

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-538238

(P2004-538238A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/00	C07K 7/00 ZNA	4C084
A61K 38/00	A61K 39/00 H	4C085
A61K 39/00	A61K 39/395 D	4H045
A61K 39/395	A61K 39/395 N	
A61K 45/00	A61K 45/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 189 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2000-601038 (P2000-601038)	(71) 出願人 397062700	
(86) (22) 出願日 平成12年2月22日 (2000.2.22)	グラクソスミスクライン バイオロジカル	
(85) 翻訳文提出日 平成13年8月27日 (2001.8.27)	ズ ソシエテ アノニム	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2000/001455	ベルギー国 リキセンザール ビー 13	
(87) 国際公開番号 W02000/050460	30 ルー デ ランスティテユート 8	
(87) 国際公開日 平成12年8月31日 (2000.8.31)	9	
(31) 優先権主張番号 9904405.9	(71) 出願人 501338277	
(32) 優先日 平成11年2月25日 (1999.2.25)	ペプチド セラピューティクス リミテ	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	ド	
(31) 優先権主張番号 9907151.6	イギリス国, ケンブリッジ シービー1	
(32) 優先日 平成11年3月29日 (1999.3.29)	9 ビーター, フルボーン ロード 10	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	0, ビーターハウス テクノロジー パー	
(31) 優先権主張番号 9910537.1	ク	
(32) 優先日 平成11年5月7日 (1999.5.7)	(74) 代理人 100077517	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	弁理士 石田 敬	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 I g E の C - イプシロン - 2 ドメインから由来のエピトープまたはミモトープ、そのアンタゴニストおよびその治療的使用

(57) 【要約】

本発明は、アレルギー性疾患の治療、予防または改善のための新規の薬剤の提供に関する。特に、新規薬剤は、I g E の C 2 ドメインの表面露呈領域のエピトープまたはミモトープを組み入れる単離ペプチドである。本発明は、これら新規の領域が受動的および能動的免疫予防法または免疫療法のための標的であり得ることを見出した。本発明はさらに、それらを含む薬剤、製剤組成物の製造方法、ならびに医療におけるそれらの使用に関する。さらに本発明の一局面を構成しているのは、本発明の表面露呈 I g E 領域を結合し得る配位子、特にモノクローナル抗体、ならびに受動的免疫療法または免疫予防法としての医療におけるそれらの使用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g E の C 2 ドメインの単離表面露呈エピトープを含むペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 2】

C 2 の表面露呈エピトープが P 1 (配列番号 1) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 3】

C 2 の表面露呈エピトープが P 2 (配列番号 2) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

10

【請求項 4】

C 2 の表面露呈エピトープが P 3 (配列番号 3) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 5】

C 2 の表面露呈エピトープが P 4 (配列番号 4) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 6】

C 2 の表面露呈エピトープが P 5 (配列番号 5) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 7】

C 2 の表面露呈エピトープが P 6 (配列番号 6) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

20

【請求項 8】

C 2 の表面露呈エピトープが P 7 (配列番号 7) である請求項 1 記載のペプチド、またはそのミモトープ。

【請求項 9】

ペプチドである請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のミモトープ。

【請求項 10】

単離エピトープが I g E の C 2 ドメインのループ構造から得られる請求項 1 記載のペプチド。

30

【請求項 11】

I g E の C 2 ドメインのループ構造が A - B または C - D ループである請求項 10 記載のペプチド。

【請求項 12】

P 1 のミモトープが一般式：

$$h \times d h h a n a n x y$$

(式中、h は疎水性アミノ酸残基であり、d はイオン結合供与アミノ酸残基であり、a は産生アミノ酸残基であり、n はイオンの中性 / 非極性アミノ酸残基であり、そして x はアミノ酸である)

のペプチドである請求項 2 記載のペプチド。

40

【請求項 13】

P 1 のミモトープが一般式：

$$Q, X_1, M, D, X_1, X_2, X_3$$

(式中、X₁ は、V、I、L、M、F または A から選択され、X₂ は、D または E から選択され、そして X₃ は、L、I、V、M、A または F から選択される)

のペプチドである請求項 2 記載のペプチド。

【請求項 14】

P 1 のミモトープが P 1 5 q (配列番号 1 1)、P T 1 0 7 9 (配列番号 1 3)、P T 1 0 7 9 G S (配列番号 1 5)、P T 1 0 7 8 (配列番号 1 6)、P T 1 5 (配列番号 8) から成る群から選択される請求項 2 記載のペプチド。

50

【請求項 15】

P 2 のミモトープが P 1 6 (配列番号 2 4) である請求項 3 記載のペプチド。

【請求項 16】

P 3 のミモトープが P 1 7 (配列番号 2 6) である請求項 4 記載のペプチド。

【請求項 17】

さらに担体分子を含む請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載のペプチドまたはミモトープを含むアレルギーの治療のための免疫原。

【請求項 18】

担体分子がプロテイン D または B 型肝炎コア抗原から選択される請求項 1 7 記載の免疫原。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 1 6 記載のペプチドまたはミモトープの化学的複合体であるか、または融合タンパク質として発現される請求項 1 7 または 1 8 記載の免疫原。

【請求項 20】

ペプチドまたはペプチドミモトープが担体の一次配列内に提示される請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれかに記載の免疫原。

【請求項 21】

アジュバントをさらに含む請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の免疫原を含むアレルギーの治療のためのワクチン。

【請求項 22】

I g E の C 2 ドメインの表面露呈エピトープを認識し得る配位子であって、 P T m A b 0 0 0 5 でないことを特徴とする配位子。

【請求項 23】

1 9 9 9 年 3 月 8 日の E C A C C でのブダペスト条約特許寄託下で寄託番号 9 9 0 3 0 8 0 5 で寄託された P T m A b 0 0 1 1 である請求項 2 2 記載の配位子。

【請求項 24】

I g E の C 2 ドメインの表面露呈エピトープを認識し得る配位子を含有する製剤組成物。

【請求項 25】

配位子が I g E の C 2 ドメインの C - D ループを認識し得る請求項 2 4 記載の製剤組成物。

【請求項 26】

配位子が P T m A b 0 0 0 5 または P T m A b 0 0 1 1 から選択されるモノクローナル抗体である請求項 2 5 記載の製剤組成物。

【請求項 27】

医療に用いるための請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 28】

医療に用いるための請求項 2 1 記載のワクチン。

【請求項 29】

医療に用いるための請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の免疫原。

【請求項 30】

アレルギーの治療または予防のための薬剤の製造における請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載のペプチドの使用。

【請求項 31】

医療に用いるための I g E の C 2 ドメインの表面露呈エピトープを認識し得る配位子。

【請求項 32】

アレルギーの治療のための薬剤の製造における I g E の C 2 ドメインの表面露呈エピトープを認識し得る配位子の使用。

【請求項 33】

P T m A b 0 0 0 5 または P T m A b 0 0 1 1 である請求項 3 1 または 3 2 記載の配位子

10

20

30

40

50

の使用。

【請求項 34】

P1 のミモトープの同定における PTmAb0005 または PTmAb0011 の使用。

【請求項 35】

PTmAb0005 または PTmAb0011 により認識され得るペプチド。

【請求項 36】

請求項 35 記載のペプチドを含む免疫原。

【請求項 37】

診断におけるまたは血液からの循環抗 IgE 抗体のアフィニティー精製における請求項 1 ~ 16 記載のペプチドの使用。

10

【請求項 38】

請求項 17 ~ 20 のいずれかに記載の免疫原の製造およびアジュバントとともに免疫原を処方することを包含するワクチンの製造方法。

【請求項 39】

アレルギーに罹患しているかまたはそれが疑われる患者の治療方法であって、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載のペプチドの患者への投与を包含する方法。

【請求項 40】

アレルギーに罹患しているかまたはそれが疑われる患者の治療方法であって、請求項 21 記載のワクチンの患者への投与を包含する方法。

【請求項 41】

アレルギーに罹患しているかまたはそれが疑われる患者の治療方法であって、請求項 24 ~ 26 のいずれかに記載の製剤組成物の患者への投与を包含する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、アレルギー疾患に対する新規な治療薬、予防薬、改善薬の提供に関する。特に、この新規な薬は、IgE の C₂ ドメインの表面露出領域のエピトープまたはミモトープを含む単離ペプチドである。発明者は、これらの新規な領域が、受動的および能動的な免疫防御または免疫療法の標的となっている可能性があることを見いだした。本発明はさらに、これらの領域を含む薬や薬理的組成物の製造方法と、その薬や薬理的組成物の医学への応用にも関する。また、本発明の表面露出 IgE 領域と結合することのできるリガンド、中でもモノクローナル抗体と、受動的免疫療法としての医療または免疫防御におけるそのリガンドの使用も、本発明の一側面を構成している。非ペプチド・ミモトープも、本発明の一実施態様である。

30

【0002】

アレルギー応答では、アレルギーに通常伴う症状は、ヒスタミンなどのアレルギー・メディエーターが免疫細胞から周囲の組織や血管構造に放出されることによってもたらされる。ヒスタミンは、通常はマスト細胞および好塩基球に貯えられていて、アレルゲン特異的 IgE と相互作用することによって放出される。喘息、食品アレルギー、アトピー性皮膚炎、タイプ I の過敏症、アレルギー性鼻炎などのアレルギー応答が起こる際に IgE が果たす役割はよく知られている。B 細胞は、花粉や塵アレルゲンなどの抗原と出会ると、アレルゲン特異的 IgE の合成を開始する。するとアレルゲン特異的 IgE は、好塩基球やマスト細胞の表面にある Fc_εRI 受容体（高アフィニティー IgE 受容体）と結合する。その後何らかのアレルゲンと出会ると、その周辺で IgE / Fc_εRI 複合体が架橋することにより、マスト細胞または好塩基球からヒスタミンの放出が開始される（サットンとグールド、Nature、第 366 巻、421 - 428 ページ、1993 年；EP 0 477 231 B1）。

40

【0003】

あらゆる免疫グロブリンと同様、IgE は、2 つの H 鎖と 2 つの L 鎖を含んでいる。H 鎖は、5 つのドメインからなる。すなわち、1 つの変域（VH）と、4 つの定常領域（C₁ ~ C₄）である。IgE の分子量は約 190,000 ドルトンであり、H 鎖は

50

長さが約550個のアミノ酸からなる。IgEの構造は、パドランとデイヴィス(Mol. Immunol.、第23巻、1063-1075ページ、1986年)、およびヘルム他(PDB(タンパク質データバンク、構造生物情報学のための共同研究所; <http://pdb-browsers.ebi.ac.uk>)に1990年10月2日に提出された2IgEモデル構造)が議論している。第2のドメインC₂は、IgEのアミノ酸番号226-328をほぼ含んでいる(フラナガン, J.G.とラビッツ, T.H., EMBO J., 第1巻、655-660ページ、1982年; ケンテン他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第79巻、6661-6665ページ、1982年)が、さらにアミノ酸を含んでいる可能性もある。IgG1の既知の構造と比較することにより、C₃ドメインの出発点がセリン337であることが推定された。

10

【0004】

IgEを媒介としたヒスタミン放出メカニズムを妨げるため、受動的または能動的な多数の免疫療法がこれまで研究されてきたが、その成果はさまざまである。これらの方法は、FcRI受容体またはFcRII受容体(低アフィニティIgE受容体)との結合の際に競合する抗体またはIgE由来のペプチドを受動的に投与することにより、IgEまたはアレルゲン/IgE複合体がこれら受容体と結合するのを妨げる操作を含んでいる。さらに、何人かの研究者は、能動的免疫法においてIgE由来の特異的ペプチドを用いることにより、ヒスタミンの放出を抑制するような免疫応答が促進されることを報告している。

【0005】

IgEが対応する受容体に結合する際に関与するIgEのドメインはC₃とC₄であることが報告されている(サットン, B.J.とグールド, H.J., Nature, 第366巻、421-428ページ、1993年; WO97/31948)。そのため、これまでの治療戦略はこれら2つのドメインを焦点としていた。

20

【0006】

この分野でこれまで研究を続けてきた研究者たちは、研究が進むにつれ、新規なアレルギー治療法を考案する際に考慮すべき多数の事柄および問題点にぶつかった。最も重大な問題点の1つは、ヒスタミン放出信号にIgEの架橋が関わっていることを巡って展開している。ほとんどの場合、能動的ワクチン接種の間に生成する抗IgE抗体は、アレルゲンなしで周辺のIgE-受容体複合体を架橋させるため、それ自体がヒスタミン放出の引き金となりうる。この現象は、アナフィラキシー誘発性と呼ばれている。実際、IgE検出アッセイで通常用いられている市販の多くの抗IgEモノクローナル抗体はアナフィラキシー誘発性を持っているため、患者に投与しても無駄であり、潜在的に危険でもある。

30

【0007】

抗体がアナフィラキシー誘発性を持っているかどうかは、IgE分子の表面の標的エピトープの位置によって決まる。しかし、この分野で現在わかっていることに基づくと、研究者が大いに興味を持って多大な努力をしているにもかかわらず、どの抗体またはエピトープであれ、その特性をほとんどまたはまったく予測できず、患者に対する臨床効果がプラスになるかマイナスになるかもほとんどまたはまったく予測できない。

【0008】

したがって、安全かつ効果的であるためには、受動的に投与される抗体、または接種によって誘導される抗体は、それ自体がアナフィラキシーを引き起こすことなく、ヒスタミンのトリガー経路を妨げることのできるIgEの領域に結合しなくてはならない。本発明はこれらの目的をすべて達成しており、本発明により、ヒスタミンの放出を抑制するアナフィラキシー非誘発性抗体を生成させることのできる薬が提供される。この薬は、能動的ワクチン接種の基礎となりうる。またこの薬は、受動的免疫療法のための適切な抗体を生成させるのに用いることもできる。この薬そのものを受動的に投与して治療効果を得ることもできる。

40

【0009】

IgEを媒介としたアレルギー応答に対して幾分かプラスの効果が実際にある特異的抗I

50

g E 抗体を同定するため、当業者によって多くの研究がなされてきた (W O 9 0 / 1 5 8 7 8、W O 8 9 / 0 4 8 3 4、W O 9 3 / 0 5 8 1 0)。有効なこれらの抗体によって認識されるエピトープを同定し、そのエピトープのペプチド・ミモトープを作り、それを免疫原として用いて抗 I g E 抗体を産生させるための多くの試みもなされてきた。

【 0 0 1 0 】

W O 9 7 / 3 1 9 4 8 には、このタイプの研究の一例が記載されている。この出願にはさらに、能動的ワクチン接種を目的としてキャリアー分子と共役した C 3 ドメインおよび C 4 ドメインからの I g E ペプチドも記載されている。これら免疫原は、ワクチン接種の研究において使用できる。また、これら免疫原は抗体を産生させることができ、続いてその抗体が生体内でヒスタミンの放出を抑制すると言われている。この出願には、C 3 ドメインに含まれていて、能動的ワクチン接種の目的に役立つ I g E ペプチドと結合できると言われているモノクローナル抗体 (B S W 1 7) が記載されている。

10

【 0 0 1 1 】

E P 0 4 7 7 2 3 1 B 1 には、能動的ワクチン接種による免疫防御で用いられるスカシガイのヘモシアニン (K L H) と共役した、I g E の C 4 ドメイン (残基 4 9 7 - 5 0 6、スタンワース・デカペプチドとしても知られる) 由来の免疫原が記載されている。W O 9 6 / 1 4 3 3 3 は、E P 0 4 7 7 2 3 1 B 1 に記載した研究の続編である。

【 0 0 1 2 】

他の方法は、好塩基球またはマスト細胞の表面の高アフィニティ受容体または低アフィニティ受容体と結合する I g E と競合するペプチドを同定することに基づいている (W O 9 3 / 0 4 1 7 3、W O 9 8 / 2 4 8 0 8、E P 0 3 0 3 6 2 5 B 1、E P 0 3 4 1 2 9 0)。

20

【 0 0 1 3 】

本発明では、I g E の C 2 ドメインの新規な表面露出エピトープを同定する。このエピトープは、能動的または受動的な免疫防御またはアレルギー疾患状態の治療の標的として用いることができる。本発明により、単離されたエピトープを含むペプチドが提供され、さらに、新たに同定されたこのエピトープのミモトープも提供される。このミモトープそのものは、アレルギーの治療に使用すること、または能動的ワクチン接種による免疫防御または治療の際の免疫原において使用することができる。単離された本発明のエピトープまたはミモトープは、能動的ワクチン接種プロトコルのための免疫原において、自己抗 I g E 抗体を誘導するのに用いることが好ましい。この自己抗 I g E 抗体そのものが、ワクチン接種を受けた患者の体内でアレルギー応答またはアレルギー症状を制限したり、低減させたり、消失させたりする。また、本発明のミモトープまたは免疫原は、患者に受動的に投与して、ワクチン接種を受けた患者の体内でアレルギー応答またはアレルギー症状を制限したり、低減させたり、消失させたりすることもできる。

30

【 0 0 1 4 】

単離された本発明のエピトープを含むペプチドは、(例えばキャリアー上に) 適切に提示されたときに免疫原性を持ち、アナフィラキシー非誘発性で生体内のアレルギー応答を改善する機能を持つ自己抗 I g E 抗体を誘導することができる。本発明のエピトープまたはミモトープは、C 2 ドメインにのみ由来し、他のどのドメインにも由来しないことが好ましい。すなわち本発明のエピトープまたはミモトープは、C 1 ドメイン、C 3 ドメイン、または C 4 ドメインには見いだされないことが好ましい。特に、好ましい一実施態様では、本発明のエピトープまたはミモトープは、ヒト I g E のセリン 2 2 2 ~ アラニン 3 2 9 によってコードされているドメインに由来する。

40

【 0 0 1 5 】

本発明のミモトープまたは免疫原で用いるのに特に適していることがわかっていた C 2 ドメインの特異的エピトープは、本発明の発明者によって表面に露出していることがわかったエピトープである。I g E のどの領域の表面が露出するかは、モデル構造からわかる (パドランとデイヴィス、M o l . I m m u n o l .、第 2 3 巻、1 0 6 3 - 1 0 7 5 ページ、1 9 8 6 年 ; ヘルム他、P D B (タンパク質データベース、構造生物情報学のた

50

めの共同研究所)に1990年10月2日に提出された2IgEモデル構造)。本発明の発明者は、本発明で有効なエピトープは、表面がよく露出していることも見いだした。発明者は、この観察結果から、他の適切なエピトープを提供する方法を考案した。このエピトープは、5残基移動ウインドウについての計算から非常にアクセスしやすいことがわかった領域を有するエピトープである。発明者は、分子シミュレーション・ソフトウェア(MSI)を用いて5残基移動ウインドウについて計算することにより、C2ドメインの好ましい領域が、50平方オングストロームよりも広い面積、好ましくは80平方オングストロームよりも広い面積を有するアクセス可能な表面を有することを見いだした。

【0016】

このように表面が露出したC2IgEエピトープの具体例は、以下の通りである：

10

【0017】

【表1】

ペプチド名	配列	位置配列及びIgEドメイン	配列番号
P1	EDGQVMDVD	Cε2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Cε2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	Cε2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Cε2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Cε2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Cε2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Cε2 (Phe231-Thr235)	7

20

【0018】

このようなエピトープを含むペプチドは、本発明の好ましい一側面を構成する。このエピトープと同じ特性を有するミモトープと、免疫応答を生じさせ、IgE分子内でIgEC2エピトープと交差反応するミモトープを含む免疫原も、本発明の一部である。

【0019】

したがって本発明には、天然のIgEエピトープそのものを含む単離されたペプチドと、その任意のミモトープとが含まれる。ミモトープとは、天然のIgEエピトープを認識する抗体が認識することのできるくらいに(ゲイセン, H.M. 他, 『抗原としての合成ペプチド』、ワイリー社、チチェスター、チバ財団シンポジウム119、130-149ページ、1986年;ゲイセン, H.M., Mol. Immunol., 第23巻、第7号、709-715ページ、1986年);あるいは、適切なキャリアーと結合させたときに、天然のIgEエピトープと交差反応する抗体を産生させることができるくらいに、天然のIgEエピトープと十分に似ているものと定義する。

30

【0020】

本発明のミモトープは、ペプチドからなるもの、または非ペプチドのものが可能である。上で同定した表面露出IgEエピトープのペプチド・ミモトープは、天然のエピトープとは配列が異なってもよいし、天然のエピトープと配列が正確に一致していてもよい。そのような分子はエピトープのミモトープとして記述する。というのも、2つの分子が同じ配列を有するとはいえ、ミモトープはC2ドメイン構造全体に提示されるわけではなく、そうであるからにはミモトープが天然のIgEエピトープとはわずかに異なった立体配置を取ることのできるからである。同定された上記の1次配列(P1~P7)が、IgEの3次構造において、IgEの1次配列では離れているかもしれない他の領域と隣接することも、当業者には明らかであろう。そのため、例えばP1のミモトープは、P1の区画と、互いに離れたこれらアミノ酸残基からなる区画を含んでいる、または似ているという点を考慮すると、連続でも不連続でもよい。

40

50

【0021】

本発明で利用することのできる好ましい表面露出領域は、ループ構造を伴う領域を含んでいる。したがって本発明のペプチドまたはミモトープは、N末端延長部またはC末端延長部を有するループを含むことができる。この末端延長部としては、隣接するシートからの天然のアミノ酸残基が可能である。その実例として、P1はIgEのC2ドメインのC-Dループを含んでおり、P2はD-Eループを含んでおり、P3はE-Fループを含んでおり、P4はF-Gループを含んでおり、P5はA-Bループを含んでおり、P6はB-Cループを含んでいる。したがって、これらループのミモトープは本発明の一側面を構成する。

【0022】

特に好ましい薬は、エピトープP1とそのミモトープに基づいている。このエピトープを含むペプチドとそのミモトープは、キャリアーと結合したときに、ヒト好塩基球からのヒスタミン放出を抑制することのできる抗IgE免疫応答を誘導する能力を有する。さらに、この免疫応答はアナフィラキシー非誘発性である。P1のミモトープは、主として、免疫原にしたときに免疫応答を引き起こしうる任意のものであると記述される。この免疫応答により、IgEのC2ドメインにおいてP1を認識することができる。

10

【0023】

P1は、C2ドメインのC-Dループに対応する。折り畳まれている免疫グロブリンのC-Dループ構造は、C鎖の終端とD鎖の始端を結合する鎖に対応している（『タンパク質の構造入門』、第2版、304ページ、ブランデンとトゥーズ、ガーランド出版、ニューヨーク、ISBN 0 8153 2305 - 0）。この結合鎖は、IgE分子のアミノ酸残基番号トリプトファン268～セリン280にほぼ対応している。したがって、IgEのC2ドメインのC-Dループのミモトープと、IgEのC2ドメインのC-Dループに結合することのできるリガンドは、本発明の好ましい一側面を構成する。

20

【0024】

上で同定したIgEのエピトープのペプチド・ミモトープに対し、選択したアミノ酸の付加、欠失、置換の操作を施すことにより、特定の目的に向けた設計にすることができる。したがって、本発明のペプチドを修飾して、タンパク質キャリアーに容易に共役するようにできる。例えば、化学的共役法の中には、IgEのエピトープに対する末端システインを含めることが望ましいものがある。さらに、キャリアー・タンパク質と共役したペプチドに、このペプチドの共役した末端から離れた疎水性末端を含め、このペプチドの共役していない自由な末端が、キャリアー・タンパク質の表面と会合したままにすることも望ましかろう。こうするとペプチドの立体配座の自由度が小さくなり、したがってこのペプチドが、IgE分子全体で見られるようなIgEペプチドの立体配座と非常によく似た立体配座として提示される確率が大きくなる。例えばペプチドを変化させて、N末端にはシステインを、C末端には疎水性アミド化された尾部を持つようにすることができる。また、1つまたはそれ以上のアミノ酸のD立体異性体を付加または置換することにより、例えばペプチドの安定性を増す有利な誘導体を作り出すことができる。当業者であれば、そのように修飾されたペプチドまたはミモトープは、構成要素であるアミノ酸残基が必ずしも天然の20種類のアミノ酸には限定されない、全体または一部が非ペプチドのミモトープが可能であることが理解できよう。さらに、このようなペプチドは、従来技術で知られている方法により環状化して、そのペプチドを、ペプチド配列がIgE分子全体の中にあるときの形と非常に似た立体配座にすることができる。

