hergestellten Antikörper werden konstruiert, um eine (oder beide) der variablen schweren und/oder leichten Ketten des anti-*Candidatus* Savagella Antigen-Antikörpers oder eine oder mehrere der CDRs der schweren oder leichten Kette einzusetzen. Die gentechnisch oder rekombinant hergestellten Antikörper können neutralisierend wie oben definiert sein.

Solche gentechnisch oder rekombinant hergestellten Antikörper können einen humanisierten Antikörper, der die Gerüstregionen eines ausgewählten humanen Immunglobulins oder Subtyps enthält, oder einen chimären Antikörper einschließen, der die konstanten Regionen der humanen schweren und leichten Kette enthält, fusioniert an die funktionalen Fragmente des Anti-*Candidatus* Savagella Antigen-Antikörpers. Ein geeigneter humaner (oder anderer tierischer) Akzeptor-Antikörper kann ein aus einer herkömmlichen Datenbank, z.B. der KABAT®-Datenbank, der Los Alamos-Datenbank und Swiss Protein-Datenbank, durch Homologie mit den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers, ausgewählt sein. Ein humaner Antikörper, der durch eine Homologie mit den Gerüstregionen des Donor-Antikörpers (auf einer Aminosäurebasis) gekennzeichnet ist, kann geeignet sein, um eine konstante Region der schweren Kette und/oder eine variable Gerüstregion der schweren Kette zur Insertion der Donor-CDRs bereitzustellen. Ein geeigneter Akzeptor-Antikörper, der konstante oder variable Gerüstregionen der leichten Kette spenden kann, kann in einer ähnlichen Weise ausgewählt werden. Es sollte beachtet werden, dass die schweren und leichten Ketten des Akzeptor-Antikörpers nicht aus dem gleichen Akzeptor-Antikörper stammen müssen.

Wünschenswert werden die heterologen Gerüstregionen und die konstanten Regionen aus humanen Immunglobulinklassen und -isotypen wie IgG (Subtypen 1 bis 4), IgM, IgA und IgE ausgewählt. Jedoch braucht der Akzeptor-Antikörper nicht nur humane Immunglobulin-Proteinsequenzen umfassen. Zum Beispiel kann ein Gen konstruiert werden, in dem eine DNA-Sequenz, die einen Teil einer humanen Immunglobulinkette codiert, an eine DNA-Sequenz fusioniert ist, die eine Nicht-Immunglobulin-Aminosäuresequenz wie einen Polypeptideffektor oder ein Reportermolekül codiert.

Bevorzugt wurden in einem humanisierten Antikörper die variablen Domänen sowohl in den humanen schweren als auch leichten Ketten durch eine oder mehrere CDR-Austausche gentechnisch hergestellt. Es ist möglich, alle sechs CDRs oder verschiedene Kombinationen aus weniger als den sechs CDRs zu verwenden. Bevorzugt werden alle sechs CDRs ausgetauscht. Es ist möglich, die CDRs nur in der humanen schweren Kette auszutauschen, wobei als leichte Kette die unmodifizierte leichte Kette aus dem humanen Akzeptor-Antikörper verwendet wird. Alternativ kann eine kompatible leichte Kette aus einem anderen humanen Antikörper durch Rückgriff auf die herkömmlichen Antikörper-Datenbanken ausgewählt werden. Der Rest des gentechnisch hergestellten Antikörpers kann aus jedem geeigneten humanen Akzeptor-Immunglobulin stammen.

Der gentechnisch oder rekombinant hergestellte humanisierte Antikörper hat somit die Struktur eines natürlichen humanen Antikörpers oder eines Fragments davon und besitzt die Kombination von Eigenschaften, die für eine wirksame therapeutische Verwendung erforderlich sind.

5 Die Fachleute werden verstehen, dass ein gentechnisch hergestellter Antikörper weiter durch Veränderungen der Aminosäuren der variablen Domäne modifiziert werden kann, ohne dass notwendigerweise die Spezifität und hohe Affinität des Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers, beeinflusst wird (d.h. ein Analogon). Es ist vorhergesehen, dass Aminosäuren der schweren und leichten Kette durch andere Aminosäuren entweder in den Gerüsten der variablen
10 Domäne oder CDRs oder beiden substituiert werden können.

Zusätzlich kann die konstante Region verändert werden, um selektive Eigenschaften der Moleküle der vorliegenden Erfindung zu steigern oder zu verringern, wie zum Beispiel Dimerisierung, Bindung an Fc-Rezeptoren oder die Fähigkeit zur Bindung und Aktivierung von
15 Komplement (siehe z.B. Angal et al., Mol. Immunol. 30:105–108 (1993), Xu et al., J. Biol. Chem. 239:3469–3474 (1994), Winter et al., EP 307,434-B).

Ein veränderter Antikörper, der ein chimärer Antikörper ist, unterscheidet sich von den oben beschriebenen humanisierten Antikörpern, indem er die gesamten variablen Regionen der
20 schweren Kette und leichten Kette des nicht-humanen Donor-Antikörpers, etwa eines Hühner Antikörpers, einschließlich der Gerüstregionen, in Verbindung mit den konstanten Regionen des humanen Immunglobulins für beide Ketten bereitstellt.

Die Herstellung von Antikörpern, die spezifisch an ein Antigen binden, ist hinlänglich im Stand der Technik beschrieben, z.B. durch die in Sambrook et al. beschriebenen Techniken (Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory (1989; 2001)). Die Herstellung eines humanisierten monoklonalen Antikörpers ist in der Folge kurz skizziert. Die variablen schweren und leichten Regionen, die wenigstens die CDR-codierenden Regionen und diejenigen Teile der Gerüstregionen der leichten und/oder schweren variablen Domäne des
30 Akzeptor-mAb enthalten, die erforderlich sind, um die Bindungsspezifität des Donor-mAb, etwa eines Hühner monoklonalen Antikörpers beizubehalten, sowie die verbleibenden aus Immunglobulin stammenden Teile der Antikörperkette, die aus einem humanen Immunglobulin stammen, werden unter Verwendung von Polynukleotidprimern und Umkehrtranskriptase erhalten. Die CDR-codierenden Regionen werden unter Verwendung einer bekannten Datenbank
35 und durch Vergleich mit anderen Antikörpern identifiziert.

