



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 253 655** (13) **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 16/42, A 61 K 39/395,**
A 61 P 37/00

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2001130068/13, 12.04.2000**

(24) Дата начала действия патента: **12.04.2000**

(30) Приоритет: **14.04.1999 GB 9908533.4**

(43) Дата публикации заявки: **27.07.2003**

(45) Опубликовано: **10.06.2005 Бюл. № 16**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 8906138 A1, 13.07.1989. RU 2193413 C2 28.02.1997.**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **14.11.2001**

(86) Заявка РСТ:
EP 00/03288 (12.04.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/63252 (26.10.2000)

Адрес для переписки:
**101000, Москва, пер. Малый Златоустинский
10, кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", Кузенковой Н.В.**

(72) Автор(ы):

**КРИЦЕК Франц (АТ),
ШТАДЛЕР Беда (СН),
ВОГЕЛЬ Моника (СН)**

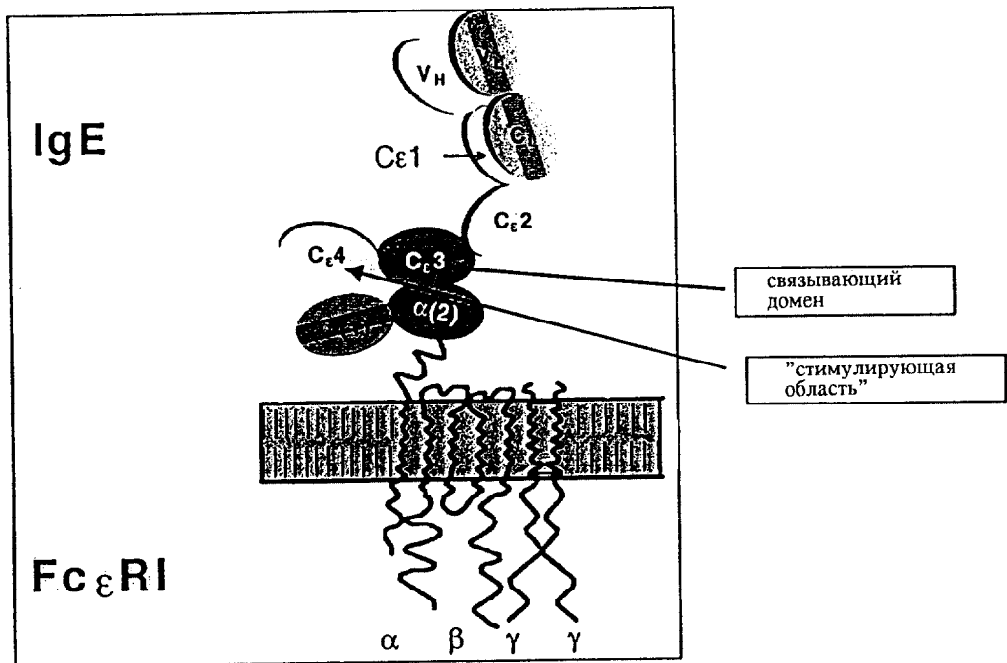
(73) Патентообладатель(ли):
НОВАРТИС АГ (СН)

(54) АНТИИДИОТИПИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К АНТИТЕЛАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ СВЯЗЫВАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА С ЕГО ВЫСОКОАФФИННЫМ РЕЦЕПТОРОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии и может найти применение в медицине. В изобретении описывается антиидиотипическое моноклональное антитело (мимеотело) или его фрагмент к антителу BSW17, оказывающему воздействие на связывание Cε3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE. Аминокислотная последовательность представлена в описании. Антиидиотипическое

антитело может быть использовано в качестве ингредиента фармацевтической композиции для лечения болезней, опосредуемых IgE, а также в составе вакцины для лечения таких заболеваний. Использование изобретения позволяет предотвратить аллергические и воспалительные реакции за счет ингибирования упомянутым мимеотелом взаимодействий Cε3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE. 2 н. и 5 з.п. ф-лы, 19 ил., 4 табл.



Взаимодействие между IgE и его высокоаффинным рецептором
 ФИГ. 1

RU 2253655 C2

RU 2253655 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001130068/13, 12.04.2000
(24) Effective date for property rights: 12.04.2000
(30) Priority: 14.04.1999 GB 9908533.4
(43) Application published: 27.07.2003
(45) Date of publication: 10.06.2005 Bull. 16
(85) Commencement of national phase: 14.11.2001
(86) PCT application:
EP 00/03288 (12.04.2000)
(87) PCT publication:
WO 00/63252 (26.10.2000)
Mail address:
101000, Moskva, per. Malyj Zlatoustinskij
10, kv.15, "EVROMARKPAT", Kuzenkovoj N.V.

(72) Inventor(s):
KRITsEK Frants (AT),
ShTADLER Beda (CH),
VOGEL' Monika (CH)
(73) Proprietor(s):
NOVARTIS AG (CH)

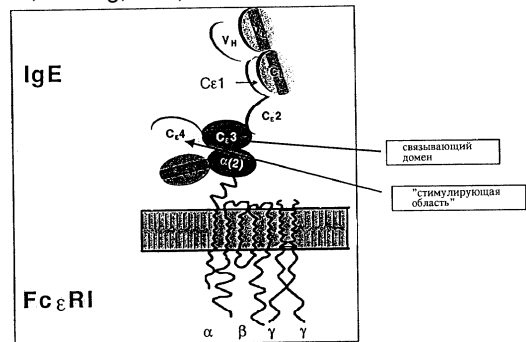
(54) **ANTIIDIOTYPICAL ANTIBODY FOR ANTIBODIES INHIBITING IMMUNOGLOBULIN BONDING TO ITS HIGH AFFINITY RECEPTOR**

(57) Abstract:

FIELD: immunology, biotechnology, medicine.
SUBSTANCE: invention relates to antiidiotypical monoclonal antibody or fragment thereof for BSW17 antibody effecting on LgE Cε3-region bonding to high affinity LgE receptor. Amino acid sequence is as described in specification. antiidiotypical antibody is useful as pharmaceutical composition ingredient for LgE-mediated disease treatment. Invention make in possible to prevent allergic disorders and inflammations due to inhibiting interaction between LgE Cε3-region with high affinity receptor by claimed antibody.
EFFECT: new agent for allergic and

inflammation disorder treatment.

7 cl, 32 dwg, 5 tbl, 10 ex



Взаимодействие между IgE и его высокоаффинным рецептором
ФИГ. 1

Настоящее изобретение относится к антиидиотипическим антителам. Оно относится к ингибированию взаимодействий, которые обычно вызывают стимуляцию тучных клеток и базофилов, индуцированную связыванием с клеткой аллергена, сшитого с IgE, что приводит к выделению гистамина и других медиаторов, а также к синтезу de novo цитокинов, вовлеченных в регуляцию аллергических и воспалительных реакций. Изобретение относится к антиидиотипическим антителам или фрагментам антител, которые оказывают воздействие на связывание C_ε 3-области IgE с рецептором, обладающим высокой аффинностью к IgE (высокоаффинным рецептором IgE.). Выявление специфических сайтов связывания на IgE, которые взаимодействуют с его высокоаффинным рецептором (Fc_ε RI), обеспечивает основу для получения антител, которые препятствуют этому взаимодействию путем распознавания связывающих эпитопов. Индукция таких антител путем вакцинации позволяет создать новый и имеющий всеобъемлющее применение метод лечения аллергии. В частности, настоящее изобретение относится к выявлению и получению фрагментов рекомбинантного антитела, которые могут входить в состав вакцины для производства антител к IgE, что может обеспечивать защиту от индукции опосредуемых IgE аллергических реакций.

Аллергические симптомы вызываются выделением из клеток в окружающую ткань и в сосудистые структуры вазоактивных аминов (медиаторов), прежде всего, гистамина. Гистамин в норме запасается в специализированных клетках, называемых тучными клетками и базофильными гранулоцитами. Тучные клетки распределены в ткани животного, а базофилы циркулируют в сосудистой системе. Эти клетки синтезируют и накапливают гистамин внутри клетки до тех пор пока не происходит определенная последовательность событий, стимулирующая его выделение.

Роль антител в виде IgE в опосредовании аллергических реакций хорошо известна. IgE представляет собой сложную, состоящую из полипептидных цепей структуру, которая так же, как и у других иммуноглобулинов, состоит из двух легких и двух тяжелых цепей, сшитых вместе дисульфидными связями в виде "Y-образной" конфигурации. Каждая легкая цепь имеет две области, одну переменную область (V_L), сшитую с областью, имеющей относительно постоянную аминокислотную последовательность, которая называется константной областью (C_L). В противоположность этому, тяжелые цепи имеют одну переменную область (V_H), и в случае IgE, четыре константных области (C_H1, C_H2, C_H3, C_H4, также известные как C_ε 1, C_ε 2, C_ε 3, C_ε 4). Два "плеча" антитела, ответственные за связывание антигена, имеют области с переменной полипептидной структурой, и их называют Fab'-фрагментами или F(ab')₂, они представляют собой два Fab'-плеча, сшитых вместе дисульфидными связями. "Хвост", или центральная ось антитела, содержит фиксированную или постоянную последовательность пептидов и его называют Fc-фрагментом. Fc-фрагмент содержит интерактивные сайты, которые дают возможность антителу взаимодействовать с другими молекулами или клетками иммунной системы, связывая его с их Fc-рецепторами. Fc-рецепторы представляют собой молекулы, которые специфически связываются с активными молекулярными сайтами внутри Fc-областей иммуноглобулина. Fc-рецепторы могут существовать в виде связанных с мембраной протеинов в наружной плазматической мембране клетки или могут существовать в виде свободных "растворимых" молекул, которые свободно циркулируют в плазме крови или в других жидкостях организма. В организме человека высокоаффинное связывание IgE с рецептором Fc_ε RI происходит в результате сложного взаимодействия протеин-протеин, в котором участвуют различные части домена третьей константной области тяжелой цепи (C_ε 3) IgE и ближайший к мембране иммуноглобулинподобный домен (α 2) субъединицы Fc_ε RIα. Хотя было установлено, что остатки внутри C_ε 3-домена константной области тяжелой цепи Fc_ε и областей, принадлежащих к α 2-домену рецептора Fc_ε RIα, имеют большое значение для связывания, детальный механизм процесса связывания пока остается неясным. Экспериментальные данные позволили установить, что человеческий IgE принимает изогнутую форму, которая, как предполагается, придает исключительно высокую аффинность IgE к Fc_ε RI ($K_d \leq 10^{-10}$ M).

Кроме того, считается, что эта изогнутая форма также ответственна за образование эквимольного комплекса между IgE и связанным с клеткой или растворимым Fc ϵ RI α , хотя на молекуле IgE могут образовываться идентичные эпитопы на двух C ϵ 3-доменах, ответственных за связывание с рецептором. Эта моновалентность является функционально необходимой, если требуется избежать стимуляции рецептора в отсутствие аллергена.

Интерактивные сайты, в зависимости от их функции, могут уже быть доступными и, следовательно, обладать способностью связываться с клеточными рецепторами. Альтернативно этому, они могут быть скрыты до момента связывания антитела с антигеном, после чего антитело может изменить строение и вследствие этого станут доступными другие активные сайты, которые далее могут стимулировать специфическую иммунную активность. Было высказано предположение о том, что конформационное преобразование, оказывающее воздействие на связывание C ϵ 3 с рецептором, является причиной стехиометрического соотношения 1:1 комплекса Fc ϵ /Fc ϵ RI на поверхности клетки.

Аллергическое (иммунологическое) выделение медиаторов в организм из тучных клеток и базофилов может происходить только при следующих обстоятельствах: молекула IgE должна присоединиться или прикрепиться с помощью своего Fc-фрагмента к сайту клеточного Fc-рецептора, в результате чего происходит прикрепление молекулы IgE к тучной клетке или базофилу; и Fab'-фрагменты связанных с клеткой молекул IgE должны быть перекрестно сшиты с определенным совместимым с ними антигеном (аллергеном). Когда такое взаимодействие происходит, в тучной клетке или в базофиле автоматически стимулируется выделение гистамина в локальную окружающую среду, вызывая известные симптомы аллергии (фиг.1). На последней фазе реакции происходят другие биохимические процессы, которые приводят к синтезу de novo и выделению цитокинов и других медиаторов.

Общепринятые подходы к лечению аллергии включают системную терапию с использованием антигистаминных препаратов или десенсибилизацию пациентов; эти подходы не направлены на вмешательство в основное взаимодействие IgE - тучная клетка/базофил. Другой подход основан на получении полипептидных цепей, способных блокировать связывание антитела в виде IgE с Fc-рецепторами на поверхностях клеток, и на вытеснении IgE из сайтов связывания, с которыми IgE уже связан, кроме того, были проведены исследования с целью выяснения природы предполагаемого "эффекторного" сайта внутри Fc-области IgE, который, вероятно, создает иммунологический сигнал, стимулирующего выделение гистамина тучными клетками/базофилами.

Также были сделаны попытки применения рекомбинантных фрагментов IgE в качестве иммуногенов для получения защитной анти-IgE вакцины, и они оказались эффективными. Основной аргумент против такой вакцины обусловлен опасением того, что использование для иммунизации больших фрагментов IgE может инициировать не только производство ингибиторных антител, но также может приводить к поперечному связыванию и тем самым продуцировать образование у пациентов анафилактикогенных антител.

Целью стратегии, позволяющей преодолеть эту проблему, является выявление наименьшего возможного фрагмента IgE, в идеале состоящего только из сайта связывания рецептора, который после связывания оказывается скрытым внутри комплекса IgE/IgERI и, таким образом, более не доступным для поперечного связывания при генерируемом вакциной иммунном ответе. Маловероятно, чтобы попытки реконструировать такую сложную молекулярную структуру оказались успешными, учитывая пространственное удаление различных областей C ϵ 3, вовлеченных во взаимодействие IgE/IgERI.

Проблемы, присущие "классическому" подходу, основанному на применении вакцин, могут быть преодолены путем использования для активной иммунизации коротких мимеотопных пептидов либо в виде синтезированных химическим путем пептидов, сшитых с соответствующими носителями, либо в виде рекомбинантных слитых конструкций, например, с овалбумином или IgG. Такие пептиды являются структурными мимиками

эпитопа, распознаваемого моноклональным антителом BSW17, которое распознает конформационный эпитоп на Fc ϵ , в том числе, те его части, которые находятся в C ϵ 3-области и которые находятся в C ϵ 4-области. Линия клеток гибридомы, продуцирующая BSW17, депонирована 19 декабря 1996 г. в соответствии с Будапештским договором о депонировании микроорганизмов в Европейской коллекции культивируемых клеток животных (ECACC) под регистрационным номером 96121916. Это антитело обладает представляющим интерес профилем биологических активностей, что обобщено на фиг.2. Оно само является неанафилактогенным и защищает тучные клетки и базофилы человека от зависящего от IgE выделения гистамина, индуцируемого триггер-сигналами. BSW17 или BSW17-подобные антитела, циркулирующие в сосудистой системе, защищают от аллергических реакций путем а) ингибирования стимуляции тучных клеток и базофилов с помощью конкурентного ингибирования взаимодействия IgE/IgERI, и б) снижения уровней IgE в сыворотке с помощью понижающей регуляции синтеза IgE на уровне В-клеток. В качестве структурных мимиков эпитопа антитела к IgE, синтезированные химическим путем BSW17-мимеотопные пептиды, индуцируют иммунный ответ, приводящий к продуцированию BSW17-подобных антител в хозяине. Поскольку установлено, что BSW17 являются неанафилактогенными, ингибируют связывание IgE/IgERI и синтез IgE на поверхности В-клеток, то эти антитела, секретируемые в ответ на введение вакцин на основе BSW17-мимеотопного пептида, обладают аналогичными защитными свойствами. Возможным недостатком таких вакцин на основе BSW17-мимеотопного пептида может являться необходимость связывания синтезированных химическим путем пептидов с носителями-протеинами для усиления иммуногенности пептидов. Кроме того, структурная гибкость коротких пептидов позволяет им принимать различные стерические конформации. Таким образом, только фракция поликлонального антимиимеотопного иммунного ответа может быть терапевтически активной при перекрестной реакции с человеческим IgE.