30

40

【0025】

ジスルフィド架橋の形成を可能にする2つのシステイン残基を含む好ましい環状化ペプチドの具体例としては、PT1079（配列ID番号14）、PT1079gs（配列ID番号15）、PT1078（配列ID番号16）、P15q（配列ID番号11）が挙げられる。

【0026】

さらに、当業者であれば、本発明のミモトープまたは免疫原は、単離されたエピトープよ

50

りも長くすることが可能であり、また、この明細書に開示した配列を含んでいてもよいことが理解できよう。したがって、本発明のミモトープは、N末端および/またはC末端の一端または両端に、他の多数の天然の残基からなる延長部を有することが可能である。ペプチド・ミモトープは、天然のIgE配列とは配列の方向が逆転しているレトロ配列にすることもできる。あるいは、ペプチド・ミモトープの配列の全部または少なくとも一部がD立体異性体のアミノ酸（反転配列）となっていることも可能である。また、ペプチド配列は、配列の方向が逆転してアミノ酸がD立体異性体の形態であるレトロ・反転も可能である。このようなレトロ・ペプチド、またはレトロ・反転ペプチドは非自己であり、免疫系における自己寛容の問題を解決することができる（例えばP15r。以下の説明を参照のこと）。

10

【0027】

また、ペプチド・ミモトープは、本発明のIgEエピトープに結合することのできる抗体を用い、ファージ提示技術などの方法を利用して同定することができる（EP0552267B1）。この方法により、天然ペプチドの構造と似ているために抗天然ペプチド抗体と結合できるが、天然のIgEペプチドとは必ずしも配列が有意なホモロジーではない多数のペプチド配列が生み出される。この方法は、免疫原性の諸特性が増強された（IgE受容体または抗IgE抗体へのアフィニティ結合特性がより大きいとか、IgEに結合するポリクローナル免疫応答をより大きなアフィニティで誘導することができるなどの）ペプチドを同定できるようにすることが可能であるとか、天然のペプチド配列を用いることに付随する可能性のある潜在的な自己抗原寛容のあらゆる問題を解決できるといった大きな利点を有する。さらに、この方法により、認識されたミモトープ配列に共通する化学的特性に関し、それぞれの天然ペプチドについて認識パターンを同定することができる。

20

【0028】

修飾されたペプチド・ミモトープの好ましい具体例と、ミモトープに由来するバクテリオファージの具体例としては、以下のものがある：

【0029】**【表2】**

ペプチド	配列	記載	配列番号
P15	CLEDGQVMDVDLL-NH ₂	P1 ミモト-7°	8
P15r	LLDVDMVQGDELC-NH ₂	P1 レトロ- ミモト-7°	9
P15p	WLEDGQVMDVDLC	P1 ミモト-7°	10
P15q	CLEDGQVMDVDLC	P1 ミモト-7°	11
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 ミモト-7°	12
C67	CFMNKQLADLELCPRE	P1 ミモト-7°	13
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGDK	P1 ミモト-7°	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 ミモト-7°	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 ミモト-7°	16
P15s	QVMDVDL	P1 ミモト-7°	17
EEC39-I	KCREVWLGESETIMDCE	P1 ミモト-7°	18
EEC39-J	ACREVWLGESETIMDCD	P1 ミモト-7°	19
EEC39-10	SCREVWLGESETVMDCG	P1 ミモト-7°	20
EEC40-9	NCQDLMLREDAGCWSKM	P1 ミモト-7°	21
EEC47-3	DCEEPMCSPVLLQQLKL	P1 ミモト-7°	22
P15t	LEDGQVMDVD	P1 ミモト-7°	23
P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 ミモト-7°	24
P2sh	TTQEGE	P2 ミモト-7°	25
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 ミモト-7°	26
P4ex	TYQGHTFEDSTKCKADSNPRGV	P4 ミモト-7°	27
P5sh	GGHFPP	P5 ミモト-7°	28
P5long1	CSSCDGGGHFPPTIQC	P5 ミモト-7°	192
P5long2	CLQSSCDGGGHFPPTIQLLC	P5 ミモト-7°	193

10

20

30

40

【0030】

他のミモト-7°においては、P1、P2、P3、P4、P5、P6、またはP7のアミノ酸残基は、それぞれ、非常によく似たアミノ酸で置換することができる。例えばAは、以下の表に示したようにV、L、またはIで置換することができる：

【0031】

【表3】

元の残基	例示的置換	好ましい置換
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

10

20

30

40

50

【0032】

表面が露出したC₂IgEエピトープに結合できるリガンドと、そのリガンドを含む薬理的組成物は、本発明の一部をなす。そのようなリガンドは、受動的な予防法または治療法で用いることができる。例えばアレルギー疾患を改善するために、そのリガンドを患者に投与する。このような有用なリガンドの具体例としては、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が挙げられる。例えば、アレルギーの予防または治療のため、ある動物の体内に誘導された抗体を精製して別の動物に受動的投与することができる。本発明のペプチドは、モノクローナル抗体ハイブリドーマ（例えばケーラーとミルステイン、Nature、第256巻、495ページ、1975年の技術を用いる）、ヒト化されたモノクローナル抗体、またはCDR移植されたモノクローナルを従来技術を用いて産生させるのにも用いることができる。したがって、本発明の関連する一側面として、IgEのC₂ドメインの表面露出エピトープと結合できるリガンドがある。このようなリガンドの具体例としては抗体（またはFab断片）が挙げられる。このような抗体は、受動的な免疫防御または免疫療法で使用したり、IgEペプチド・ミモトープの同定に用いたりすることができる。

【0033】

“抗体”という用語は、この明細書では、有効な抗原結合特異性を有する分子を指すのに用いる。当業者であれば、この用語には、同じ機能または非常によく似た機能を果たす抗体断片であるポリペプチドまたは抗体誘導體であるポリペプチドも含めうるということが容易に理解できよう。そこでこのような抗体断片または抗体誘導體は、この明細書で用いる抗体という用語に含めるつもりである。

【0034】

好ましいリガンドはモノクローナル抗体である。特に好ましいリガンドは、P1のリガンドであり、それはモノクローナル抗体であることが好ましい。例えばPTmAb0011は、ブダベスト条約に基づく特許寄託としてE C A C C（欧州細胞培養物コレクション、

ワクチン研究・製造研究所、公衆衛生研究部門、応用微生物学研究センター、ポートン・ダウン、ソールズベリー、ウィルトシャー、S P 4 O J G、イギリス)に1999年3月8日に登録番号99030805号として寄託されたマウスのIgG1タイプのモノクローナル抗体の参照名である。

【0035】

例えばPTmAb0011はC₂のC-Dループを認識する。PTmAb0011はまた、ヒト好塩基球の表面の高アフィニティ受容体と結合したとき、脱顆粒を起こすことなくIgEを認識することができる。PTmAb0011はさらに、IgEがFc_γR1に結合するのを妨げることにより非アレルギー性好塩基球の受動的感作を阻止し、アレルギー性好塩基球においてLo1P1によってトリガーされるヒスタミンの放出を抑制することができる。C₂のC-Dループを認識する別のモノクローナル抗体はPTmAb0005である(シグマ・ケミカルズ社からカタログ番号I6510、クローン番号GE-1として入手可能)。本発明により、このモノクローナル抗体が薬理的組成物中に含まれた形で提供される。

10

【0036】

P1のリガンドは、バクテリオファージ選別法において新しいP1ミモトープを同定するのに用いられている。例えばP1を認識することのできるモノクローナル抗体は、以下の配列を発現するバクテリオファージと結合する：

【0037】

【表4】

20

配列番号	配列															
29	C	F	I	N	K	Q	M	A	D	L	E	L	C			
30	C	F	M	N	K	Q	L	A	D	L	E	L	C			
31	K	C	R	E	V	W	L	G	E	S	E	T	I	M	D	C

【0038】

C₂ IgEのC-Dループの他のペプチド・ミモトープは、PTmAb0011とPTmAb0005を用いたバクテリオファージ選別法によって同定されている。そのようなミモトープの具体例としては以下のものが挙げられる：

30

【0039】

【表5】

ペプチド P1 ミモトープ (PTmAb0011 フェージ・パニング)	配列番号
HCQQVFFPQDYLWCQRG	SEQ ID No. 32
SCREVLGGSEMIMDCE	SEQ ID No. 33
ECNQNLGSLRHVDLNC	SEQ ID No. 34
DCEEPMCSPLVLLQKLP	SEQ ID No. 35
SCREVLGGSEMIMDCE	SEQ ID No. 36
RCDQQLPRDSYTFMMS	SEQ ID No. 37
SCPAFPREGDLCAPPTV	SEQ ID No. 38
FCPEPICSPPLSRMTLS	SEQ ID No. 39
VCDECVSRELAL	SEQ ID No. 40
WCLEPECAPGLL	SEQ ID No. 41
VCDECVSRELAL	SEQ ID No. 42
DCLSKGQADLCL	SEQ ID No. 43
SCQGREVRRECW	SEQ ID No. 44
WCREVLGSEITIMDCE	SEQ ID No. 45
ACREVLGSEITIMDCD -	SEQ ID No. 46
GCAEPKCWQALHQKLP -	SEQ ID No. 47
ペプチド P1 ミモトープ (PTmAb0005 フェージ・パニング)	配列番号
ECRGNMQMMDHCPTTD	SEQ ID No. 48
QCNVLEGLQMVHDHCWN	SEQ ID No. 49
CCVADPETQMTPSSEMF	SEQ ID No. 50
HCKNEFKKGQWTYSCSD	SEQ ID No. 51
QCRQFVMNQSEKEFGQC	SEQ ID No. 52
NCFMKNQLADLELCPRE	SEQ ID No. 53
SCAYTAQRQCSDVPNPG	SEQ ID No. 54
GCFMKNQMADLELCPRTAA	SEQ ID No. 55
ACFMKNQMADLELCPRVAA	SEQ ID No. 56
GCFINKQLADLELCPRVAA	SEQ ID No. 57
GCFMKNQLADWELCPRAAA	SEQ ID No. 58
ECFMKNQLADSELCPRVAA	SEQ ID No. 59
GCFMKNQLADPELCPREAE	SEQ ID No. 60
GCFMKNQLVDLELCPRGAA	SEQ ID No. 61
GCFMKNQLADLELCPREAA	SEQ ID No. 62
GCFMKNQQADLELCPRGAA	SEQ ID No. 63
GCFINKQMADLELCPREAA	SEQ ID No. 64

10

20

30

【0040】

したがって、PTmAb0005またはPTmAb0011と結合できるC 2 I g E
のミモトープと、このミモトープを含む免疫原は、本発明の重要な一側面を構成する。P
T m A b 0 0 0 5 または P T m A b 0 0 1 1 と 結 合 す る こ の の 可 能 な ミ モ ト ー プ を 含 む
ワクチンは、アレルギー治療に有効である。

40

【0041】

P1のミモトープについての幅広い定義を制限することなく、これらのフェージ配列およ
び他のフェージ配列から、P1様ペプチドの部分集合についてコアとなるパターンを同定
した。このパターンはP1のミモトープの部分集合であり、各位置のアミノ酸を、以下の
ような特定の抗P1モノクローナル抗体が認識するのに望ましい化学的性質という観点か
ら見たミモトープの記述になっている。

【0042】

y h x d h h a n a n x y

50

ここに、

y y は環状にすることができる。

【0043】

h は疎水性である（システイン、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、メチオニン、フェニルアラニン）。

【0044】

d はイオン結合を与える（アルギニン、リシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、トレオニン、セリン）。

【0045】

a は酸性である（アスパラギン酸、グルタミン酸）。

10

【0046】

n はイオンの中性 / 非極性である（アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニンを除くすべて）。

【0047】

x は任意のアミノ酸である（ $n = 0 \sim 3$ ）。

【0048】

したがって、一実施態様では、P1 のミモトープは、上記の一般的なコア構造 y h x d h h a n a n x y で記述することができる。ペプチド P1 またはそのミモトープは、いずれかの端部に他のアミノ酸が隣接して、共役を助けたり、他の任意の目的を果たしていたりしてもよい。

20

【0049】

P1 の特に好ましいミモトープは、P15s（配列 ID 番号 17）である。この配列の残基の中で Q と M と最初の D が、PTmAb0011 と PTmAb0005 の結合活性にとって極めて重要であることがわかっている（実施例を参照のこと）。したがって、P15s に対するミモトープの配列は、

Q、X₁、M、D、X₁、X₂、X₃

となる（本質的ではない残基は、（上に概説したように）似たようなアミノ酸で置換した）。ここに X₁ は V、I、L、M、F、A の中から選択し、X₂ は D または E であり、X₃ は L、I、V、M、A、F の中から選択する。

【0050】

PTmAb0005 と PTmAb0011 を使用して IgE の新規なミモトープを同定し、続いてそれをアレルギー治療に使用することも、本発明の重要な 1 つの側面を構成する。PTmAb0005 は市販されているため、本発明の組成物にはならない。しかし PTmAb0005 を含む薬理的組成物と、それを利用した P1 のミモトープの同定法は、本発明の 2 つの重要な側面を構成する。

30

【0051】

P2、P3、P4、P5 のミモトープも、本発明の重要な一側面を構成する。例えば P16 と P17 は、それぞれ P2 と P3 のミモトープである。これらのペプチドは、キャリア上に適切に提示されたときには、どちらもアナフィラキシー非誘発性である強力な抗 IgE 抗体反応を誘導することができる。

40

【0052】

好ましい一実施態様では、同定された上記エピトープを含むペプチド、あるいはペプチド性または非ペプチド性ミモトープを含む本発明のペプチドは、サイズが小さくて、C₂ドメイン全体から選択した領域と似ている。したがってペプチド性ミモトープは、アミノ酸の長さが 100 個未満、好ましくは 75 個未満、さらに好ましくは 50 個未満、最も好ましくは 4 ~ 25 個となっているはずであることが予想される。好ましいペプチド・ミモトープの具体例は PT1079 と P15q である。これらは、アミノ酸の長さがそれぞれ 21 個と 13 個である。非ペプチド・ミモトープは、モル体積に関しては対応するペプチド・ミモトープと似たようなサイズであることが予想される。

【0053】

50

当業者にとっては、特定の構造体の状態がミモトープであることを確認するのにさまざまな技術を利用できることは明らかであろう。そうした技術としては、以下のものがある。ミモトープと推定されるものを調べてその免疫原性を確かめることができるため、そのミモトープと推定されるものによって培養した抗血清は、天然のIgE分子と交差反応するとともに、アレルギー・エフェクター細胞からのアレルギー・メディエーターの放出を阻止する機能も有する。このような反応の特異性は、抗血清の活性を、ミモトープそのものまたは天然のIgE、および/またはIgEのC₂内の表面に露出したエピトープと結合することが知られている特異的モノクローナル抗体で阻害するという競合実験によって確かめることができる。競合アッセイで使用するこのようなモノクローナル抗体の具体例としては、例えば、PTmAb0005とPTmAb0011が挙げられる。これらを用いると、ミモトープと推定されるものがIgEのC₂ドメインのC-Dループのミモトープであるかどうかを確認することができよう。 10

【0054】

本発明の一実施態様では、IgEのエピトープまたはミモトープを含む上記の少なくとも1つのペプチドをキャリア分子と結合させ、ワクチン・プロトコルのための免疫原を作る。キャリア分子は天然のIgE分子とは関係がないことが好ましい。ペプチドまたはミモトープは、化学的共有結合によって、または遺伝子工学で作った融合パートナーを発現させることによって、あるいはまたリンカー配列によって、結合させることができる。

【0055】

免疫誘導性キャリアーとペプチドを共有結合させるには、従来技術において周知の方法を用いることができる。例えば、直接的共有結合のためには、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、または(N-[-マレイミドブチリルオキシ])スクシンイミドエステルを用いることが可能である。その際、一般に市販されているCDAPやSPDPなどのヘテロ二機能性リンカーを(製造者の指示に従って)利用する。結合反応の後、免疫原は、透析法、ゲル濾過法、分画法などによって容易に単離し、精製することができる。 20

【0056】

本発明の免疫原で使用するキャリアーのタイプは、当業者には容易にわかるであろう。キャリアーの機能は、IgEペプチドに対する免疫応答の誘導を促進するためにサイトカインの協力を提供することである。本発明で用いることのできるキャリアーのリストには、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)などの血清アルブミン、破傷風毒素(TT)やジフテリア毒素(DT)などの不活性化した細菌毒素またはこれらの組み換え断片(例えば、TTの断片Cのドメイン1、またはDTのトランスロケーション・ドメイン)、ツベルクリンの精製タンパク質誘導體(PPD)などが含まれるが、これだけに限定されるわけではない。また、ミモトープまたはエピトープは、リボソーム・キャリアーに直接共役させることもできる。なおこのキャリアーは、T細胞を助けることのできる免疫原をさらに含んでいてもよい。ペプチドとキャリアーの比は、約1:1~20:1であることが好ましく、各キャリアーは3~15個のペプチドを含んでいることが好ましい。 30

【0057】

本発明の一実施態様では、好ましいキャリアーは、ヘモフィルス・インフルエンザに由来するプロテインDである(EP 0 594 610 B1)。プロテインDは、ヘモフィルス・インフルエンザに由来するIgD結合タンパク質であり、フォースグレンがこれについて特許を取得している(WO 91/18926につき、EP 0 594 610 B1として特許取得)。場合によっては、例えば組み換え免疫原発現系において、プロテインDの断片、例えばプロテインDの1/3(プロテインDのN末端の100~110個のアミノ酸を含む(GB 9717953.5))を用いることが望ましかろう。 40

【0058】

本発明のIgEペプチドを提示する別の好ましい方法では、組み換え融合分子が関係する。例えばEP 0 421 635 Bは、キメラになったヘパドナウイルスのコア抗原粒子を用いてウイルス様粒子内で外来性ペプチド配列を提示する方法を記述している。そのよ 50

うなわけで、本発明の抗原は、B型肝炎コア抗原からなるキメラ粒子内に提示されるIgEペプチドを含むことができる。さらに、組み換え融合タンパク質は、本発明のミモトープと、インフルエンザ・ウイルスのNS1などのキャリアー・タンパク質を含むことができる。組み換えによって発現する本発明の任意のタンパク質をコードする核酸も、本発明の一側面を構成する。

【0059】

本発明で用いるペプチドは、従来技術で周知の固相法を用いて容易に合成することができる。適切な合成は、“T-boc”法または“F-moc”法を用いて行なうことができる。環状ペプチドは、周知の“F-moc”法とポリアミド樹脂を用いた固相法により、完全に自動化された装置内で合成することができる。また、当業者であれば、この方法を
10
手で実施するのに必要な実験手続きを知っているであろう。固相合成の技術と方法は、IRLによってオックスフォード大学出版から発行されたE. アサートンとR. C. シェパード著、『固相ペプチド合成：実践的方法』、1989年に記載されている。また、ペプチドは、ミモトープをコードしている核酸分子を細菌または哺乳類の細胞系列の中で発現させた後、その発現したミモトープを精製するという操作を含む組み換え法によっても
20
産生させることができる。ペプチドやタンパク質を組み換え発現させる技術は従来から知られており、マニアティス, T., フリッチ, E. F., サムブルック他、『分子クローニング、実験室マニュアル』、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年に記載されている。

【0060】

本発明の免疫原は、ミモトープなどの上記ペプチドを含むことができる。また本発明の免疫原としては、免疫学的交差活性誘導体、またはその断片が可能である。本発明の免疫原、ペプチド、ミモトープ、またはこれらの誘導体をコードする核酸の一部も本発明の一部を構成する。さらに、本発明の免疫原は、同じ免疫原内に、2種類以上のエピトープ、すなわちP1とP2を含むことができる。あるいはミモトープそのものが、2種類以上のエピトープを含むことができる。

【0061】

したがって本発明により、(上で説明したように)本発明のエピトープまたはミモトープを含む新規なペプチドを用いてアレルギーを予防または治療するための薬理的組成物の
30
製造方法が提供される。本発明のミモトープまたはペプチドを含む免疫原と、キャリアー分子も、アレルギーの免疫防御または治療のためのワクチンで使用するのに提供される。したがって、本発明のミモトープ、ペプチド、または免疫原は、医学と、アレルギー疾患の治療または予防において使用するのに提供される。従って、アレルギーを患っている患者またはアレルギーになりやすい患者に本発明のワクチンまたは薬を投与する操作を含むアレルギー治療法が提供される。

【0062】

本発明のワクチンは、アジュバントも含んでいることが好ましい。本発明のワクチンにとって適切なアジュバントは、IgEペプチド免疫原に対する抗体応答を増大させることのできるアジュバントである。アジュバントは従来技術でよく知られている(『ワクチンの
40
設計 - サブユニットとアジュバントのアプローチ』、1995年、薬理学のバイオテクノロジー、第6巻、パウエル, M. F. とニューマン, M. J. 編、プレナム・プレス、ニューヨークとロンドン、ISBN 0-306-44867-X)。本発明の免疫原とともに用いるのが好ましいアジュバントとしては、アルミニウム塩またはカルシウム塩(例えば水酸化物塩、リン酸塩)が挙げられる。他のアジュバントとしては、サポニン・アジュバントであるQS21(アメリカ合衆国特許第5,057,540号)と3D-MPL(イギリス国第2220211号)がある。

【0063】

本発明のワクチンは、一般に、開始用量と追加用量の投与がある。追加用量は、1回ごとの投与間隔を十分にあけるか、好ましくは、毎年投与するか、抗体の循環レベルが所望の
50

レベルよりも下がった時期に投与することを想定している。追加用量は、元のキャリアー分子が存在しないペプチドで構成されている可能性がある。このような追加投与物は、別のキャリアーを含んでいてもよいし、まったくキャリアーを含んでいなくてもよい。

【0064】

本発明のさらに別の側面では、医学で使用される本明細書記載のワクチンが提供される。

【0065】

本発明のワクチン調製物は、このワクチンを全身経路または粘膜経路を通じて投与することにより、アレルギーになりやすい哺乳類、またはアレルギーになっている哺乳類を保護または治療するのに用いることができる。投与方法としては、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射、皮下注射、または、経口/消化器、呼吸器、泌尿生殖器といった経路の粘膜への投与が可能である。好ましい投与経路は経皮経路であり、例えば皮膚パッチによる。

10

【0066】

1回のワクチン用量に含まれるタンパク質の量は、典型的なワクチンにおける重大なマイナスの副作用なしに免疫防御応答を誘導する量を選択する。そのような量は、どの特異的免疫原を用いるかと、どのようにその特異的免疫原を提示するかによって異なるであろう。一般に、1回の用量は、タンパク質を1~1000 μ g、好ましくは1~500 μ g、さらに好ましくは1~100 μ g、最も好ましくは1~50 μ g含むことになる。個々のワクチンの最適量は、被検対象内における適切な免疫応答を観察することを含め、標準的な研究によって確認する。被検対象は、最初のワクチンの後、1回ごとの投与間隔を十分にあげた1回~数回の追加免疫処置を受ける可能性がある。

20

【0067】

リガンドを含む上記の薬理的組成物も、本発明の一側面を構成する。本発明により、医学におけるリガンドの使用法と、アレルギーを治療するための薬の製造におけるリガンドの使用法も提供される。

【0068】

本発明のさまざまな側面は、診断でも利用することができる。例えば、本発明のさまざまなペプチドを認識する一群のリガンドは、患者から採取した血清中の抗IgEの力価を調べるのに用いることができる。さらに、ペプチドそのものは、循環する抗IgEをタイプ分けするのに用いることができる。ある種の状況では、例えばアトピー患者の体内を循環する抗IgEのレベルを調べることが適切であろう。すると、本発明のペプチドとポリクローナル/モノクローナル抗体を用いてアトピーの診断を行なうことができる。さらに、ペプチドを用いて、患者の血液から循環する抗IgEをアフィニティ除去した後、その血液を再びその患者に注入することができる。

30

【0069】

免疫防御またはアレルギーの治療のため、IgEの構造についてのコンピュータ・モデルを用いてIgEの表面露出ペプチドを同定する操作を含むペプチド免疫原同定法も本発明の一部を構成する。次にこれら領域を免疫原にして、医学で利用する。したがって、アレルギーの免疫防御と治療で用いるペプチドを同定する際にPTmAb0005とPTmAb0011を使用することは、本発明の一部を構成する。

【0070】

ワクチン調製物は、全体像が、ヴォラー他編、『ワクチンの新しい潮流と展開』、ユニヴァーシティ・パーク・プレス、バルチモア、メリーランド州、アメリカ合衆国、1978年に記載されている。巨大分子に対するタンパク質の共役は、リカイトのアメリカ合衆国特許第4,372,945号と、アーモア他のアメリカ合衆国特許第4,474,757号に開示されている。

40

【0071】

IgEのアミノ酸残基のナンバリング・システムは、ドリントン, K. J. とベンニッチ, H.、Immuno1. Rev.、第41巻、3-25ページ、1978年;ベンニッチ, H. とパー-リンダストローム, H. フォン、Prog. Immunol.、第11巻、49-58ページ、1978年に記載されているシステムであることがしば

50

しばある。しかし、その後ヒト I g E の遺伝子および c D N A 配列が決定された (マックス, E . E . 他, C e l l , 第 2 9 巻、6 9 1 - 6 9 9 ページ、1 9 8 2 年 ; フラナガン, J . G . とラビッツ, T . H . , 前掲文献、1 9 8 2 年 ; ケンテン, J . H . 他、前掲文献、1 9 8 2 年) ことにより、余分なロイシンが C 2 内の 2 7 3 番目の位置 (カバート・ナンバリング) にあることが明らかになった。このことは初期の文献には報告されていない。本発明で利用するナンバリング・システムは、したがって、ドリントン, K . J . とベンニッチ, H . によるものとは異なる可能性がある。

【 0 0 7 2 】

本発明を以下の実施例に基づいて説明するが、本発明がこれら実施例に限定されることはない。

10

【 0 0 7 3 】

第 1 部 本発明のミモトープと免疫原

実施例 1 .