Ein Hühner/humaner chimärer Antikörper kann dann hergestellt und auf Bindungsfähigkeit untersucht werden. Ein solcher chimärer Antikörper enthält die gesamten VH- und VL-Regionen des nicht-humanen Hühner Donor-Antikörpers in Verbindung mit den konstanten Regionen von
40 humanem Ig für beide Ketten.

Homologe Gerüstregionen einer variablen Region der schweren Kette aus einem humanen Antikörper können unter Verwendung computerisierter Datenbanken, z.B. KABAT®, identifiziert werden, und ein humaner Antikörper mit Homologie zum Hühner Donor-Antikörper wird als Akzeptor-Antikörper ausgewählt werden. Eine geeignete variable Gerüstregion der
5 leichten Kette kann in einer ähnlichen Weise geschaffen werden.

Ein humanisierter Antikörper kann aus dem chimären Antikörper stammen oder bevorzugt synthetisch durch Inserieren der CDR-codierenden Regionen des Hühner Donor-mAb aus den schweren und leichten Ketten in geeigneter Weise innerhalb des ausgewählten Gerüsts der
10 schweren und leichten Kette hergestellt werden. Alternativ kann ein humanisierter Antikörper unter Verwendung von Mutagenese-Standardtechniken hergestellt werden. Somit enthält der resultierende humanisierte Antikörper humane Gerüstregionen und CDR-codierende Regionen des Hühner Donor-mAb. Es kann eine anschließende Manipulation von Gerüstresten geben. Der resultierende humanisierte Antikörper kann in rekombinanten Wirtszellen, z.B. COS-, CHO-
15 oder Myelomzellen, exprimiert werden.

Ein herkömmlicher Expressionsvektor oder ein rekombinantes Plasmid wird durch Platzieren dieser codierenden Sequenzen für den Antikörper in operativer Assoziation mit herkömmlichen regulatorischen Kontrollsequenzen hergestellt, die die Vermehrung und Expression in und/oder
20 Sekretion aus einer Wirtszelle kontrollieren können. Regulatorische Sequenzen schließen Promotorsequenzen, zum Beispiel einen CMV-Promotor, und Signalsequenzen ein, die aus anderen bekannten Antikörpern stammen können. In ähnlicher Weise kann ein zweiter Expressionsvektor mit einer DNA-Sequenz hergestellt werden, die eine komplementäre leichte oder schwere Kette eines Antikörpers codiert. Bevorzugt ist dieser zweite Expressionsvektor
25 identisch mit dem ersten, ausgenommen insoweit die codierenden Sequenzen und selektierbaren Marker betroffen sind, um soweit wie möglich sicherzustellen, dass jede Polypeptidkette funktionell exprimiert wird. Alternativ können die codierenden Sequenzen der schweren und leichten Kette für den veränderten Antikörper auf einem einzelnen Vektor ruhen.

Eine ausgewählte Wirtszelle wird durch herkömmliche Techniken mit sowohl dem ersten als auch dem zweiten Vektor ko-transfiziert (oder einfach mit einem einzelnen Vektor transfiziert), um die transfizierte Wirtszelle zu erzeugen, die sowohl die rekombinanten oder synthetischen leichten als auch schweren Ketten umfat. Die transfizierte Zelle wird dann durch herkömmliche Techniken kultiviert, um den gentechnisch oder rekombinant hergestellten Antikörper der
30 Erfindung zu erzeugen. Der humanisierte Antikörper, der die Assoziation der rekombinanten schweren Kette und/oder leichten Kette einschließt, wird aus der Kultur durch einen geeigneten Assay, zum Beispiel ELISA oder RIA, durchmustert. Ähnliche herkömmliche Techniken können eingesetzt werden, um andere veränderte Antikörpermoleküle zu konstruieren.
35

Geeignete Vektoren für die in den Verfahren und der Konstruktion der hierin zur Verfügung gestellten Zusammensetzungen eingesetzten Klonierungs- und Subklonierungsschritte können durch einen Fachmann ausgewählt werden. Zum Beispiel kann die herkömmliche pUC-Reihe von Klonierungsvektoren verwendet werden. Ein Vektor, pUC19, ist kommerziell erhältlich von Lieferanten wie Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom) oder Pharmacia (Uppsala, Schweden). Zusätzlich kann jeder Vektor, der leicht vervielfältigt werden kann, eine Vielzahl von Klonierungsarten und selektierbaren Genen (z.B. Antibiotikaresistenz) aufweist und leicht manipuliert wird, zur Klonierung verwendet werden.

In ähnlicher Weise können die für die Expression der Antikörper eingesetzten Vektoren durch einen Fachmann aus jedem herkömmlichen Vektor selektiert werden. Die Vektoren enthalten auch ausgewählte regulatorische Sequenzen (wie CMV-Promotoren), die die Vervielfältigung und Expression heterologer DNA-Sequenzen in ausgewählten Wirtszellen ausrichten. Diese Vektoren enthalten die oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die für den Antikörper oder die veränderte Immunglobulin-codierende Region codieren. Zusätzlich können die Vektoren die ausgewählten Immunglobulin-Sequenzen aufnehmen, die durch die Insertion gewünschter Restriktionsorte zur leichten Manipulation modifiziert sind.

Die Expressionsvektoren können auch durch Gene gekennzeichnet werden, die zur Amplifizierung der Expression der heterologen DNA-Sequenzen, zum Beispiel des Dihydrofolatreduktase-Gens (DHFR) aus Säugetier, geeignet sind. Andere bevorzugte Vektorsequenzen schließen eine Poly A-Signalsequenz ein, wie zum Beispiel aus bovinem Wachstumshormon (BGH); und die Betaglobin-Promotorsequenz (Betaglopro). Die hier nützlichen Expressionsvektoren können durch Fachleuten allgemein bekannte Techniken synthetisiert werden.