Настоящее изобретение лишено возможных недостатков, присущих подходу, основанному на применении мимеотопных пептидов. Оно основано на применении антител или фрагментов антител, которые являются антиидиотипическими по отношению к антителам, которые воздействуют на связывание IgE с его высокоаффинным рецептором, в частности на применении рекомбинантных антиидиотипических антител к BSW17. Согласно схематичной теории Jerne (Jerne N., Ann. Immunol. 125C [1974] 373), гипервариабельные участки антитела (At1) сами могут являться антигенами. Продуцируемые таким путем антитела известны как антиидиотипические (anti-id) антитела (At2), поскольку они связываются с идиотипической областью первого антитела (фиг.3). Такие anti-id-антитела направлены к антигенсвязывающему центру (паратопу) первого антитела (At1) и, таким образом, представляют собой "внутренний образ" исходного антигена. Следовательно, anti-id-антитела (At2), называемые антителами "внутреннего образа" или At2 β , также обладают способностью стимулировать образование антител с помощью их гипервариабельных участков. Эти антитела к anti-id-антителам (At3) напоминают по структуре паратоп At1 и, следовательно, обладают биологическими свойствами, аналогичными антителу At1. В случае системы hIgE/BSW17, IgE представляет собой исходный антиген, а BSW17 - антитело At1. Паратоп антиидиотипического антитела к BSW17, т.е. At2, таким образом, является структурным мимиком hIgE-области (эпитоп), распознаваемой BSW17. Структурно паратоп At2 является эквивалентом описанных выше синтезированных химическим путем BSW17-мимеотопных пептидов. Если такое (рекомбинантное) антиидиотипическое антитело к BSW17 используется в качестве вакцины, то у вакцинированного пациента должен индуцироваться BSW17-подобный иммунный ответ (At3). Подобно BSW17, эти поликлональные иммуноглобулины в виде At3 могут оказывать воздействие на связывание IgE с его высокоаффинным рецептором, таким образом, действуя в качестве антиаллергических агентов. В противоположность гибким синтетическим мимеотопным пептидам паратоп At2 должен присутствовать в окружающей среде в структурно жесткой конформации. Таким образом, иммунный ответ к определенному эпитопу hIgE должен быть более специфическим. Кроме того, при таком

подходе отпадает необходимость в гетерологичном иммуногенном носителе. При этом удается избежать возможных побочных воздействий, которые связаны с протеином-носителем типа столбнячного токсина или токсоида дифтерии.

Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, которые являются антиидиотипическими по отношению к таким антителам, как E25 (олизумаб) или CGP56901 или предпочтительно BSW17, оказывающим воздействие на связывание C_ε 3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE; далее в контексте настоящего описания они кратко обозначены как "мимеотела по изобретению". В случае, когда они являются антиидиотипическими по отношению к BSW17, то их кратко обозначают как "BSW17-мимеотела".

Таким образом, мимеотела по изобретению представляют собой антиидиотипические антитела или фрагменты антител, которые специфично связываются с эпитопом, который представляет собой паратоп антитела к IgE, распознающий сайт C_ε 3-области молекулы IgE, связывающейся с высокоаффинным рецептором IgE (F_{Cε} RI).

Если мимеотела по изобретению предназначены для введения людям, то они главным образом являются человеческими. Предпочтительно они являются рекомбинантными. Предпочтительно они являются моноклональными. Предпочтительно они представляют собой фрагменты антител, например содержат или включают:

- либо как тяжелые, так и легкие цепи (например, Fab-фрагменты), либо только тяжелые или легкие цепи (например, димеры легких цепей), предпочтительно в сочетании с участками компонента их константной области, которые, например, представлены на фиг.4 (Seq.id. no. 35, 36, 37 и 38), где под "константной областью" следует также понимать константную область, имеющую незначительные стерические модификации, такие как присутствующие в аллотипических вариантах, например в 1-5 положениях, как правило, только в 1 положении аминокислоты в константной области;

- или их части, в частности, по меньшей мере их определяющие специфичность части, например, представленные на фиг.5а-5г (Seq.id. no. 2, 4, 6, 8);

- или их подчасти, например, по меньшей мере их гипервариабельные участки, такие как пептиды, состоящие из участков аминокислотных последовательностей, включающих по меньшей мере один CDR, например, включающих по меньшей мере один CDR, или предпочтительно два или еще более предпочтительно три CDR, представленных на фиг.5а, 5б, 5в или 5г (Seq.id. no. 2, 4, 6, 8), необязательно в сочетании с соседними каркасными последовательностями, например, включающими вплоть до примерно 10 аминокислот на одном или обоих концах CDR.

Мимеотела по изобретению представляют собой выделенные и практически чистые антитела или фрагменты антител, полученные из встречающихся в естественных условиях anti-id-антител к IgE. В частности, они практически не содержат других антител. Под "практической чистотой" следует понимать чистоту, составляющую по меньшей мере примерно 60 мас.%, предпочтительно примерно 90 мас.%, более предпочтительно примерно 99 мас.% или более.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, прежде всего вакцинам, включающим мимеотела по изобретению либо в виде отдельной молекулы, либо в виде конъюгата протеина, химически связанного с молекулой иммуногенного носителя, при необходимости в сочетании с адъювантом или другими общепринятыми эксципиентами.

Оно также относится к мимеотелам по изобретению, предназначенным для применения в качестве фармацевтических агентов, в частности, в качестве вакцин, прежде всего, для лечения опосредуемых IgE болезней.

Оно также относится к применению антител, которые оказывают воздействие на связывание C_ε 3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE, такого как BSW17, для идентификации мимеотела по изобретению с помощью общепринятых методов, таких как технология воспроизводства фага.

Кроме того, оно относится к способу лечения опосредуемых IgE болезней, в частности,

путем вакцинации, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества мимеотела по изобретению пациенту, который нуждается в таком лечении или вакцинации.

5 Оно также относится к применению мимеотела по изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения опосредуемых IgE болезней, в частности вакцины.

Оно также относится к применению мимеотел по изобретению для создания поликлональных или моноклональных антител, предназначенных для пассивной иммунизации; для получения поликлональных или моноклональных антител к мимеотелам по изобретению для пассивной иммунизации либо путем введения мимеотел по 10 изобретению приемлемому животному (не человеку) и выделения и очистки полученных таким образом антител, либо с помощью общепринятых методов на основе гибридом; и к применению поликлональных или моноклональных антител, полученных с использованием мимеотел по изобретению, для лечения опосредуемых IgE болезней с помощью пассивной иммунизации.

15 Оно также относится к способу идентификации мимеотел по изобретению, предусматривающему

- идентификацию встречающихся в естественных условиях антиидиотипических антител к IgE;

- выделение их фрагментов; и

20 - отбор их рекомбинантных фрагментов путем связывания с приемлемым моноклональным антителом к IgE, таким как BSW17, которое оказывает воздействие на связывание C ϵ 3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE.

После их идентификации и изучения свойств мимеотела по изобретению могут быть получены обычным образом, например, с помощью рекомбинантной ДНК или путем 25 химического синтеза.

Для идентификации антиидиотипических антител, обладающих такой же специфичностью, что и указанные выше мимеотопные пептиды (т.е. выбранные эпитопы на молекуле IgE), может использоваться доступная библиотека бактериофага, которая экспрессирует Fab-область популяции человеческих антител. Эту библиотеку 30 конструируют, например, из группы В-клеток, полученных из миндалин людей, а иммобилизованное антитело BSW17 используют в качестве мишени для биологического пэннинга. Фаговые частицы, экспрессирующие человеческие Fab-фрагменты, специфично распознающие BSW17, выделяют и увеличивают их количество. Таким образом, эти рекомбинантные Fab-фрагменты являются мимеотелами по изобретению и представляют 35 собой антиидиотипы к гипервариальным областям BSW17. При применении в качестве вакцины они индуцируют иммунный ответ, который приводит к производству BSW17-подобных антител у страдающего аллергией пациента. Поскольку BSW17 является неанафлактогенным и ингибирует связывание IgE/IgERI и синтез IgE на поверхности В-клеток, то поликлональные антитела, секретируемые в организме пациента в ответ на 40 введение вакцин на основе антиидиотипических Fab-фрагментов BSW17, обладают аналогичными свойствами. Иммунный ответ является очень специфическим и безопасным, поскольку в противоположность "классическому подходу, основанному на применении вакцин" не присутствуют никакие происходящие из IgE фрагменты протеина, которые могли бы обеспечивать поперечное связывание антител у иммунизированных пациентов, кроме 45 того, могут применяться композиции, в которых отсутствует носитель.

Эти BSW17-мимеотела представляют собой рекомбинантные антитела или фрагменты антител, состоящие из переменных областей (V-областей) и константных областей (C-областей), происходящих из человеческого иммуноглобулина G. Два различных клон (клоны 52 и 43), которые несут различные фрагменты мимеотел на своей поверхности, 50 были выявлены путем биологического пэннинга библиотек фаговых антител на иммобилизованном антителе BSW17. Структура мимеотела имитирует BSW17-эпитоп на фрагментах человеческого IgE внутри гипервариальных участков (CDR) и соседних каркасных участков (FR) V-областей. кДНК и аминокислотные последовательности тяжелой

и легкой цепей V-областей клона 52 и клона 43 представлены на фиг.5а-5г (Seq. id. no. 1-8). Конструкция легкой цепи клона 52 (L.C.)₂ включает димерный "Fab-подобный" фрагмент легкой цепи. Полная структура этих BSW17-мимеотел схематично представлена на фиг.4А-4В, при этом следует понимать, что части константной области также могут
5 иметь незначительные стерические модификации, такие как присутствующие в описанных выше аллотипических вариантах. Аминокислотная последовательность каждой полной тяжелой и легкой цепи этих клонов представлена на фиг.12а-12г (Seq.id. no. 35-38).

Мимеотела по изобретению обладают фармакологической активностью. Вследствие этого они могут применяться в качестве фармацевтических агентов, например антигенов
10 для вакцин. Будучи практически неспособными вызывать нецитолическое выделение гистамина, они способны стимулировать появление антител, обладающих сильной серологической перекрестной реактивностью по отношению к аминокислотным последовательностям-мишеням Fc-фрагмента IgE.

Начальная доза мимеотела по изобретению составляет, например, от приблизительно
15 0,05 мг до приблизительно 5 мг, предпочтительно приблизительно 1 мг; она может вводиться, например, назально или подкожно или внутримышечно, после чего спустя 14-28 дней вводят повторные (бустерные) дозы этого же препарата. Дозы, естественно, должны зависеть в определенной степени от возраста, веса и общего состояния здоровья пациента и могут регулироваться соответствующим образом.

Непосредственную вакцинацию, которая называется активной иммунизацией мимеотелами по изобретению, предпочтительно осуществляют с помощью
20 рекомбинантных пептидов (Fab-фрагмента легкой цепи или тяжелой цепи), которые могут быть получены с помощью общепринятой методики в различных экспрессионных системах-хозяевах, например бактериях, грибах или эукариотических клетках.

Предпочтительным является введение свободного рекомбинантного мимеотела. Однако также возможно дополнительно повышать иммуногенность иммуногена путем химического
25 связывания с иммуногенным носителем. Под понятием "иммуногенный носитель" в контексте настоящего описания подразумевают материалы, которые обладают способностью независимо вызывать иммуногенный ответ у животного-хозяина и которые
30 могут быть ковалентно сшиты с полипептидом либо непосредственно путем образования пептидных или сложноэфирных связей между свободной карбоксильной, амино- или гидроксильной группами в полипептиде и соответствующими группами на материале иммуногенного носителя, либо в альтернативном варианте путем связи через обычную бифункциональную сшивающую группу.

Примеры таких носителей включают: альбумины сыворотки животных, глобулины сыворотки животных, тироглобулины животных, гемаглобины животных, гемоцианины животных (в частности, гемоцианин лимфы улитки [KLH]); протеины, экстрагируемые из аскарид, например экстракты аскарид, описанные в J. Immun. 111 [1973] 260-268, J. Immun. 122 [1979] 302-308, J. Immun. 98 [1967] 893-900 и в Am. J. Physiol. 199 [1960]
35 575-578, или их очищенные продукты; полилизин, полиглутаминовую кислоту, сополимеры лизина и глутаминовой кислоты, сополимеры, содержащие лизин или орнитин, и т.д. В настоящее время вакцины производятся с использованием в качестве материала иммуногенного носителя токсоида дифтерии, такого как CRM197, или столбнячного токсоида (Lepow M.L. и др., J. Infectious Diseases 150 [1984] 402-406; Coen Beuvery E. и др., Infection and Immunity 40 [1983] 39-45), и эти токсидные материалы также
40 могут применяться согласно настоящему изобретению. В противоположность химически детоксицированному токсину дифтерии, предпочтительно применяют рекомбинантный мутантный токсин дифтерии CRM197. В CRM197 остаток глицина в положении 52 заменен глутаминовой кислотой с образованием нетоксичного продукта. CRM197 представляет
45 собой хорошо известный нетоксичный носитель-протеин, и он применяется в зарегистрированной человеческой вакцине. Очищенное протеиновое производное туберкулина (PPD) является особенно предпочтительным для использования в схеме "активной" иммунизации, поскольку (1) оно не индуцирует сам Т-клеточный ответ (т.е.
50

оно является в действительности "Т-клеточным гаптеном"), но еще ведет себя как полностью процессированный антиген и поэтому распознается Т-клеткой; (2) известно, что оно является одним из наиболее сильных гаптовых "носителей" с точки зрения механизма распознавания; и (3) оно может применяться для иммунизации людей без
5 дополнительного тестирования.

В качестве агентов, связывающих гаптен с носителем, могут использоваться агенты, обычно применяемые в препаратах антигенов. Ковалентное сшивание мимеотел по изобретению с иммуногенным материалом носителя может быть осуществлено
10 общепринятым методом. Так, например, для непосредственного ковалентного сшивания предпочтительно использовать в качестве сшивающего агента производные бис-N-сукцинимидила, более предпочтительно бис(сульфосукцинимидил)суберат (BSS), или глутаровый альдегид или карбодиимид, наиболее предпочтительно дициклогексилкарбодиимид (DC) или 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид.

Соотношение гаптена, агента, связывающего гаптен с носителем, и носителя может
15 быть легко оценено общепринятым способом, но предпочтительно, чтобы применяемое массовое соотношение носителя и гаптена составляло от приблизительно 1 до приблизительно 6, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 5 в пересчете на массу гаптена, а соотношение молярных эквивалентов агента, связывающего гаптен с носителем, и гаптена составляло от приблизительно 5 до приблизительно 10. С помощью
20 описанной выше реакции сочетания носитель связывают с гаптеном с помощью агента, связывающего гаптен с носителем, получая нужную композицию антигена в виде комплекса пептид-носитель, состоящего из мимеотопа по изобретению и носителя.

После завершения реакции полученный иммуноген может быть легко выделен и очищен общепринятым методом, например диализом, гель-фильтрацией или методом
25 фракционированного осаждения.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является активная иммунизация путем непосредственной вакцинации; однако также возможна и пассивная иммунизация. В последнем случае мимеотела по изобретению вводят
30 пригодному животному (не человеку) и полученные антитела выделяют и очищают, а затем вводят человеку, для того чтобы вызвать облегчение аллергических симптомов.

Мимеотела по изобретению могут применяться в качестве фармацевтических агентов, прежде всего вакцин, в частности, для лечения опосредуемых IgE болезней, таких как аллергия, например, астма, атопический дерматит, аллергические формы эозинофилии, риниты, хроническая крапивница и пищевые аллергии.

Под понятием "лечение" следует понимать профилактическую, а также и лечебную
35 иммунизацию. Хозяин предпочтительно представляет собой человека, однако при внесении соответствующих изменений изобретение также применимо практически к любому млекопитающему, например кошке или собаке. При рассмотрении настоящей заявки на интернациональной фазе в качестве ссылок были рассмотрены следующие прототипы:

40 D1 Progr. Allergy Clin. Immunol. (Proc. Int. Congress Allergol. Clin. Immunol., 16-й) 4 [1997] 339-342;

D2 Int. Arch. Allergy Immunol. 118 [1999] 119-121;

D3 Tumor Biology 18 [1999] Suppl. 2, 59;

D4 Tanox WO 89/06138;

45 D5 Patent Abstracts of Japan 4 [1999] [C.A. 130 [1999] 138296k] [JP 11/000174].

Пояснение к чертежам:

Фиг.1: Взаимодействие между IgE и его высокоаффинным рецептором.

Фиг.2: Свойства моноклонального антитела BSW17 к hIgE.