1 . 1 表面が露出したエピトープの同定、化学的共役、血清学的方法

I g E の C 2 ドメインの表面露出エピトープを、パドランとデイヴィス (M o l . I m m u n o l . , 第 2 3 巻、1 0 6 3 - 1 0 7 5 ページ、1 9 8 6 年) が記述しているヒト I g E のモデル構造を用いて同定した。連続的なペプチドと溶媒にさらしたペプチドの両方を同定した。これは、分子シミュレーション・ソフトウェア (M S I) を用いて I g E の各アミノ酸の近づくやすさを計算し、近づくことが可能な表面を 5 残基移動ウインドウで平均し、その 5 マーの平均値が 8 0 平方オングストロームよりも大きい I g E ペプチドの領域を同定することによって実現した。テスト結果を図 1 に示す。

20

【 0 0 7 4 】

結果

図 1 から、また 1 9 9 0 年のヘルムらのモデル (P D B (タンパク質データバンク、構造生物情報学のための共同研究所) に 1 9 9 0 年 1 0 月 2 日に提出された 2 I g E モデル構造) を利用して同じ方法を繰り返した結果から、I g E に対する抗体を作るための免疫原として使用できる多数の天然ペプチドが存在していることがわかる。

【 0 0 7 5 】

【表 6】

30

表 1, 露出天然表面、及び連続 I g E ペプチド

ペプチド名	配列	位置配列、及び I g E ドメイン	配列番号
P1	EDGQVMDVD	Cε2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Cε2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	Cε2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Cε2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Cε2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Cε2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Cε2 (Phe231-Thr235)	7

40

【 0 0 7 6 】

これらペプチド、またはそのミモトープを合成し、それをキャリアーと共役させるか、あるいはそれを肝炎コア抗体構造体にして、ウイルス様粒子を発現する組み換えペプチドを

50

作る。

【0077】

1.2 スクシンイミド - マレイミド交差リンカーを用いた I g E ペプチド / プロテイン D 複合体の合成

スクシンイミド - マレイミド交差リンカーを用いてプロテイン D を I g E ペプチドに直接共役させることにより、本発明の抗原を作ることができる。この化学反応を利用すると、スクシンイミド基の固定を通じてキャリアー残基の NH_2 活性化を制御することが可能になる。マレイミド基はシステイン結合部位である。したがって、以下の実施例の目的を達成するためには、共役するはずの I g E ペプチドの N 末端にシステインを付加する必要がある。

10

【0078】

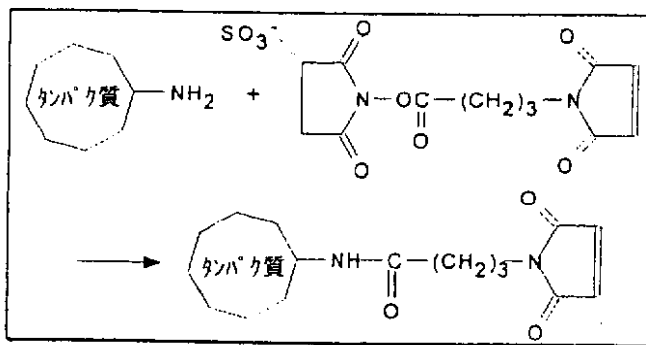
結合剤は選択的ヘテロ二機能性交差リンカーであり、その一端は、スクシンイミジルエステルによってタンパク質キャリアーのアミノ基を活性化し、他端は、マレイミド基によってペプチドのスルフヒドリル基を結合させる。反応経路は以下の通りである。

【0079】

a. リシンとスクシンイミジルエステルの反応によるタンパク質の活性化

【0080】

【化1】



20

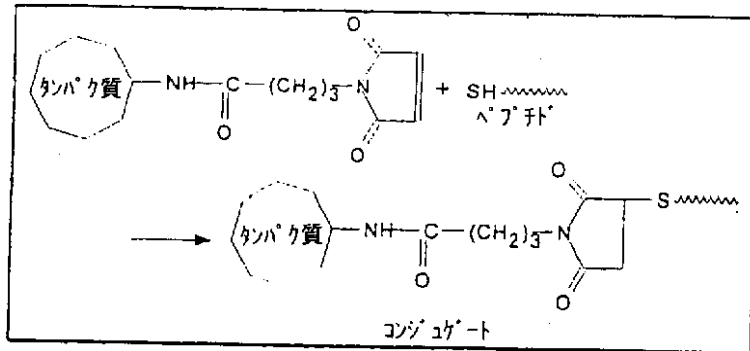
【0081】

b. マレイミド基との反応による、活性化したタンパク質とペプチド中のシステインの結合

【0082】

【化2】

30



10

【0083】

1.3 IgEペプチド-プロテインD複合体の調製

プロテインDを、pHが7.2で濃度が2.5 mg/mlのリン酸緩衝溶液(PBS)に溶解させる。結合剤(N-[マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル-GMBS)をDMSOの中に102.5 mg/mlの割合で溶かし、タンパク質溶液に添加する。割合としては、1 mgのプロテインDにつき、GMBSを1.025 mg用いる。反応溶液を室温で1時間培養する。副産物を脱塩ステップで除去し、セファクリル200HR透過ゲルの上に載せる。使用する溶離液は、pHが6.8の0.1%リン酸緩衝溶液-トゥイーン80(商標)である。活性化したタンパク質を回収し、貯蔵する。ペプチド(表1に記載のもの、あるいはその誘導體またはミモトープ)を4 mg/mlの割合で0.1 Mの酢酸に溶かし、ジスルフィド結合が形成されないようにする。活性化した1分子のプロテインDにつき2~20個のペプチドというモル比にして結合を行なわせる。ペプチド溶液をゆっくりとタンパク質に添加し、得られる混合物を25℃で1時間培養する。結合中はpHを6.6に維持する。25℃でpHを6.5にしてシステインを30分間添加する(1 mgの活性化したプロテインDにつき0.1 mgのシステインを、0.1 Mの酢酸に4 mg/mlとなるように溶かす)ことにより停止ステップを実施する。150 mMのNaCl+0.1%のトゥイーン80に対して2回透析を行ない、過剰なシステインまたはペプチドを除去する。

20

30

【0084】

最終ステップは、0.22 μmの膜を使った滅菌濾過である。最終生成物は透明な濾過性溶液であり、それを4℃で保存する。ペプチド/プロテインDの最終的な比は、アミノ酸分析によって測定する。

【0085】

同様の方法で、本発明のペプチドを、BSAを含むキャリアーと共役させることができる。

【0086】

P1のミモトープが合成されてCLEDGQVMDVDLL(P15、配列ID番号8)が得られた。これを、上記の方法を利用してプロテインDとBSAの両方に共役させた。

40

【0087】

1.4 ELISA法

抗ペプチドELISAまたは抗ペプチド・キャリアーELISA

抗ペプチド免疫応答および抗キャリアー免疫応答を、以下に概略を示すELISA法で調べた。マイクロタイター・プレート(ナック社)を、2 μg/mlのストレプトアビジンを含むPBS(4℃、一晚)中にて特異的抗原でコーティングし(続いてビオチン化したペプチド(1 μM)で37℃にて1時間培養した。3×PBS-0.1%のトゥイーン20で洗浄する。37℃で1時間にわたり、PBS-1%のBSA-0.1%のトゥイーン

50

ン20 (飽和緩衝溶液)でプレートを飽和させる。添加その1として、抗体 = (飽和緩衝溶液中に) 2ステップで希釈した血清を添加し、37 で1時間30分培養する。3 × P B S - 0.1%のトゥーン20で洗浄する。添加その2として、HRPと結合した抗マウスIg (または抗マウス・アイソタイプ特異的モノクローナル抗体)を添加する。37 で1時間培養する。5 × P B S - 0.1%のトゥーン20で洗浄する。暗所で室温にて10分間TMB (バイオラド社)を用いることにより、見えなかったものを見るようにする。0.4NのH₂SO₄を用いて反応を止める。

【0088】

マウス血清における抗ヒトIgEの反応性の検出方法 (IgEプレート結合ELISA) pHが9.6のカルボン酸塩/ジカルボン酸塩コーティング用緩衝溶液の中で、37 で1時間、または4 で一晩かけて、ELISAプレートを、1 μg/mlのヒトのキメラIgEでコーティングする。5% w/vのマーヴェル粉ミルクを含むPBS/0.05%のトゥーン20を用い、37 で1時間かけて非特異的結合部位をブロックする。PBS/0.05%のトゥーン20/1% w/vのBSA/4%のウシ胎仔血清の中でさまざまな濃度に順次希釈したマウス血清を37 で1時間にわたって添加する。ポリクローナル血清の結合をヤギ抗マウスIgG - ビオチン (1/2000)で検出し、次いでストレプトアビジン - HRP (1/1000)で検出する。共役した抗体を、TMB基質を用いて450nmで検出する。PTmAb0011の標準曲線をそれぞれのプレートに含めておき、血清サンプル中の抗IgEの活性をμg/mlの単位で計算できるようにする。

10

【0089】

マウス血清中で抗ヒト受容体と結合したIgEの活性の検出方法 pHが9.6のカルボン酸塩/ジカルボン酸塩コーティング緩衝溶液の中で、37 で1時間、または4 で一晩かけて、ELISAプレートを、0.5 μg/mlの組み換えヒトFc R1 でコーティングする。5% w/vのマーヴェル粉ミルクを含むPBS/0.05%のトゥーン20を用い、37 で1時間かけて非特異的結合部位をブロックする。次に、1 μg/mlのヒトIgEを37 で1時間にわたって添加する。次に、PBS/0.05%のトゥーン20/1% w/vのBSA/4%のウシ胎仔血清の中でさまざまな濃度に順次希釈したマウス血清を37 で1時間にわたって添加する。ポリクローナル血清の結合をヤギ抗マウスIgG - ビオチン (1/2000)で検出し、次いでストレプトアビジン - HRP (1/1000)で検出する。共役した抗体を、TMB基質を用いて450nmで検出する。PTmAb0011の標準曲線をそれぞれのプレートに含めておき、血清サンプル中の抗IgEの活性をμg/mlの単位で計算できるようにする。

20

30

【0090】

ミモトープ・ペプチド、可溶性IgE、またはPTmAb0011がIgEと結合する際の競合

あらかじめブロックしたポリスチレン製96ウェル・プレートの中で、マウスのポリクローナル血清の1種類の希釈液を、1種類の濃度のミモトープ・ペプチド、またはヒトIgEと混合する。この混合物を37 で1時間培養し、次に、IgEでコーティングされたELISAプレートに37 で1時間かけて添加する。ポリクローナル血清の結合をヤギ抗マウスIgG - ビオチン (1/2000)で検出し、次いでストレプトアビジン - HRP (1/1000)で検出する。共役した抗体を、TMB基質を用いて450nmで検出する。血清とPTmAb0011がIgEとの結合において競合するようにするため、血清とPTmAb0011 - ビオチンの混合物を、IgEでコーティングされたELISAプレートに添加する。PTmAb0011の結合を、ストレプトアビジン - HRP (1/1000)で検出する。

40

【0091】

1.5 ヒト好塩基球アッセイ

ヒト好塩基球 (HBA)を用いて2種類のアッセイを行なった。1つは、モノクローナル抗体のアナフィラキシー誘発性を調べるためであり、単離したPBMCに抗体を添加する操作を行なう。もう1つは、あらかじめHBAを培養し、Lo1PI (強力なアレルゲン

50

）によって引き起こされるヒスタミン放出をモノクローナル抗体が抑制することを測定するためである。

【0092】

アレルギーのドナーから静脈穿刺によって血液を回収し、0.1容積の2.7% EDTA (pH 7.0) を収容したチューブに入れる。次にこの血液を、0.1% ヒト血清アルブミン (HBH / HSA) を含む等容積の HBH 溶媒を用いて 1/2 に希釈する。得られる細胞分散液を、50 容積% フィコール - パックの上に層をなすようにして載せ、400 g で室温にて 30 分間遠心分離する。境界面の末梢血単核細胞 (PBMC) 層を回収し、ペレットを廃棄する。細胞を HBH / HSA の中で 1 回洗浄し、数を数え、細胞密度が 1 ml につき 2.0×10^6 個となるようにして HBH / HSA の中に再び分散させる。この細胞分散液 100 μ l を、希釈した試験サンプルまたはモノクローナル抗体を 100 μ l 含む V 底の 96 ウェル・プレートに添加する。それぞれの試験サンプルをさまざまな希釈度でテストするが、テストは、各希釈度について 6 つのウェルで行なう。ウェルの内容物をプレート攪拌装置を用いて軽く混合してから、120 rpm の攪拌速度で 37 °C にて 30 分間培養する。

10

【0093】

各血清希釈物につき、3 つのウェルには L o l P I 抽出物を 10 μ l 添加し (最終希釈度 1 / 10000) でトリガーとし、3 つのウェルにはアナフィラキシー誘発性を調べるために HBH / HSA を 10 μ l 添加する。ウェルの内容物を再びプレート攪拌装置を用いて混合してから、120 rpm の攪拌速度で 37 °C にてさらに 30 分間培養する。培養を終えてから、500 g で 5 分間遠心分離する。上澄みを除去し、市販されているヒスタミン EIA 測定キット (イムノテック社) を用いてヒスタミン・アッセイを行なう。試験サンプルを含まない対照のウェルをルーチン作業に含め、自発的放出とトリガーによる放出を調べる。細胞と 0.05 % のイゲパル洗浄剤を含むウェルもルーチン作業に含め、細胞の全ヒスタミンを調べる。

20

【0094】

結果は以下のように表記する。

【0095】

アナフィラキシー誘発アッセイ

試験サンプルに起因するヒスタミン放出 = (試験サンプルで処理した細胞から放出されたヒスタミンの%) - (自発的なヒスタミン放出の%)。

30

【0096】

遮断アッセイ

ヒスタミン放出の抑制度は、以下の式を用いて計算することができる：

抑制% = [1 - (試験サンプルで処理した細胞から放出されたヒスタミン*) / (抗原で刺激した細胞から放出されたヒスタミン*)] × 100]。

* 自発的放出が補正された数値。

【0097】

実施例 2 . P 15 複合体 (P 15 - B S A または P 15 - P D) を用いてマウスを免疫処置することによって抗ヒト I g E 抗体の産生が誘導される

40

1 . 4 に記載したミモトープ P 15 (25 μ g タンパク質 / 用量) を含む複合体を、W O 9 5 / 1 7 2 1 0 に記載されている Q S 2 1 と 3 D - M P L を含む水中油乳剤をアジュバントとして、10 匹の B a l b C マウスからなる複数のグループに投与した。追加投与は、21 日目と 42 日目に行ない、血清は 42 日目と 56 日目に回収することができる。抗ペプチドと抗プレートが結合した I g E に対する免疫応答は、実施例 1 に記載した方法で調べた。

【0098】

結果

3 回目のワクチン接種から 14 日目に測定した抗ペプチド応答と抗 I g E 応答の結果を表 2 に示す。

50

【 0 0 9 9 】

【 表 7 】

表 2, P15 免疫原性結果

ミトゲ・ コンジュガート	抗ペプチド応答 (中点・力価)			抗-IgE 応答 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ (PTmAb0011))		
	平均	標準偏差	幾何平均	平均	標準偏差	幾何平均
P15-PD (n=16)	41391	26858	36154	1.6	4.5	0.3
P15-BSA (n=10)	49591	9259	48719	2.2	2.5	1.0

10

【 0 1 0 0 】

実施例 3 . 複合体で免疫処置した後にマウスに誘導される抗 I g E はアナフィラキシー非誘発性である

20

複合体で免疫処置したマウスからの完全血清またはそのマウスから精製した I g G についての何種類かの希釈液は、アレルギー患者から採取したばかりの末梢血に由来する好塩基球の存在下でテストすることができる。

【 0 1 0 1 】

アナフィラキシー誘発性は、以下に説明するように、テストする抗体によって放出が誘導されたヒスタミンを測定することによって評価できる。

【 0 1 0 2 】

・赤血球をグルコース・デキストラン勾配の上で末梢血から除去する。

【 0 1 0 3 】

・細胞を洗浄し、テストするサンプル（例えばアレルギー、抗体、アレルギー + 抗体など）でコーティングする。

30

【 0 1 0 4 】

・培養の後、上澄みを回収し、ヒスタミンの放出を製造者の指示に従って測定する（イムノテック社、ヒスタミン酵素イムノアッセイ・キット）。

【 0 1 0 5 】

P 1 5 - B S A または P 1 5 - P D とともに生成したどの抗血清もアナフィラキシー誘発性ではなかった。

【 0 1 0 6 】

実施例 4 . 複合体で免疫処置した後にマウスに誘導される抗 I g E は、アレルギー患者からの好塩基球に働きかけることで誘導される、I g E を媒介としたヒスタミン放出を阻止することができる

40

ヒスタミンの放出は、複合体で免疫処置したマウスからの完全血清またはそのマウスから精製した I g G についての何種類かの希釈液の存在下または不在下で、何種類かの濃度のアレルギーを用いてトリガーした好塩基球サンプルにおいて測定することができる。抗血清中の抗 P 1 5 抗体の阻止活性は、アレルギーによって誘導されたヒスタミン放出の抑制を測定することによって評価した。ヒスタミンの放出と抑制は、実施例 3 に記載したようにして測定した。P 1 5 は P 1 のミトープであるため、P T m A b 0 0 1 1 を対照として用いた。というのも、P T m A b 0 0 1 1 は同じエピトープ（P 1）に結合しているからである。結果を表 3 に示す。

【 0 1 0 7 】

50

【表 8】

表 3, アレルギー性ヒト好塩基球からのヒスタミン放出阻害

抗血清	希釈	ヒスタミン放出の阻害%
P15-PD (マウス 4.12)	1/30	79
P15-PD (マウス 4.5)	1/30	57
P15-BSA (マウス 7.3)	1/30	67
P15-BSA (マウス 7.5)	1/30	57
PTmAb0011	0.1 μ g/ml	56
PTmAb0011	1 μ g/ml	90
抗-BSA 血清	1/30	40
抗-PD 血清	1/30	40

10

20

【0108】

実施例 5 . P 2 と P 3 のミモトープの免疫原性

実施例 1 . 2 に記載した方法を用いて以下のミモトープを B S A と共役させ、実施例 2 に記載したのと同じ処方およびスケジュールに従って、その複合体を用いてマウスを免疫処置した。

【0109】

【表 9】

P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 ミモトーフ°	配列番号 24
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 ミモトーフ°	配列番号 26

30

【0110】

最後に免疫処置した後にマウスから採血し、I g E プレートが結合した E L I S A の中の抗 I g E 活性をテストした。個々の結果、結果の平均 (A v)、幾何平均 (G M) を以下の表にまとめてある (S D = 標準偏差)。

【0111】

【表 10】

40

表4, P16とP17の免疫原性結果

抗ペプチド免疫応答/マウス（単3回接種後14日目）、中点力価													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	標準偏差	幾何平均
P16	1891	649	1299	2349	591	1474	4605	918	4177	865	1882	1436	1478
P17	100	4349	2850	3434	6133	2231	5085	2991	13070	8874	5446	3515	4656

10

20

【0112】

実施例6. P1のミモトープの製造と、その免疫原性/機能活性

6.1 免疫原の製造

P1のミモトープは、ファージ提示法、またはIgEのC2ドメインのC-Dループの分子モデリングによる合理的設計のいずれかによって得られたものであった。以下のペプチドを合成し、BSA-ペプチド複合体とHepBコア-抗原組み換え構造体の両方を作った。

【0113】

【表11】

ペプチド名	配列	配列番号	
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1ミモトープ	12
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	P1ミモトープ	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGSSGGP	P1ミモトープ	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1ミモトープ	16

30

40

【0114】

ペプチド/タンパク質キャリアー構造体を以下のようにして製造した。アシルヒドラジン・ペプチド誘導体を化学合成経路1(図2)に示したようにして固相上で調製した。このペプチド誘導体は、ポリアミドまたはポリエチレングリコール-ポリスチレン(PEG-PS)の支持体を用いる周知の“Fmoc”法を利用し、完全に自動化された装置内で従来技術で周知の技術により、容易に調製することができる(固相合成のための技術と方法は、IRLによってオックスフォード大学出版から発行されたE. アサートンとR.C. シェパード著、『固相ペプチド合成:実践的方法』、1989年に記載されている)。酸を媒介とした開裂により、直線状で、保護されておらず、修飾されたペプチドが得られた。このペプチドは容易に酸化する。このペプチドを精製することにより、ジスルフィ

50

ド結合によって修飾されたエピトープを得ることができよう。なお修飾には、『分子生物学におけるいろいろな方法』、第5巻：『ペプチド合成のプロトコル』（M. W. ペンニントンとB. M. ダン編）の中で、D. アンドローが書いた第7章、91 - 171ページに概略が記載されている方法を用いる。

【0115】

このようにして合成されたペプチドは、次に、以下の方法を用いてタンパク質キャリアー（ここではウシ血清アルブミン（BSA））と共役させることができる。

【0116】

6.2 修飾されたキャリアーの合成

アリールアルデヒド基の導入には、化学合成経路2（図3。詳細についてはWO98/17628を参照のこと）に示したようにして調製したスクシンイミド活性エステル（BAL-OSu）を用いた。BSA（ウシ血清アルブミン）のアミノ基を約50%置換すると、修飾された可溶性タンパク質が常に得られた。BSAをさらに置換すると、溶けない構造体を得られた。同じモル数のBSAとBAL-OSuをDMSO/緩衝溶液の中で2時間混合した（化学合成経路3、図3を参照）。自由なアミノ基を探すフルオレスカミン・テストによって判定したところ、実験的に得られたこのプロトコルにより、BSAが約50%置換された。

【0117】

6.3 ペプチド - BSA構造体

修飾されたペプチドと誘導體化したBSAを単純に組み合わせることにより、透析によって容易に単離することのできるペプチド - BSA構造体を得られた（化学合成経路4、図4）。SDS-PAGEを用いて分子量の増加を確認した。