Die Komponenten solcher Vektoren, z.B. Replikons, Selektionsgene, Verstärker, Promotoren, Signalsequenzen und dgl., können aus gewerblichen oder natürlichen Quellen erhalten oder durch bekannte Verfahren zur Verwendung in der Ausrichtung der Expression und/oder Sekretion des Produkts der rekombinanten DNA in einem ausgewählten Wirt erhalten werden. Andere geeignete Expressionsvektoren, von denen zahlreiche Typen auf diesem Gebiet für die Säugetier-, bakterielle, Insekten-, Hefe- und Pilz Expression bekannt sind, können ebenfalls für diesen Zweck ausgewählt werden.

Die Vektoren können zur Generierung einer Zelllinie eingesetzt werden, die mit einem rekombinanten Plasmid transfiziert ist, das die codierenden Sequenzen der Antikörper oder veränderten Immunglobulinmoleküle davon enthält. Für die Klonierung und andere Manipulationen dieser Klonierungsvektoren nützliche Wirtszellen sind ebenfalls herkömmlich. Beispielsweise können Bakterienzellen, wie Zellen aus verschiedenen Stämmen von E. coli, Hefezellen, Insektenzellen, oder Säugetierzellen zur Vervielfältigung der Klonierungsvektoren

und für andere Schritte in der Konstruktion veränderter Antikörper dieser Erfindung verwendet werden.

5 Geeignete Wirtszellen oder Zelllinien zur Expression des Antikörpers der Erfindung sind bevorzugt Säugetierzellen wie NS0, Sp2/0, CHO, COS, eine Fibroblastenzelle (z.B. 3T3) und Myeloidzellen und besonders bevorzugt eine CHO- oder Myeloidzelle. Humane Zellen können verwendet werden, wodurch es möglich wird, das Molekül mit humanen Glykosylierungsmustern zu modifizieren. Alternativ können andere eukaryontische Zelllinien eingesetzt werden. Die Auswahl geeigneter Säugetier-Wirtszellen und Verfahren zur
10 Transformation, Kultur, Amplifikation, Durchmusterung und Produktherstellung und -reinigung sind fachbekannt; siehe z.B. Sambrook et al., oben zitiert.

Bakterielle Zellen können sich nützlich als Wirtszellen erweisen, die für die Expression der rekombinanten Fabs der vorliegenden Erfindung geeignet sind (siehe z.B. A. Plückthun,
15 Immunol. Rev., 130:151–188 (1992)). Jedoch müsste aufgrund der Tendenz von Proteinen, die in bakteriellen Zellen exprimiert werden, in einer ungefalteten oder ungeeignet gefalteten Form oder in einer nicht-glykosylierten Form zu sein, jedes in einer bakteriellen Zelle erzeugte rekombinante Fab auf Beibehaltung der Antigen-Bindungsfähigkeit durchgemustert werden. Falls das durch die bakterielle Zelle exprimierte Molekül in einer geeignet gefalteten Form erzeugt
20 würde, wäre die bakterielle Zelle ein wünschenswerter Wirt. Zum Beispiel sind verschiedene Stämme von E. coli, die zur Expression verwendet werden, allgemein als Wirtszellen auf dem Gebiet der Biotechnologie bekannt.

Verschiedene Stämme von B. subtilis, Streptomyces, anderen Bacilli und dgl. können auch in
25 diesem Verfahren eingesetzt werden.

Nach Wunsch sind auch Stämme von Hefezellen, die den Fachleuten bekannt sind, als Wirtszellen verfügbar, ebenso wie Insektenzellen, z.B. Drosophila und Lepidoptera, und virale Expressionssysteme. Siehe z.B. Miller et al., Genetic Engineering, 8: 277–298, Plenum Press
30 (1986) und darin zitierte Literaturstellen.

Die allgemeinen Verfahren, durch die die Vektoren konstruiert werden können, die Transfektionsverfahren, die zur Erzeugung der Wirtszellen erforderlich sind, und Kulturverfahren, die zur Erzeugung des veränderten Antikörpers der Erfindung aus solchen
35 Wirtszellen notwendig sind, sind allesamt herkömmliche Techniken. Gleichsam können die Antikörper der Erfindung, sobald sie erzeugt sind, aus den Zellkulturinhalten gemäß Standardverfahren auf diesem Gebiet gereinigt werden, die Ammoniumsulfat-Präzipitation, Affinitätssäulen, Säulenchromatographie, Gelelektrophorese und dgl. einschließen. Solche Techniken gehören zum Können des Fachmanns.

Sobald er durch das gewünschte Verfahren exprimiert wird, wird der Antikörper dann auf in-vitro-Aktivität durch Verwendung eines geeigneten Tests (Assay) untersucht. Derzeit werden herkömmliche ELISA-Testformate eingesetzt, um die qualitative und quantitative Bindung des Antikörpers an MAG zu beurteilen. Zusätzlich können andere in-vitro-Assays zur Verifizierung der spezifischen Bindung an das Antigen und neutralisierenden Wirksamkeit wie hierin beschrieben vor anschließenden humanen klinischen Studien verwendet werden, die zur Auswertung der Fortdauer des Antikörpers im Körper trotz der gewöhnlichen Clearance-Mechanismen durchgeführt werden.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment gewählt aus der Gruppe bestehend aus: Immunglobulin Molekül, polyklonaler Antikörper, monoklonaler Antikörper, chimärer Antikörper, durch CDR-grafting erzeugter Antikörper, humanisierter Antikörper, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Disulfid-verknüpftes Fv, scFv, Einzeldomänenantikörper, Diabody, multispezifischer Antikörper, dualspezifischer Antikörper, und bispezifischer Antikörper.

Vorzugsweise ist der Antikörper ein Huhn Immunglobulin Molekül oder Antikörper. Der Antikörper wird bevorzugt gegen ein Antigen oder geeignetes Peptid des Bakteriums *Candidatus Savagella* erzeugt und ist bevorzugt ein polyklonaler oder monoklonaler Hühner Antikörper. Der Hühner Antikörper kann dabei humanisiert oder verändert sein, wie an anderer Stelle definiert.