Фиг.3: Схема антиидиотипического взаимодействия:

50 Эпитоп hIgE, распознаваемый BSW17, и антиидиотипический паратоп схематически показаны черными точками. Черными окружностями обозначены гипервариабельные области антитела BSW17 (At1) и поликлонального антитела 3 (At3), индуцированного иммунизацией с использованием антиидиотипического антитела At2.

Фиг.4: Строение трех рекомбинантных BSW17-мимеотел:

А: Anti-id-BSW17 (аптиидиотипическое антитело к BSW17), клон 52 (SDS426); легкая цепь: (L.C.)₂ (Seq.id. no. 36)

Б: Anti-id-BSW17, клон 52 (SDS427); Fab: F_{AB} (Seq.id. no. 35 и 36)

5 В: Anti-id-BSW17, клон 43 (SDS463); Fab: F_{AB} (Seq.id. no. 37 и 38)

Фиг.5.: Клоны Fab-фрагментов антител к BSW17: последовательность ДНК человеческого иммуноглобулина, выявленного с использованием бактериофага, и выведенная аминокислотная последовательность:

Гипервариабельные участки (CDR) показаны курсивом:

10 Фиг.5а: клон 52; вариабельная область тяжелой цепи (Seq.id. no. 1 и 2) (CDR1: Seq.id. no. 39 и 40; CDR2: Seq.id. no. 41 и 42; CDR3: Seq.id. no. 43 и 44);

Фиг.5б: клон 52; вариабельная область легкой цепи (Seq.id. no. 3 и 4) (CDR1: Seq.id. no. 45 и 46; CDR2: Seq.id. no. 47 и 48; CDR3: Seq.id. no. 49 и 50);

15 Фиг.5в: клон 43; вариабельная область тяжелой цепи (Seq.id. no. 5 и 6) (CDR1: Seq.id. no. 51 и 52; CDR2: Seq.id. no. 53 и 54; CDR3: Seq.id. no. 55 и 56);

Фиг.5г: клон 43; вариабельная область легкой цепи (Seq.id. no. 7 и 8) (CDR1: Seq.id. no. 57 и 58; CDR2: Seq.id. no. 59 и 60; CDR3: Seq.id. no. 61 и 62).

Фиг.6: Гомология аминокислотных последовательностей rFab-фрагментов антител к BSW17 и C_ε 3-домена человеческого IgE:

20 А: anti-id-Fab, клон 52, тяжелая цепь (hlgE, C_ε 3: Seq.id. no. 25; клон 52: Seq.id. no.26):

anti-id Fab, клон 52, легкая цепь, сравнительный анализ последовательностей 1 (hlgE, C_ε 3: Seq.id. no. 27; клон 52: Seq.id. no.28);

25 anti-id-Fab, клон 52, легкая цепь, сравнительный анализ последовательностей 2 (hlgE, C_ε 3: Seq.id. no. 29; клон 52: Seq.id. no.30) соответственно;

Б: anti-id-Fab, клон 43, тяжелая цепь (hlgE, C_ε 3: Seq.id. no. 31; клон 43: Seq.id. no.32); anti-id-Fab, клон 43, легкая цепь (hlgE, C_ε 3: Seq.id. no. 33; клон 43: Seq.id. no.34) соответственно.

30 Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей: идентичные остатки обозначены закрашенными прямоугольниками, аналогичные аминокислоты обозначены серыми прямоугольниками (Lipman и Pearson). Положения F_{Cε} -остатков обозначено над каждой парой сравниваемых последовательностей. Положение гипервариабельных (CDR) и каркасных участков (FR) рекомбинантных Fab-фрагментов обозначено под каждой парой последовательностей.

35 Фиг.7: Конкурентное связывание rFab-фрагмента anti-id-BSW1 на поверхности примированных IgE CHO_α -клетках с использованием меченного с помощью ФИТЦ BSW17.

Фиг.8: Связывание с человеческим IgE очищенных с помощью аффинной хроматографии кроличьих иммуноглобулинов антитела к BSW17-мимеотелу:

40 Выявление комплексов hlgE/антитело к мимеотелу с помощью сэндвич-ELISA: hlgE и очищенные с помощью иммуноаффинной хроматографии препараты антител к BSW17-мимеотелу смешивали в эквимольной концентрации и инкубировали при 4° С. После инкубации смеси добавляли в лунки титрационного микропланшета, сенсibilизированные моноклональным антителом к hlgE LE27 (1 мкг/мл) в качестве иммобилизирующего антитела. Связанный IgG мимеотела выявляли с помощью комплекса: козий антикроличий IgG-HRP:

□ обозначает комплексы hlgE/SDS410;

○ обозначает комплексы hlgE/SDS411.

Фиг.9: Иммунный ответ на антитело к BSW17-мимеотелу у мышей линии Balb/c:

■ обозначает мышь 1; ● обозначает мышь 2; ▽ обозначает мышь 3; △ обозначает мышь

50 4; ◆ обозначает мышь 5

А: anti-id-BSW17.52; легкая цепь (SDS426);

Б: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427);

В: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463).

Величины ОП представляют собой значения оптической плотности, скорректированные для фонового связывания в несенсибилизированных лунках. Приведены средние значения по двум повторностям. Вариации обычно составляют <0,05 ОП.

Фиг.10: Ингибирование связывания hlgE/Fc_ε RI_α с использованием очищенных с помощью иммуноаффинной хроматографии антител к мимеотелу:

А: ■ обозначает BSW17;

● обозначает клон 52 антитела; легкая цепь (SDS410);

△ обозначает клон 52 антитела; Fab (SDS411);

▽ обозначает клон 52 антитела; легкая цепь (пропущенная через колонку);

Б: ■ обозначает BSW17;

● обозначает клон 43 антитела; Fab (SDS476).

Фиг.11: Профили ПКА-баллов групп макак резус (n=2), иммунизированных различными препаратами мимеотел:

А: Иммуноген: anti-id-BSW17.52; легкая цепь (SDS426);

Б: Иммуноген: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427);

В: Иммуноген: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463).

Представлены данные о пассивной кожной анафилактической (ПКА) реакции кожи макак резус через различные промежутки времени после иммунизации. Значения ПКА-баллов обозначают интенсивности ПКА-реакций, рассчитанные на основе величин площадей под кривыми (AUC), которые получены путем построения графика зависимости диаметров голубых пятен на коже от концентраций инъецированного IgE (JW8). Баллы обозначают средние значения для каждой группы, состоящей из 2 обезьян, которых иммунизировали одним и тем же препаратом мимеотела, и их рассчитывали исходя из данных для каждой обезьяны, приведенных в таблице 4. Вариации приведены на графике в виде отрезков прямой, характеризующих значение погрешности результата. Статистические значения p показаны над отрезками прямой, характеризующими значение погрешности результата. Моменты времени, в которые производились бустер-инъекции, обозначены под осью абсцисс.

фиг.12: Полные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей трех рекомбинантных BSW17-мимеотел:

Фиг.12а: Anti-id-BSW17, клон 52: переменная и первая константная области тяжелой цепи (Seq.id. no. 35);

Фиг.12б: Anti-id-BSW17, клон 52: переменная и константная области легкой цепи каппа-типа (Seq.id. no. 36);

Фиг.12в: Anti-id-BSW17, клон 43: переменная и первая константная области тяжелой цепи (Seq.id. no. 37);

Фиг.12г: Anti-id-BSW17, клон 43: переменная и константная области легкой цепи лямбда-типа (Seq.id. no. 38).

Клон 52 мимеотела (L.C.)₂ включает легкую цепь, представленную на фиг.12б (Seq.id. no. 36), связанную дисульфидными мостиками, как показано на фиг.4А.

Fab-фрагмент клона 52 мимеотела включает легкую цепь, представленную на фиг.12б (Seq.id. no. 36), и тяжелую цепь, представленную на фиг.12а (Seq.id. no. 35), связанные дисульфидными мостиками, как показано на фиг.45.

Fab-фрагмент клона 43 мимеотела включает легкую цепь, представленную на фиг.12г (Seq.id. no. 38), и тяжелую цепь, представленную на фиг.12в (Seq.id. no. 37), связанные дисульфидными мостиками, как показано на фиг.4В.

Ниже изобретение проиллюстрировано на примерах, не ограничивающих его объем.

Температуры даны в градусах Цельсия. В описании использованы следующие сокращения:

anti-id = антиидиотипическое

ABTS = [2,2'-азиноди(3-этилбензтиазолин)сульфонат]

BCA = бычий сывороточный альбумин

BSW17 = мышинное моноклональное антитело к человеческому IgE; C_ε 3 -

специфическое

CDR = гипервариабельные участки

C_ε 3 = домен третьей константной области тяжелой цепи IgE;

C_ε 4 = домен четвертой константной области тяжелой цепи IgE

5 C_ε E = мимеотопный пептид, имитирующий C_ε 3-эпитопную область, распознаваемую BSW17

C_ε M = мимеотопный пептид, имитирующий C_ε 4-эпитопную область, распознаваемую BSW17

KOE = колониеобразующая единица

10 ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ

Fab = фрагмент антител, лишенный константных областей 2 и 3 тяжелой цепи

F_{Cε} RI; IgERI = высокоаффинный рецептор IgE

F_{Cε} RI_α = высокоаффинный рецептор IgE, α -цепь

15 ТФС = фетальная телячья сыворотка

FR = каркасные участки

ФИТЦ = конъюгированная с флуоресцинизоцианатом

HRP = пероксидазпероксидаза из хрена

ЧСА = человеческий сывороточный альбумин

20 (h)IgE = (человеческий) иммуноглобулин E

mAt = моноклональное антитело

MNC = мононуклеарные клетки

NIP = 3-нитро-4-гидроксифенилуксусная кислота

p.c. = поликлональный

25 Phab = фаг, предоставляющий Fab-фрагменты (Fab-экспрессирующий бактериофаг)

ЗФР = забуференный фосфатом физиологический раствор

ПКА = пассивная кожная анафилаксия

PWM = митоген лаконоса

r = рекомбинантный

30 КТ = комнатная температура

SPR = поверхностный плазменный резонанс

Пример 1: Конструирование доступных библиотек фага

а) Источник лимфоцитов

35 В качестве доноров для получения мононуклеарных клеток (MNC) из периферической крови использовали двух взрослых мужчин. Первому взрослому мужчине, который являлся атопическим донором, имеющим клинические симптомы аллергии, вводили с помощью внутримышечной бустер-инъекции 0,5 мл адсорбированного на квасцах столбнячного токсоида (Te Anatoxal Bern, Swiss Serum and Vaccine Institute, Берн, Швейцария).

40 Через 7 дней MNC выделяли с помощью центрифугирования в градиенте Фиколла (Lymphoprep, фирма Pharmacia, Милуоки, штат Висконсин, США) и затем культивировали в

течение 3 дней в среде RPMI-1640 (фирма Seromed, Базель, Швейцария), содержащей 10³ ед./мл IL-2 (фирма Sigma, Сент-Луис, Миссури, США), 50 мкг/мл клеток линии Pansorbin (штамм Staphylococcus aureus Cowan 1, фирма Calbiochem, Ла Джолла, штат Калифорния, США) и столбнячный токсоид, разбавленный в соотношении 1:1000 средой

45 RPMI-1640. Затем из этих клеток получали общую РНК с использованием фенол-хлороформа и гуанидинийизотиоцианата (Chomczynski P. и Sacchi, N., Anal. Biochem. 162 [1987] 156). Второму донору, который представлял собой взрослого гипериммунного

50 мужчину, имеющему резус D, вводили с помощью внутривенной бустер-инъекции 2 мл уплотненных эритроцитов крови, полученных из крови известного донора-мужчины, имеющего группу крови 0 RhD+.

MNC выделяли с помощью центрифугирования в градиенте Фиколла на 18-й день после ревакцинации. Клетки перед экстракцией РНК культивировали в течение 3 дней в среде RPMI-1640, содержащей 10³ ед./мл IL-2 и 10 мкг/мл митогена лаконоса (PWM; фирма Sigma, L9379, Бухс, Швейцария).

Образцы человеческих миндалин получали после удаления миндалин у трех детей.

Миндалины размягчали в среде RPM1-1640 в стерильных чашках Петри и разрезали на мелкие кусочки. Затем ткань, клетки и среду переносили в стерильные пробирки, давали осадиться тканевому дебрису и из супернатанта выделяли MNC с помощью центрифугирования в градиенте Фиколла. Отбирали В-клетки путем инкубации MNC с покрытыми (сенсibiliзироваанными) CD19 парамагнитными гранулами и затем получали РНК с помощью указанного выше метода с использованием фенол-хлороформа и гуанидинийизотиоцианата.

Для клонирования цепей всех миметел использовали вектор pComb3, который получали из Scripps Research Institute La Jolla, штат Калифорния, США (Barbas III C.F. и Lerner, R.A., Companion Methods Enzymol. 2 [1991] 119). Штамм Escherichia coli XL1-Blue, который применяли для трансформации вектора pComb3, и фаг-хелпер VCSM13, получали от фирмы Stratacyte (Ла Джолла, штата Калифорния, США).

б) Создание библиотек бактериофагов

Конструировали три различные библиотеки: первую, обозначенную как BS, из MNC, выделенных из крови первого атопического донора-мужчины, вторую, обозначенную как LD2, из MNC второго донора-мужчины, полученных на день +18 после внутривенной бустер-инъекции, и третью, обозначенную как СТ, из обогащенной В-клетками популяции MNC, выделенной из миндалин детей. Из этих клеток получали общую РНК с использованием метода на основе фенол-хлороформа и гуанидинийизотиоцианата. 10 мкг этой РНК использовали для создания кДНК с помощью олиго(дТ)-праймера (400 нг) и подвергали обратному транскрибированию с помощью обратной транскриптазы M-MuLV и условиях, описанных у поставщика (фирма Boehringer Mannheim, Германия). ПЦР-амплификацию осуществляли согласно методу, описанному у Vogel M. и др., E.J. of Immunol. 24 (1994) 1200. В целом метод состоит в следующем: использовали 100 мкл среды для ПЦР, содержащей буфер Perkin-Elmer с 10 mM MgCl₂, 5 мкл кДНК, 150 нг каждого соответствующего 5'- и 3'-праймера, все 4 дНТФ, каждый в концентрации 200 мкМ, и 2 ед./мл полимеразы Taq (фирма Perkin Elmer, Нью-Джерси, США). ПЦР-амплификацию тяжелой и легкой цепей Fab- молекулы осуществляли по отдельности с помощью набора праймеров фирмы Stratacyte (детали приведены ниже). Для амплификации тяжелой цепи использовали 6 праймеров, обеспечивающих синтез против хода транскрипции, которые гибридизуются с каждым из 6 семейств V_H-генов, а для амплификации легкой цепи использовали один праймер для цепи каппа-типа и один праймер для цепи лямбда-типа. Праймеры, обеспечивающие синтез по ходу транскрипции, конструировали таким образом, чтобы они были совместимы с шарнирной областью константных доменов γ 1 и γ 3 тяжелой цепи. Для амплификации легкой цепи праймеры, обеспечивающие синтез по ходу транскрипции, должны соответствовать 3'-концу константных областей каппа-цепи и лямбда-цепи. ПЦР-продукты тяжелой и легкой цепей объединяли по отдельности, подвергали очистке на геле и расщепляли соответственно с помощью рестриктаз XhoI/SpeI и SacI/XbaI (фирма Boehringer Mannheim, Германия). После расщепления ПЦР-продукты экстрагировали один раз смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт и очищали с помощью гель-эксцизии. Встраивание расщепленного с помощью XhoI/SpeI Fd-фрагмента и последующее встраивание путем лигирования расщепленной с помощью SacI/XbaI легкой цепи в вектор pComb3, трансформацию клеток штамма XLI-Blu и получение фагов осуществляли согласно методу, описанному у Barbas III C.F. и Lerner R.A., Companion Methods Enzymol. 2 [1991] 119. После трансформации штамма XLI-Blue E.coli образцы клеток выделяли и подвергали титрованию на планшетах с целью определения размера библиотек. Эти результаты свидетельствуют о том, что уровень экспрессии библиотек составляет 1×10^7 , $7,7 \times 10^6$ и 3×10^6 КОЕ (колониеобразующих единиц) для BS, LD2 и СТ соответственно.