【0118】

6.4 肝炎コア抗原構造体

EP0421635Bに記載されている分子生物学の方法を用いて肝炎コア抗原組み換え構造体（HBC）も調製した。HBCの実験において、PT1079を修飾し、末端のリシンを除去した。

【0119】

【表12】

ペプチド	配列	配列番号
PT1078HBC	CLEDGQVMDVDCPREAAEGD	65
PT1079HBC	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	66

【0120】

PTmAb0005とPTmAb0011を用いたBIAコア実験により、P1 - ミモトープ・ペプチドの発現を確認した。免疫原性は、HBCをほんの3μg/用量を投与するだけで生じた。

【0121】

6.5 免疫原性の研究

ミモトープ/HBC構造体とミモトープ/BSA構造体を精製してワクチンにするとともに、WO95/17210に記載されているQS21と3D-MPLを含む水中油乳剤をアジュバントとして使用した（25μgのBSA複合体/用量）。このワクチンを10匹のBalbCマウスからなる複数のグループに投与した。追加投与は、14日目と28日目に行ない、血清は42日目に回収した。抗プレートに結合したIgEと受容体指向性IgEに対する免疫応答は、実施例1.4に記載した方法で調べた。また、アレルギー性好塩基球からのヒスタミン放出抑制における抗血清の活性は、実施例1.5に記載した方法で測定した。

10

20

30

40

50

【0122】

6.6 結果

BSA構造体とHBC構造体はすべて、IgEが直接ELISAプレートに結合したときと、高アフィニティ・レポーターのほうを向いたときに、高力価の抗IgE抗体を誘導した。さらに、これら応答はすべて、自由なIgEとミモトープそのものが競合し、非特異的ペプチドによっては競合しないという点で特異的であることが確認された。これら免疫原によって誘導される抗IgEは、アレルギーのドナー（ライムギ、LolP1）に由来するヒト好塩基球からのヒスタミン放出を抑制することができる。

【0123】

C67-8の結果については、図5、図6、図13、図15を参照のこと。PT1078の結果については、図9、図10、図14、図15を参照のこと。PT1079の結果については、図7、図8、図14、図15を参照のこと。PT1079gsの結果については、図11、図12、図15を参照のこと。

【0124】

さらに、これらペプチド・ミモトープによって生じた免疫応答は、アナフィラキシー誘発性ではなかった。

【0125】

【表13】

表5, P1ミモトープ抗血清のアナフィラキシー原性

免疫原	血清希釈	%ヒスタミン放出
Spontaneous Release		0.25 ± 0.06
Naïve serum	1/50	1.9 ± 0.4
BSA	1/50	2.15 ± 0.65
BSA-IgE C67-8	1/50	2.9 ± 1.1
BSA-1078	1/50	5.00 ± 1.40
BSA-1079	1/1250	0.43 ± 0.04
HBCwt	1/50	3.5 ± 1.0
HBC-1079	1/1250	0.12 ± 0.04
HBC-1079gs	1/1250	0.02 ± 0.02
HBC-IgE C67-8	1/50	2.14 ± 0.26

表の注、Lol P1感受性ドナーからの細胞を30分間希釈マウス血清で処理した。

放出されたヒスタミンを商業的に入手可能な特異的EIAにより測定した。

データは平均±S.E.M. (n=10)である。

【0126】

第2部 本発明のエピトープおよびミモトープと結合するリガンド

ペプチド免疫原について第1部で説明した。ペプチド免疫原は、ワクチンの形態で哺乳類に投与すると、免疫応答を引き起こす。この免疫応答により、(a) IgEを認識し、(b) インビトロでヒスタミン放出を抑制することができる。第2部では、本発明のエピトープまたはミモトープと結合することのできるリガンドと、その機能について説明する。IgEのC2のC-Dループを認識するPTmAb0005とPTmAb0011という2種類のモノクローナル抗体が同定されている。このペプチドのミモトープは、第1部において、免疫原性があり、活性ワクチン接種において機能を発揮することが示された。このセクションでは、これらモノクローナル抗体のキャラクタリゼーションについて説明

し、これらモノクローナル抗体が受動的ワクチン接種において有効である証拠を示す。

【0127】

抗体の標的となるエピトープは、ファージ選別法を用いて、すなわち複数のバクテリオファージ標的の配列アラインメントを用いて同定し、それに続けてドメイン・マッピングと位置指定突然変異誘発によってその同定結果を洗練し、確認した。抗体の機能活性は、インビトロにおける抗IgEの認識とアレルギー・メディエーターの放出抑制を調べるだけでなく、サルにおけるインビボでの受動的皮膚アナフィラキシー（PCA）研究によっても確認した。

【0128】

実施例7

7.1 モノクローナル抗体標的のファージマッピング

ファージgVIIIPのN末端にXCX₁₅、XCX₁₀またはXAX₁₀ペプチド配列（ここで、Xは任意のアミノ酸である）を表示する3つの異なるファージライブラリーを用いてモノクローナル抗体の結合部位をマッピングするために、ファージ表示ライブラリーを用いた。表6および7は、それぞれ抗ヒトIgEモノクローナル抗体PTmAb0005を有するペプチド配列に関する選択の結果を示す。ペプチドおよびヒトIgE間のアミノ酸パターン類似性は、IgEのC₂ドメイン中のc-dループとの強力な相同適合を明示する。ファージ回復から生成される相同パターンは、Qhhahah（ここで、h = 疎水性アミノ酸およびa = アミノ酸）であり、これは、ヒトIgE C₂ドメインのC-Dループ中の配列QVMDVDL（配列番号17）と一列に整列した。

【0129】

ファージパニング実験から得られ、PTmAb0005に対して最高アフィニティーを有するペプチドであるIgEC67も、エピトープマッピングした。これは、PCR突然変異誘発により無作為突然変異を誘導し、小繊維状ファージタンパク質gVIIIP表示に関してヒューズ5ベクター中でサブクロニングすることにより実施した。IgEC67突然変異体を、表8に示したようにPTmAb0005との結合の順に等級付けした。これらのならびにその他の結果は、C₂エピトープと整列したIgEC67内のアミノ酸の重要性を確認した。例えば、L8P、D10G、L11M、E12GおよびL13R突然変異体はすべて、抗IgE PTmAb0005との結合を低減した（データは示されていない）。その他の部位における突然変異は、PTmAb0005に対するアフィニティーにほとんど影響を及ぼさなかった。

【0130】

最高アフィニティーPTmAb0005およびPTmAb0011ファージ表示由来ペプチドから無作為サブライブラリーを作製して、前に記載された方法（Yu, J. and Smith, G.P. (1996) "Affinity maturation of phage-displayed peptide ligands." *Methods in Enzymology*, 267, 3-27）を適応することにより、抗体に対するペプチドのアフィニティーを強化した。これは、無作為PCT工程による大コートタンパク質（gVIIIP）繊維状ファージ表示ベクターから低コピー数小ファージコートタンパク質（gIIIP）表示ベクターへのDNAサブクロニング転移を包含する。サブライブラリーは、最高アフィニティーPTmAb0005配位子IgEC67およびIgEC67-8を含めたいくつかのファージ配列から作製される。C67およびC67-8に対するアフィニティー成熟化配列を、それぞれ表8および9に示す。表に含まれるのは、等級順位、それに利用可能な場合にはBIAコアアフィニティーもである。ペプチド発現ファージが免疫原として用いられる場合には、IgEC67-8は、マウスにおける抗ヒトIgE応答を誘導可能である。

【0131】

7.2 ドメインマッピングによる標的の確認

IgE定常ドメインに関してPTmAb0005およびPTmAb0011の結合特異性をマッピングするために、多数の構築物を生成した。以下の構築物を生成した：C₂-

10

20

30

40

50

4、C₂-3、C₃-4、C₃-4L (C₃-4 + ドメインC₂ およびC₃ 間のリンカー配列) およびC₂ 単独。

【0132】

ヒトIgE Fcの種々のドメイン(単数または複数)を包含する断片を、キメラヒトIgEを発現するハイブリドーマ株JW8/5/13から得られるcDNAを用いてクローニングした(Neuberger, M Set al (1985) Nature 314, 268-270; Bruggemann, M et al (1987) J Exp Med 166, 1351-61)。適切なプライマー対およびJW/8/5/3 cDNAを鋳型として用いて、IgE Fc断片を増幅した。c₂-4断片は、アミノ酸(aa) S225-K547をコードする。c₃-4断片は、aaG335-547をコードする。c₃-4L断片(ドメイン3-4+c₂をc₃に連結するリンカー配列)は、aaE322-K547をコードする。c₂-3断片は、aaS225-G436をコードする。c₂断片は、aaS225-S324をコードする。構築物はすべて、検出および精製目的のためのCOOH末端ヘキサヒスチジン尾を含有する。発現断片の分泌を指図するためにCD33由来リーダーコード配列を有する枠内で真核生物発現ベクター中でこれらの断片をクローニングした。これは、哺乳類細胞株中での発現を可能にした。ベクターは、pcDNA3.1+(Invitrogen)から得た。クローン化断片を発現するために、適切なクローンをCOS-7細胞中にトランスフェクトして、その結果生じた状態調節化培地をトランスフェクションの48~60時間後に収穫した。

10

【0133】

ELISA検定により、ELISAプレートに構築物を結合し、その後モノクローナル抗体を用いたインキュベーション、ならびに抗マウス抗体による暴露により、発現化IgEドメインとのPTmAb0005およびPTmAb0011の結合を検査した。さらに、変性構築物との結合を、ウエスタンブロットの周知の技法により検査した。

20

【0134】

PTmAb0005に関する結果は、それらのネイティブ形態でのC₂-4、C₂-3およびC₂-との強い結合を示し、ウエスタンブロットにおける変性後も、C₂-4およびC₂と結合した。C₃-4またはC₃-4Lとの結合は、いずれの検定においても観察されなかった。

【0135】

PTmAb0011は、それらのネイティブ形態でC₂-4、C₂-3およびC₂とも結合し、さらにそれらの変性形態でC₂-4およびC₂と結合した。

30

【0136】

したがって、抗体が、IgEのC₂ドメイン中に存在する標的エピトープを認識したことは明らかである。

【0137】

7.3 特定部位の突然変異誘発による標的の確証

ドメインマッピング試験は、両mAbがC₂ドメイン単独と結合し得る、ということを実証した。ファージ表示化ペプチドライブラリーのバイオパニングから得られた配列の分析は、PTmAb0005由来配列がP1との顕著な類似性を示すことを明示した。この領域は、IgEモデル構造におけるC₂のC-D鎖間にループを形成する。特定部位の突然変異誘発試験に着手して、PTmAb0005およびPTmAb0011に関するエピトープとしてこの配列を有効なものにした。

40

【0138】

パネルファージ配列の分析およびIgEモデル構造(Helmet al 1990, 上記)とヒトIgG1Fcの既知の構造(Deisenhoffer, J., 1981, Biochemistry, 20, 2361-2370)との比較により、抗体認識に關与すると思われる3つの残基の同定がなされた。これらの残基は、グルタミン(Q)273、メチオニン(M)275およびアスパラギン酸(D)276である。これらを各々、アラニン(A)および以下に示すような少なくとも1つのその他のアミノ酸残基に変

50

えた。

【0139】

Q273 : AおよびE (グルタミン酸)

M275 : QおよびK (リシン)

D276 : AおよびN (アスパラギン)

アラニン突然変異は、標的残基の構造および化学的性質をとともに変えたが、一方、多の突然変異は構造を保持し(できるだけ近く)、しかし例えばQ273Eを変えた。ここで、グルタミン酸は、本質的にはグルタミンと同一構造を有するが、しかし中性の代わりに負に荷電する。

【0140】

C2-4構築物中で、各突然変異を別々に生成した。各突然変異体ポリペプチドを野生型(WT)C2-4と同様レベルに発現させ、ELISAベースの検定において、WTc2-4と同様に効率的に、各々を組換え体FcR1エクトドメインに結合させ得た。同時に、これらのデータは、突然変異は発現系におけるポリペプチドの生成/分泌に影響を及ぼさないが、c2-4断片の構造に相対的に影響を及ぼさないということを実証した。

【0141】

突然変異はすべて、PTmAb0005との結合を~50%だけ低減するD276N以外は、本質的にはPTmAb0005およびPTmAb0011の両方と結合することを阻害する(表10)。C2内の代替的グルタミン残基、Q317の突然変異は、これらの実験における対照として作用するよう実行した。Q317EおよびQ317K突然変異体を生成し、C2-4を認識するPTmAb0005およびPTmAb0011の能力に影響を及ぼさないことを見出した。同様に、FcR1の認識にも影響を及ぼさなかった。

【0142】

したがって、PTmAb0005およびPTmAb0011の結合活性は、C2のC-Dループ内の突然変異により特異的に影響される。

【0143】

要するに、配列P1は、PTmAb0005およびPTmAb0011の両方に関する主要結合決定基を含む。

【0144】

【表14】

10

20

30

表10, PTmAb0005 及び PTmAb0011によるIgEドメイン構築物の認識

突然変異	PTmAb0005 による認識	PTmAb0011 による認識	FcεR1α エクストドメイン による認識
WT cε2-4	++++	++++	++++
Q273A	-	-	++++
Q273E	-	-	++++
M275A	+/-	+/-	++++
M275Q	+/-	+/-	++++
M275K	+/-	+/-	++++
D276A	-	-	++++
D276N	++	-	++++
Q317E	++++	++++	++++
Q317K	++++	++++	++++

10

20

【0145】

7.4 IgE C 2のC-Dループの精製モデル作製

ヒトIgEの正確な構造はまだ確定されていない(モデルは利用可能であるが)ので、詳細なレベルでの検査後には、このモデル構造に誤差が存在すると思われる。したがって本発明は、ヒトIgG1のC 2の等価領域でのこのループのマッピングにより、IgEのC 2ループ領域のこのモデルを精製した(Deisenhofer J 1981 上記)。

30

【0146】

構造的特徴の境界についてのこの新しい情報から、合成した場合に全IgE分子の状況においてC 2のC-Dループのものと非常によく似た配座を適応すべきである環化ペプチドを設計した。このペプチド、Ac-CLEDGVQMDVDLCPREAAEGDK(Ac)-NH₂を、PT1079(配列番号14)と名付けた。

【0147】

BIAcore技法を用いてPTmAb0005およびPTmAb0011の両方に対するPT1079のアフィニティーを測定し、これらのモノクローナル抗体の両方に対する非常に強い認識(それぞれ~20 nMおよび~250 nMの見掛けのアフィニティーでPTmAb0005およびPTmAb0011の両方により認識される)を示すことを見出した。環化のVが1つのアミノ酸残基のみによりシフト去れ、それにより1つのアミノ酸残基だけ環化部位間のペプチドの長さを減少する対照であるPT1079の誘導体ペプチド(PT1078)は、PTmAb0005またはPTmAb0011とのペプチドの結合を低減した。さらに、ループ領域がPT1079と同数の残基を有するようさらに別の残基が付加されるようにPT1078を修飾したが、しかしながら、この修飾はPTmAb0005またはPTmAb0011との結合を修復できなかった。したがって、全IgE分子の状況においてネイティブ標的と非常によく似た形状に適応するよう本発明のペプチドの表示を修正することの重要性を示している。

40

50

【 0 1 4 8 】

【 化 3 】

	C	I	N	K	Q	M	A	D	L	E	L	C	sp'1 位置				
	C	M	N	K	Q	L	A	D	L	E	L	C	-- C67-8				
ミモトープ	K	C	R	E	W	L	G	E	S	E	T	I	M	D	C	-- C67	
ミモトープ	C	E	D	G	Q	V	M	D	V	D	L	C	-- EEC39-I				
													-- PT1079				
	y	h	(x	x	x)	d	h	h	a	n	a	n	(x	x	x)	y	パターン
			(0-3)								(0-3)		(δ/i)
ミモトープ	W	E	D	G	XXXXXXXXXXXX							S	C ₂ c _d				
													ループ				

10

下線は部位指定突然変異誘発により認識されている。

20

【 0 1 4 9 】

要約

ここで説明した作業は、モノクローナル抗体 P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 が P 1 を特異的に認識することを示す。これらの抗体は、高アフィニティーでモノクローナル抗体により認識される I g E の C 2 ドメインの c - d ループのミモトープを同定するために、ファージ表示試験に用いられてきた。

30

【 0 1 5 0 】

7 . 5 P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 の特徴の機能的特徴
以下の実験は、P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 の機能的特徴を記載する。したがって、これらの抗体の標的の使用は、P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 様免疫応答を誘導する。したがって、これらのペプチドベースの免疫原を用いたワクチン接種は、同一機能特徴を有する。

【 0 1 5 1 】

実施例 8

8 . 1 材料および方法

8 . 1 . 1 F c R I 結合検定 (プロテイン A プレート)

この検定では、I g E に対する高アフィニティー受容体の鎖のエクトドメイン (エクトドメイン) の組換え体形態を用いて、キメラ I g E を結合する。エクトドメインのカルボキシル末端を人 I g G 1 F c 配列と融合させる。これは、組換え体分子を F c 領域を介してプロテイン A 被覆微小滴定プレートに結合させる。それゆえ、大多数のエクトドメイン分子は結合配位子に対して利用可能であるべきであり、そして I g E - 受容体相互作用の分析のための系を提供する。以下に記載するフォーマットは、抗 I g E 抗体の (高アフィニティー) 受容体遮断活性の検出を目的とする。

40

【 0 1 5 2 】

8 . 1 . 2 高アフィニティー受容体の鎖エクトドメインとの I g E の結合の検出のための E L I S A プロトコール

遮断緩衝液 (P B S / 5 % B S A / 0 . 0 5 % トウイーン 2 0) 中で 0 . 2 5 μ g / m l

50

に希釈した $100 \mu\text{l}$ / ウエルの γ -エクト-Ig 融合タンパク質でプロテインAプレートを被覆する。37℃で1時間インキュベートする。キメラIgEを10%ブタ血清中で $0.03125 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈する。このIgE溶液中で抗IgE抗体を適切な試験濃度(単数または複数)に希釈する。室温で1時間インキュベートする。プレート洗浄機を用いて、PBS/0.05%トウイン20で3回、プレートを洗浄する。 $100 \mu\text{l}$ / ウエルのIgE:抗IgE溶液(各抗IgE濃度を4回検定する)を付加する。37℃で1時間インキュベートする。プレート洗浄機を用いて、PBS/0.05%トウイン20で3回、プレートを洗浄する。遮断溶液中で1:6000希釈溶液に希釈した $100 \mu\text{l}$ / ウエルのヤギ抗マウス鎖HRPO複合抗体を付加する。37℃で1時間インキュベートする。プレート洗浄機を用いて、PBS/0.05%トウイン20で3回、プレートを洗浄する。200 μl / ウエルのOPD基質を付加し、暗所で室温で2~10分間インキュベートする。25 μl の25% H_2SO_4 の付加により反応を停止する。プレート振盪機-SLOW速で停止反応物を混合する。490 nmでODを読み取る。

10

【0153】

IgEのその受容体との結合の抑制%に関する数値を算定し得る。10%ブタ血清単独中にIgEを含有した(即ち、非抗IgE)一組のウエルの平均から、IgEに関する最大結合値を確定する。

【0154】

したがって、%抑制値は、以下のように算定される：

(最大IgE値 - 抗IgE複製物の平均値) / 最大IgE値 $\times 100$

20

8.1.3 FcRI結合検定(縮小エクトドメイン)

本検定は、本質的には前検定と同一であるが、但し、FcRIエクトドメイン/IgG構築物をタンパク質分解酵素X因子で処理して、2つの部分を開裂する。プロテインAビーズを用いてIgG Fc部分を除去し、ストレプトタビジンビーズを用いてX因子を除去し、したがって、本質的純粋鎖エクトドメイン生成物を残す。この検定フォーマットでは、エクトドメインはプラスチック微小滴定プレートに結合される。その他の検定詳細はすべて、前記の党利である。

【0155】

8.1.4 CD23-結合検定(FcRII、低アフィニティー受容体)

RPMI 8866細胞または一次ヒトB細胞で、本検定を実施した。2つのフォーマットを用い得る：即ち、FcRIIと会合したIgEと結合するmAbの検出のためのものと、mAbがFcRIIと会合するIgEを妨害するか否かを分析する第二のものであった。最初の検定に関しては、PBS、1%FBS、0.1% NaN_3 中で氷上で1時間、キメラIgE($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)を細胞に負荷した。余分量のIgEを除去し、抗IgEmAbを付加した。FITC複合化ラット抗マウスIgG₁抗体で結合mAbを明らかにした。第二検定に関しては、細胞に付加する前に、静かに混合しながら室温で1時間、抗IgEmAbとともにキメラIgE($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)を予備インキュベートした。混合物を細胞とともに氷上で1時間インキュベートし、次に洗浄して非結合IgEを除去した。FITC-ヤギ抗ヒトIgEで結合IgEを検出し、あるいはFITC-複合化ラット抗マウスIgG₁抗体で結合抗IgEmAbを検出した。PBMCで試験を実施した場合、PE-複合化抗CD19抗体により構成B細胞を同定した。フローサイトメトリーにより、試料を分析した。

30

40

【0156】

8.2 結果

PTmAb 0005およびPTmAb 0011に関する結果を、図16~21に示す。図16は、プレート結合IgEとのモノクローナル抗体の濃度依存性結合を示す。図17は、PTmAb 0005およびPTmAb 0011によるFcRI/IgG構築物と結合するIgEの濃度依存性抑制を示す。図18は、抗体PTmAb 0005およびPTmAb 0011による、プラスチックプレートに直接結合されたFcRIの縮小エクトドメインに結合するIgEの抑制を示す。図19は、抗体PTmAb 0005(クローン

50

G E - 1) および P T m A b 0 0 1 1 による F c R I I (C D 2 3) と結合する I g E の抑制の欠如を示す。図 2 0 および 2 1 は、抗体 P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 によるアレルギー性ヒト血中好塩基球からのヒスタミン放出の濃度依存性遮断を示す。

【 0 1 5 7 】

P T m A b 0 0 1 1 はヒト I g E に対する特異性を有するマウスモノクローナル抗体であり、その他のヒト I g アイソタイプまたはラット / マウス I g E との交差反応性を示さない。P T m A b 0 0 1 1 は、無作為配向で E L I S A プレートに結合される場合、ネイティブおよび熱処理 I g E の療法と結合し、これは、I g E 上のその認識部位が熱不安定性であることを示す。P T m A b 0 0 1 1 は、抗原を介して E L I S A プレートに結合される場合、I g E も認識する。この m A b が、ヒト I g E と高アフィニティー I g E 受容体 (F c R I) の鎖結合構成成分との間の相互作用を完全に遮断し得る、ということは重要である。しかしながら、この m A b は、F c R I に前結合される場合、依然としてヒト I g E を認識し、これは、m A b 結合部位が受容体結合時に損失されないことを示す。

10

【 0 1 5 8 】

実施例 9

9 . 1 正常および抗原配向化 E L I S A による P T m A b 0 0 1 1 の I g E 結合特性の分析

実施例 1 に記載したように、ヒトキメラ I g E 、骨髄腫 I g E 、ヒト I g アイソタイプまたは齧歯類 I g E でプレートをコーティングすることにより (p H 9 . 6 炭酸塩 / 重炭酸塩コーティング緩衝液中 1 μ g / m l) 、正常 I g E 結合 E L I S A 法を実施した。抗原配向化 E L I S A に関しては、キメラ I g E (1 μ g / m l) の付加前に、飽和濃度で N P - B S A を被覆した。あるいは、可溶性ヒト F c R I 鎖を被覆 (0 . 2 5 μ g / m l) し、その後、キメラ I g E を付加した。実験 1 に記載した通りに、残りの E L I S A を実行した (マウス抗ヒト I g E m A b の検出のための E L I S A プロトコール) 。