Besonders bevorzugt ist das Huhn Immunglobulin Molekül ein IgY Immunglobulin Molekül oder polyklonaler IgY Antikörper.

25 Immunglobulin Y, abgekürzt IgY, ist eine Klasse von Immunglobulin-Molekülen, die im Serum von Hühnern und, in hohen Konzentrationen, insbesondere im Eigelb von Hühnereiern enthalten sind. Wie bei den anderen Immunglobulinen handelt es sich auch bei IgY um Proteine, die vom Immunsystem als Reaktion auf bestimmte Fremdstrukturen gebildet werden und diese spezifisch erkennen.

30 Immunglobulin Y ist in Hühnern das funktionelle Äquivalent zu IgG und ist wie dieses aus zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut. Strukturell unterscheiden sich beide Immunglobulinklassen vor allem in den schweren Ketten, die bei IgY eine Molekülmasse von etwa 65,1 Kilodalton haben und damit größer sind als bei IgG. Die leichten Ketten von IgY sind mit einer molaren Masse von etwa 18,7 Kilodalton etwas kleiner im Vergleich zu IgG. Die molare Masse von IgY beträgt damit etwa 167 Kilodalton. Die sterische Flexibilität des IgY Moleküls ist geringer als die von IgG.

40 Funktionell ist IgY sowohl teilweise mit IgE als auch mit IgG vergleichbar. IgY bindet jedoch im Gegensatz zu IgG nicht an Protein A beziehungsweise Protein G und auch nicht an zelluläre

Fc-Rezeptoren. Darüber hinaus aktiviert IgY nicht das Komplementsystem. Der Name Immunglobulin Y wurde 1969 von G.A. Leslie und L.W. Clem vorgeschlagen, nachdem sie Unterschiede zwischen den in Hühnereiern gefundenen Immunglobulinen und Immunglobulin G zeigen konnten.

5

Für die gezielte Gewinnung von Antikörpern und deren Verwendung in der Bioanalytik bietet IgY verschiedene Vorteile gegenüber der Verwendung von Säugetier Antikörpern. Da die Antikörper aus dem Eigelb gelegter Eier gewonnen werden, handelt es sich um eine nicht-invasive Methode der Antikörperproduktion. Den Hühnern muss also kein Blut zur Gewinnung von Blutserum entnommen werden. Durch die wiederholte Eiablage vom gleichen Huhn steigt die verfügbare Menge eines bestimmten Antikörpers erheblich. Auch die Kreuzreaktivität mit Proteinen von Säugetieren ist deutlich geringer als die von IgG. Darüber hinaus ist die Immunantwort gegen bestimmte Antigene in Hühnern stärker ausgeprägt als in Kaninchen oder anderen Säugetieren. Da von den während der Immunantwort entstehenden Immunglobulinen nur IgY in Hühnereiern zu finden ist, sind in entsprechenden Präparationen keine Verunreinigungen mit IgA oder IgM enthalten. Die Ausbeute an IgY aus einem Hühnerei ist hoch und vergleichbar mit der an IgG aus Kaninchenserum. Die Tatsache, dass IgY nicht an Protein A/G bindet, keine Komplementfaktoren aktiviert und nicht an den Fc Teil von Antikörpern bindet, führt zu einem reduzierten Hintergrund in vielen Anwendungen.

20

Darüber hinaus wird IgY insbesondere in asiatischen Ländern wie Japan als Bestandteil von Lebensmitteln eingesetzt. So werden dort zum Beispiel Joghurtprodukte vertrieben, die spezifisches IgY enthalten. Dieses verhindert das Anheften von Bakterien der Art *Helicobacter pylori* im Magen. Das hierzu verwendete IgY wird aus den Eiern von immunisierten Hühnern gewonnen. Antikörper werden so auch gegen Salmonellen und andere Bakterien, aber auch gegen Viren produziert und als Bestandteil der Nahrung zum Schutz gegen diese Krankheitserreger eingesetzt. Somit kann das erfindungsgemäße IgY zum Beispiel in Form von „Novel Food“ oder „Nutrazeutika“ eingesetzt werden.

30 Es gibt mittlerweile eine Reihe von kommerziellen Anbietern für polyklonale Antikörperproduktion aus Hühnereigelb oder die Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus Hühnern (z.B. Genosphere Biotechnologies, Davids Biotechnologie).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform führt der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment (indirekt) zu einer Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität. Alternativ oder zusätzlich hemmt der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment die Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen.

Th17 Zellen entwickeln sich aus sogenannten naiven T Helferzellen, also T Helferzellen, die noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten, erst nach deren Aktivierung durch

40

Antigenkontakt. Für die Differenzierung von Th17 Zellen ist IL-6 und TGF- β nötig. Th17 Zellen sind nach dem von ihnen produzierten Interleukin IL-17 benannt und haben eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, werden aber auch mit der Entstehung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Weitere Sekretionsprodukte von Th17 Zellen sind TNF- α und IL-6. Rezeptoren für IL-17 befinden sich auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems, beispielsweise auf myeloiden Zellen, zu denen die Neutrophilen Granulozyten gehören, und auf Lymphozyten. Die von den Th17 Zellen ausgeschütteten Botenstoffe bewirken Entzündungsprozesse, bei denen Neutrophile Granulozyten eine dominante Rolle spielen. IL-17 bewirkt in den genannten Zielzellen eine Ausschüttung von u.a. G-CSF, IL-6 und IL-8, die Neutrophile Granulozyten zum Einwandern bringen und aktivieren. Außerdem werden verstärkt entzündungsfördernde Proteine wie IL-1, IL-6, PGE-2, Cyclooxygenase 2 und Matrixmetalloproteasen exprimiert.