в) ПЦР-праймеры

VHI 5'-CAC TCC CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3' (Seq.id. no. 9);

VHII 5'-GTC CTG TCC CAG GTC AAC TTA CTC GAG TCT GG-3' (Seq.id. no. 10);

VHIII 5'-GTC CAG GTG GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3' (Seq.id. no. 11);

VHIV 5'-GTC CTG TCC CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG-3' (Seq.id. no. 12);
 VHV 5'-GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3' (Seq.id. no. 13);
 VHVI 5'-GTC CTG TCA CAG GTA CAG CTG CTC GAG TCA GG-3' (Seq.id. no. 14);
 CHI(γ I) 5'-AGC ATC ACT AGT ACA AGA TTT GGG CTC-3' (Seq.id. no. 15);
 5 VL(κ) 5'- GT GCC AGA TGT GAG CTC GTG ATG ACC CAG TCT CCA-3' (Seq.id. no. 16);
 CL(κ) 5'- T CCT TCT AGA TTA CTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT TGT GAC
 GGG CGA ACT C-3' (Seq.id. no. 17);
 VL(λ) 5'- C TGC ACA GGG TCC TGG GCC GAG CTC GTG GTG ACT CA-3' (Seq.id. no. 18);
 10 CL(λ) 5'- G CAT TCT AGA CTA TTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC-3' (Seq.id. no. 19).

10 Пример 2: Отбор рекомбинантных фрагментов BSW17-специфических антител (BSW-17-мимеотел) из библиотек фага

Отбор BSW17-специфических фагов осуществляли с помощью 4 циклов пэннинга. Каждый цикл включал две предварительных абсорбции на МАт к IgE Le27 перед абсорбцией на МАт к IgE BSW17. Предварительные абсорбции осуществляли следующим образом: 2 пробирки для иммуноанализа (Maxisorp, Nunc) сенсibilizировали 4 мл Le27 (20 мкг/мл) в течение ночи при 4° , затем блокировали в течение 2 ч при 37° 4 мл смеси 3ФР/2% обезжиренное молоко. Первую пробирку инкубировали на вращающейся вниз-вверх горизонтальной платформе при КТ в течение 30 мин с 4 мл блокировочного раствора, содержащего 2×10^{12} КОЕ каждой библиотеки фага (BS, LD2 и СТ). Затем фаги переносили во вторую пробирку и процесс повторяли еще раз. После второй предварительной абсорбции неспецифические в отношении Le27 фаги добавляли в пробирку, сенсibilizированную 4 мл BSW17 (20 мкг/мл), и блокировали смесью 3ФР/2% обезжиренное молоко, согласно описанной выше методике. После инкубации в течение 2 ч при КТ на вращающейся вниз-вверх горизонтальной платформе пробирку последовательно промывали 10 раз 3ФР/0,1% Твин и 10 раз 3ФР. Прикрепившиеся фаги последовательно элюировали сначала с помощью 500 мкл 0,1 М триэтиламина, а затем после трехкратной промывки 3ФР с помощью 500 мкл 0,1 М раствора HCl, значение pH которого доведено до 2,2 с помощью глицина, в который добавляли 1 мг/мл БСА. Каждую стадию элюирования осуществляли в течение 10 мин при КТ и элюированные фаги нейтрализовали с помощью 250 мкл 1 М Трис-HCl, pH 7,4 и 30 мкл 2 М Трис-основания соответственно. Отобранные фаги амплифицировали с помощью клеток штамма E. coli XLI-Blue согласно методу, описанному у Varbas и Lerner выше (1991), после чего их использовали еще в трех циклах пэннинга. После каждого цикла пэннинга осуществляли мониторинг титра элированных фагов, определяя КОЕ (таблица 2):

Цикл пэннинга ^{a)}	Титр элюированных фагов (КОЕ)
1	3×10^5
2	2×10^4
3	3×10^5
4	5×10^7

^{a)} Для каждого цикла пэннинга 6×10^{12} фаговых частиц предварительно абсорбировали дважды в пробирках, сенсibilizированных 20 мкг/мл Le27, а затем инкубировали в одной пробирке, сенсibilizированной 20 мкг/мл BSW17.

45 Пример 3: Нуклеотидная последовательность рекомбинантных BSW17-мимеотел.
 Плазмидную ДНК отобранных клонов фагов получали с помощью набора Nucleotrap (фирма Machery-Nagel, Дюрен, Германия) и секвенирование нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью системы для секвенирования типа ABI 373A с использованием набора для терминации цепи PRISM Ready Reactin DyeDeoxy Terminator
 50 Cycle Sequencing (фирма Applied Biosystems, Германия).

Для секвенирования последовательности тяжелой цепи использовали следующие праймеры:

CH γ I (5'-CGCTGTGCCCCAGAGGT-3') (Seq.id. no. 20) и

pCH (5'-GGCCGCAAATTCTATTTCAAGG-3') (Seq.id. no. 21).

Для получения последовательностей легкой цепи использовали следующие праймеры:

C λ (5'-GAGACACACCAGTGTGGC-3') (Seq.id. no. 22).

C κ (5'-CACAACAGAGGCAGTTCC-3') (Seq.id. no. 23) и

5 pCL (5'-CTAAACTAGCTAGTCGCC-3') (Seq.id. no. 24).

Праймеры синтезировали с помощью Microsynth (Balgach, Швейцария), на основе последовательностей ДНК различных отобранных клонов фагов были выведены 2 различные аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей рекомбинантного BSW17-специфического антитела (клон 52, клон 43). Последовательности и их локализация на гипервариабельных участках (CDR) и последовательности каркасных участков

10

приведены на фиг.5а-5г (Seq.id. no. 1-8). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей фрагментов рекомбинантного BSW17-специфического антитела, представленных клонами 52 и 43, и

15

человеческого C ϵ 3-домена, который участвует в связывании с высокоаффинным рецептором (фиг.6) (Seq.id. no. 25-34). Таким образом, паратопы, характерные для

фрагментов рекомбинантного антитела, имитируют определенные структуры, присутствующие в человеческом IgE ("мимеотела"). Таким образом, антитела, которые

20

вырабатываются у страдающих аллергией пациентов при вакцинации этими рекомбинантными мимеотелами, должны распознавать человеческий IgE и предупреждать

аллергические реакции путем ингибирования связывания IgE/IgERI.

Пример 4: Получение и очистка рекомбинантных BSW17-мимеотел

Получали растворимые мимеотела из фаговых клонов 43 и 52 (фиг.5) (Seq.id. no. 1-8).

25

Для получения растворимых Fab-фрагментов последовательность gIII, кодирующую хвостовой протеин pIII фаговой частицы, удаляли и заменяли состоящей из 6 остатков гистидина меткой с целью облегчения очистки Fab-фрагмента с помощью Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии.

Фазмидную ДНК получали с помощью набора Nucleotrap (фирма Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) и расщепляли с помощью SpeI и NheI. Фрагмент ДНК длиной 4,7 т.п.п.,

30

лишенный gIII-области, обрабатывали щелочной фосфатазой и очищали с помощью электрофореза на агарозном геле. Линеаризованную ДНК лигировали с фрагментом

ДНК, кодирующим шесть остатков гистидина на 5'- и 3'-концах сайтов рестрикции SpeI и NheI соответственно. После лигирования ДНК трансформировали клетки E. coli XL1-Blue и

35

отбирали отдельные клоны, продуцирующие растворимые мимеотела. Один из этих клонов был отобран для крупномасштабной очистки и его выращивали в 1 л SB-среды (Супер

бульон), содержащей 50 мкг/мл карбенициллина при 37° до достижения ОП 1,0 при 600

нм. Затем культуры индуцировали 1 мМ изопропил- β -D-тиогактопиранозидом (IPTG) (фирма Biofine, Прароман, Швейцария) и выращивали в течение 4 ч при 37° . Бактерии

40

пеллетировали при 6000 об/мин в течение 20 мин при 4° ресуспендировали в 30 мл буфером, в котором производят обработку ультразвуком (0,1 М Na₃PO₄, 8 М мочевины, рН

8,0), и затем обрабатывали ультразвуком на льду. После этого нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 30 мин при 4° и содержащий

Fab-фрагмент супернатант очищали на 1-миллилитровой никель-нитроацетатной колонке. Колонку промывали буфером, в котором производят обработку ультразвуком, для удаления

45

примесей, а затем осуществляли двухстадийное элюирование буфером, в котором производят обработку ультразвуком при рН 5,1 и 4 соответственно. Осуществляли

мониторинг фракций при ОП 280 нм и аликвоты анализировали с помощью ДСН-ПААГ (12%, не восстанавливающий) для подтверждения чистоты и идентичности мимеотел.

50

Содержащие мимеотела фракции затем объединяли, концентрировали и подвергали диализу в противотоке ЗФР.

Чистоту конечных препаратов мимеотел (приведенных на фиг.4 и 12) (Seq.id. no. 35, 36, 37, 38) оценивали, подвергая образец ДСН-ПААГ. Полосы протеина оценивали с помощью окрашивания кумасси бриллиантовым голубым. Концентрацию определяли путем

сравнения окрашенных кумасси бриллиантовым голубым полос мимеотела с известными количествами стандартного протеина (БСА), а также спектрофотометрически. Эти препараты мимеотел далее применяли для анализа конкурентного связывания и для иммунизации кроликов.

5 Пример 5: Ингибирование опосредуемого BSW17 замещения связанного с рецептором IgE с помощью рекомбинантных BSW17-мимеотел

BSW17 распознает и замещает IgE, связанный с его высокоаффинным рецептором. Для определения того, могут ли rFab-фрагменты anti-id-BSW17 ингибировать эту реакцию замещения, осуществляли анализ конкурентного связывания с использованием IgE, присоединенного к клеточной поверхности, на которой присутствует IgERI. Для анализа использовали рекомбинантную линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), стабильно трансфектированную ДНК кодирующей α -цепь человеческого IgERI [линия клеток CHO α ; Blank U. и др., Eur.J.Biol.Chem. 266 (1991) 2639]. Серии тестируемых образцов, содержащих 5×10^4 CHO α -клеток, инкубировали в FACS-буфере (буфер для клеточного сортера с возбуждением флуоресценции) (ЗФР, 0,3% БСА, 0,02% NaN₃) с 48 нг гибридомы IgE B11 (Zyrcher A.W. и др., Immunol.Lett. 46 (1995) 49-57] в течение 15 мин при КТ. После однократной промывки FACS-буфером каждый образец инкубировали в течение 15 мин при КТ с предварительно полученными комплексами BSW17, конъюгированного с флуоресцинизиотиоцианатом (BSW17-ФИТЦ), и с возрастающими концентрациями rFab-фрагментов anti-id BSW17. Комплексы получали следующим образом: 50 мкл BSW17-ФИТЦ в концентрации 1,3 нМ инкубировали с различными количествами rFab-фрагментов anti-id-BSW17 (40 нМ; 200 нМ; 1 мкМ; 4 мкМ; и 40 мкМ) в течение 30 мин при КТ. Контрольный образец, содержащий только CHO α -клетки, инкубировали в течение 15 мин при КТ с BSW17-ФИТЦ для определения неспецифического связывания. CHO α -клетки однократно промывали FACS-буфером и после добавления 100 мкл FACS-буфера клетки анализировали в проточном цитометре типа FACSCalibur (фирма Becton Dickinson), снабженном аргоновым лазером, настроенным на длину волны 488 нм. Дискриминирующие окна для рассеивания в прямом направлении/боковом направлении для дот-блота устанавливали вокруг мономерных клеток и флуоресценцию оценивали количественно и выражали в виде среднего значения флуоресценции для канала (mcf). Процент позитивных клеток рассчитывали как процент связывания BSW17 с CHO α -клетками. Как видно из фиг.7, связывание BSW17 с CHO α -клетками уменьшается при повышении концентраций Fab-фрагментов anti-id-BSW17, что свидетельствует о том, что 2 клонa Fab-фрагментов anti-id BSW17 обладают способностью ингибировать связывание BSW17 с IgE.

Пример 6: Иммунизация кроликов рекомбинантными BSW17-мимеотелами

В этом примере продемонстрировано, что иммунизация либо rFab-фрагменты антитела к BSW17 (которые содержат тяжелую плюс легкую цепи клонa 52, как показано на фиг.4, а также на фиг.12а и 12б) (Seq.id. no. 35 и 36), либо рекомбинантным мимеотелом, включающим только легкую цепь (фиг.4А, а также фиг.12б) (Seq.id. no. 36), индуцирует у кроликов гуморальный иммунный ответ, который дает перекрестную реакцию с человеческим IgE. Двух самок белых новозеландских кроликов сенсibilizировали (первично иммунизировали), вводя подкожно 300 мкг/кг rFab-фрагмента антитела к BSW17 или фрагмента легкой цепи клонa 52, эмульгированных в соотношении 1:1 в полном адьюванте Фрейнда, и затем трижды каждые 2 недели подвергали бустер-инъекциям таким же количеством мимеотела, эмульгированного в соотношении 1:1 в неполном адьюванте Фрейнда. Образцы сыворотки получали в день 0 (до обработки) и у животных брали образцы крови через 7 дней после последней инъекции.

50 Кроличью иммунную сыворотку очищали с помощью иммуноаффинной хроматографии, используя человеческое IgE (SUS-11 IgE), химически сшитое с колонками Sepharose 4В. С помощью этой процедуры фракция антитела к hIgE может быть выделена из общей фракции иммуноглобулинов, что дает возможность точно охарактеризовать терапевтически важный иммунный ответ с точки зрения титров антител и их аффинности.

Иммуноаффинная очистка антител к мимеотелу, которые дают перекрестную реакцию с человеческим IgE, включает две стадии. На первой стадии IgG-фракцию выделяли из кроличьей антисыворотки осаждением с помощью сульфата аммония, на второй стадии hlgE-специфические антитела к BSW17-мимеотелу связывали с человеческим IgE (SUS-11 IgE), ковалентно сшитым с CN-Sepharose 4B, с последующим элюированием, диализом и концентрированием.

Зависящее от концентрации образование в растворе комплекса очищенных с помощью иммуноаффинной хроматографии иммуноглобулинов с человеческим IgE подтверждали с помощью ELISA: SUS-11 IgE инкубировали при 4° в течение ночи с эквимоллярными количествами иммуноглобулинов к мимеотелу. Образованные в растворе комплексы вносили в лунки титрационного микропланшета, сенсibiliзированные моноклональным антителом LE27 к hlgE в качестве иммобилизирующего антитела. Связанный IgG к мимеотелу выявляли с помощью комплекса: поликлональный антикроличий IgG-HRP. Результаты приведены на фиг.8.

Пример 7: Иммунизация мышей рекомбинантными BSW17-мимеотелами

Рекомбинантные мимеотела, происходящие из обоих клонов 43 и 52, могут индуцировать появление антител к мимеотелам. Мышей подвергали иммунизации. Группам из 5 мышей линии Balb/c вводили подкожно по 5 мкг на 5 мышь рекомбинантных BSW17-мимеотел, которые получали в бактериях *E. coli* и очищали с помощью никель-аффинной хроматографии. В качестве адъюванта использовали гидроксид алюминия:

группу 1 иммунизировали с помощью образца SDS426, соответствующего anti-id-BSW17.52; легкая цепь;

группу 2 иммунизировали с помощью образца SDS427, соответствующего anti-id-BSW17.52; Fab-фрагмент;

группу 3 иммунизировали с помощью образца SDS463, соответствующего anti-id-BSW17.43; Fab-фрагмент.

В дни 21 и 41 после первичной иммунизации осуществляли 2 бустер-инъекции (по 5 мкг на мышь). Образцы крови брали в дни 0, 20, 28, 35, 42, 49 и 56 после первичной иммунизации. Получали сыворотку и зондировали ее на присутствие антитела к мимеотелу с помощью ELISA.

Лунки титрационного микропланшета сенсibiliзировали с помощью 1 мкг/мл поликлонального человеческого IgG и инкубировали с разбавленной в соотношении 1:50 мышьиной сывороткой, полученной из образцов крови, взятой в указанные моменты времени после первичной иммунизации. Связанные антитела к мимеотелу (ahlgG к человеческим каркасным участкам и константным областям человеческого антитела) определяли с помощью второй инкубации с пероксидазой из хрена, конъюгированной с кроличьим антимышиным IgG (gamlgG-HRP). Изменение цвета реакционной смеси получали, используя хромогенный субстрат ABTS.

Обнаружено, что все мыши вырабатывали антитела к мимеотелам после второй бустер-инъекции при использовании всех рекомбинантных препаратов мимеотел (фиг.9).