20

【 0 1 5 9 】

9 . 2 結果

図 2 2 は、無作為配向様式で E L I S A プレートに結合される場合、P T m A b 0 0 1 1 がヒト / マウスキメラ I g E およびヒト骨髄腫 I g E の両方と結合することを説明する。同様に、抗原配向化 I g E との結合 (即ち、得れと結合 N P - B S A に結合される I g E) は、用量依存性である。一連の期間の間の 5 6 での熱処理後のキメラ I g E を認識するその能力に関しても、P T m A b 0 0 1 1 を分析した。図 2 2 は、I g E に関する P T m A b 0 0 1 1 の結合能力が熱処理により影響されないことを示す。

30

【 0 1 6 0 】

P T m A b 0 0 1 1 が、高アフィニティー I g E 受容体の鎖構成成分との I g E の相互作用を抑制し得るか否かを確定するために、m A b 特性化をさらに拡張した (図 2 3) 。プレート結合 F c R I 鎖への付加前の P T m A b 0 0 1 1 の予備インキュベーションは、F c R I 鎖との I g E の相互作用の用量依存性抑制を生じた。P T m A b 0 0 1 1 は同様に (図 2 4) 、用量依存様式で、F c R I 鎖関連 I g E を認識する。

40

【 0 1 6 1 】

実施例 1 0

1 0 . 1 一次ヒト B 細胞からの I g E 分泌の分析

I L - 4 および抗 C D 4 0 を補充した培地中の 9 6 U ウエルプレート中で 2 × 1 0 ⁵ 細胞 / ウエルで P B M C をプレート化した。P T m A b 0 0 1 1 またはアイソタイプ適合化対照 m A b を付加し、細胞を 1 4 日間インキュベートした後、I g E 分析のために上清を収穫した。0 . 5 M 炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝液 (p H 9 . 6) 中のウサギ抗ヒト I g E 抗体 (1 0 μ g / m l) で E L I S A プレートをコーティングすることにより、全 I g E レベルを測定した。洗浄したプレートを P B S 、 0 . 0 5 % トウイーン 2 0 、 5 % B S A で遮断した。細胞上清および I g E 標準の両方を飽和量の P T m A b 0 0 1 1 (1 0 μ g /

50

m l) とともに室温で1時間インキュベートした後、E L I S A プレートに付加して、I g E / 抗 I g E 複合体を生成させた。インキュベーションおよび洗浄過程後、H R P - ヒツジ抗ヒト I g E で、その後 O P D 基質により、結合 I g E を検出した。次に、細胞上清中の I g E のレベルを、標準曲線と比較して概算した。

【0162】

10.2 結果

10 μ g / m l ~ 0.5 μ g / m l の用量範囲に亘る P T m A b 0 0 1 1 を用いて I g E を予備インキュベートし、ヒト B 細胞株 R P M I 8 8 6 6 に及ぼす F c R I I とのその後の I g E 結合に及ぼすその作用に関して検査した。図 2 5 は、P T m A b 0 0 1 1 による I g E の予備インキュベーションが F c R I I との I g E 結合を強化することを説明する。非 P 1 特異的モノクローナル抗体 (P T m A b 0 0 1 7) は F c R I I 受容体との I g E の結合を強化しなかった。P T m A b 0 0 1 1 は、一次 B 細胞上での F c R I I との I g E 結合を強化する (図 2 6) 。

10

【0163】

10.3 一次ヒト B 細胞からの I g E 分泌に及ぼす P T m A b 0 0 1 1 の作用

I g E 分泌への B 細胞アイソタイプ切り換えを促すために、付加的 I L - 4 および抗 C D 4 0 抗体の存在下で、末梢血単核球を P T m A b 0 0 1 1 とともに培養した。全 I g E レベル、即ち遊離 I g E および P T m A b 0 0 1 1 複合化 I g E の測定を可能にする E L I S A 検定を開発した。このような定量を成し遂げるために、分泌 I g E を飽和レベルの P T m A b 0 0 1 1 とともに予備インキュベートして、すべての I g E を複合体化させた。飽和レベルの P T m A b 0 0 1 1 と複合体化されていた I g E の標準曲線と比較して、組織培養上清内の全 I g E を定量した。図 2 7 は、3 つの異なるドナーにおいて、P T m A b 0 0 1 1 (1 μ g / m l) を用いた一次 B 細胞のインキュベーションが全レベルの分泌 I g E における有意の低減を生じたことを説明する。このような抑制は、アイソタイプ適合化対照抗体では観察されなかった。

20

【0164】

10.4 ヒト好塩基球からのヒスタミン放出の確定

2 つの検定フォーマットを適応させた。非アレルギー性ドナーからの P B M C を 1 μ g / m l のキメラ I g E で 3 7 で 3 0 分間受動的に感作し、洗浄して、モノクローナル抗体で 3 7 で 3 0 分間処理した。あるいは、L o 1 P 1 - 感受性ドナーからの P B M C をモノクローナル抗体で 3 7 で 3 0 分間、直接処理した。遠心分離により反応を停止させた。特異的イムノアッセイ (I m m u n o t e c h 2 5 6 2) により、細胞上清中のヒスタミン放出を確定した。0.5% イゲパル洗剤で溶解した細胞中で、全細胞性ヒスタミン含量を確定した。

30

【0165】

10.5 好塩基球遮断検定

モノクローナル抗体および I L - 3 の存在下で 3 7 で 3 0 分間、キメラ I g E を用いた非アレルギー性ドナーからの P B M C のインキュベーションにより、ヒト好塩基球における F c R 1 とのキメラ I g E の結合を遮断する抗 I g E 抗体の能力を確定した。細胞を洗浄し、3 7 でさらに 3 0 分間、N P - B P A によりヒスタミン放出を触発した。遠心分離により反応を停止させて、ヒスタミン放出を前記と同様に測定した。

40

【0166】

10.6 アレルギー性好塩基球抑制検定

L o 1 P 1 で触発する前に、3 7 で 3 0 分間、L o 1 P 1 感受性ドナーからの P B M C をモノクローナル抗体とともに予備インキュベートすることにより、アレルギー触発化脱顆粒化を抑制する抗 I g E 抗体の能力を調べた。

【0167】

10.7 ヒト肺マスト細胞からのトリプターゼ放出の確定

ヒアルロニダーゼ、プロナーゼおよび D N アーゼを包含するカクテルによる酵素的消化により、ヒト肺組織から粗製マスト細胞懸濁液を調製した。細胞は、直接用いるか、または

50

抗 I g E 抗体での処理の前にキメラ I g E で予備感作した。顆粒酵素トリプターゼの比色検定により、マスト細胞脱顆粒化を確定した。

【 0 1 6 8 】

1 0 . 8 ヒト F c R 1 でトランスフェクトした R B L 細胞からの ヘキソサミニダーゼ放出の確定

シェフィールド大学 の B . H e l m 博士から、トランスフェクト化細胞株 R B L J 4 1 を入手した。マウスモノクローナル I g E 抗 D N P またはヒトキメラ I g E 抗 N P で細胞を受動的感作し、抗ヒト I g E 抗体で触発した。ヘキソサミニダーゼ放出の比色検定により、脱顆粒化を測定した。

【 0 1 6 9 】

1 0 . 9 結果

1 0 . 9 . 1 ヒト好塩基球中の抗 I g E モノクローナル抗体のアナフィラクトゲン性多数の異なる抗モノクローナル抗体を、アレルギー性および非アレルギー性好塩基球からのヒスタミン放出を触発するそれらの能力に関して検定した (図 2 8) 。その他の抗体と対照をなして、P T m A b 0 0 1 1 は、一貫して有意のヒスタミン放出を生じ得ない。

【 0 1 7 0 】

1 0 . 9 . 2 ヒト肺マスト細胞における抗 I g E モノクローナル抗体のアナフィラクトゲン性

P T m A b 0 0 1 1 は、感作および非感作ヒト肺マスト細胞の両方においても有意量のトリプターゼを放出し得ない (図 2 9) 。ポリクローナル抗ヒト I g E は、これらの細胞において 6 0 ~ 7 0 % 放出を示す。

【 0 1 7 1 】

1 0 . 9 . 3 ヒト F c R 1 でトランスフェクトした R B L 細胞における抗 I g E モノクローナル抗体のアナフィラクトゲン性

キメラヒト I g E 抗 N P で受動的感作した R B L J 4 1 細胞は、抗 N P - B S A で、ならびにポリクローナル抗ヒト I g E で触発され得たが、しかし P T m A b 0 0 1 1 ではされなかった (図 3 0) 。これに対比して、細胞をマウス I g E 抗 D N P で感作した場合には、両抗ヒト I g E 抗体は作用を伴わなかった。細胞は、抗原 D N P - B S A により依然として触発され得た。

【 0 1 7 2 】

1 0 . 9 . 4 好塩基球遮断検定

P T m A b 0 0 1 1 は、非アレルギー性好塩基球における F c R 1 との I g E の結合を遮断し、したがって N P - B S A 抗原によるその後の触発を抑制し得た。この活性の I C ₅₀ 値は、約 6 0 n g / m l であった (図 3 1) 。P T m A b 0 0 1 1 は、4 0 n g / m l の I C ₅₀ 値でアレルギー性好塩基球からの L o 1 P 1 - 触発性ヒスタミン放出も強力に抑制し得た (図 3 1) 。

【 0 1 7 3 】

実施例 1 1 サル受動的皮膚アナフィラキシー試験

P T m A b 0 0 0 5 および P T m A b 0 0 1 1 を、i n v i v o 活性に関しても試験した。要するに、アフリカミドリザルの局所的皮膚マスト細胞をそぎ取って、両腕への 1 0 0 n g の抗 N P I g E (ヒト I g E 抗ニトロフェニルアセチル (N P) 、S e r o t e c h から購入) の皮内投与により感作した。2 4 時間後、試験したモノクローナル抗体の用量範囲を、片腕のヒト I g E と同じ注射部位に注射した。同一動物の反対腕の対照部位に、リン酸塩緩衝化生理食塩水 (P B S) または非特異的ヒト I g E (ヒトサイトメガロウイルス (C M V) またはヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対して特異的である) を投与した。5 時間後、1 0 m g の B S A - N P 複合体 (B i o s e a r c h L a b o r a t o r i e s から購入) を静注により投与した。1 5 ~ 3 0 分後、対照動物は、アナフィラキシーからの容易に観察可能なほぼ環状の浮腫を発症し、これはミリメートルで測定可能である。結果は、3 匹のサルの群の平均浮腫直径で、または P B S 対照との比較における抑制パーセンテージとして表される。ヒト I g E の C 4 ドメイン中のペプチド 4 9 6

10

20

30

40

50

~ 506 を認識する Dec7B は EP0477231B に記載されており、陽性対照として用いられた。

【0174】

【表15】

テストされるべき サンプル量 (μ g)	浮腫の平均直径 (mm)				
	mAb0005	mAb0011	Dec7B	IgE α -CMV 対照	IgE α -HIV 対照
20	0	0	0	19.5	21
10	0	0	20	20.7	22
1	4	4.5	25	22.7	23
0.1	14.8	15.7	20	21.8	22.5
0.05	17.8	18.7	22.5	21.5	22.8
PBS	23.2	28.2	26	24.5	22.5

アナフィラキシーのパーセント阻害を図32に示す。

10

20

【0175】

【表16】

表6—771-ニテ由ル1次771-ジ・テ・イソトイ・バ・イホ・ニガ・ニガから同定されたPTmAb0005ハ・フチド・リガント

ヒト IgE Cε2 EDGQVMDVD - 配列番号 1

名称	ライブラリ	ランク (ECL) PTmAb BIA 37 K_D^{rel} (μM)				配列番号
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
IgEC67	XCX15	CFMKNQLADLELCPRE	243	0.1	4.8	13
IgEC26	XCX15	QCNAVLEGLQMVDHCWN;	43	3	53.4	67
IgEC29	XCX15	CCVADPETQMTPSSEMF;	40	>600	>600	68
IgEC42	XCX15	ECLKIEQQCADIVEIPR;	15	19.4	>500	69
IgEC69	XCX15	SCAYTAQRQCSVDVPPNG;	11	6.6	6.4	70
IgEC9	XCX15	ECRGNMQMDHCPTTD;	10	-	-	71
IgEC13	XCX15	ECLVYGMADCAAGWP;	5	>1000	>1000	72
IgEC56	XCX15	QCRQFVMNQSEKEFGQC;	0	60	>1000	73
IgEC43	XCX15	HCKNEFKKGQWTYSCSD;	0	-	-	74
IgEC81	XCX15	CCVTDVQTTNMDVPAGQ;	0	78	6.3	75
IgEC83	XCX15	TCCVTDIPPPDYEQSLG;	0	-	-	76
IgEC70	XCX15	CCESDIPLNELHALADP;	0	-	-	77
IgEC64	XCX15	CCKSDIPSPVTQFNTMK;	0	-	-	78
IgEC73	XCX15	CCQSDVPHIQPGINDLIIV;	0	>600	>600	79
IgEC72	XCX15	CCMSDTPDISRLPVVPS;	0	-	-	80
IgEC66	XCX15	CCMSDSPADPNRGLPIW;	0	>600	>600	71
IgEC75	XCX15	CCLSDDAFTLPVRR;	0	-	-	82
ESC18	XCX15	CCITDVPQGVMYKGGSPD;	0	-	-	83
ESC45	XCX15	ECKVDGQLSDSPLLRNN;	0	-	-	84

10

20

30

40

【 0 1 7 6 】

【 表 1 7 】

名称	アミノ酸配列	アミノ酸配列 (ECL)			K ₀ ^{rel} (μM)	配列番号
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011		
ESC12	XCX15	CCMTDDPMDPNSTWAIK;	0	-	-	85
ESC43	XCX15	CCMTDDPMTNSTWAIK;	0	-	-	86
ESC1	XCX15	CCVDDTPNSGLAMRVSK;	0	-	-	87
ESC4	XCX15	CCEVDDFPTHHPGWTLK;	0	-	-	88
ESC46	XCX15	SCNLNHQSCDIPPVKQI;	0	-	-	89
ESC20	XCX15	CCMADQELDLGHNAANA;	0	-	-	90
ESD36	XCX10	CCVMDLELASGF;	0	-	-	91
ESD14	XCX10	CCVMDIEVRGSA;	0	-	-	92
ESD38	XCX10	CCQRDVELVFGS;	0	-	-	93
ESD15	XCX10	CCRADFEVGNNG;	0	-	-	94
ESD6/10/40	XCX10	CCVSDEPAGVRD;	0	-	-	95
ESB4/35	XAX10	GAGWQEKDKELR;	0	70	700	96
ESB25	XAX10	GAMTAGQLSDLP;	0	60	>1000	97
ESB10/38	XAX10	VAGGQVVDRELK;	0	139	>1000	98
ESB8	XAX10	KAGEQAMDMEELR;	0	257	>1000	99
ESB29/36	XAX10	RGRNQIMDLEI;	0	-	-	100
ESB15	XAX10	QIDRQITDTLL;	0	-	-	101
ESB26	XAX10	REQQISDVPRV;	0	-	-	102
ESB12	XAX10	CQAMDAEILNQV;	0	-	-	103
ESB1/6etc	XAX10	GQMMDTLELNR;	0	-	-	104
ESB7	XAX10	SMEGQVRDIQV;	0	-	-	105
ESB18	XAX10	YQQRDLELLAE;	0	-	-	106
ESB9	XAX10	SMGQKVDRELV;	0	-	-	107

10

20

30

40

【 0 1 7 7 】

【 表 1 8 】

名称	ライブ細胞	リンク (ECL)		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	配列番号
		PTmAB BIA 37	K_D^{Rel} (μ M)					
ESB40	XAX10			0	-	-	PTmAb0011	108
SB21/33/31	XAX10			0	-	-		109
ESB32	XAX10			0	-	-		110
ESB4/35	XAX10			0	-	-		111
ESB24	XAX10			0	-	-		112
ESB13	XAX10			0	-	-		113

10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

【 表 1 9 】

表7-77に示す1次アミノ酸・ペプチド・糖鎖・糖質・糖タンパク質・糖質・糖質・糖質

ト IgE Cε2 EDGQVMDVD (配列番号1)

名称	アミノ酸配列	アミノ酸配列 (ECL)			PTmAb0011	PTmAb0011	PTmAb0005	配列番号
		アミノ酸配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列				
EEC39/50/129	XCX15	SCREVLGGSEMIMDCE;	1611	2.4	>1000	114		
EEC131	XCX15	SCPAFPREGDLCAPPTV;	910	42	>1000	115		
EEC147	XCX15	FCPEPICSPPLSRMTLS;	883	-	-	116		
EEC40	XCX15	ECNQNLGSLRHVDLNC;	547	-	-	117		
EEC115/3/48	XCX15	RCDQQLPRDSYTFMMS;	438	-	-	118		
EEC36	XCX15	HCQQVFFPQDYLCWQRG;	158	-	-	119		
EEC17/47/25	XCX15	DCEEPMCSVLLQKLP;	147	-	-	120		
EEC40A	XCX15	NCQDQMLREDAGCWSKI;	80	-	-	121		
EEC51/48/53	XCX15	HCEEPEYSPATRVFCGR;	75	-	-	122		
EEC2/23/44/132	XCX15	DCDWINPPDPHFVKDT;	33	7	>600	123		
EEC41	XCX15	ACFSRNGQVTDVPHSCY;	31	-	-	124		
EEC135	XCX15	KCPTYPKPNDRCLWPVP;	19	-	-	125		
EEC116	XCX15	YCPKYPLEGDCLLDNDY;	4	-	-	126		
EEC21/19	XCX15	RCEEWLCIPPAPAFAP;	3	27.8	14.9	127		
EEC55	XCX15	TCGQSELRCASLETHHV;	0	-	-	128		
EEC5	XCX15	NCNDNPMLDCMPAWSS;	0	-	-	129		
EEB33	XAX10	DALDERAWRARA;	15	117	>600	130		
EED183	XCX10	SCQGREVRRECW;	596	-	-	131		
EED35/53/164	XCX10	VCDECVSRELAL;	330	-	-	132		

【 0 1 7 9 】

【 表 2 0 】

10

20

30

40

名称	ラゲ'ラ'-	ラカ (ECL)		PTmAb0005	配列番号
		PTmAb0011	PTmAb0011		
EED38	XCX10	330	-	-	133
EED147/173	XCX10	281	-	-	134
EED35/53/164	XCX10	118	-	-	135
EED36	XCX10	52	-	-	136
EED131/138/102	XCX10	32	-	-	137
EED18/47/48	XCX10	31	-	-	138
EED132	XCX10	28	-	-	139
EED139	XCX10	26	-	-	140
EED134	XCX10	14	-	-	141
EED33	XCX10	7	-	-	142
EED50	XCX10	6	-	-	143
EED34/104	XCX10	3	-	-	144
EED41/56	XCX10	0	-	-	145
EED51	XCX10	0	-	-	146
EED57	XCX10	0	-	-	147

10

20

30

40

【 0 1 8 0 】

【 表 2 1 】

表 8 - PTmAb0005 と PTmAb0011 についての改善されたアフィニティーをもつ IgEC67 突然変異体

元の配列からの突然変異体を青で示す。

ヒト IgE Cε2. EDGQVMDVD (配列番号 1)

名称	配列	PTmAb ラック		BIA コア : K_D^{Rel} (μ M)	配列番号
		0005	0011		
IgEC67	CFMKNQLADLLCPRE	-	-	0.1	13
IgEC67-8	CFMKNQLADLLCPRE	4.36	2.4	0.0094	12
IgEC67-10	ADGAGCFMKNKQ ^{AD} LELCPRE ^{AAEA} ;	4.2	2.3	-	148
IgEC67-1	ADGAGCFMKNKQ ^{AD} LELCPR ^{TAAEA} ;	4.1	2.2	-	149
IgEC67-2	ADGAA ^{CF} MKNKQ ^{AD} LELCPR ^{VAAEA} ;	3.2	1.8	-	150
IgEC67-3	ADGAGCFMKNQL ^{AD} LELCPR ^{VAAEA} ;	3	1.7	-	151
IgEC67-12	ADGAGCFMKNQL ^{AD} LELCPRE ^{AAEA} ;	3	1.9	-	152
IgEC67-9	ADGAGCFMKNQL ^{AD} LEMCP ^{DDAEA} ;	2.7	2.4	-	153
IgEC67-4	ADGAGCFMKNKQL ^{AD} PELCPRE ^{AAEA} ;	2.4	1.3	-	154
IgEC67-5	ADGAGCFMKNKQL ^{VD} LELCPR ^{GAAEA} ;	1.9	1.6	-	155
IgEC67-6	ADGAGCFMNNQL ^{AD} WELCP ^{RAAAEA} ;	1.9	1.6	-	156
IgEC67-11	ADGAGCFMKNKQ ^{AD} WEMCP ^{RAAAEA} ;	1.8	1.9	-	157
IgEC67-14	ADGAGCFMKNKQ ^{AD} LELCPR ^{GAAEA} ;	1.2	0.9	-	158
IgEC67-13	ADGAECFMKNKQL ^{AD} SELCP ^{RVAEA} ;	1.1	0.8	-	159
IgEC67-7	ADGAGCFMKNKQL ^{AD} LELCPRE ^{AAEA} ;	1	1	-	160

【 0 1 8 1 】

【 表 2 2 】

表9 - Pt_mAb0005Iについて改善されたアフィニティーをもつIgEC67-8突然変異体

ヒト IgE Cε2 EDGQVMDVD (配列番号1)

クローン	比ラックA	比ラックB	配列番号
IgEC67-8	1.00	1.00	12
PT _m Ab0005Iについての改善されたアフィニティーをもつ突然変異体			
1-3	1.73	1.31	161
2-13	1.56	2.14	162
3-11	1.54	2.02	163
3-1, 3-9, 3-10	1.54	1.85	164
1-11	1.45	1.32	165
2-15	1.44	1.57	166
4-9	1.38	1.70	167
1-4, 1-2, 1-12	1.37	1.39	168
5-16	1.29	1.83	169
4-1	1.24	1.52	170
2-12	1.22	1.50	171
1-9, 2-5	1.21	1.41	172
2-9, 2-6	1.19	1.54	173
1-16	1.14	1.17	174
1-5	1.13	1.73	175
4-2, 4-3	1.11	1.60	176
1-10	1.10	1.08	177

10

20

30

40

【 0 1 8 2 】

【 表 2 3 】

クローン	比ランクA	比ランクB	配列番号
PT _m AB0005 についての類似のアフィニティーをもつ突然変異体			
5-11	ADGAGCFINRQMQADPELCPREAAEA;	1.09	178
1-8	ADGAGCFIEKQMQADMELCQARAAEA;	1.08	179
5-10	ADGAGCFINKQMQADWELCPREAAEA;	1.05	180
5-2	ADGAGCFINNQMQADLELCPREAAEA;	1.04	181
1-1	ADGAGCFIEKQMQADMELCQRETAEA;	1.04	182
2-3	ADGAGCFINKQMQADMELCQPREAAEA;	1.03	183
2-8, 1-13, 4-11, 1-14	ADGAGCFINKQMQADLELCPREAAEA;	1.00	184
1-6	ADGAGCFRNKQMQADLELCPREAAEA;	0.95	185
1-7	ADGAGCFINKQMQADLELCPARAAEA;	0.91	186
2-11, 2-4, 2-10, 2-7	ADGAGCFINRQLADMELCSRGAEEA;	0.79	187
4-4	ADGAECFINRQMQADLELCPREAAEA;	0.69	188
ストレプトアビジンについてのアフィニティーをもつ突然変異体			
6-9, 5-1, 6-2, 6-8, 6-4	ADGAGCFISPQLADWKRCMREAAEA;	1.53	189
6-12, 5-8	ADGAGCSIHTQMQADWERCCLREGAEEA;	0.93	190
6-10	ADGAGCSIHRQMQADWERCCLREGAEEA;	0.91	191

【 0 1 8 3 】

【 表 2 4 】

10

20

30

40

WO 00/50460

PGT/EP00/01455

出願人のファイル番号 RE/B45172	国際出願
----------------------	------

寄託された微生物に関する表示
(PCT Rule 13 bis)