Durch die oben angeführten Mechanismen, i.e. Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität und/oder Hemmung der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen, trägt der Antikörper der Erfindung zu einer erhöhten Immuntoleranz bei. Immunerkrankungen wie multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Typ-1 Diabetes und allergisches Asthma werden wesentlich von der Aktivität von Th17 Immunzellen bestimmt. Das Darmbakterium, *Candidatus Savagella* („segmented filamentous bacteria“) induziert genau diese Th17 Immunzellen (siehe z.B. US 2012/276149; WO 2011/047153). Die vorliegende Erfindung umfasst die Neutralisierung dieses Bakteriums mit oral applizierten Hühnereiweiß-Antikörpern, um so Th17 immunzellvermittelte Erkrankungen zu therapieren. Tests zur Reduktion der Th17 Zellproliferation, Reduktion der Th17 Zelldifferenzierung, Reduktion der Th17 Zellaktivität oder Hemmung der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen sind dem Fachmann bekannt und im Stand der Technik beschrieben; siehe etwa US 2012/276149 oder WO 2011/047153.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella* ein Bakterienwandprotein, besonders bevorzugt das „myosin-cross-reactive antigen“ (SEQ ID Nr. 1).

Beispiel für ein Antigen im Sinne der Erfindung ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Candidatus Savagella*, wie etwa das „myosin-cross-reactive antigen“, dessen Aminosäuresequenz in der SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform bindet der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Epitop aus dem myosin-cross-reactive antigen, umfassend oder bestehend aus der Aminosäuresequenz SVLDEFYWLDKKDPYSL (SEQ ID Nr. 2), PDFKAVRFTRRNQYESMI (SEQ ID Nr. 3), oder QATSIKILRDGKEEEIKL (SEQ ID Nr. 4).

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers, umfassend:

- a) Immunisierung von Hühnern mit einem immunogenen Peptid aus einem Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella*; und
- 5 b) Gewinnung und Aufreinigung der in den Hühnern oder in einem von diesen Hühnern gelegten Ei gebildeten Antikörper.

Zur Generierung eines neutralisierenden Antikörpers der Erfindung wird aus der Gruppe von funktionsbestimmenden und „segmented filamentous bacteria“ (SFB)-spezifischen Proteine ein
10 geeignetes Protein ausgewählt, das sich dadurch auszeichnet, dass es ein Bakterienwandprotein ist und eine nicht-redundante Rolle für Adhärenz an das intestinale Epithel und/oder das Überleben von *Candidatus Savagella* oder „segmented filamentous bacteria“ (SFB) spielt, wie z.B. das „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein. Innerhalb der Proteinsequenz des ausgewählten Targetantigens werden anschließend geeignete Epitope bestimmt, beispielsweise
15 durch „epitope prediction programs“ und/oder mit Hilfe von Datenbanken. Die Zielsequenz mit der rechnerisch besten Antigenität/Immunogenität wird dann für die Antikörperherstellung ausgewählt. Mit der Aminosäuresequenz wird im nächsten Schritt das entsprechende Peptid in ausreichender Menge synthetisiert. Um als Antigen wirken zu können, müssen niedermolekulare Moleküle wie Peptide an Trägerproteine („carrier“) gekoppelt werden. Neben Ovalbumin
20 (Hühnerei-Albumin) und bovinen oder humanen Serumalbuminen ist das Schneckenprotein KLH ein in der Biotechnologie verbreitetes Trägerprotein bei der Immunisierung von Tieren. So kann das Peptid anschließend z.B. an das Protein Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) gekoppelt werden. Die Hühner werden innerhalb von 60 Tagen vier Mal mit dem Peptid-KLH Komplex immunisiert, während der ersten Immunisierung erhält das Tier dabei
25 die doppelte Menge. Nach dieser Immunisierungsphase produziert ein Huhn bis zu 3 Gramm IgY pro Monat. Die Antikörper werden anschließend aus dem Eidotter isoliert und auf ihre neutralisierende Wirkung hin getestet, d.h. ob der Antikörper in der Lage ist, die Anhaftung oder Bindung des Bakteriums *Candidatus Savagella* an Darmepithelzellen zu hemmen, die Proliferation des genannten Bakteriums zu inhibieren, und/oder das Bakterium zu depletieren oder
30 abzutöten.

Bevorzugt zur Herstellung des erfindungsgemäßen Antikörpers nach dem o.a. Verfahren ist das myosin-cross-reactive antigen als Antigen des Bakteriums *Candidatus Savagella*. Besonders bevorzugt sind die Epitopsequenzen aus dem myosin-cross-reactive antigen mit der
35 Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 1, also Peptide mit der Aminosäuresequenz SVLDEFYWLDDKKDPYSL (SEQ ID Nr. 2), PDFKAVRFTRRNQYESMI (SEQ ID Nr. 3), oder QATSIKILRDGKEEEIKL (SEQ ID Nr. 4).

Die zuvor getroffenen Definitionen und gemachten Erklärungen der Begriffe gelten für die
40 nachfolgend beschriebenen Ausführungsformen entsprechend.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel, umfassend den Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment der Erfindung, oder den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Antikörper. Bevorzugt ist der Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment der Erfindung in einem pharmazeutisch akzeptierbaren Träger suspendiert. Bevorzugt ist der zu behandelnde Patient ein Mensch.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Arzneimittel umfassend den Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment der Erfindung, oder den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Antikörper, sowie vorzugsweise geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe. Als Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich beispielsweise eine physiologische Kochsalzlösung, geeignete Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, etc. Als Stabilisatoren eignen sich beispielsweise Tween 80 (0,02%), Zuckerlösungen, wie z. B. Saccharose-Lösung (20-30%) oder Aminosäure-Lösungen, wie z. B. Glycin- oder Cystein-Lösungen. Üblicherweise wird das erfindungsgemäße Arzneimittel dadurch hergestellt, dass der Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment der Erfindung mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt wird.

Die therapeutischen Mittel dieser Erfindung können als Prophylaktikum oder ansonsten nach Bedarf verabreicht werden. Die Dosis und Dauer der Behandlung steht in Beziehung zur relativen Dauer der Moleküle der vorliegenden Erfindung im humanen Kreislauf und kann durch einen Fachmann in Abhängigkeit vom behandelten Zustand und der allgemeinen Gesundheit des Patienten eingestellt werden.