Пример 8: Иммуноглобулины к рекомбинантным BSW17-мимеотелам, полученные в организме кроликов, связываются с высокой аффинностью с человеческим IgE

Установлено, что вакцинация с помощью рекомбинантных BSW17-мимеотел индуцирует гуморальный иммунный ответ, отличающийся высокой аффинностью в отношении человеческого IgE. Кинетические параметры, характерные для связывания очищенных с помощью иммуноаффинной хроматографии иммуноглобулинов к мимеотелам с человеческим IgE, анализировали с помощью поверхностного плазменного резонанса (SPR).

SPR-анализ осуществляли с помощью устройства типа BIAcore (фирма Biacore, Уппсала, Швеция). Специфические связывающие поверхности получали, сшивая с помощью аминного сочетания человеческий IgE или мышьиный IgG₃ с сенсорным элементом типа CM5 согласно инструкциям производителя. С помощью этой процедуры биологические молекулы соединяют посредством первичных аминокрупп с карбоксиметилированной

декстрановой поверхностью сенсорного элемента. 10 пмоль человеческой миеломы, включающей IgE или SUS-11 IgE, связывали с различными подвижными клеткам элемента. Мышиный МАТ в виде IgG₃, ABL 364 (АТСС НВ 9324), иммобилизовали на различных дорожках одного и того же сенсорного элемента. ABL 364 использовали в качестве эталона для определения связывания антител к мимеотелам со структурами, не относящимися к иммуноглобулину hIgE, и для коррекции возможных изменений коэффициента отражения, вызванных изменениями буфера. Плотности сочетания составляли ~ 13000 RU.

Все биомолекулярные взаимодействия, которые оценивали с помощью устройства BIAcore, осуществляли при 25°, используя HBS (10 mM HEPES, pH=7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM ЭДТК и 0,005 об.% поверхностно-активного вещества Р-20) в качестве постоянно текущего буфера. Концентрации каждого анализируемого образца, пропускаемого с целью кинетического анализа по поверхности сенсорного элемента, составляли от 33 нМ до 499 нМ. Скорость потока составляла 5 мкл/мин. Анализируемые образцы инъецировали в течение 1200 с, а затем вводили HBS в течение примерно 1800 с для оценки диссоциации связанного анализируемого образца. Элемент регенерировали, пропуская в течение 120 с 10 mM HCl. Неспецифическое связывание оценивали, пропуская анализируемые образцы через эталонную дорожку, содержащую ABL 364, и перед проведением кинетического анализа вычитали полученное значение из данных, полученных для специфического связывания.

Кривые связывания, полученные с помощью SPR, анализировали, используя пакет программ для анализа BIAevaluation 3.0. Для сравнительного анализа взаимодействий антитела к мимеотелу/IgE применяли однофазную модель. Для каждой кривой рассчитывали константы скорости ассоциации k_a , константы скорости диссоциации k_d и константы равновесия диссоциации $K_D=1/K_A$ (K_A =константа аффинности), и эти данные обобщены в таблице 3:

Таблица 3

Кинетические константы (SPR/BIAcore) взаимодействия между препаратами поликлональный (р.с.) кроличий Ig к мимеотелу и hIgE

		Миелома IgE	SUS-11 IgE
BSW17	K_a (1/Мс) K_d (1/с) K_D (нМ)	н.о. н.о. н.о.	$0,8 \pm 0,3 \times 10^4$ $4,2 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ $0,53 \pm 0,33$
a(anti-id-BSW17.52;легкая цепь) ¹⁾ (SDS410)	K_a (1/Мс) K_d (1/с) K_D (нМ)	$2,1 \pm 0,8 \times 10^4$ $2,8 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ $1,33 \pm 6,8$	$2,2 \pm 0,9 \times 10^4$ $2,3 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ $10,7 \pm 3,3$
a(anti-id-BSW17.52;Fab) ²⁾ (SDS 411)	K_a (1/Мс) K_d (1/с) K_D (нМ)	$4,1 \pm 2,7 \times 10^4$ $2,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ $5,0 \pm 2,2$	$2,5 \pm 1,0 \times 10^4$ $1,5 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ $6,0 \pm 1,8$
a(anti-id-BSW17.43;Fab) ³⁾ (SDS476)	K_a (1/Мс) K_d (1/с) K_D (нМ)	н.о. н.о. н.о.	$2,2 \pm 0,4 \times 10^4$ $1,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ $0,75 \pm 0,02$

a обозначает "анти-"

н.о. обозначает "не определяли"

¹⁾ т.е. анти-SDS426 (т.е. антитело к SDS426)

²⁾ т.е. анти-SDS427 (т.е. антитело к SDS427)

³⁾ т.е. анти-SDS463 (т.е. антитело к SDS463)

Очевидно, что антитела, обладающие высокой аффинностью к человеческому IgE, могут

индуцироваться у кроликов, иммунизированных рекомбинантными BSW17-мимеотела (значения K_D находятся в наномолярном диапазоне). Fab клона 43 (SDS463; фиг.4B; anti-id-BSW17.43) обладал способностью индуцировать иммунный ответ, отличающийся очень высокой аффинностью по отношению к человеческому IgE ($K_D < 1$ нМ).

5 Таким образом, с помощью моноклонального антиидиотипического антитела можно индуцировать сильный поликлональный ответ против IgE, что является основным компонентом стратегии вакцинации человека.

Пример 9: Иммуноглобулины к рекомбинантным BSW17-мимеотелам, полученные в организме кроликов, ингибируют связывание человеческого IgE с его высокоаффинным рецептором

Для того чтобы вакцина была активной противоаллергической вакциной, должен образовываться комплекс между антителами к мимеотелам и hIgE, который должен предупреждать связывание IgE с его высокоаффинным рецептором. В связывании с высокоаффинным рецептором участвует C_{ϵ} 3-эпитопная область Val(370) - Gly(379) в последовательности Val(370)-Asn(383) (фиг.6) (Seq.id. no. 25). для которой выявлена гомология аминокислотной последовательности с CDR BSW17-мимеотела. Таким образом, можно ожидать, что IgE-специфические антитела, которые вырабатываются при иммунизации рекомбинантными BSW17-мимеотелами, проявляют свое терапевтическое действие путем ингибирования связывания IgE с его высокоаффинным рецептором путем блокады связывающего домена. Для подтверждения этого очищенные антитела к мимеотелу, полученные из иммунизированных кроликов, тестировали в отношении ингибирования связывания hIgE/ $F_{c\epsilon}$ RI α с помощью конкурентного анализа ELISA. В качестве характерного для болезни признака оценивали способность свободного IgE связываться с рекомбинантным $F_{c\epsilon}$ RI α (RI α - ЧСА-RI α двойной слитый протеин; DFP) (фиг.10).

hIgE (SUS-11; 1 мкг/мл на фиг.10A и 0,1 мкг/мл на фиг.10Б) подвергали предварительной инкубации в течение 16 ч при +4° с возрастающими концентрациями иммуноглобулинов к мимеотелам или с МАт BSW17 в качестве эталона. Группа иммуноглобулинов, присутствующих во фракции пропущенного через колонку препарата SDS410, была включена в качестве отрицательного контроля. Образовавшиеся комплексы вносили в лунки титрационного микропланшета, сенсibiliзированные 1 мкг/мл антитела Le27 к IgE в качестве связывающего антитела, и инкубировали с двойным слитым протеином $F_{c\epsilon}$ RI α - ЧСА - $F_{c\epsilon}$ RI α , меченным пероксидазой из хрена, в течение 1 ч при 37 °. Связанный DFP определяли с помощью хромогенного субстрата. Значения ОП выражали в виде % связывания. Связывание с несодержащим конкурента SUS-11 IgE принимали за 100%. Представлены средние значения измерений, проведенных с дублированием. Вариации, как правило, составляли менее 2%.

Результаты свидетельствуют о том, что иммунизация грызунов с использованием BSW17-мимеотел приводит к образованию специфических высокоаффинных антител к hIgE. Эти антитела к мимеотелам ингибируют связывание IgE с его высокоаффинным рецептором *in vitro*, что свидетельствует о важности стратегии вакцинации с использованием BSW7-мимеотел для разработки противоаллергической вакцины.

Пример 10: Ингибирование пассивной кожной анафилаксии путем вакцинации макак резус рекомбинантными BSW17-мимеотелами

45 Ингибирование пассивной кожной анафилаксии (ПКА) у обезьян может использоваться для теста противоаллергической активности соединений *in vivo*.

Вакцинация мимеотелами приводит к ингибированию анафилактических кожных реакций у макак резус. Группам, состоящим из 2 обезьян, вводили подкожно по 500 мкг на животное рекомбинантных anti-id-BSW17-мимеотел. После первичной иммунизации осуществляли 2 бустер-инъекции. Примерно через 10 дней после каждой бустер-инъекции осуществляли тестирование ПКА. Обезьян VI 91, VI 92, VI 93 и VI 95 тестировали в отношении ПКА-реакции еще раз через 3 месяца после последней бустер-инъекции. Схема иммунизации обобщена ниже в таблице 1:

Таблица 1			
Обезьяна	Иммуноген	Бустер-инъекция (день №)	ПКЛ (день №)
VI 91	anti-id-BSW17.52; легкая цепь (SDS426) (фиг.4А)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203

5

Обезьяна	Иммуноген	Бустер-инъекция (день №)	ПКЛ (день №)
VI 92	anti-id-BSW17.52; легкая цепь (SDS426) (фиг.4А)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 93	anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427) (фиг.4Б)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 95	anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427) (фиг.4Б)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 2	anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463) (фиг.4В)	0, 21, 54, 112	0, 33, 64, 123
VI 75	anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463) (фиг.4В)	0, 21, 54, 112	0, 33, 64, 123

10

15

20

25

Макакам резус, предварительно обработанным небольшими дозами гидрохлорида кетамина, 10-15 мг/кг, внутримышечно (Ketalar[®], Parke Davis, Великобритания) для того, чтобы поддерживать их в неподвижном состоянии, вводили путем внутрикожной инъекции различные дозы IgE (JW8) (фирма Serotec, Оксфорд, Великобритания) в кожу брюшного отдела. IgE (JW8) представляет собой химерное антитело, состоящее из мышинового антигенсвязывающего участка, специфического для гаптена NIP, и человеческого Fe ϵ -фрагмента тяжелой цепи. С помощью иглы 30-го размера цефалокаудально в объеме 100 мкл вводили возрастающие количества (0, 2, 10, 50, 250 нг/мл физиологического раствора) IgE (JW8). Спустя 2 ч животному внутривенно вводили 25 мг NIP, конъюгированного с БСА. После контрольного заражения конъюгатом NIP-БСА животных вновь обрабатывали седативным средством. Для визуализации кожной реакции немедленно после контрольного заражения антигеном животным вводили подкожно краситель голубой Эванса (1%, 0,5 мл/кг). Кожные реакции оценивали через 20 мин после инъекции антигена путем измерения с дублированием диаметров голубого пятна и расчета их среднего значения в мм.

30

ПКА оценивали в определенные моменты времени после первичной иммунизации и бустер-инъекций. Интенсивность ПКА рассчитывали из величин площадей под кривыми (AUC), полученными путем построения графиков зависимости диаметров голубых пятен на кожи от концентраций инъецированных IgE (JW8). ПКА-баллы, приведенные в таблице 4 для каждой обезьяны, представляют собой рассчитанные значения AUC:

35

40

45

50

Таблица 4

Воздействие вакцинации с использованием BSW17-мимеотел на пассивную кожную анафилактику у макак резус

5

А

	ПКА-балл			
Дни после иммуниза-	Иммуноген: anti-id-BSW17.52; легкая цепь		Иммуноген: anti-id-BSW17.52; Fab	
	обезьяна VI91	обезьяна VI92	обезьяна VI93	обезьяна VI95
0	11,6 ¹⁾ (100) ²⁾	10,6 (100)	15,8 (100)	15,6(100)
30	10,5 (91)	10,5 (99)	15,4 (97)	16,8(108)
61	10,1 (87)	1,8 (17)	21,4 (139)	16,5(106)
105	4,6 (40)	21 (20)	5,6 (35)	7,0(45)
203	9,8 (84)	6,3 (59)	12,6 (80)	11,2(72)

20

Б

	ПКА-балл	
Дни после иммунизации	Иммуноген: anti-id-BSW17.43; Fab	
	обезьяна VI2	обезьяна VI75
0	15,8 ¹⁾ (100) ²⁾	15,8 (100)
33	16,5 (104)	18,9 (120)
64	9,8 (62)	13,0 (82)
124	16,8 (106)	18,9 (120)

35

1) ПКА-баллы рассчитывали, исходя из значений площадей под кривыми (AUC), которые получали путем построения графиков зависимости диаметров голубых пятен на коже от концентраций инъектированного IgE (JW8), как описано выше (77)

40

2) интенсивность ПКА относительно данных, полученных до иммунизации.

ПКА в день 0 = 100%

На основе ПКА-баллов для каждого животного до его иммунизации (значения в день 0), используемых в качестве эталона для сравнения, можно заключить, что все обезьяны отвечали на вакцинацию BSW17-мимеотелом снижением интенсивности ПКА. Наилучшие результаты получены с использованием конструкции на основе легкой цепи клона 52 (SDS426) (фиг.4А), при этом уровни ингибирования составляли 60-83% (ПКА-баллы 40 и 17). У обезьян, иммунизированных Fab-фрагментом клона 52 (образец SDS427) (фиг.4Б), ПКА-реакция подавлялась на 55-65% (ПКА-баллы 45 и 35). Несколько меньшие уровни ингибирования ПКА, составляющие 18-38% (ПКА-баллы 82 и 62), обнаружены при использовании Fab-фрагмента клона 43 (образец SDS463) (фиг.4В), несмотря на его более высокие по сравнению с клоном мимеотел 52 характеристики в отношении BSW17-

50

связывания и индукции высокоаффинных антител к hlgE у кроликов.

Согласно протоколу вакцинации вакцинация с использованием клона мимеотел 52 становится эффективной после третьей бустер-инъекции (за исключением обезьяны VI92) и частичное подавление ПКА сохраняется даже спустя 3 месяца. В противоположность этому Fab-фрагмент клона 43 оказался эффективным после второй бустер-инъекции, в то время как третье контрольное заражение мимеотелом не оказывало действия.

Профиль средних ПКА-баллов для каждой группы из 2 обезьян, иммунизированных одним и тем же препаратом мимеотела, рассчитанный для полученных для каждой обезьяны данных (таблица 4), приведен на фиг.11.

Положительные в отношении ПКА результаты, полученные при вакцинации обезьян (по сравнению с баллами, полученными перед обработкой каждого животного или по сравнению с необработанными контрольными животными), ясно доказывают эффективность вакцинации мимеотелами и подтверждают концепцию их механизма действия. Вакцинация макак резус рекомбинантными BSW17-мимеотелами приводит к образованию высокоаффинных антител к человеческому IgE, которые ингибируют ПКА *in vivo*.