A. 明細書の 11 頁 12~17 行に言及した微生物に関する表示	
B. 寄託の特定 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 European Collection of Cell Cultures	
寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む) Vaccine Research and Production Laboratory Public Health Laboratory Service Centre For Applied Microbiology Research Porton Down, Salisbury Wiltshire SP4 0JG, GB	
寄託日 1999 年 3 月 8 日 (08/03/99)	寄託番号 99030805
C. 追加記載 (該当しない場合には空白にしておく) この情報は添付別紙に 続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められるこれらの寄託に関し、寄託された微生物のサ ンプルは、ヨーロッパ特許の付与の公表まで、又は出願が拒絶され又は取り 下げられもしくは取り下げられたものとみなされるまで入手可能となるで あろう。但し、該サンプルを要求する人によって指名された専門家にのみそ のようなサンプルを与える。	
D. この記載が目的とする指定国 (すべての指定国を目的としないとき)	
E. 別個の表示の届出 (該当しない場合には空白にしておく)	
下記の表示は国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のよ うに表示事項を明記する)	
—— 受理官庁使用のみ —— <input type="checkbox"/> この用紙は国際出願と共に出願 時に受理された。 権限のある職員	—— 国際事務局使用のみ —— <input type="checkbox"/> 国際事務局が受理した日 : 権限のある職員

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、パドランとデイヴィスの 1986 年のモデルを用いた I g E のアミノ酸表面の露出を示す。

【図 2】

図 2 は、化学合成経路 1 の図であり、固相ペプチド合成を示す。

【図 3】

50

図3は、化学合成経路2と3の図であり、修飾されたキャリアーの調製を示す。

【図4】

図4は、化学合成経路4の図であり、ペプチド/キャリアー複合体の形成を示す。

【図5】

図5は、C67-8抗IgEのデータである。(A)25 μ gのBSA-IgE C67-8(PTL化学反応を利用して共役させた)または3 μ gのHepBコア-IgE C67-8構造体を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗プレート結合IgE反応性。(B)25 μ gのBSA-IgE C67-8(PTL化学反応を利用して共役させた)または3 μ gのHepBコア-IgE C67-8構造体を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗受容体結合IgE反応性。

10

【図6】

図6は、可溶性IgEとIgE C67-8ペプチドを用いた競合アッセイの図である。BSA-IgE C67-8またはHBC-IgE C67-8で免疫処置したマウスに由来する血清を、可溶性IgE(10 μ g/ml)またはIgE C67-8ペプチド(25 μ M)または無関係なペプチドPT326(25 μ M)を用いてあらかじめ培養し、IgEでコーティングしたELISAプレートに添加した。データは、平均 \pm 測定の標準誤差(n=10)である。

【図7】

図7は、PT1079抗IgEのデータである。(A)25 μ gのBSA-PT1079(PTL化学反応を利用して共役させた)または3 μ gのHepBコア-PT1079構造体を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗プレート結合IgE反応性。(B)25 μ gのBSA-PT1079(PTL化学反応を利用して共役させた)または3 μ gのHepBコア-PT1079構造体を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗受容体結合IgE反応性。

20

【図8】

図8は、可溶性IgEとPT1079ペプチドを用いた競合アッセイの図である。BSA-1079またはHBC-PT1079で免疫処置したマウスに由来する血清を、可溶性IgE(10 μ g/ml)またはPT1079ペプチド(25 μ M)または無関係なペプチドPT326(25 μ M)を用いてあらかじめ培養し、IgEでコーティングしたELISAプレートに添加した。データは、平均 \pm 測定の標準誤差(n=10)である。

30

【図9】

図9は、PT1078抗IgEのデータである。(A)25 μ gのBSA-PT1078(PTL化学反応を利用して共役させた)を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗プレート結合IgE反応性。(B)25 μ gのBSA-PT1078(PTL化学反応を利用して共役させた)を用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗受容体結合IgE反応性。

【図10】

図10は、可溶性IgEとPT1078ペプチドを用いた競合アッセイの図である。BSA-1078で免疫処置したマウスに由来する血清を、可溶性IgE(10 μ g/ml)またはPT1078ペプチド(25 μ M)または無関係なペプチドPT326(25 μ M)を用いてあらかじめ培養し、IgEでコーティングしたELISAプレートに添加した。データは、平均 \pm 測定の標準誤差(n=10)である。

40

【図11】

図11は、PT1079gs抗IgEのデータである。(A)3 μ gのHBC-PT1079gsを用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗プレート結合IgE反応性。(B)3 μ gのHBC-PT1079gsを用いて免疫処置したBalb Cマウスに由来する血清の抗受容体結合IgE反応性。

【図12】

図12は、可溶性IgEとPT1079ペプチドを用いた競合アッセイの図である。HBC-PT1079gsで免疫処置したマウスに由来する血清を、可溶性IgE(10 μ g

50

/ml) または PT1079 ペプチド (25 μM) または無関係なペプチド PT326 (25 μM) を用いてあらかじめ培養し、IgE でコーティングした ELISA プレートに添加した。データは、平均 ± 測定の標準誤差 (n = 10) である。

【図 13】

図 13 は、マウス BSA - C67 - 8 で誘導した抗血清の抑制活性を示す。Lo1P1 感受性ドナーからの細胞をマウス血清 (1/50 に希釈) で処理し、次に Lo1P1 でヒスタミンの放出を開始させた。データは、平均 ± 測定の標準誤差 (n = 10) である。

【図 14】

図 14 は、BSA - PT1078 と BSA - PT1079 で誘導したマウス血清の抑制活性を示す。Lo1P1 感受性ドナーからの細胞をマウス血清で処理し (BSA 抗血清と BSA - PT1078 抗血清は 1/50 に希釈; BSA - PT1079 抗血清は 1/1250 に希釈)、次に Lo1P1 でヒスタミンの放出を開始させた。データは、平均 ± 測定の標準誤差 (n = 10) である。

10

【図 15】

図 15 は、HBC - C67 - 8、HBC - PT1078、HBC - PT1079、HBC - PT1079 gs で誘導したマウス血清の抑制活性を示す。Lo1P1 感受性ドナーからの細胞をマウス血清で処理し (HBC 野生型 (wt) と HBC - - IgE C67 - 8 抗血清は 1/50 に希釈; HBC - PT1079 と HBC - PT1079 gs 抗血清は 1/1250 に希釈)、次に Lo1P1 でヒスタミンの放出を開始させた。データは、平均 ± 測定の標準誤差 (n = 10) である。

20

【図 16】

図 16 は、IgE に対する抗体 PTmAb0005 と PTmAb0011 の結合が濃度に依存することを示す。

【図 17】

図 17 は、対照と比較すると、抗体 PTmAb0005 と PTmAb0011 によって、Fc₁ / IgG 構造体に対する IgE の結合の抑制が濃度に依存するようになっていくことを示す。

【図 18】

図 18 は、対照と比較すると、抗体 PTmAb0005 によって、プラスチック・プレートに直接結合した Fc_{R1} の切断された外ドメインに対する IgE の結合の抑制が濃度に依存するようになっていることを示す。

30

【図 19】

図 19 は、抗体 PTmAb0005 (GE - 1) と PTmAb0011 によって IgE が Fc_{R1} II (CD23) に結合する様子を示す。

【図 20】

図 20 は、アレルギーの人の血液中存在する好塩基球からのヒスタミン放出が、対照と比較すると抗体 PTmAb0005 と PTmAb0011 の濃度に依存して抑制されることを示す。

【図 21】

図 21 は、アレルギーの人の血液中存在する好塩基球から Lo1P1 によってトリガーされるヒスタミンの放出が、PTmAb0005 と PTmAb0011 の両方によって抑制されることを示す。

40

【図 22】

図 22 は、さまざまな IgE に結合する PTmAb0011 を示す; (A) キメラ IgE に結合する PTmAb0011; (B) ミエローマ IgE に結合する PTmAb0011; (C) 抗原指向性 IgE に結合する PTmAb0011; (D) 熱で変性した IgE に結合する PTmAb0011。

【図 23】

図 23 は、Fc_{R1} に対する IgE の結合が PTmAb0011 によって抑制される様子を示す。

50

【図24】

図24は、受容体と結合したIgEに対するPTmAb0011の結合を示す。

【図25】

図25は、(A) IgE上のPTmAb0011が、RPMI8866細胞上のFcRIIへの結合に及ぼす影響を示す。RPMI8866細胞($1 \times 10^6 / \text{ml}$)を、キメラIgE($1 \mu\text{g} / \text{ml}$)および抗IgE mAb($10 \sim 0 \mu\text{g} / \text{ml}$)とともに氷の上で1時間培養した。IgEと抗IgEは、室温で1時間あらかじめ培養してから細胞に添加した。結合したIgEは、FITC-ヤギ抗ヒトIgEを用いて検出した。その結果として、ゲートを通った10,000の注目事象をフロー・サイトメトリー分析によって測定した、複製サンプルの平均チャンネル蛍光発光(MCF)を示す。(B)非P1特異的抗体PTmAb0017。

10

【図26】

図26は、IgE上のPTmAb0011が、一次ヒトB細胞上のFcRIIへの結合に及ぼす影響を示す。末梢血単核細胞($1 \times 10^6 / \text{ml}$)を、キメラIgE($1 \mu\text{g} / \text{ml}$)と、抗IgE mAb($10 \sim 0 \mu\text{g} / \text{ml}$; オープン)またはアイソタイプが一致した同じ濃度の対照mAb(固体)とともに、氷の上で1時間培養した。IgEと抗IgEは、室温で1時間あらかじめ培養してから細胞に添加した。結合したIgEは、FITC-ヤギ抗ヒトIgEを用いて検出し、PEが共役した抗CDを用いて一次B細胞を明らかにした。その結果として、ゲートを通った5,000の注目事象をフロー・サイトメトリー分析によって測定した、複製サンプルの平均チャンネル蛍光発光(MCF)を示す。

20

【図27】

図27は、一次ヒトB細胞から分泌されるIgEに対するPTmAb0011の効果を示す。末梢血単核細胞($2 \times 10^5 / \text{ml}$)を、IL-4($10 \text{ ng} / \text{ml}$)と抗CD40抗体($1 \mu\text{g} / \text{ml}$)を追加した培地で培養した。PTmAb0011またはアイソタイプが一致した対照のmAbを14日間にわたって添加し($1 \mu\text{g} / \text{ml}$)、上澄みの細胞を回収し、ELISAによってIgEの全含有量を分析した。結果は、いかなる抗体も存在していない状態で分泌されるIgE量を%で表示してある。

【図28】

図28は、アレルギーのヒト好塩基球(A)と非アレルギーのヒト好塩基球(B)における抗ヒトIgEモノクローナル抗体のアナフィラキシー誘発性を示す。 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のキメラIgEを用いて受動感作した、アレルギーのドナーまたは非アレルギーのドナーからのPBMCを、mAbsを用いて37で30分間処理した。ヒスタミン放出を特異的EIAによって測定した。データは、それぞれ異なるドナーを用いて行なった別々の3回の実験の平均である。

30

【図29】

図29は、感作したヒト肺マスト細胞(A)と非感作のヒト肺マスト細胞(B)における抗ヒトIgE抗体のアナフィラキシー誘発性を示す。感作した、または感作していない未精製ヒト肺マスト細胞の分散液を、抗体を用いて37で45分間処理した。上澄みへのトリプターゼの放出を比色アッセイで測定した。データは、代表的な1つの実験を2回繰り返した結果の平均である。

40

【図30】

図30は、ヒトFcRI(A)とマウスFcRI(B)からのRBL J41細胞における抗ヒトIgE抗体のアナフィラキシー誘発性を示す。RBL J41細胞は、ヒトのキメラIgEまたはマウスIgEを用いて感作し、抗体を用いて37で30分間処理した。上澄みへのヘキソサミニダーゼの放出を比色アッセイで測定した。データは、代表的な1つの実験を3回繰り返した結果の平均である。

【図31】

図31は、ヒト好塩基球においてアレルギーが引き金となるヒスタミン放出がPTmAb0011によって抑制される様子を示す。PBMCは、PTmAb0011だけを用いて(アレルギー・アッセイ(A))、またはPTmAb0011とIgEを用いて(遮断ア

50

ッセイ (B)) 3 7 で 3 0 分間培養した。次に抗原を用いて細胞を 3 7 で 3 0 分間トリガーし、特異的 E I A によりヒスタミン放出を測定した。データは、それぞれ異なるドナーを用いて行なった別々の 3 回の実験の平均 ± 測定の標準誤差である。

【 図 3 2 】

図 3 2 は、 P T m A b 0 0 1 1 と P T m A b 0 0 0 5 によってサルの皮膚において受動的皮膚アナフィラキシーが抑制される様子を示す。モノクローナル抗体 D e c 7 B (スタンワース・デカペプチド) を対照として用いた。

【 図 1 - 1 】

Fig. 1 モデルを用いた I g E アミノ酸表面暴露 Padlan and Davies1986

残基	表面積	平均/5	>50	>80
ARG_1	270.322723			
ASP_2	139.374542			
PHE_3	64.298927	117.361489	1	1
THR_4	46.170193	64.494911	1	0
PRO_5	66.64106	39.0209532	0	0
PRO_6	5.989833	29.3644924	0	0
THR_7	12.004753	21.4426604	0	0
VAL_8	16.016628	8.6200336	0	0
LYS_9	6.561028	10.2708942	0	0
ILE_10	2.527226	9.5044914	0	0
LEU_11	14.243686	13.375776	0	0
GLN_12	8.173189	19.2992118	0	0
SER_13	35.373051	29.1890154	0	0
SER_14	36.178207	32.6313328	0	0
CYS_15	51.576944	39.0100884	0	0
ASP_16	31.455273	45.6153238	0	0
GLY_17	40.066967	50.0071888	1	0
GLY_18	68.590228	46.9957994	0	0
GLY_19	58.546532	59.6253914	1	0
HIS_20	36.519997	63.4215874	1	0
PHE_21	94.603233	68.1998405	1	0
PRO_22	59.047947	65.8573506	1	0
PRO_23	92.381494	62.0824146	1	0
THR_24	46.809082	50.1635586	1	0
ILE_25	17.670317	38.6392736	0	0
GLN_26	35.008953	21.6261078	0	0
LEU_27	1.426522	12.5259452	0	0
LEU_28	7.215665	10.3518628	0	0
CYS_29	1.300269	3.5500722	0	0
LEU_30	7.799905	4.8164434	0	0
VAL_31	0	4.0672202	0	0
SER_32	7.758378	3.8055664	0	0
GLY_33	3.469549	9.5755666	0	0
TYR_34	0	20.7786542	0	0
THR_35	36.649906	28.9967052	0	0
PRO_36	56.015438	50.2230378	1	0
GLY_37	48.846433	57.590085	1	0
THR_38	109.601212	73.50021	1	0
ILE_39	36.832326	70.1846368	1	0
ASN_40	116.200531	73.2560022	1	0
ILE_41	39.437572	51.7217026	1	0
THR_42	64.20546	49.2710734	0	0
TRP_43	1.729714	35.2314448	0	0
LEU_44	24.58209	49.7465942	0	0
GLU_45	46.002388	50.9119188	1	0
ASP_46	112.113319	74.3084848	1	0
GLY_47	69.932083	91.0816862	1	1
GLN_48	118.912544	85.9516244	1	1
VAL_49	108.448097	91.6210626	1	1

【 図 1 - 2 】

MET_50	20.352079	89.4386316	1	1
ASP_51	140.46051	77.093856	1	0
VAL_52	59.019928	65.644336	1	0
ASP_53	57.198666	72.8180802	1	0
LEU_54	51.290497	45.9930286	0	0
SER_55	56.1208	49.3437382	0	0
THR_56	6.335252	47.723164	0	0
ALA_57	75.773476	43.8934994	0	0
SER_58	49.095795	51.656078	1	0
THR_59	32.142174	59.4056414	1	0
THR_60	94.933692	72.6291262	1	0
GLN_61	45.083069	73.3905916	1	0
GLU_62	141.8909	99.7907822	1	1
GLY_63	52.903122	90.626043	1	1
GLU_64	164.143127	83.4067496	1	1
LEU_65	49.109997	57.2201384	1	0
ALA_66	8.986602	47.5594318	0	0
SER_67	10.957844	17.0083172	0	0
THR_68	4.554589	7.3021006	0	0
GLN_69	11.432554	7.2534874	0	0
SER_70	0.578914	5.0619186	0	0
GLU_71	8.743536	8.9567614	0	0
LEU_72	0	10.8120506	0	0
THR_73	24.028803	23.2812776	0	0
LEU_74	20.709	37.264713	0	0
SER_75	62.925049	69.375269	1	0
GLN_76	78.640713	79.644746	1	0
LYS_77	160.55278	78.1594206	1	0
HIS_78	75.474831	77.9196576	1	0
TRP_79	13.18373	76.6092892	1	0
LEU_80	61.725234	70.354977	1	0
SER_81	72.108871	73.244224	1	0
ASP_82	129.281219	81.9731098	1	1
ARG_83	89.921066	69.9061278	1	0
THR_84	56.828159	58.6259284	1	0
TYR_85	1.391324	32.766846	0	0
THR_86	15.707874	23.8688072	0	0
CYS_87	0	12.5331254	0	0
GLN_88	45.416679	24.6522706	0	0
VAL_89	0	22.314276	0	0
THR_90	62.3368	48.4045714	0	0
TYR_91	3.817901	45.5941352	0	0
GLN_92	130.451477	47.9061642	0	0
GLY_93	31.264498	62.7324992	1	0
HIS_94	11.560145	91.80503	1	1
THR_95	136.468475	85.5324108	1	1
PHE_96	149.18042	87.190961	1	1
GLU_97	99.088516	90.6138422	1	1
ASP_98	39.657249	75.8683994	1	0
SER_99	28.674531	62.1985202	1	0
THR_100	62.741261	62.338042	1	0
LYS_101	80.831024	61.8922236	1	0
LYS_102	100.786125	65.3434144	1	0
CYS_103	36.428219	66.2248162	1	0
ALA_104	45.930443	63.0386422	1	0
ASP_105	67.14827	64.611715	1	0