Der Verabreichungsmodus des therapeutischen Mittels der Erfindung kann jeder geeignete Weg sein, der das Mittel an den Wirt abgibt. Die Antikörper und pharmazeutischen Zusammensetzungen/Arzneimittel der Erfindung sind besonders nützlich zur oralen Verabreichung.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Arzneimittel zur Verwendung zur Prävention oder Behandlung einer onkologischen Erkrankung, allergischen Erkrankung oder einer Immunerkrankung, vorzugsweise einer Autoimmunerkrankung, wobei die genannten Erkrankungen durch die Aktivität von Th17 Zellen vermittelt werden.

Beispielsweise nimmt ein Allergiker oder Patient mit Autoimmunerkrankung über einen definierten Zeitraum in einem definierten Behandlungsschema die spezifischen SFB Antikörper der Erfindung oral ein. Anschließend wird die Reduktion der allergischen Reaktion beispielsweise über einen Prick-Test bestimmt. Die Wirkung der spezifischen SFB Antikörper auf einen Patienten mit Autoimmunerkrankung kann beispielsweise über eine Verminderung der Bildung von Auto-Antikörpern nachgewiesen werden. Die Referenz entspricht der Stärke der Reaktion ohne SFB Antikörperbehandlung.

Bevorzugt ist die allergische Erkrankung, Immunerkrankung oder Autoimmunerkrankung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: multipler Sklerose, Typ-1 Diabetes, rheumatoide Arthritis, allergische Atemwegserkrankung und allergisches Asthma.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon oral appliziert. Hühner Antikörper (IgY) sind besonders säurestabil und eignen sich deshalb besonders für eine orale Anwendung beim Patienten. Umfasst sind jedoch auch alle bisherigen Routen, die für den Transfer von Immunglobulinen verwendet werden, z.B. intramuskuläre, intravenöse, intraperitoneale, oder intratekale Verabreichung.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon in Kombination mit einem Antibiotikum verwendet, vorzugsweise einem Beta-Lactam und/oder Glykopeptid Antibiotikum.

15 Zudem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, umfassend:

a) Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon; und

b) Formulierung des Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon als
20 Arzneimittel.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit umfassend einen erfindungsgemäßen Antikörper oder eines antigen-bindenden Fragments davon zur Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität, und/oder Hemmung der
25 Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen.

Neben dem erfindungsgemäßen Antikörper oder einem antigen-bindenden Fragment davon kann das Kit auch ein Antibiotikum wie Beta-Lactam und/oder ein Glykopeptid Antibiotikum umfassen, sowie eine Anleitung zur Anwendung der Komponenten des Kit.

30

Der Begriff „etwa“ wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen spezifischen Wert, auf den in dieser Beschreibung Bezug genommen wird, einschließlich einer Variation, die im Bereich von +/- 20%, +/- 10%, +/- 5%, +/- 4%, + liegt / -3%, +/- 2% oder +/- 1% liegt.

35 Die Begriffe „Bestimmen“, „Bestimmung“ oder „Nachweis“ wie hier verwendet umfassen die qualitative, semi-quantitative und/oder quantitative Bestimmung, beispielsweise die quantitative Bestimmung des Antikörpers der Erfindung im Serum oder Plasma eines Patienten, dem dieser Antikörper zu therapeutischen Zwecken verabreicht wurde.

Der Inhalt sämtlicher hierin zitierten Literaturstellen ist hiermit durch Bezugnahme auf den jeweiligen speziellen Offenbarungsgehalt und in ihrer Gesamtheit aufgenommen.

5 Weitere besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den folgenden Beispielen gezeigt.

Figuren:

Figur 1: Graphische Zusammenfassung des dieser Erfindung zugrundeliegenden Konzepts:
10 Spezielle fadenförmige *Candidatus Savagella* Bakterien („segmented filamentous bacteria“, SFB) besiedeln die Darmwand und aktivieren über dendritische Zellen (DC) Th17 Zellen, die zur Autoimmunität und Atopie beitragen. Zuerst werden geeignete Bakterienwandproteine des genannten Bakteriums identifiziert (1), synthetisiert und in Hühner injiziert (2). Die Hühner bilden hochspezifische anti-SFB Antikörper, die aus den Eiern isoliert werden können (3) und
15 für die orale Antikörpertherapie im Menschen zur Verfügung stehen (4). Eine Reduktion der SFB Keimzahl im Darm kann zu einer Reduktion der Th17 Effektorzellaktivität und somit zur Immuntoleranz führen.

Beispiele:

20

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustration der Erfindung. Sie dürfen im Hinblick auf den Schutzzumfang nicht in einschränkender Weise ausgelegt werden.

**Beispiel 1: Herstellung und Gewinnung von neutralisierenden Antikörpern gegen das
25 „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein**

Aus der Gruppe der funktionsbestimmenden und „segmented filamentous bacteria“ (SFB)-spezifischen Proteine wurde das „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein ausgewählt, das durch die bakterienwandständige Lage und die nicht-redundante Rolle für Adhärenz an das
30 intestinale Epithel im Menschen und das Überleben von *Candidatus Savagella* oder „segmented filamentous bacteria“ (SFB) ein geeignetes Target für einen neutralisierenden Antikörper darstellt. Innerhalb der bekannten Proteinsequenz des MCRA Proteins (SEQ ID Nr. 1) wurden anschließend geeignete Epitope bestimmt. Die Zielsequenz mit der rechnerisch besten Antigenität wurde für die Antikörperherstellung ausgewählt. Mit der bekannten
35 Aminosäuresequenz wurde im nächsten Schritt das entsprechende Peptid mit den SEQ ID Nrn. 2, 3 und 4 in ausreichender Menge synthetisiert und anschließend an das Protein Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) gekoppelt. Die Hühner wurden innerhalb von 60 Tagen vier Mal mit dem Peptid-KLH Komplex immunisiert, während der ersten Immunisierung erhielt das Tier dabei die doppelte Menge. Nach dieser Immunisierungsphase

produzierte ein Huhn bis zu 3 Gramm IgY pro Monat. Die Antikörper wurden anschließend aus dem Eidotter isoliert (Hassl et al., 1987 <http://www.unet.univie.ac.at/~a7505973/texte/JiM1.pdf>).