20

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novartis AG
 <120> РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА
 <130> Перечень последовательностей для 4-30888
 5 <140>
 <141>
 <150> GB 9908533.4
 <151> 1999-04-14
 <160> 62
 <170> PatentIn Ver. 2.1

 10 <210> 1
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 1
 15 caggtgaaac tgctcgagtc ggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag tctctggatt caccttcagt aactataata tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gactagagtg ggtctcatcc attagtagtc gaaattctta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acgccgagag taccttgat 240
 ctgcaaatgg acaacctggg agtcgaagac acggctgtct atttttgtac gagcggccgc 300
 cttttcgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctct 345

 20 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2
 25 Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Asn Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Ser Gly Arg Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

 35 <210> 3
 <211> 315
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 3
 gtgatgacc agtctccatc ctcaactgtct gcactctgtag gagacagagt caccatcact 60
 tgtcgggcta gtcagggcat taacaattat ttagcctggt ttcagcagaa accagggaaa 120
 gccctaagt cctgatccta tagtgcatcc attttgcaaa gtgggggtccc atccaagtcc 180
 agcggcagtg gatctgggac agatttcact ctaccatca gcaacctgca gcctgaagat 240
 tttgcaactt attactgcca acaatataat tattatccgc tcactttcgg cggagggacc 300
 aaggtggaga tcaaa 315

 45 <210> 4
 <211> 105
 <212> PRT

 50

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 5 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp
 65 70 75 80
 10 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 378

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 5

caggtgaaac tgctcgagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 20 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggac ctggatccgc 120
 cagcgcccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctcc 180
 tacaaccctg ccctcaagag tcgagtcacc atgtcagtgg acacgtctaa aaaccagttc 240
 tccttgaggc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tctattactg tgcgcgagag 300
 cggggtgaga cgggtctata ttacccttat tactacatag acgtctgggg cacagggacc 360
 accgtcaccg tctctctca 378

<210> 6

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 30 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 35 Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Arg Gly Glu Thr Gly Leu Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 40 Ile Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 7

<211> 342

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 7

gagctcgtgg tgactcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagaag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacaa 120
 caccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcagggggt 180

50

tctaatacgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cactctcggg 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc ctaggtcagc cc 342

5 <210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Glu Leu Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 10 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro

20 <210> 9
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

25 <400> 9
 cactcccagg tgcagctgct cgagtctgg 29

30 <210> 10
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gtcctgtccc aggtcaactt actcagagtct gg 32

35 <210> 11
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gtccaggtgg aggtgcagct gctcagagtct gg 32

40 <210> 12
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

45 <400> 12
 gtcctgtccc aggtgcagct gctcagagtct gg 32

<210> 13
 <211> 32
 <212> ДНК

50

<213> Homo sapiens

<400> 13
gtctgtgccg aggtgcagct gctcgagtct gg 32

5 <210> 14
<211> 32
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

10 <400> 14
gtcctgtcac aggtacagct gctcgagtca gg 32

<210> 15
<211> 27
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

15 <400> 15
agcatcacta gtacaagatt tgggctc 27

20 <210> 16
<211> 35
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 16
gtgccagatg tgagctcgtg atgaccagct ctcca 35

25 <210> 17
<211> 56
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

30 <400> 17
tccttctaga ttactaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gaactc 56

<210> 18
<211> 36
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

35 <400> 18
ctgcacaggg tcctgggccg agctcgtggt gactca 36

40 <210> 19
<211> 34
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 19
gcattctaga ctattatgaa cattctgtag gggc 34

45 <210> 20
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 20
cgctgtgccc ccagaggt 18

50

<210> 21
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 21
 ggccgcaaat tctatttcaa gg 22

<210> 22
 <211> 18
 <212> ДНК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 gagacacacc agtgtggc 18

<210> 23
 <211> 18
 <212> ДНК
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 cacaacagag gcagttcc 18

20 <210> 24
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 24
 ctaaactagc tagtcgcc 18

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn
 1 5 10

35 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 40 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 27
 Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15

50

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 28
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly
 1 5 10

15 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 30
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 1 5 10

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 31
 Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn
 20 25

30 <210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 32
 Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 20 25 30

40 <210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 33
 Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr
 1 5 10 15
 His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met
 20 25

50 <210> 34

<211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

5 Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln
 1 5 10 15
 Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
 20 25

<210> 35
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

40 Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45
 45 Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp
 65 70 75 80
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 100 105 110

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 115 120 125
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 130 135 140
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 145 150 155
 5 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 165 170 175
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 180 185 190
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg
 195 200 205
 10 Gly Glu Cys
 210

<210> 37

<211> 229

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Glu Leu Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

50

RU 2 253 655 C2

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95
 5 Ser Thr Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
 115 120 125
 Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
 130 135 140
 10 Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
 145 150 155 160
 Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
 165 170 175
 Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
 180 185 190
 15 Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
 195 200 205
 Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

20 <210> 39
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 aactataata tgaac

15

25 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Asn Tyr Asn Met Asn
 30 1 5

35 <210> 41
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 tccattagta gtcgaaattc ttacatatac tacgcagact cagtgaaggg c

51

40 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Ser Ile Ser Ser Arg Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 45 1 5 10 15
 Gly

50 <210> 43
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 ggccgccttt togactac 18

5 <210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Gly Arg Leu Phe Asp Tyr
 1 5

10 <210> 45
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

15 <400> 45
 cgggctagtc agggcattaa caattattta gcc 33

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 47
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 30 agtgcatcca ttttgcaaag t 21

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 48
 Ser Ala Ser Ile Leu Gln Ser
 1 5

<210> 49
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 caacaatata attattatcc gctcact 27

45 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 50

Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 51
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 agcagtggtg gttactactg gacc 24

10 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 52
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Thr
 1 5

20 <210> 53
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 ggatacatct attacagtg ggcacacctcc tacaaccgt ccctcaagag t 51

25 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 54
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser

35 <210> 55
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 gagcggggtg agaccggtct atattacccc tattactaca tagacgtc 48

40 <210> 56
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 56
 Glu Arg Gly Glu Thr Gly Leu Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val
 1 5 10 15

50 <210> 57
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 57
actggaacca gaagtgacgt tggtggttat aactatgtct cc 42

5 <210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

10 <210> 59
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

15 <400> 59 gatgtcagta atcggccctc a 21

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 60
Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 61
<211> 33
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

30 <400> 61 agctcatata caagcagcag cactctcggg gtg 33

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 62
Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Gly Val
1 5 10

Формула изобретения

- 40 1. Рекомбинатное моноклональное антитело (мимеотело) или фрагмент антитела, являющееся антиидиотипическим по отношению к антителу BSW17, которое оказывает воздействие на связывание Cε3-области IgE с высокоаффинным рецептором IgE, отличающееся тем, что оно представляет собой или включает димер легкой цепи или один из двух Fab-фрагментов, представленных на фиг.4 (SEQ ID NO : 35, 36, 37 и 38), при
45 этом их константные области дополнительно могут включать стерические модификации до 5 аминокислот, такие, как присутствующие в аллотипических вариантах, и где SEQ ID NO: 36 соответствует димеру легкой цепи (L.C.)₂ мимиотела клона 52 SDS426;
SEQ ID NO : 35 и 36 соответствуют Fab фрагменту мимиотела клона 52 SDS427;
SEQ ID NO : 37 и 38 соответствуют Fab фрагменту мимиотела клона 43SDS463.
- 50 2. Мимеотело по п.1, отличающееся тем, что представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную на фиг.5а, 5б, 5в или 5 г (SEQ ID NO : 2, 4, 6 и 8), при этом ее константные области дополнительно могут включать стерические модификации до 5 аминокислот, такие, как присутствующие в аллотипических

вариантах.

3. Мимеотело по п.1, отличающееся тем, что представляет собой или включает по меньшей мере один CDR или предпочтительно 2 или более, предпочтительно 3, CDR, представленных на фиг.5а (SEQ ID NO : 2, 40, 42 и 44), 5б (SEQ ID NO : 4, 46, 48 и 50), 5в (SEQ ID NO : 6, 52, 54 и 56) или 5 г (SEQ ID NO : 8, 58, 60 и 62),
5
необязательно в сочетании с соседними последовательностями каркасного участка, включающего до 10 аминокислот на одном или обоих концах CDR.

4. Мимеотело по п.1, отличающееся тем, что представляет собой или включает, по меньшей мере, одну из последовательностей, приведенных на фиг.6 для клонов 52 и 43,
10
которые являются гомологами C_ε3 - домена человеческого IgE (SEQ ID NO: 26, 28, 30, 32 и 34).

5. Мимеотело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что оно предназначено для применения в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции для лечения опосредуемых IgE болезней.

15
6. Фармацевтическая композиция для лечения опосредуемых IgE болезней, отличающаяся тем, что она включает мимеотело по п.1 либо в виде отдельной полной молекулы, либо в виде протеинового конъюгата, химически связанного с молекулой иммуногенного носителя, при необходимости с адъювантом и дополнительными общепринятыми эксципиентами.

20
7. Фармацевтическая композиция по п.6, отличающаяся тем, что она представляет собой вакцину.

25

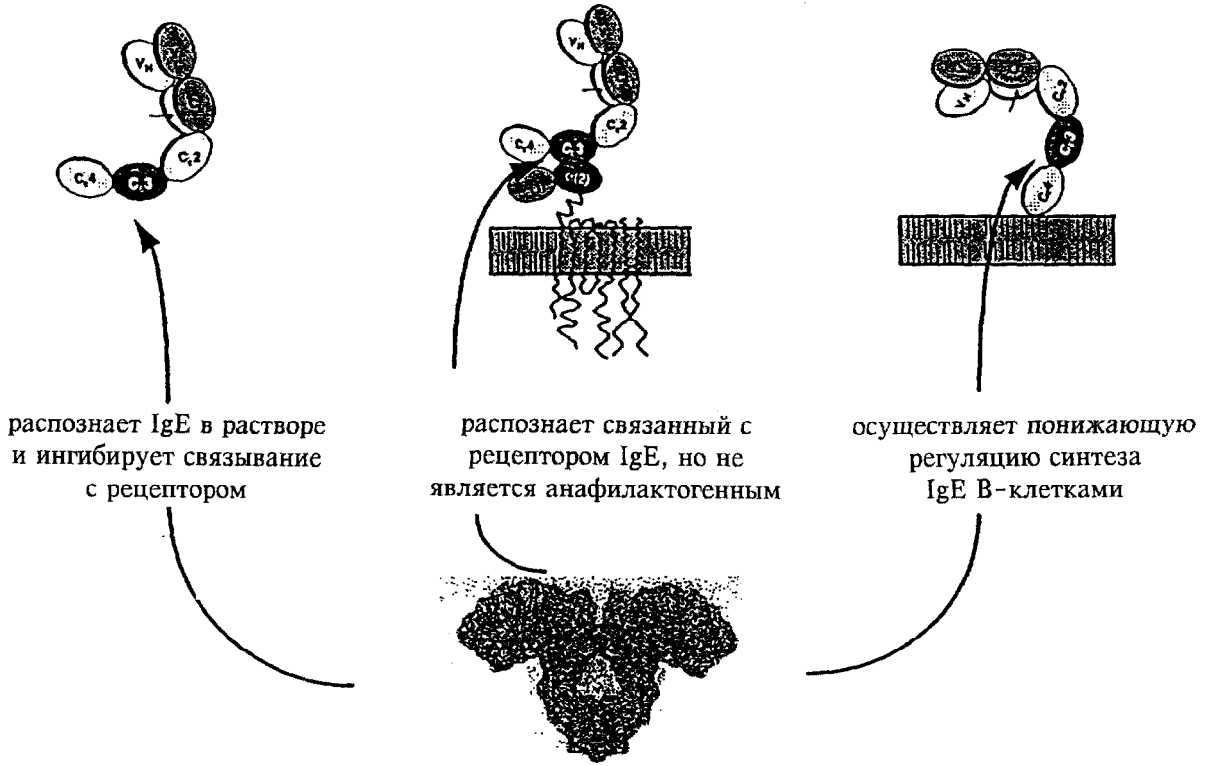
30

35

40

45

50

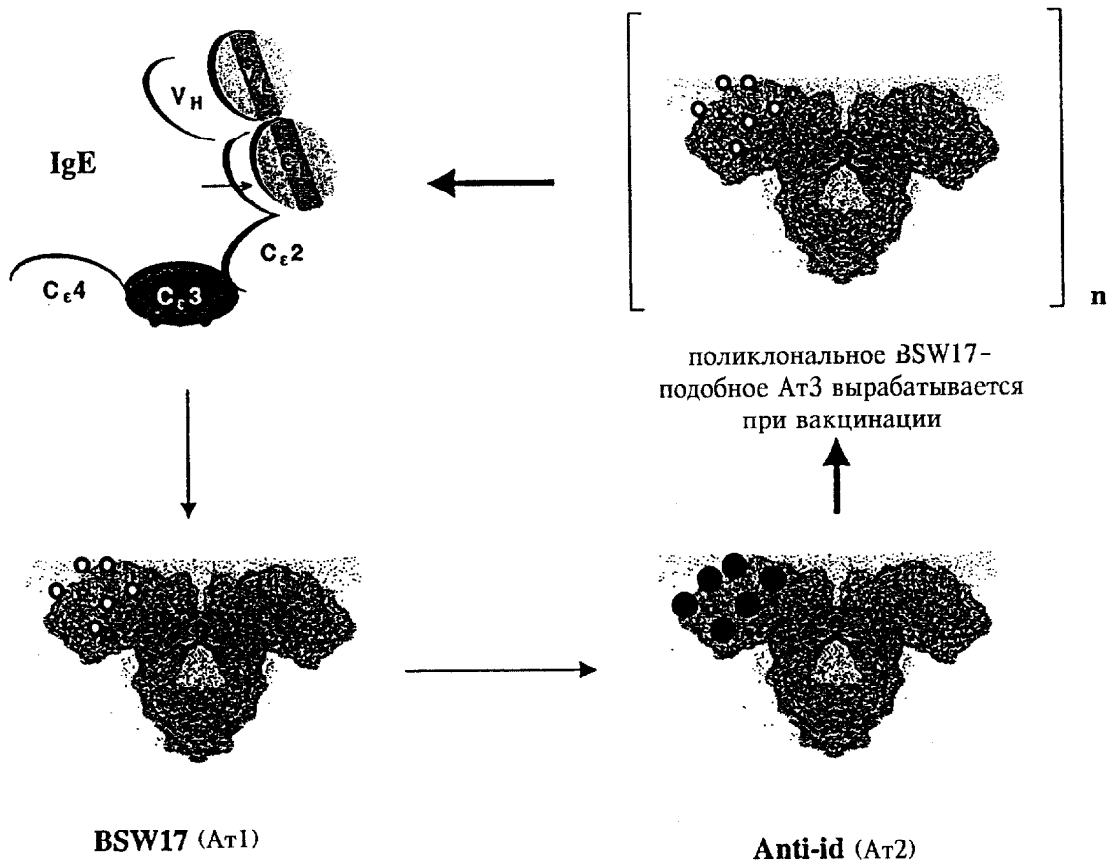


BSW17

Свойства моноклонального антитела BSW17 к hIgE

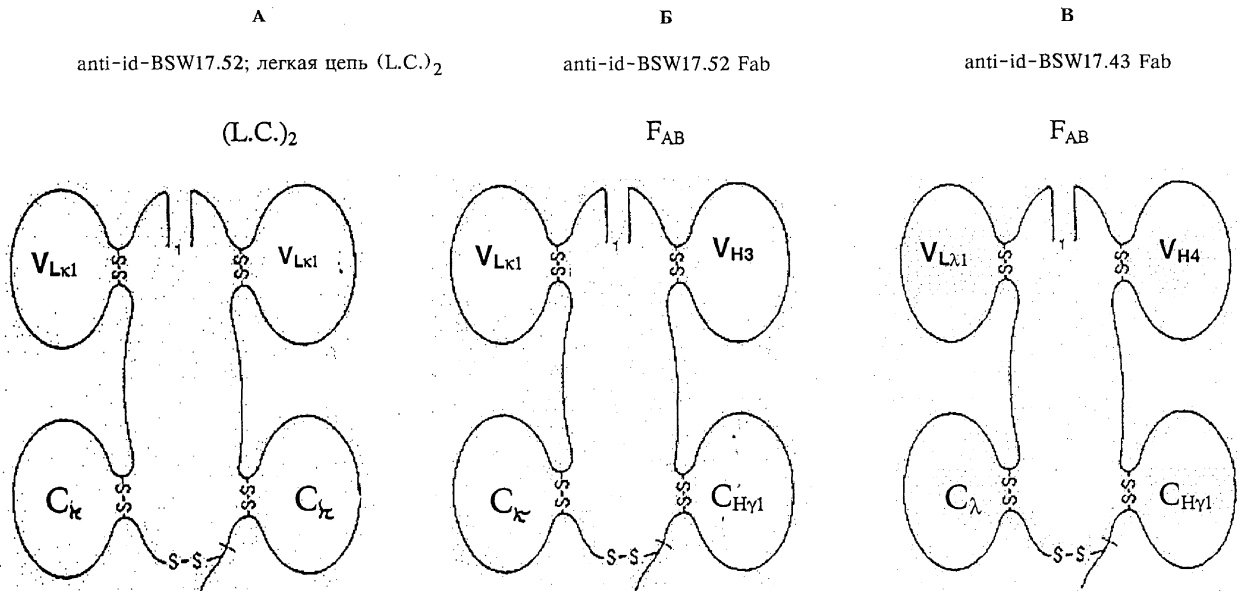
ФИГ. 2

Схема антиидиотипического взаимодействия:



ФИГ. 3

Схематическое строение рекомбинантных мимеотел:



ФИГ. 4

Fab-фрагмент антитела к BSW17, клон 52; переменная область тяжелой цепи: последовательность ДНК человеческого иммуноглобулина, выявленного с использованием бактериофага, и выведенная аминокислотная последовательность
Гипервариабельные участки (CDR) обозначены курсивом