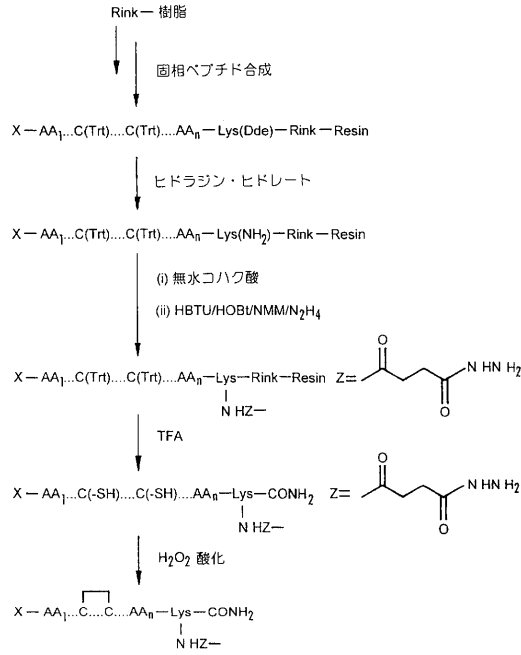
【 図 1 - 3 】

SER_106	64.900154	71.4769134	1	0
---------	-----------	------------	---	---

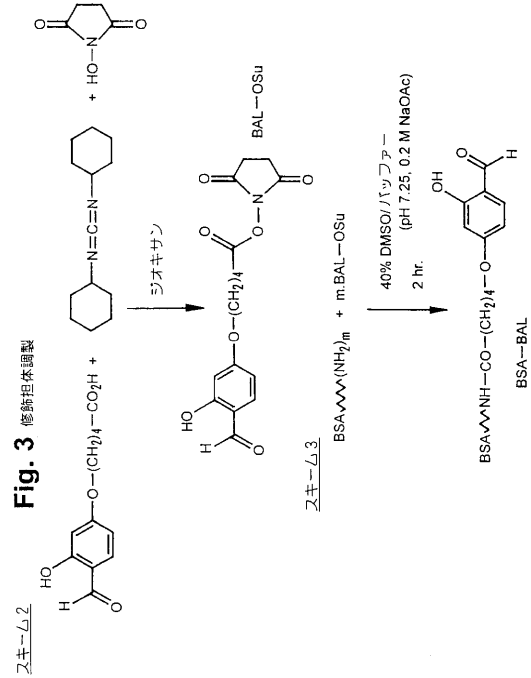
【 図 2 】

Fig. 2 スキーム 1, 固相ペプチド合成

スキーム 1



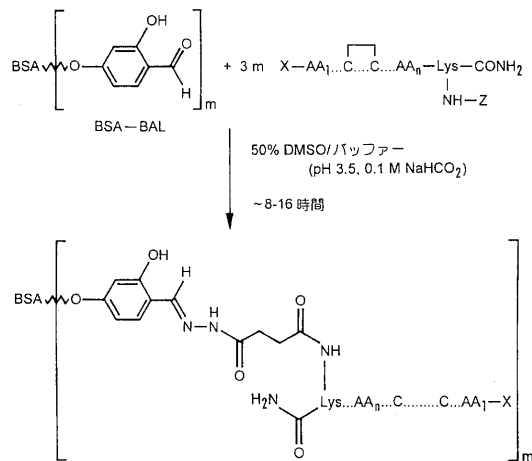
【 図 3 】



【 図 4 】

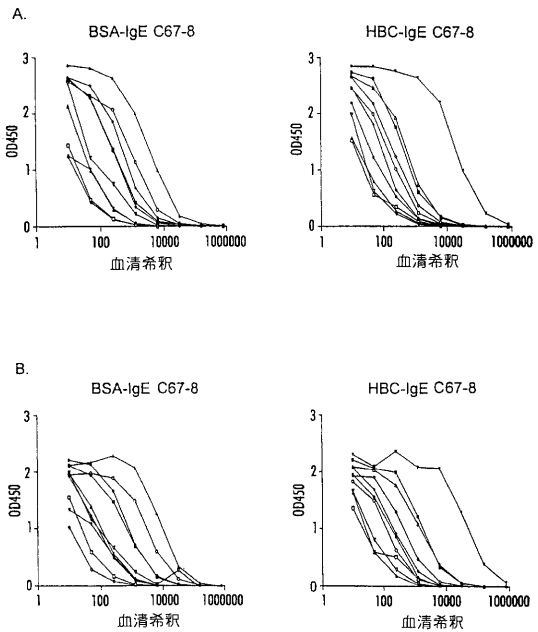
Fig. 4 化学スキーム 4, ペプチド/抗体コンジュゲーション

スキーム 4



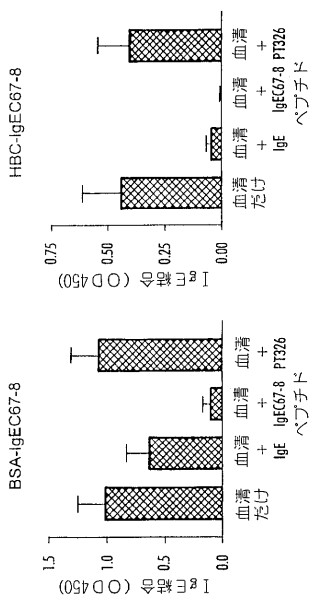
【 図 5 】

Fig. 5 C67-8 抗-IgE テータ



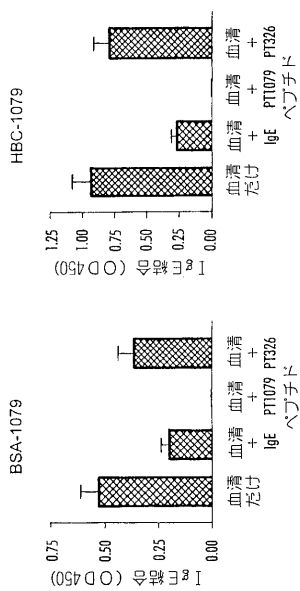
【 図 6 】

Fig. 6 可溶性IgE及びヒビIgEC67-8ヘブチドによる
結合アッセイ



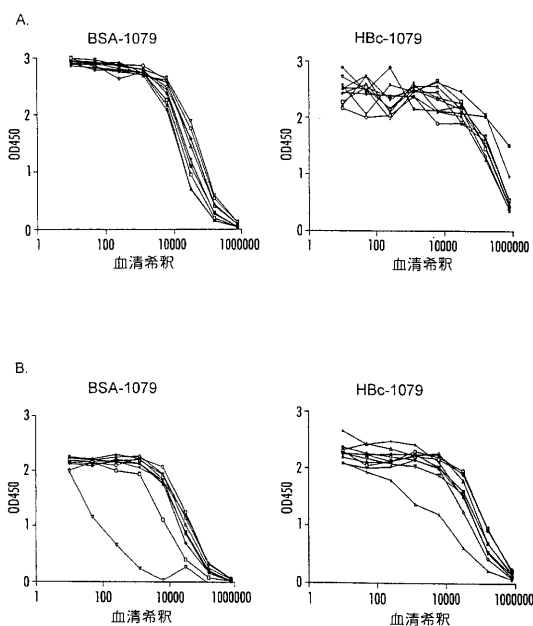
【 図 8 】

Fig. 8 可溶性IgE及びPT1079ヘブチドによる
結合アッセイ



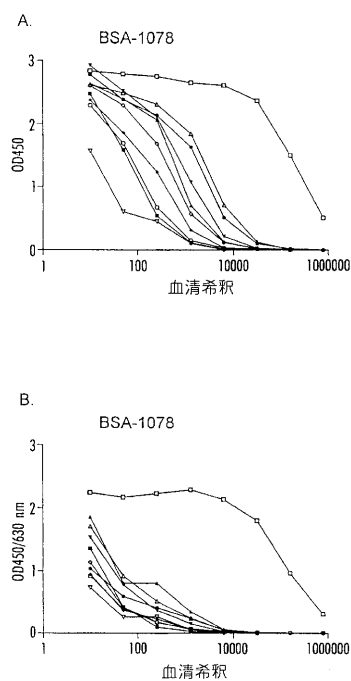
【 図 7 】

Fig. 7 PT1079抗-IgEデータ



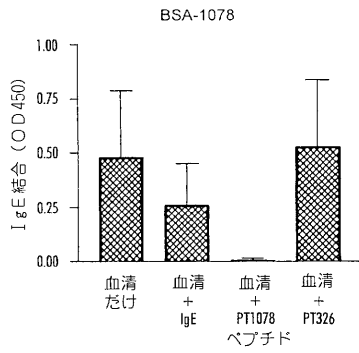
【 図 9 】

Fig. 9 PT1078抗-IgEデータ



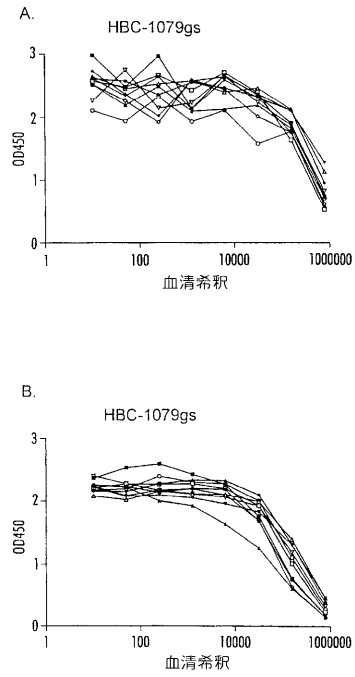
【 図 1 0 】

Fig. 10 可溶性 IgE 及び P T 1078 ペプチドによる競合アッセイ



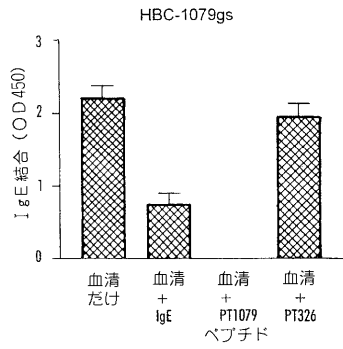
【 図 1 1 】

Fig. 11 P T 1079gs 抗-IgE テータ



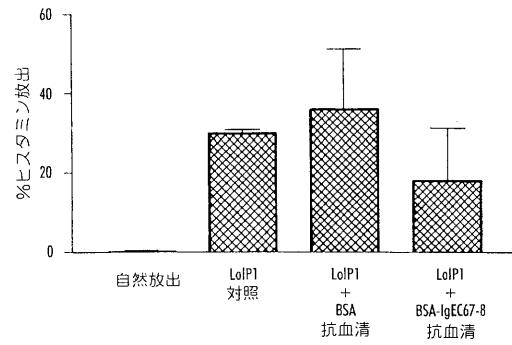
【 図 1 2 】

Fig. 12 可溶性 IgE 及び P T 1079 ペプチドによる競合アッセイ



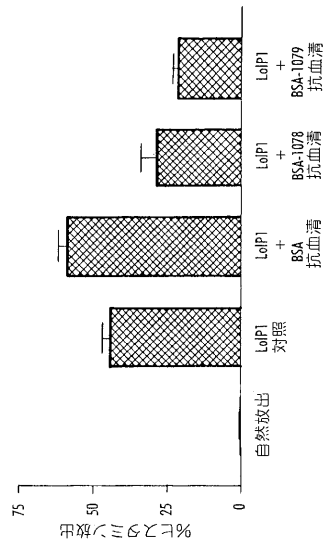
【 図 1 3 】

Fig. 13 マウス B S A - C 67 - 8 誘導抗血清の阻害活性



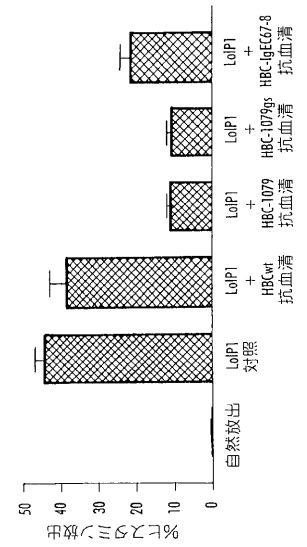
【 図 1 4 】

Fig. 14 BSA-1078とBSA-1079により誘導されたマウス抗血清の阻害活性



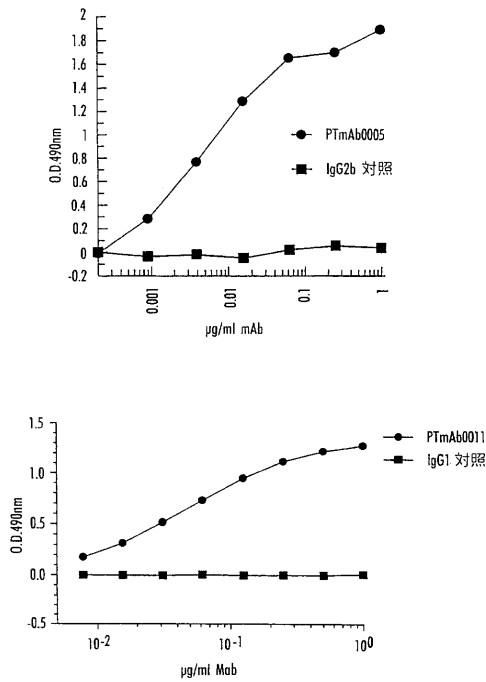
【 図 1 5 】

Fig. 15 HBC-C67-8, HBC-1078, HBC-1079及びHBC-1079gsにより誘導されたマウス抗血清の阻害活性



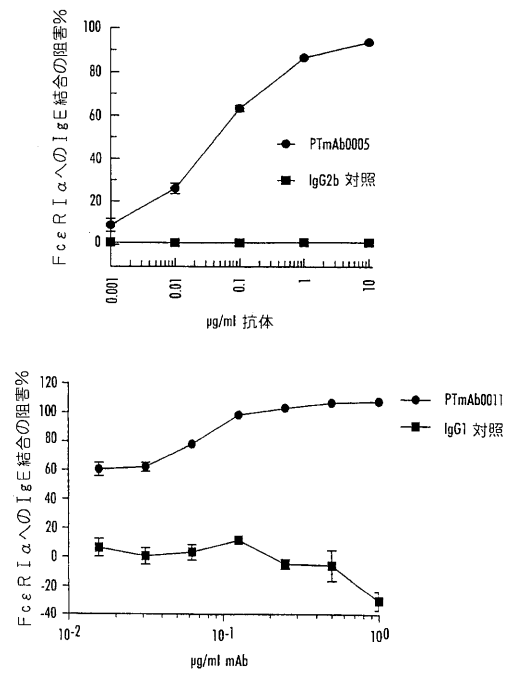
【 図 1 6 】

Fig. 16 IgEに対するPTmAb0005及びPTmAb0011抗体の濃度依存性結合を示す



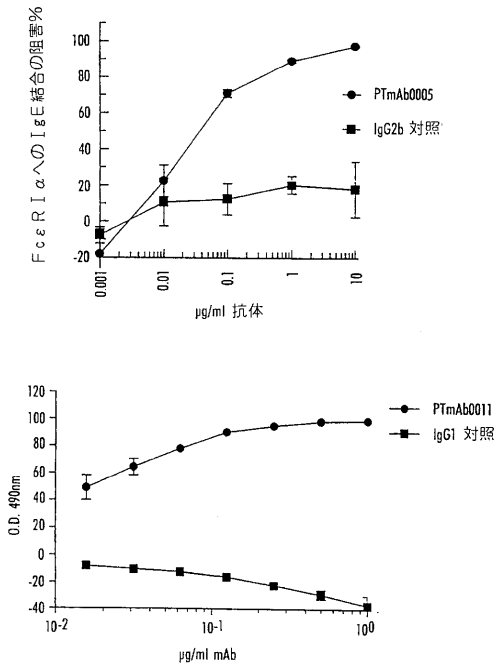
【 図 1 7 】

Fig. 17 対照に比較したPTmAb0005及びPTmAb0011抗体によるFcεRIα/IgE構築物に結合するIgEの濃度依存性阻害を示す



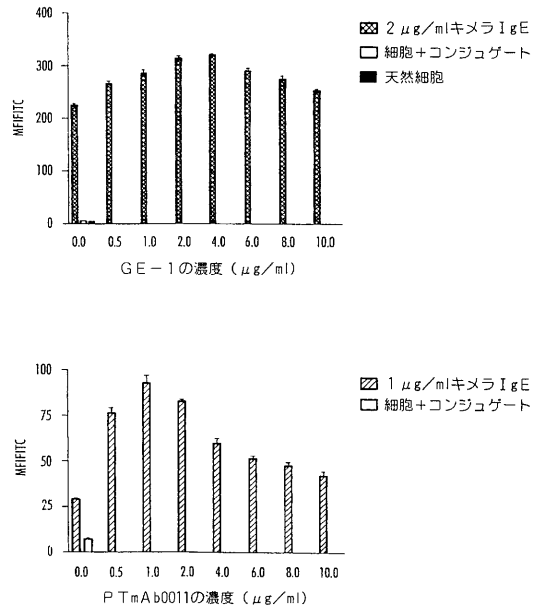
【 図 1 8 】

Fig. 18 対照に比較したPTmAb0005抗体による、プラスチックプレートに直接結合したFcεRIαのクリップされたエクストドメインに結合するIgEの濃度依存性阻害を示す



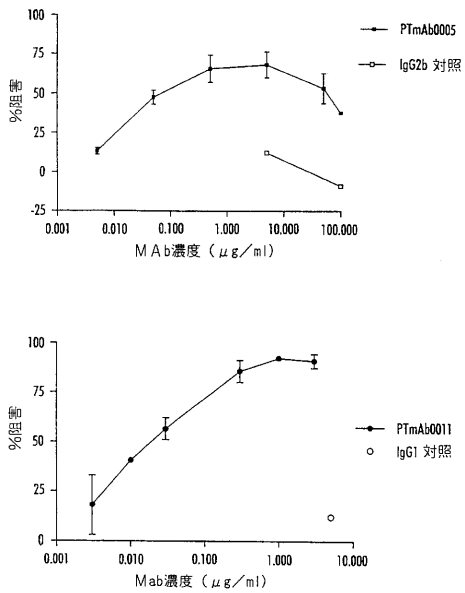
【 図 1 9 】

Fig. 19 PTmAb0005 (GE-1)とPTmAb0011抗体によるFcεRII (CD23)へのIgE結合を示す



【 図 2 0 】

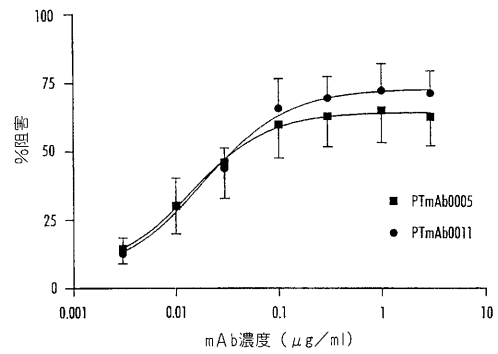
Fig. 20 対照に比較したPTmAb0005とPTmAb0011抗体による、アレルギー性ヒト好塩基球からのヒスタミン放出の濃度依存性ブロックを示す