Beispiel 2: Therapeutische Anwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen das „myosin-cross-reactive antigen“ (MCRA) Protein

5

10

Die zugrundeliegende Arbeitshypothese der Erfinder besagt, dass eine verringerte Kolonisationsdichte mit SFB im Darm von Patienten zu einer reduzierten TH17 Antwort führt. Dies hätte allgemein eine große therapeutische Relevanz in TH17-vermittelten entzündlichen Erkrankungen.

15

Die Erfinder gehen davon aus, dass das SFB auch im Darm menschlicher Patienten existiert und die orale Therapie mit einem neutralisierenden Antikörper für die Behandlung einer ganzen Reihe von allergischen Erkrankungen, Immunerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und onkologischen Erkrankungen geeignet sein könnte.

20

Der gewählte Therapieansatz ist besonders attraktiv, da kaum Nebenwirkungen zu erwarten sind - im Gegensatz zu den meisten etablierten Therapien, wie beispielsweise Dexamethason für die allergische Atemwegserkrankung - und gegebenenfalls Möglichkeiten für eine stark vereinfachte Zulassung bestehen, zum Beispiel als „Novel Food“.

25

Diesbezüglich ist die Verwendung von Hühner-Antikörpern (IgY) ein grundlegendes Konzept der vorliegenden Erfindung. Die Verwendung von Hühner-Antikörpern (IgY) hat zahlreiche Vorteile gegenüber klassischen Ansätzen: IgY reagieren zum Beispiel nicht mit dem menschlichen Komplementsystem und weisen eine besonders hohe Säurestabilität auf, welches sie attraktiv für die Entwicklung eines oral applizierten Therapeutikums machen.

Die orale Applikation kann hierbei wie folgt aussehen:

30

Ein Allergiker nimmt über einen definierten Zeitraum in einem definierten Behandlungsschema die spezifischen SFB Antikörper oral ein. Anschließend wird die Reduktion der allergischen Reaktion beispielsweise über einen Prick-Test bestimmt. Die Referenz entspricht der Stärke der Reaktion ohne SFB Antikörperbehandlung.

35

Zusammenfassend wurden in diesem Projekt die geeigneten SFB Bakterienwandproteine identifiziert, synthetisiert und in Hühner injiziert. Die Hühner produzierten hochspezifische, neutralisierende anti-SFB Antikörper, die aus den Eiern isoliert wurden. Dieses aus den Eiern isolierte Produkt mit pharmazeutischem Potential kann dann für die orale Antikörpertherapie im Patienten zur Behandlung einer ganzen Reihe von allergischen Erkrankungen,

Immunerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und onkologischen Erkrankungen genutzt werden.

Zitierte Literatur

- [1] Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V: The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010;10: 735-744.
- 5
- [2] Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK: Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl Acad Sci-U-S- A* 15-3-2011; 108 Suppl 1: 4615-4622.
- 10
- [3] Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D: Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 25-6-2010;32: 815-827.
- [4]
- 15 http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A1444
- [5] Spillner E, Braren I, Greunke K, Seismann H, Blank S, du PD: Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals* 2012;40: 313-20 322.
- [6] Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL: The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 69-75.
- 25
- [7] Bach JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 19-9-2002; 347: 911-920.
- [8] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kirn S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, 30 Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K: Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 8-8-2013; 500: 232-236.
- [9] Wang H, Geier MS, Howarth GS: Prebiotics: a potential treatment strategy for the 35 chemotherapy-damaged gut? *Crit Rev Food Sei Nutr* 27-8-2014.
- [10] Zeissig S, Blumberg RS: Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol* 2014; 15: 307-310.

- [11] Lecuyer E, Rakotobe S, Lengline-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, Fritzen R, Eberl G, McCoy KD, Macpherson AJ, Reynaud CA, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V: Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* 17-4-2014;40: 608-620.
- 5
- [12] Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez MG, Laufer TM, Ignatowicz L, Ivanov II: Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity* 17-4-2014;40: 594-607.
- 10
- [13] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR: Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 30-10-2009; 139: 485-498.
- 15
- [14] Davidson GP, Whyte PB, Daniels E, Franklin K, Nunan H, McCloud PI, Moore AG, Moore DJ: Passive immunisation of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet* 23-9-1989; 2: 709-712.
- [15] Tollemar J, Gross N, Dolgiras N, Jarstrand C, Ringden O, Hammarstrom L: Fungal prophylaxis by reduction of fungal colonization by oral administration of bovine anti-Candida antibodies in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 283-290.
- 20
- [16] Shimamoto C, Tokioka S, Hirata I, Tani H, Ohishi H, Katsu K: Inhibition of Helicobacter pylori infection by orally administered yolk-derived anti-Helicobacter pylori antibody. *Hepatology* 2002; 49: 709-714.
- 25
- [17] Torres O, Cruz JR: Protection against Campylobacter diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. *Acta Paediatr* 1993; 82: 835-838.
- 30
- [18] Ochi H, Abraham M, Ishikawa H, Frenkel D, Yang K, Basso AS, Wu H, Chen ML, Gandhi R, Miller A, Maron R, Weiner HL: Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+. *Nat Med* 2006; 12: 627-635.