5'	CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCG	GGG	GGA	GTC	CTG	GTC	AAG	CCT	GGG	TCC	CTG	54	
	Q	V	K	L	L	E	S	G	G	L	L	V	K	P	G	S	L		
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	<i>AAC</i>	<i>TAT</i>	<i>AAT</i>	<i>ATG</i>	<i>AAC</i>	TGG	108
	R	L	S	C	A	V	S	G	F	T	F	S	<i>N</i>	<i>Y</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>N</i>	W	
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGA	CTA	GAG	TGG	GTC	TCA	<i>TCG</i>	<i>ATT</i>	<i>AGT</i>	<i>AGT</i>	<i>CGA</i>	162
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	R	
	<i>AAT</i>	<i>TCT</i>	<i>TAC</i>	<i>ATA</i>	<i>TAC</i>	<i>TAC</i>	<i>GCA</i>	<i>GAC</i>	<i>TCA</i>	<i>GTG</i>	<i>AAG</i>	<i>GGC</i>	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	216
	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>Y</i>	<i>I</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	R	F	T	I	S	R	
	GAC	AAC	GCC	GAG	AGT	ACC	TTG	TAT	CTG	CAA	ATG	252	AAC	CTG	261	GTC	GAA	270	
	D	N	A	E	S	T	L	Y	L	Q	M	D	N	L	G	V	E	D	
	ACG	GCT	GTC	TAT	TTT	TGT	ACG	AGC	<i>GGC</i>	<i>CGC</i>	<i>CTT</i>	<i>TTC</i>	<i>GAC</i>	<i>TAC</i>	TGG	GGC	CAG	324	
	T	A	V	Y	F	C	T	S	<i>G</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>Y</i>	W	G	Q	G	
	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	342	TCT	3'											
	T	L	V	T	V	S	S												

ФИГ. 5a

Fab-фрагмент антитела к BSW17, клон 52; переменная область легкой цепи: последовательность ДНК человеческого иммуноглобулина, выявленного с использованием бактериофага, и выведенная аминокислотная последовательность
Гипервариабельные участки (CDR) обозначены курсивом

5'	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	54
	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	
	ATC	ACT	TGT	<i>CGG</i>	<i>GCT</i>	<i>AGT</i>	<i>CAG</i>	<i>GGC</i>	<i>ATT</i>	<i>AAC</i>	<i>AAT</i>	<i>TAT</i>	<i>TTA</i>	<i>GCC</i>	TGG	TTT	CAG	CAG	108
	I	T	C	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>Y</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	W	F	Q	Q	
	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG	TCC	CTG	ATC	TAT	<i>AGT</i>	<i>GCA</i>	<i>TCC</i>	<i>ATT</i>	<i>TTG</i>	<i>CAA</i>	<i>AGT</i>	162
	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>S</i>	
	GGG	GTC	CCA	TCC	AAG	180	AGC	GGC	189	GGA	TCT	198	ACA	GAT	207	ACT	CTC	216	
	G	V	P	S	K	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	
	ATC	AGC	AAC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	243	TTT	GCA	ACT	252	TAC	TGC	<i>CAA</i>	<i>CAA</i>	<i>TAT</i>	270
	I	S	N	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Y</i>	<i>N</i>	
	<i>TAT</i>	<i>TAT</i>	<i>CCG</i>	<i>CTC</i>	<i>ACT</i>	288	TTC	GGC	GGA	297	ACC	AAG	306	GAG	ATC	315	AAA	3'	
	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>P</i>	<i>L</i>	<i>T</i>	F	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K			

ФИГ. 56

Fab-фрагмент антитела к BSW17, клон 43; переменная область тяжелой цепи: последовательность ДНК человеческого иммуноглобулина, выявленного с использованием бактериофага, и выведенная аминокислотная последовательность
 Гипервариабельные участки (CDR) обозначены курсивом

5'	CAG Q	GTG V	<i>AAA</i> K	CTG L	CTC L	<i>GAG</i> E	TCG S	GGC G	<i>CCA</i> P	GGA G	CTG L	<i>GTG</i> V	<i>AAG</i> K	CCT P	<i>TCG</i> S	GAG E	ACC T	54 CTG L
	TCC S	CTC L	<i>ACC</i> T	TGC C	ACT T	<i>GTC</i> V	TCT S	GGT G	<i>GGC</i> G	TCC S	ATC I	<i>CDR1 AGC</i> S	<i>AGT</i> S	<i>GGT</i> G	<i>GGT</i> G	<i>TAC</i> Y	<i>TAC</i> Y	108 TGG W
	<i>ACC</i> T	TGG W	ATC I	CGC R	CAG Q	CGC R	CCA P	GGG G	<i>AAG</i> K	GGC G	CTG L	<i>GAG</i> E	TGG W	ATT I	<i>CDR2 GGA</i> G	<i>TAC</i> Y	<i>ATC</i> I	162 TAT Y
	<i>TAC</i> Y	<i>AGT</i> S	<i>GGG</i> G	<i>AGC</i> S	<i>ACC</i> T	<i>TCC</i> S	<i>TAC</i> Y	<i>AAC</i> N	<i>CCG</i> P	<i>TCC</i> S	<i>CTC</i> L	<i>AAG</i> K	<i>AGT</i> S	CGA R	207 GTC V	ACC T	ATG M	216 TCA S
	GTG V	GAC D	ACG T	TCT S	AAA K	AAC N	CAG Q	TTC F	TCC S	CTG L	AGG R	CTG L	ACC T	TCT S	261 GTG V	ACT T	GCC A	270 GCG A
	GAC D	ACG T	GCC A	GTC V	TAT Y	288 TAC Y	TGT C	GCC A	297 CGA R	<i>CDR3 GAG</i> E	<i>CGG</i> R	306 <i>GGT</i> G	<i>GAG</i> E	<i>ACC</i> T	315 <i>GGT</i> G	<i>CTA</i> L	<i>TAT</i> Y	324 TAC Y
	<i>CCC</i> P	<i>TAT</i> Y	<i>TAC</i> Y	<i>TAC</i> Y	<i>ATA</i> I	342 <i>GAC</i> D	<i>GTC</i> V	TGG W	351 GGC G	ACA T	GGG G	360 ACC T	ACC T	GTC V	369 ACC T	GTC V	TCC S	378 TCA S

ФИГ. 5в

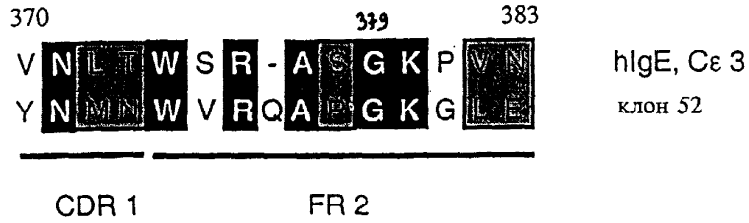
Fab-фрагмент антитела к BSW17, клон 43; переменная область легкой цепи: последовательность ДНК человеческого иммуноглобулина, выявленного с использованием бактериофага, и выведенная аминокислотная последовательность
 Гипервариабельные участки (CDR) обозначены курсивом

5'	GAG E	CTC L	<i>GTG</i> V	<i>GTG</i> V	ACT T	<i>GAG</i> Q	CCT P	GCC A	TCC S	GTG V	TCT S	GGG G	TCT S	CCT P	45 GGA G	CAG Q	TCG S	54 ATC I
	ACC T	ATC I	TCC S	TGC C	<i>CDR1 ACT</i> T	<i>GGA</i> G	<i>ACC</i> T	<i>AGA</i> R	<i>AGT</i> S	<i>GAC</i> D	<i>GTT</i> V	<i>GGT</i> G	<i>GGT</i> G	<i>TAT</i> Y	99 <i>AAC</i> N	<i>TAT</i> Y	<i>GTC</i> V	108 TCC S
	TGG W	TAC Y	117 CAA Q	CAA Q	CAC H	126 CCA P	GGC G	AAA K	GCC A	CCC P	AAA K	CTC L	ATG M	ATT I	153 TAT Y	<i>CDR2 GAT</i> D	<i>GTC</i> V	162 <i>AGT</i> S
	<i>AAT</i> N	<i>CGG</i> R	<i>CCC</i> P	<i>TCA</i> S	GGG G	180 GTT V	TCT S	AAT N	189 CGC R	TTC F	TCT S	198 GGC G	TCC S	AAG K	207 TCT S	GGC G	AAC N	216 ACG T
	GCC A	TCC S	CTG L	ACC T	ATC I	TCT S	GGG G	CTC L	243 CAG Q	GCT A	GAG E	GAC D	GAG E	GCT A	261 GAT D	TAT Y	TAC Y	270 TGC C
	<i>CDR3 AGC</i> S	<i>TCA</i> S	<i>TAT</i> Y	<i>ACA</i> T	<i>AGC</i> S	288 <i>AGC</i> S	<i>AGC</i> S	<i>ACT</i> T	297 <i>CTC</i> L	<i>GGG</i> G	<i>GTG</i> V	306 TTC F	GGC G	GGA G	315 GGG G	ACC T	AAG K	324 TTG L
	ACC T	GTC V	CTA L	GGT G	CAG Q	342 CCC P	3'											

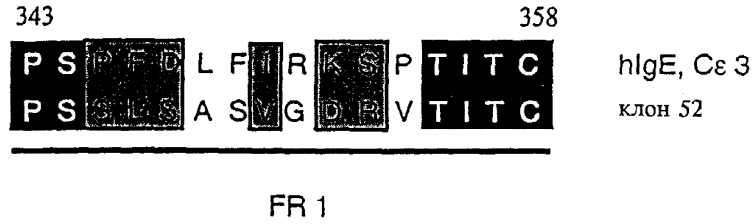
ФИГ. 5г

A

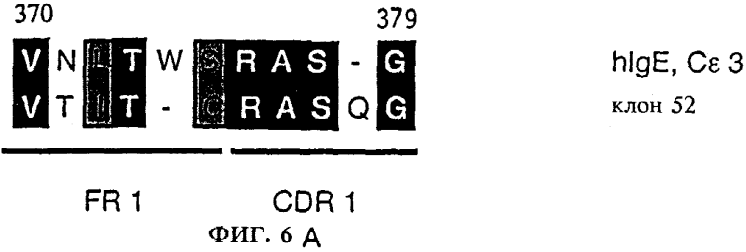
anti-id-Fab, клон 52, тяжелая цепь:



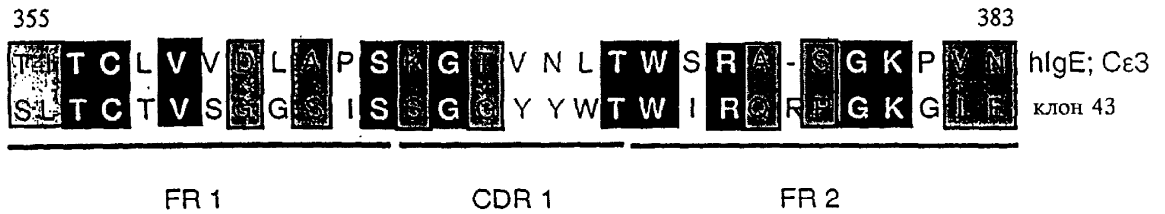
anti-id-Fab, клон 52, легкая цепь,
сравнительный анализ последовательностей, 1:



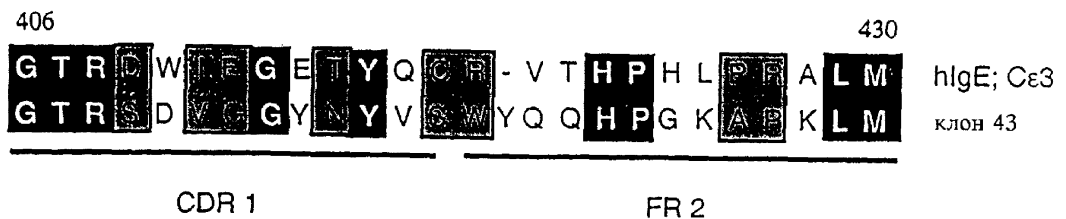
anti-id-Fab, клон 52, легкая цепь,
сравнительный анализ последовательностей 2:



anti-id-Fab, клон 43, тяжелая цепь:

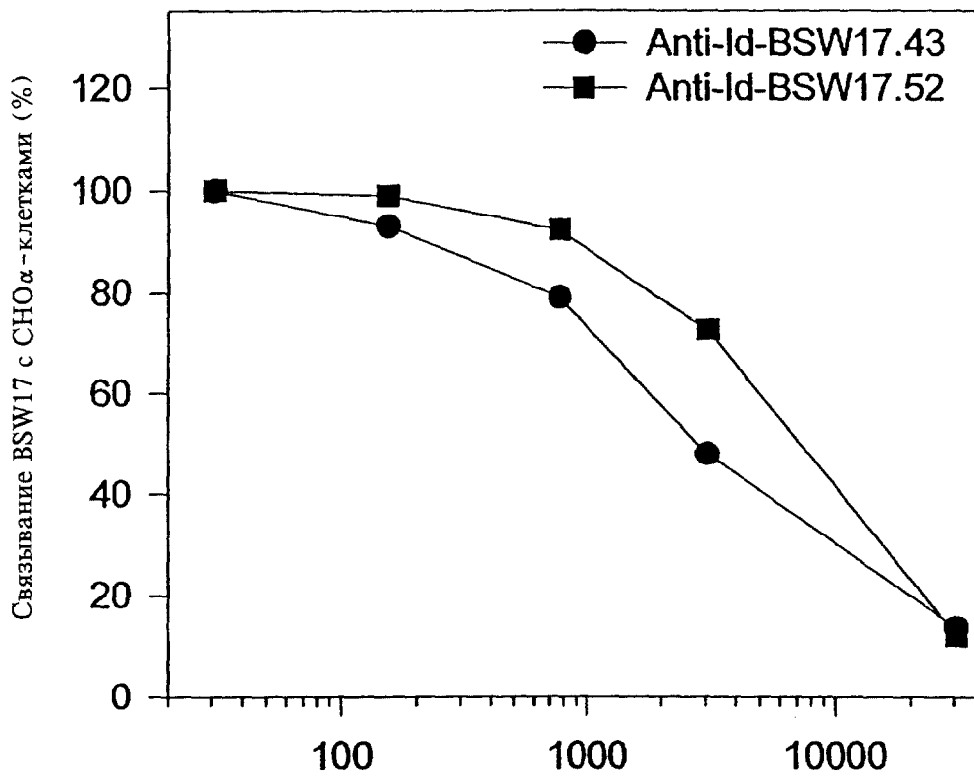


anti-id-Fab, клон 43, легкая цепь:



Фиг. 6 В

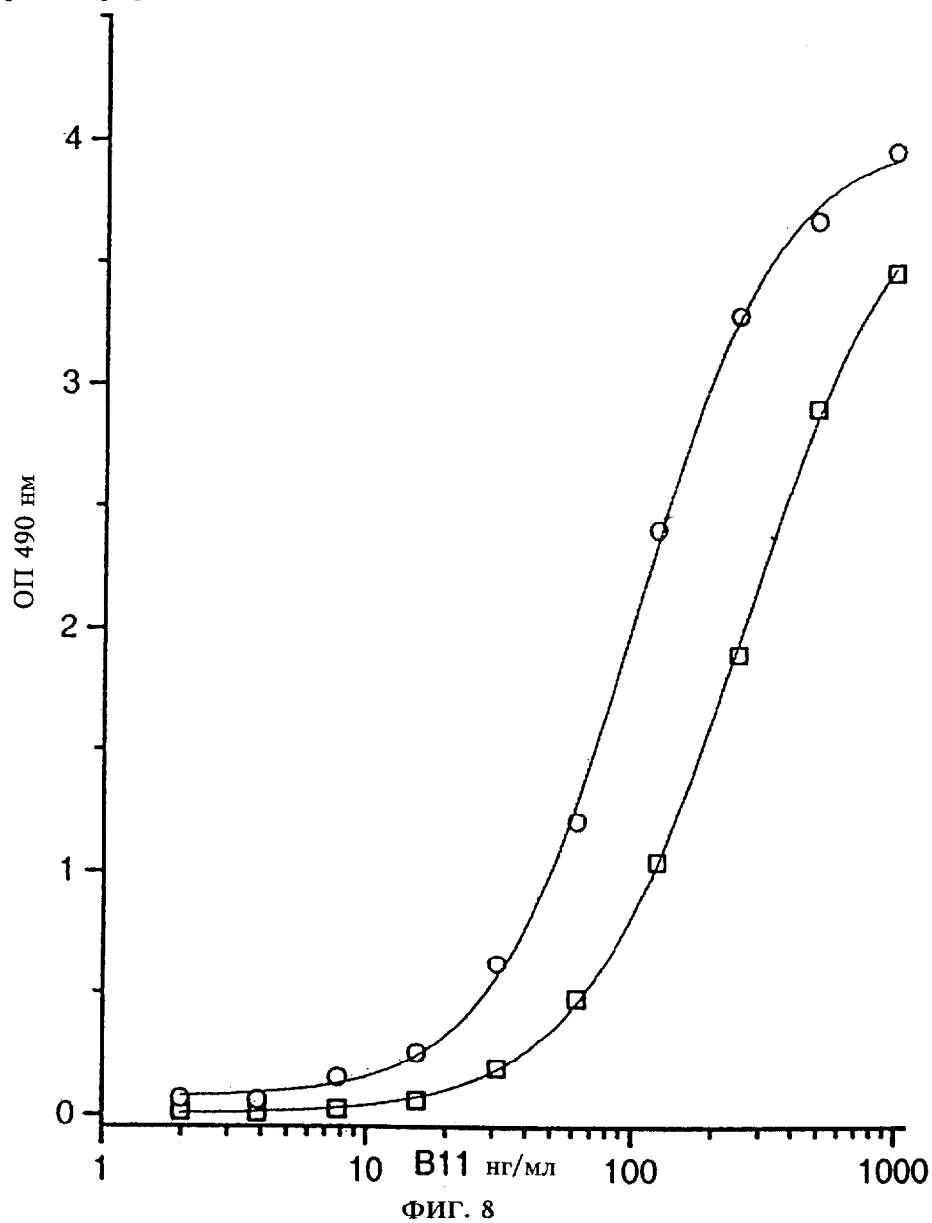
Конкурентное связывание rFab-фрагмента anti-id-BSW1
на поверхности примоированных IgE CHO α -клетках и
меченного с помощью ФИТЦ BSW17



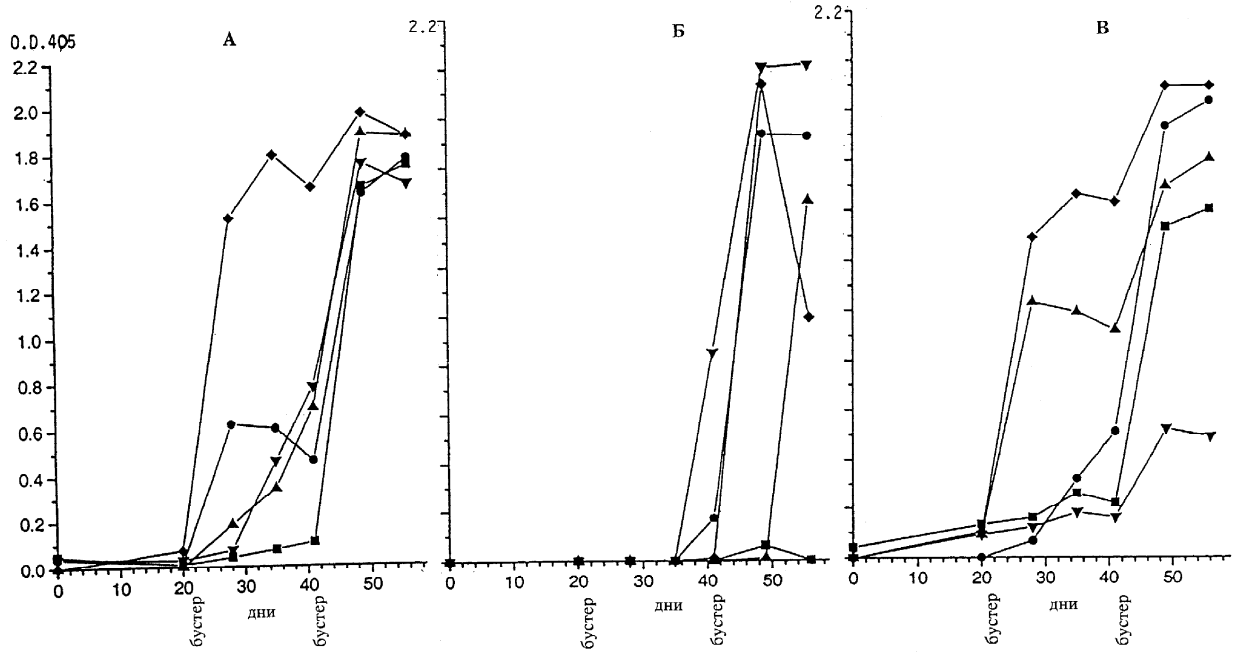
Молярный избыток Fab-фрагментов anti-id-BSW1

ФИГ. 7

Связывание с человеческим IgE очищенных с помощью аффинной хроматографии кроличьих иммуноглобулинов к BSW17-миместелу



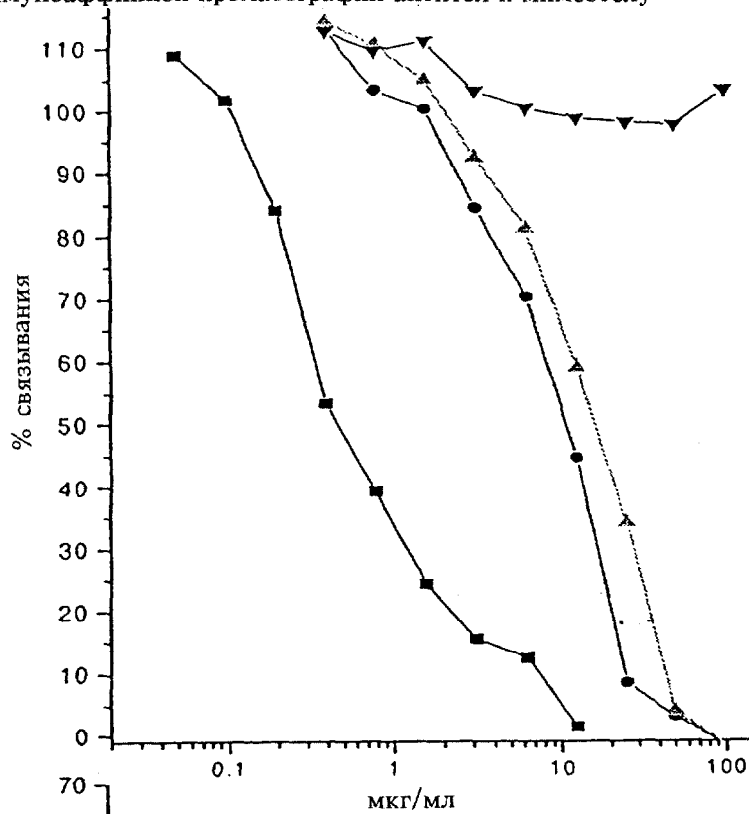
Иммунный ответ на антигено к BSW17-мимеотелу у мышей линии Balb/c:



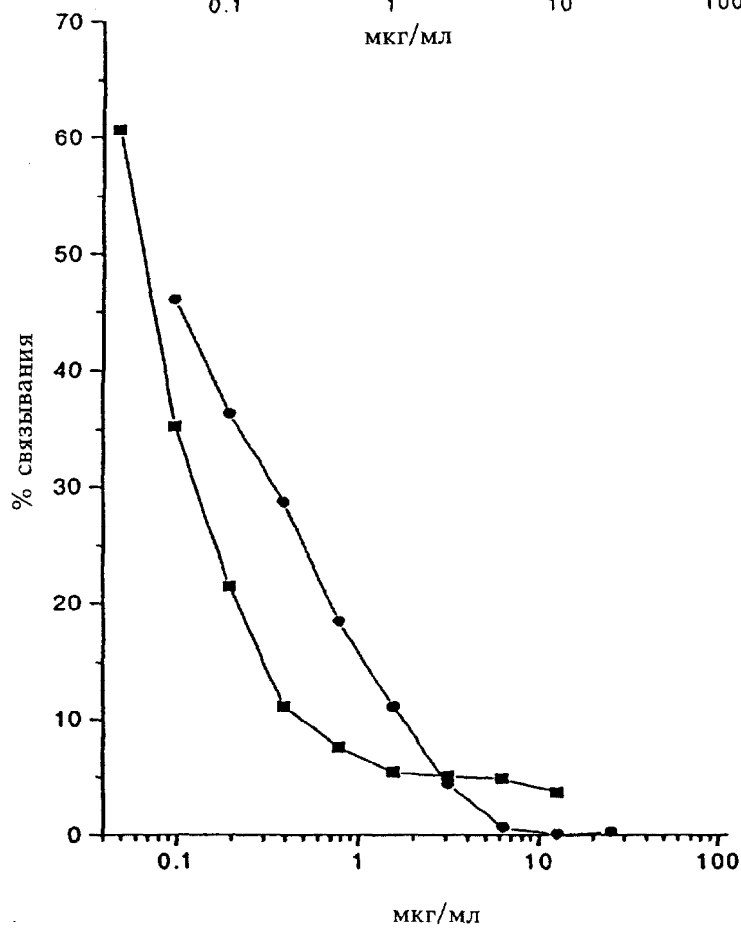
ФИГ. 9

Ингибирование связывания hIgE/FcεRIα с использованием очищенных с помощью иммуноаффинной хроматографии антител к мимеотелу

А



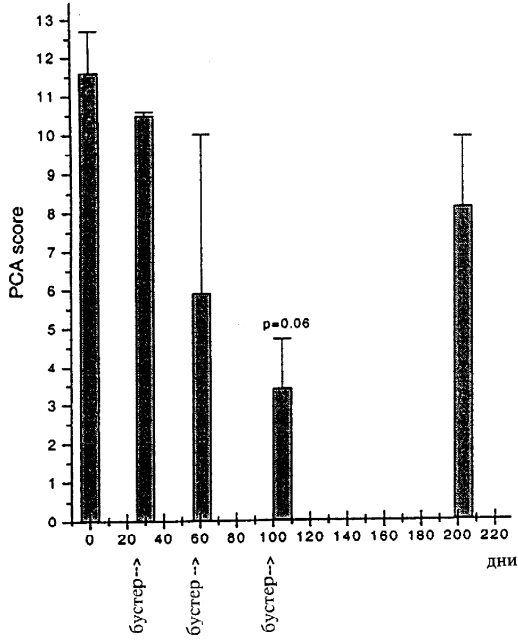
Б



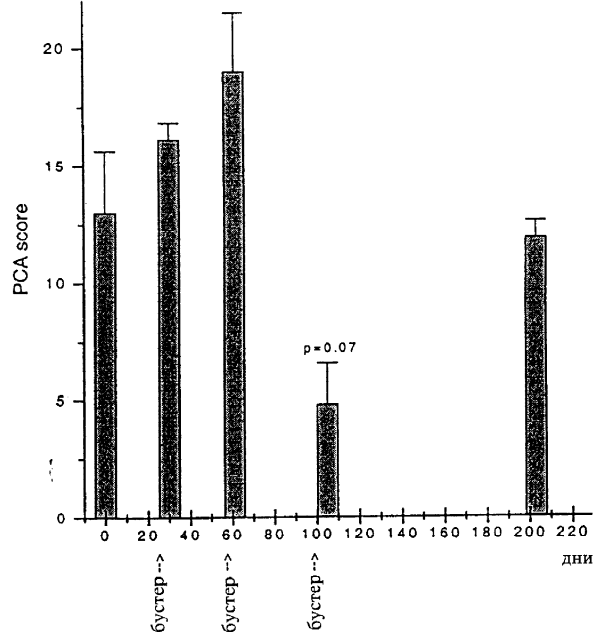
ФИГ. 10

Профили ПКА-баллов группы макак резус (n = 2), иммунизированных различными препаратами мимесетел

А: Иммуноген: anti-id-BSW17.52; легкая цепь (SDS426)

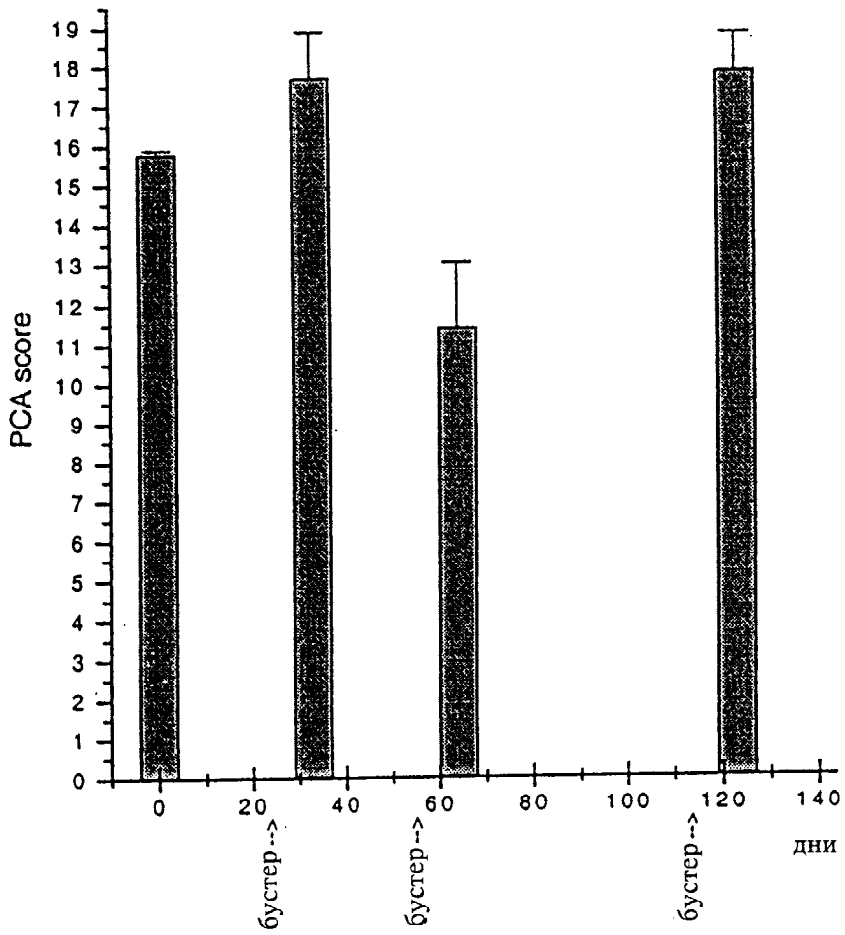


Б: Иммуноген: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427)



ФИГ. 11

В: Иммуноген: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463)



ФИГ. 11

RU 2 253 655 C2

Anti-id-BSW17, клон 52: переменная и первая
константная области тяжелой цепи

Q V K L L E S G G G L V K P G G S L R L S C A V S
 G F T F S N Y N M N W V R Q A P G K G L E W V S S
 I S S R N S Y I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A
 E S T L Y L Q M D N L G V E D T A V Y F C T S G R
 L F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P
 L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E
 P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V
 N H K P S N T K V D K K A E P K S C

ФИГ. 12а

Anti-id-BSW17, клон 52: переменная и константная
области легкой цепи каппа-типа

V M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q
 G I N N Y L A W F Q Q K P G K A P K S L I Y S A S
 I L Q S G V P S K F S G S G S G T D F T L T I S N
 L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N Y Y P L T F G G G T
 K V E I K T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
 T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
 L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S
 P V T K I F N R G E C

ФИГ. 12б

Anti-id-BSW17, клон 43: переменная и первая
константная области тяжелой цепи

Q V K L L E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S
 G G S I S S G G Y Y T W W I R Q R P G K G L E W I
 G Y I Y Y S G S T S Y N P S L K S R V T M S V D T
 S K N Q F S L R L T S V T A A D T A V Y Y C A R E
 R G E T G L Y Y P Y Y Y I D V W G T G T T V T V S
 S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A
 L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
 V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S
 S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K A E
 P K S C

ФИГ. 12в

Anti-id-BSW17, клон 43: переменная и константная
области легкой цепи лямбда-типа

E L V V T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T
R S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P G K A P K L M I
Y D V S N R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L
T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T L G
V F G G G T K L T V L G Q P Q P K A A P S V T L F
P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A
V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S
N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H K S Y S C
Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

ФИГ. 12г