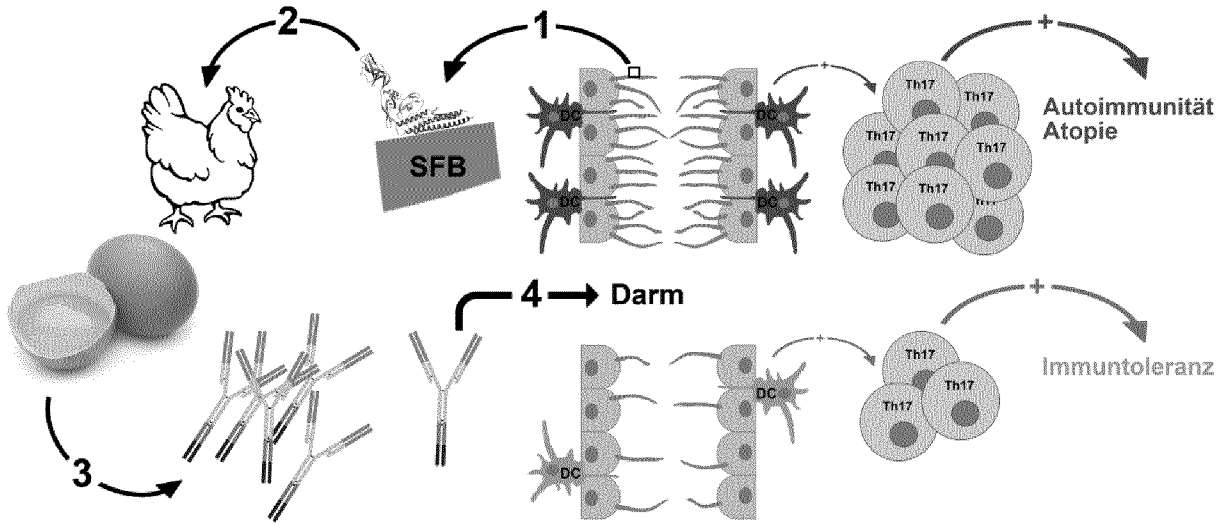
Ansprüche

- 5 1. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Antigen des Bakteriums *Candidatus* Savagella bindet und (i) die Anhaftung des Bakteriums an Darmepithelzellen, vorzugsweise humane Darmepithelzellen, inhibiert, und/oder (ii) das Bakterium depletiert.
- 10 2. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Immunglobulin Molekül, polyklonaler Antikörper, monoklonaler Antikörper, chimärer Antikörper, durch CDR-grafting erzeugter Antikörper, humanisierter Antikörper, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Disulfid-verknüpftes Fv, scFv, Einzeldomänenantikörper, Diabody, multispezifischer Antikörper, dualspezifischer Antikörper, und bispezifischer Antikörper.
- 15
3. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Antikörper ein Huhn Immunglobulin Molekül oder Antikörper ist.
- 20
4. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach Anspruch 3, wobei das Huhn Immunglobulin Molekül IgY ist.
5. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 25 4, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment zu einer Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität führt und/oder die Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen hemmt.
6. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 30 5, wobei das Antigen des Bakteriums *Candidatus* Savagella ein Bakterienwandprotein ist, vorzugsweise das myosin-cross-reactive antigen umfassend die in der SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz.
7. Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 35 6, wobei der Antikörper oder das antigen-bindende Fragment an ein Epitop aus dem myosin-cross-reactive antigen bindet, wobei das Epitop aus der Aminosäuresequenz SVLDEFYWLDKKDPYSL (SEQ ID Nr. 2), PDFKAVRFTRRNQYESMI (SEQ ID Nr. 3), oder QATSIKILRDGKEEEIKL (SEQ ID Nr. 4) besteht oder diese umfasst.

8. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 7, umfassend:
- a) Immunisierung von Hühnern mit einem immunogenen Peptid aus einem Antigen, vorzugsweise einem Bakterienwandprotein, des Bakteriums *Candidatus Savagella*; und
- 5 b) Gewinnung und Aufreinigung der in den Hühnern oder in einem von diesen Hühnern gelegten Ei gebildeten Antikörper.
9. Arzneimittel, umfassend den Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einen Antikörper, der durch das Verfahren nach
- 10 Anspruch 8 hergestellt ist.
10. Arzneimittel nach Anspruch 9 zur Verwendung zur Prävention oder Behandlung einer onkologischen Erkrankung, einer allergischen Erkrankung, einer Immunerkrankung, oder einer Autoimmunerkrankung, wobei die genannten Erkrankungen durch die Aktivität von
- 15 Th17 Zellen vermittelt werden.
11. Arzneimittel nach Anspruch 10, wobei die allergische Erkrankung, Immunerkrankung oder Autoimmunerkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: multipler Sklerose, Typ-1 Diabetes, rheumatoide Arthritis und allergisches Asthma.
- 20 12. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei der Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon oral appliziert wird.
13. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei der Antikörper oder ein antigen-
- 25 bindendes Fragment davon in Kombination mit einem Antibiotikum verwendet wird, vorzugsweise einem Beta-Lactam und/oder Glykopeptid Antibiotikum.
14. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 9 bis 13, umfassend:
- 30 a) Herstellung eines Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 7; und
- b) Formulierung des Antikörpers oder eines antigen-bindenden Fragments davon als Arzneimittel.
- 35 15. Kit umfassend einen Antikörper oder ein antigen-bindendes Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Reduktion der Th17 Zellproliferation, Th17 Zelldifferenzierung oder Th17 Zellaktivität, und/oder Hemmung der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene durch B Zellen, und optional ein Antibiotikum.
- 40

Figur 1:

5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/070910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 1/20</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/74</i> (2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12R; C40B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gwen Talham ET AL. "Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System" 01 January 1999 (1999-01-01), pages 1992-2000, Retrieved from the Internet: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96557/ / [retrieved on 2019-09-20] XP055624661 abstract	1-15
T	GRANT A. HEDBLOM ET AL. "Segmented Filamentous Bacteria - Metabolism Meets Immunity" <i>FRONTIERS IN MICROBIOLOGY</i> , Vol. 9, 24 August 2018 (2018-08-24), DOI: 10.3389/fmicb.2018.01991 XP055624665 the whole document	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2019		Date of mailing of the international search report 04 October 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Meyer, Wolfram Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N1/20 C12N15/74 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12R C40B		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Gwen Talham ET AL: "Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System", 1. Januar 1999 (1999-01-01), Seiten 1992-2000, XP055624661, Gefunden im Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96557/ [gefunden am 2019-09-20] Zusammenfassung ----- -/-	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
25. September 2019	04/10/2019	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Meyer, Wolfram	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>GRANT A. HEDBLOM ET AL: "Segmented Filamentous Bacteria - Metabolism Meets Immunity", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, Bd. 9, 24. August 2018 (2018-08-24), XP055624665, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01991 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	