【 図 2 1 】

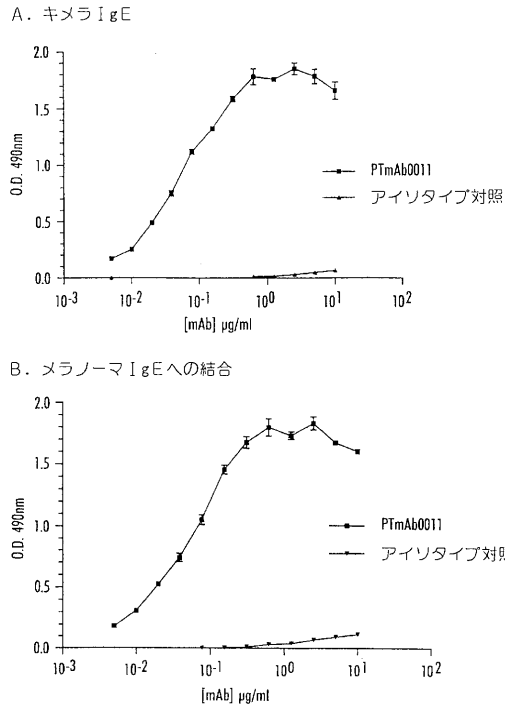
Fig. 21

アレルギー性ヒト好塩基球におけるLoIP1-誘発ヒスタミン放出の阻害



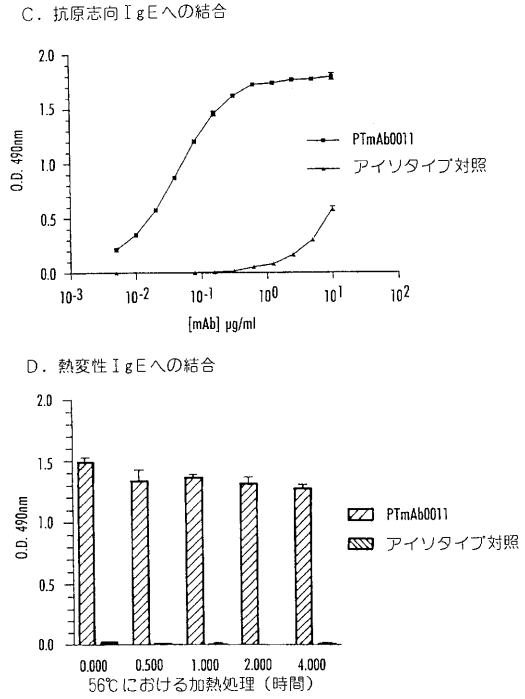
【 図 2 2 - 1 】

Fig. 22 異なる IgE に結合する PTmAb0011

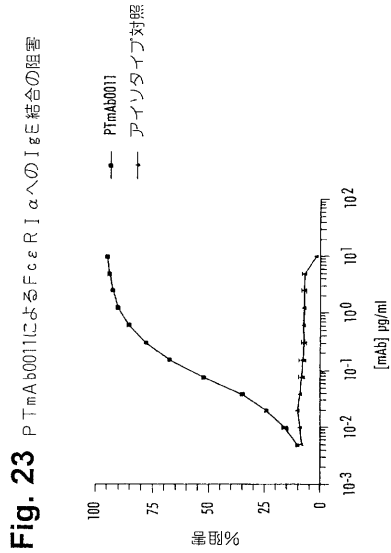


【 図 2 2 - 2 】

Fig. 22

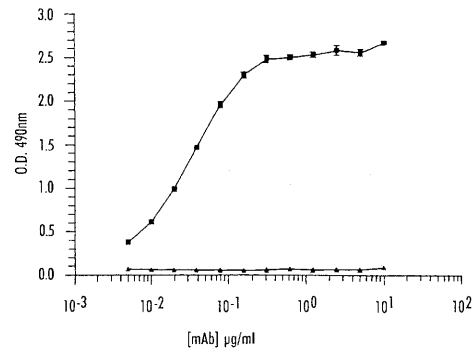


【 図 2 3 】



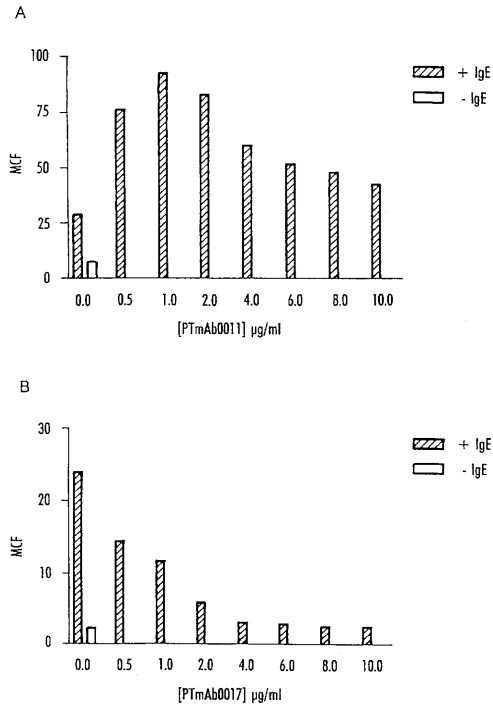
【 図 2 4 】

Fig. 24 レセプター結合 IgE への PTmAb0011 の結合



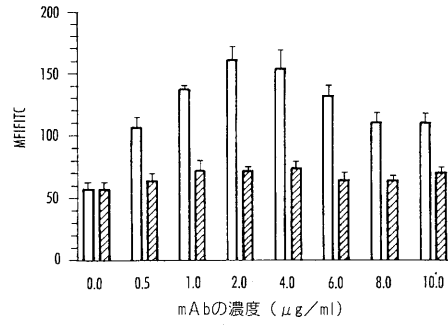
【 図 2 5 】

Fig. 25 R P M I 8866細胞上に F c ε R II に結合している I g E に対する P T m A b 0011 の効果



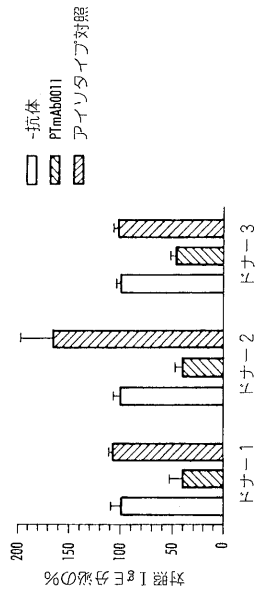
【 図 2 6 】

Fig. 26 1 次ヒト B 細胞上の F c ε R II に結合する I g E に対する P T m A b 0011 の効果の分析



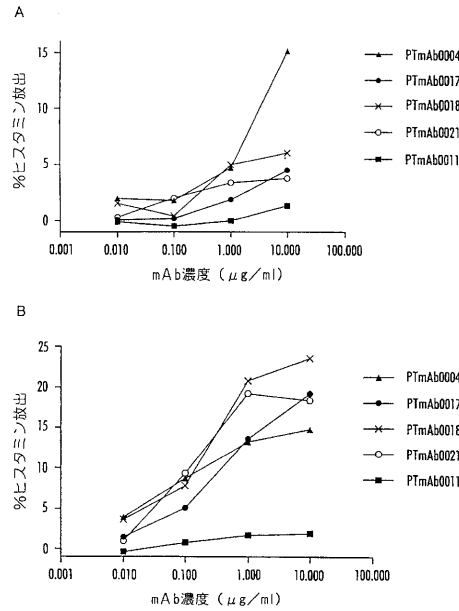
【 図 2 7 】

Fig. 27 1 次ヒト B 細胞からの I g E 分泌に対する P T m A b 0011 の効果



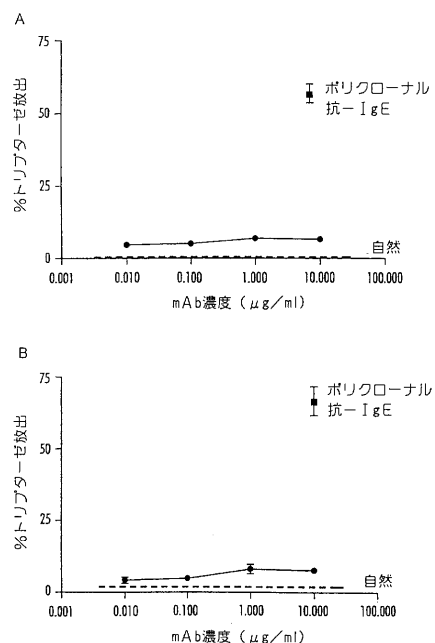
【 図 2 8 】

Fig. 28 アレルギー (A) 及び非アレルギー (B) 性ヒト好塩基球における抗ヒト I g E モノクローナル抗体のアナフィラキシー原性



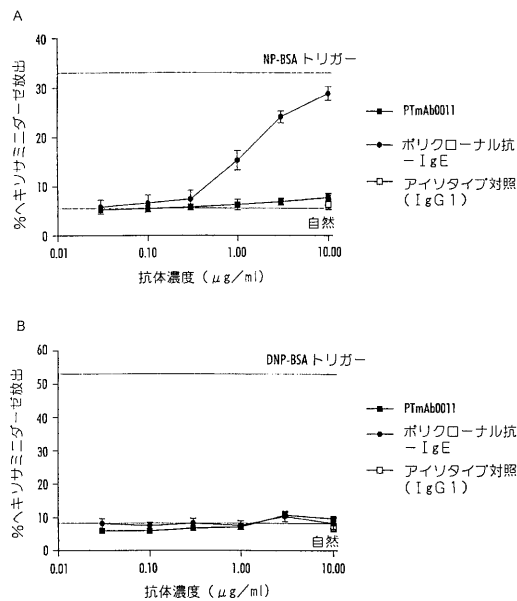
【 図 2 9 】

Fig. 29 過敏 (A) 及び非過敏 (B) ヒト肺マスト細胞における抗ヒト IgE 抗体のアナフィラキシー原性



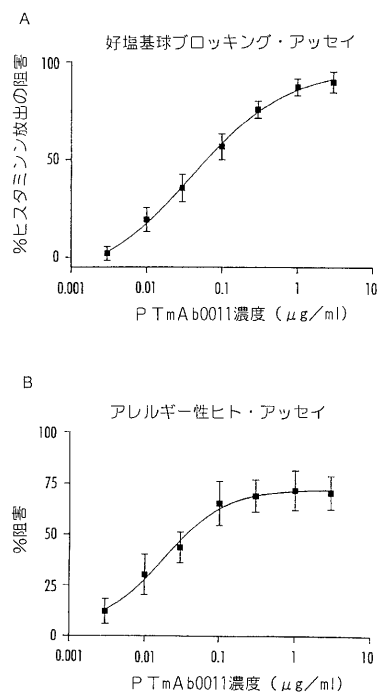
【 図 3 0 】

Fig. 30 ヒト FcεRI (A) とマウス FcεRI (B) を通じての RBL J41 細胞における抗ヒト IgE 抗体のアナフィラキシー原性



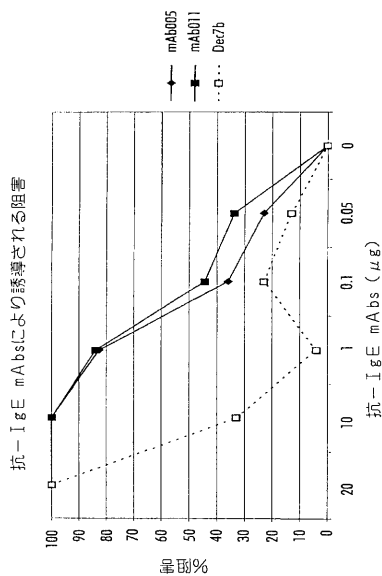
【 図 3 1 】

Fig. 31 P T m A b 0 0 1 1 によるヒト好塩基球におけるアレルギー誘導ヒスタミン放出の阻害



【 図 3 2 】

Fig. 32 P T m A b 0 0 1 1 と P T m A b 0 0 0 5 によるサル皮膚症における受動皮膚アナフィラキシーの阻害



【国際公開パンフレット】

PCT		WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION International Bureau	
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)			
(51) International Patent Classification 7 : C07K 16/00, 16/42, A61K 39/00, 39/385, 39/395, G01N 33/577, 33/68, A61P 37/08		A1	(11) International Publication Number: WO 00/50460
		(43) International Publication Date: 31 August 2000 (31.08.00)	
(21) International Application Number: PCT/EP00/01455	(22) International Filing Date: 22 February 2000 (22.02.00)		
(30) Priority Data:	<p>(GB) FRIEDE, Martin [GB/GB]; Corporate Intellectual Property, SmithKline Beecham, 2 New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB); GRIEENWOOD, Judith [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); HEWITT, Ellen [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); LAMONT, Alan [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); MASON, Sean [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); RANDALL, Roger [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); TURNELL, William, Gordon [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB); VAN MECHELEN, Marcelle, Paulette [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE); VINALS Y DE BASSOLS, Carlota [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).</p> <p>(74) Agents: DALTON, Marcus, Jonathan, William; SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).</p> <p>(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</p>		
<p>9904405.9 25 February 1999 (25.02.99) GB</p> <p>9907151.6 29 March 1999 (29.03.99) GB</p> <p>9910537.1 7 May 1999 (07.05.99) GB</p> <p>9910538.9 7 May 1999 (07.05.99) GB</p> <p>9918594.4 7 August 1999 (07.08.99) GB</p> <p>9918603.3 7 August 1999 (07.08.99) GB</p> <p>9921046.0 7 September 1999 (07.09.99) GB</p> <p>9921047.8 7 September 1999 (07.09.99) GB</p> <p>9925619.0 29 October 1999 (29.10.99) GB</p> <p>9927698.2 23 November 1999 (23.11.99) GB</p>			
(71) Applicants (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE); PEPTIDE THERAPEUTICS LIMITED [GB/GB]; Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT (GB).			
(72) Inventors; and			
(75) Inventors/Applicants (for US only): DYSON, Michael [GB/GB]; Peptide Therapeutics Limited, Peterhouse Technology Park, 100 Fulbourn Road, Cambridge CB1 9PT			
(54) Title: EPITOPES OR MIMOTOPES DERIVED FROM THE C-EPSILON-2 DOMAIN OF IGE, ANTAGONISTS THEREOF, AND THEIR THERAPEUTIC USES			
(57) Abstract			
<p>The present invention relates to the provision of novel medicaments for the treatment, prevention or amelioration of allergic disease. In particular, the novel medicaments are isolated peptides incorporating epitopes or mimotopes of surface exposed regions of the Cε2 domain of IgE. The inventors have found that these novel regions may be the target for both passive and active immunoprophylaxis or immunotherapy. The invention further relates to methods for production of the medicaments, pharmaceutical compositions containing them and their use in medicine. Also forming an aspect of the present invention are ligands, especially monoclonal antibodies, which are capable of binding the surface exposed IgE regions of the present invention, and their use in medicine as passive immunotherapy or in immunoprophylaxis.</p>			

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Ireland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Cote d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

**EPITOPES OR MIMOTOPES DERIVED FROM THE C-EPSILON-2 DOMAIN OF
IGE, ANTAGONISTS THEREOF, AND THEIR THERAPEUTIC USES**

The present invention relates to the provision of novel medicaments for the treatment, prevention or amelioration of allergic disease. In particular, the novel medicaments are isolated peptides incorporating epitopes or mimotopes of surface exposed regions of the Cε2 domain of IgE. The inventors have found that these novel regions may be the target for both passive and active immunoprophylaxis or immunotherapy. The invention further relates to methods for production of the medicaments, pharmaceutical compositions containing them and their use in medicine. Also forming an aspect of the present invention are ligands, especially monoclonal antibodies, which are capable of binding the surface exposed IgE regions of the present invention, and their use in medicine as passive immunotherapy or in immunoprophylaxis. Non-peptidic mimotopes are also an embodiment of the present invention.

In an allergic response, the symptoms commonly associated with allergy are brought about by the release of allergic mediators, such as histamine, from immune cells into the surrounding tissues and vascular structures. Histamine is normally stored in mast cells and basophils, until such time as the release is triggered by interaction with allergen specific IgE. The role of IgE in the mediation of allergic responses, such as asthma, food allergies, atopic dermatitis, type-I hypersensitivity and allergic rhinitis, is well known. On encountering an antigen, such as pollen or dust mite allergens, B-cells commence the synthesis of allergen specific IgE. The allergen specific IgE then binds to the FcεRI receptor (the high affinity IgE receptor) on basophils and mast cells. Any subsequent encounter with allergen leads to the triggering of histamine release from the mast cells or basophils, by cross-linking of neighbouring IgE/ FcεRI complexes (Sutton and Gould, *Nature*, 1993, 366: 421-428; EP 0 477 231 B1).

IgE, like all immunoglobulins, comprises two heavy and two light chains. The ε heavy chain consists of five domains: one variable domain (VH) and four constant domains (Cε1 to Cε4). The molecular weight of IgE is about 190,000 Da, the heavy chain being approximately 550 amino acids in length. The structure of IgE is discussed in Padlan and Davis (*Mol. Immunol.*, 23, 1063-75, 1986) and Helm *et al.*,

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

(2IgE model structure deposited 2/10/90 with PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://pdb-browsers.ebi.ac.uk>)). The second domain, Cε2, approximately comprises amino acids 226-328 of IgE (Flanagan J.G. and Rabbitts, T.H., 1982, EMBO J., 1, 655-660; Kenten et al., 1982,

5 Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 79, 6661-6665), but may encompass additional amino acids. By comparison with the known structure of IgG1, the start point of Cε3 domain is deduced to be Ser337.

In the past, a number of passive or active immunotherapeutic approaches designed to interfere with IgE-mediated histamine release mechanism have been
10 investigated with variable success. These approaches include interfering with IgE or allergen/IgE complexes binding to the FcεRI or FcεRII (the low affinity IgE receptor) receptors, with either passively administered antibodies, or with passive administration of IgE derived peptides to competitively bind to the receptors. In addition, some authors have described the use of specific peptides derived from IgE in
15 active immunisation to stimulate histamine release-inhibiting immune responses.

It has been reported that the IgE domains involved in the binding of IgE to its receptor are Cε3 and Cε4 (Sutton, B.J. and Gould, H.J.; Nature, 1993, 366: 421-428; WO 97/31948), and as such the previous therapeutic strategies have focussed on portions of these two domains.

20 In the course of their investigations, previous workers in this field have encountered a number of considerations, and problems, which have to be taken into account when designing new anti-allergy therapies. One of the most dangerous problems revolves around the involvement of IgE cross-linking in the histamine release signal. It is most often the case that anti-IgE antibodies generated during active
25 vaccination, are capable of triggering histamine release *per se*, by the cross-linking of neighbouring IgE-receptor complexes in the absence of allergen. This phenomenon is termed anaphylactogenicity. Indeed many commercially available anti-IgE monoclonal antibodies which are normally used for IgE detection assays, are anaphylactogenic, and consequently useless and potentially dangerous if administered
30 to a patient.

Whether or not an antibody is anaphylactogenic depends on the location of the target epitope on the IgE molecule. However, based on the present state of knowledge

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

in this area, and despite enormous scientific interest and endeavour, there is little or no predictability of what characteristics any antibody or epitope may have and whether or not it might have a positive or negative clinical effect on a patient.

Therefore, in order to be safe and effective, the passively administered, or
5 vaccine induced, antibodies must bind in a region of IgE which is capable of interfering with the histamine triggering pathway, without being anaphylactic *per se*. The present invention achieves all of these aims and provides medicaments which are capable of raising non-anaphylactic antibodies which inhibit histamine release. These medicaments can form the basis of an active vaccine or be used to raise appropriate
10 antibodies for passive immunotherapy, or may be passively administered themselves for a therapeutic effect.

Much work has been carried out by those skilled in the art to identify specific anti-IgE antibodies which do have some beneficial effects against IgE-mediated allergic reaction (WO 90/15878, WO 89/04834, WO 93/05810). Attempts have also
15 been made to identify epitopes recognised by these useful antibodies, to create peptide mimotopes of such epitopes and to use those as immunogens to produce anti-IgE antibodies.

WO 97/31948 describes an example of this type of work, and further describes IgE peptides from the Cε3 and Cε4 domains conjugated to carrier molecules for active
20 vaccination purposes. These immunogens may be used in vaccination studies and are said to be capable of generating antibodies which subsequently inhibit histamine release *in vivo*. In this work, a monoclonal antibody (BSW17) was described which was said to be capable of binding to IgE peptides contained within the Cε3 domain which are useful for active vaccination purposes.

EP 0 477 231 B1 describes immunogens derived from the Cε4 domain of IgE
25 (residues 497-506, also known as the Stanworth decapeptide), conjugated to Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) used in active vaccination immunoprophylaxis. WO 96/14333 is a continuation of the work described in EP 0 477 231 B1.

Other approaches are based on the identification of peptides which themselves
30 compete for IgE binding to the high or low affinity receptors on basophils or mast cells (WO 93/04173, WO 98/24808, EP 0 303 625 B1, EP 0 341 290).

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

The present invention identifies novel surface exposed epitopes of the Cε2 domain of IgE, which may be used as the target of active or passive immunoprophylaxis or therapy of allergic disease states. The present invention provides peptides incorporating the isolated epitopes *per se*, and further provides mimotopes of these newly identified epitopes, which may be used *per se* in the treatment of allergy, or may be used in immunogens in active vaccination immunoprophylaxis or therapy. The isolated epitopes or mimotopes of the present invention are preferably used in immunogens for active vaccination protocols to induce auto anti-IgE antibodies, which themselves limit, reduce, or eliminate allergic responses or symptoms in vaccinated subjects. Alternatively, the mimotopes or the immunogens of the present invention may be passively administered to a patient to limit, reduce, or eliminate allergic responses or symptoms in vaccinated subjects.

The peptides, which incorporate the isolated epitopes of the present invention are immunogenic, when suitably presented (e.g. on a carrier), and are capable of inducing auto anti-IgE antibodies which are non-anaphylactogenic, and function in ameliorating allergic responses *in vivo*. The epitopes or mimotopes of the present invention are preferably exclusively derived from Cε2 domain, in that they are not derived from any other domain, *i.e.* they are not found within the Cε1, Cε3 or Cε4 domains. In particular, as a preferred embodiment they are derived from the domain encoded by Ser222-Ala329 of human IgE.

Specific epitopes of the Cε2 domain which have been found to be particularly suitable for use in the mimotopes or immunogens of the present invention are those which have been found by the present inventors to be surface exposed. The surface exposure of a region of IgE may be determined from its modelled structure. (Padlan and Davies, *Mol. Immunol.*, 23, 1063-75, 1986; Helm *et al.*, 2IgE model structure deposited 2/10/90 with PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)). The present inventors have found that the epitopes useful in the present invention, are also found to be highly surface exposed. From this observation the present inventors have designed a method for providing other suitable epitopes, those being epitopes having highly accessible regions calculated over a sliding window of five residues. The inventors have found that preferred regions of the Cε2 domain have an accessible surface calculated over a sliding window of 5

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

residues using the Molecular Simulations Software (MSI) of greater than 50 Å², and preferably greater than 80Å².

Examples of such surface exposed Ce2 IgE epitopes are:

<i>Peptide Name</i>	<i>Sequence</i>	<i>Location sequence and IgE Domain</i>	<i>SEQ ID NO.</i>
P1	EDGQVMDVD	Ce2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Ce2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWSLSDRT	Ce2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Ce2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Ce2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Ce2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Ce2 (Phe231-Thr235)	7

5 Peptides incorporating such epitopes form a preferred aspect of the present invention. Mimotopes which have the same characteristics as these epitopes, and immunogens comprising such mimotopes which generate an immune response which cross-react with the IgE Ce2 epitope in the context of the IgE molecule, also form part of the present invention.

10 The present invention, therefore, includes the isolated peptides encompassing the native IgE epitopes themselves, and any mimotope thereof. The meaning of mimotope is defined as an entity which is sufficiently similar to the native IgE epitope so as to be capable of being recognised by antibodies which recognise the native IgE epitope; (Gheysen, H.M., et al., 1986, Synthetic peptides as antigens. 15 Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, p130-149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7, 709-715); or are capable of raising antibodies, when coupled to a suitable carrier, which antibodies cross-react with the native IgE epitope.

The mimotopes of the present invention may be peptidic or non-peptidic. A peptidic mimotope of the surface exposed IgE epitopes identified above, may have a 20 sequence which differs from the native epitope but may also be of exactly the same sequence as the native epitope. Such a molecule is described as a mimotope of the epitope, because although the two molecules share the same sequence, the mimotope will not be presented in the context of the whole Ce2 domain structure, and as such the mimotope may take a slightly different conformation to that of the native IgE 25 epitope. It will also be clear to the man skilled in the art that the above identified linear sequences (P1 to P7), when in the tertiary structure of IgE, lie adjacent to other

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

regions that may be distant in the primary sequence of IgE. As such, for example, a mimotope of P1 may be continuous or discontinuous, in that it comprises or mimics segments of P1 and segments made up of these distant amino acid residues.

5 Preferred surface exposed regions which may be used in the present invention contain regions which are associated with a loop structure. The peptides or mimotopes of the present invention may comprise, therefore, a loop with N or C terminal extensions which may be the natural amino acid residues from neighbouring β -sheets. As examples of this P1 contains the C-D loop, P2 contains the D-E loop, P3 contains the E-F loop, P4 contains the F-G loop, P5 contains the A-B loop, and P6 contains the
10 B-C loop of the C ϵ 2 domain of IgE. Accordingly, mimotopes of these loops form an aspect of the present invention.

Particularly preferred medicaments are based on the epitope P1, and mimotopes thereof. Peptides incorporating this epitope, and mimotopes thereof, when coupled to a carrier, are potent in inducing anti-IgE immune responses which are
15 capable of inhibiting histamine release from human basophils. Moreover, these immune responses are non-anaphylactogenic. Mimotopes of P1 are described primarily as any entity which when formulated into an immunogen, is capable of inducing an immune response, which response is capable of recognising P1 when in the context of C ϵ 2 domain of IgE.

20 P1 corresponds to the C-D loop of the C ϵ 2 domain. The C-D loop structure of immunoglobulin folds corresponds to the linking chain between the end of the C beta-strand and the beginning of the D beta-strand (Introduction to protein Structure, page 304, 2nd Edition, Branden and Tooze, Garland Publishing, New York, ISBN 0 8153 2305-0), corresponding approximately to amino acid residue numbers Trp268-Ser280
25 of the IgE molecule. Accordingly, mimotopes of the C-D loop of IgE C ϵ 2, and ligands that are capable of binding to the C-D loop of IgE C ϵ 2, form a preferred aspect of the present invention.

Peptide mimotopes of the above-identified IgE epitopes may be designed for a particular purpose by addition, deletion or substitution of elected amino acids. Thus,
30 the peptides of the present invention may be modified for the purposes of ease of conjugation to a protein carrier. For example, it may be desirable for some chemical conjugation methods to include a terminal cysteine to the IgE epitope. In addition it

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

may be desirable for peptides conjugated to a protein carrier to include a hydrophobic terminus distal from the conjugated terminus of the peptide, such that the free unconjugated end of the peptide remains associated with the surface of the carrier protein. This reduces the conformational degrees of freedom of the peptide, and thus increases the probability that the peptide is presented in a conformation which most closely resembles that of the IgE peptide as found in the context of the whole IgE molecule. For example, the peptides may be altered to have an N-terminal cysteine and a C-terminal hydrophobic amidated tail. Alternatively, the addition or substitution of a D-stereoisomer form of one or more of the amino acids may be performed to create a beneficial derivative, for example to enhance stability of the peptide. Those skilled in the art will realise that such modified peptides, or mimotopes, could be a wholly or partly non-peptide mimotope wherein the constituent residues are not necessarily confined to the 20 naturally occurring amino acids. In addition, these may be cyclised by techniques known in the art to constrain the peptide into a conformation that closely resembles its shape when the peptide sequence is in the context of the whole IgE molecule.

Examples of preferred cyclised peptides which contain a pair of cysteine residues to allow the formation of a disulphide bridge are PT1079 (SEQ ID NO. 14), PT1079GS (SEQ ID NO.15), PT1078 (SEQ ID NO.16), and P15q (SEQ ID NO. 11).

Further, those skilled in the art will realise that mimotopes or immunogens of the present invention may be longer than the isolated epitopes, and may comprise the sequences disclosed herein. Accordingly, the mimotopes of the present invention may consist of addition of N and/or C terminal extensions of a number of other natural residues at one or both ends. The peptide mimotopes may also be retro sequences of the natural IgE sequences, in that the sequence orientation is reversed; or alternatively the sequences may be entirely or at least in part comprised of D-stereo isomer amino acids (inverso sequences). Also, the peptide sequences may be retro-inverso in character, in that the sequence orientation is reversed and the amino acids are of the D-stereoisomer form. Such retro or retro-inverso peptides have the advantage of being non-self, and as such may overcome problems of self-tolerance in the immune system (for example P15r – see below).

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Alternatively, peptide mimotopes may be identified using antibodies which are capable themselves of binding to the IgE epitopes of the present invention using techniques such as phage display technology (EP 0 552 267 B1). This technique, generates a large number of peptide sequences which mimic the structure of the native peptides and are, therefore, capable of binding to anti-native peptide antibodies, but may not necessarily themselves share significant sequence homology to the native IgE peptide. This approach may have significant advantages by allowing the possibility of identifying a peptide with enhanced immunogenic properties (such as higher affinity binding characteristics to the IgE receptors or anti-IgE antibodies, or being capable of inducing polyclonal immune response which binds to IgE with higher affinity), or may overcome any potential self-antigen tolerance problems which may be associated with the use of the native peptide sequence. Additionally this technique allows the identification of a recognition pattern for each native-peptide in terms of its shared chemical properties amongst recognised mimotope sequences.

Preferred examples of modified peptide mimotopes and examples of bacteriophage derived mimotopes include:

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<i>Peptide</i>	<i>Sequence</i>	<i>Description</i>	<i>SEQ ID NO.</i>
P15	CLEDGQVMDVDLL-NH ₂	P1 mimotope	8
P15r	LLDVDMVQGDELN-NH ₂	P1 retro mimotope	9
P15p	WLEDGQVMDVDLC	P1 mimotope	10
P15q	CLEDGQVMDVDLC	P1 mimotope	11
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 mimotope	12
C67	CFMNKQLADLELCPRE	P1 mimotope	13
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGDK	P1 mimotope	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVLCGGSSGGP	P1 mimotope	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 mimotope	16
P15s	QVMDVDL	P1 mimotope	17
EEC39-I	KCREVWLGESETIMDCE	P1 mimotope	18
EEC39-J	ACREVWLGESETIMDCD	P1 mimotope	19
EEC39-10	SCREVWLGESETVMDCG	P1 mimotope	20
EEC40-9	NCQDLMLREDAGCWSKM	P1 mimotope	21
EEC47-3	DCEPMSPVLLQQLKL	P1 mimotope	22
P15t	LEDGQVMDVD	P1 mimotope	23
P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 mimotope	24
P2sh	TTQEGE	P2 mimotope	25
P17	CSQKHWSLSDRT-NH ₂	P3 mimotope	26
P4ex	TYQGHTFEDSTKCCADSNPRGV	P4 mimotope	27
P5sh	GGHFPP	P5 mimotope	28
P5long1	CSSCDGGGHFPPTIQC	P5 mimotope	192
P5long2	CLQSSCDGGGHFPPTIQLLC	P5 mimotope	193

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

In other mimotopes, the amino acid residues of P1, P2, P3, P4, P5, P6 or P7 can each individually be replaced by the amino acid that most closely resembles that amino acid. For example, A may be substituted by V, L or I, as described in the

5 following table.

Original residue	Exemplary substitutions	Preferred substitution
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

Ligands which are capable of binding to, the surface exposed C ϵ 2 IgE epitopes, and pharmaceutical compositions comprising them, form part of the present invention. Such ligands are capable of being used in passive prophylaxis or therapy, by administration of the ligands into a patient, for the amelioration of allergic disease. Examples of such useful ligands include monoclonal or polyclonal antibodies. For example, antibodies induced in one animal may be purified and passively administered to another animal for the prophylaxis or therapy of allergy. The peptides of the present invention may also be used for the generation of monoclonal antibody hybridomas (using known techniques *e.g.* Köhler and Milstein, Nature, 1975, 256, p495), humanised monoclonal antibodies or CDR grafted monoclonals, by techniques known in the art. Accordingly, in a related aspect of the present invention are ligands

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

capable of binding to the surface exposed epitopes of the Cε2 domain of IgE.

Example of such ligands are antibodies (or Fab fragments). Such antibodies may be used in passive immunoprophylaxis or immunotherapy, or may be used themselves in the identification of IgE peptide mimotopes.

5 The term "antibody" herein is used to refer to a molecule having a useful antigen binding specificity. Those skilled in the art will readily appreciate that this term may also cover polypeptides which are fragments of or derivatives of antibodies yet which can show the same or a closely similar functionality. Such antibody fragments or derivatives are intended to be encompassed by the term antibody as used
10 herein.

Preferred ligands are monoclonal antibodies. Particularly preferred ligands are ligands of P1, and are preferably monoclonal antibodies. For example, PTmAb0011 is the reference name for a mouse IgG1-type monoclonal antibody deposited as
15 Budapest Treaty patent deposit at ECACC (European Collection of Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, UK) on 8th March 1999 under Accession No. 99030805.

For example, PTmAb0011 recognises the C-D loop of Cε2, and is itself capable of recognising IgE when bound to its high affinity receptor on human
20 basophils without causing degranulation, moreover it is able to block the passive sensitisation of non-allergic basophils by preventing the binding of IgE to FcεR1α, and inhibits LolP1-triggered histamine release in allergic basophils. Another monoclonal antibody which recognises the C-D loop of Cε2 is PTmAb0005 (available from Sigma Chemicals Catalogue number I6510, clone number GE-1). The present
25 invention provides this monoclonal antibody in a pharmaceutical composition.

The ligands of P1 have been used in bacteriophage panning techniques to identify new P1 mimotopes. For example a monoclonal antibody which is capable of recognising P1, bound bacteriophages expressing the following sequences:

SEQ ID	Sequence
29	C F I N K Q M A D L E L C
30	C F M N K Q L A D L E L C
31	K C R E V W L G E S E T I M D C

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Other peptide mimotopes of the C-D loop of Cε2 IgE have been identified by bacteriophage panning with PTmAb0011 and PTmAb0005. Examples of such mimotopes include:

<i>Peptide P1 mimotope (PTmAb0011 phage panning)</i>	<i>SEQ NO.</i>
HCQQVFFPQDYLWCQRG	SEQ ID No. 32
SCREVWLGSEMMIDCE	SEQ ID No. 33
ECNQNLGSLRHVDLNC	SEQ ID No. 34
DCEEPMCSPLVLLQKLP	SEQ ID No. 35
SCREVWLGSEMMIDCE	SEQ ID No. 36
RCDQQLPRDSYTFMMS	SEQ ID No. 37
SCPAFPREGDLCAPTV	SEQ ID No. 38
FCPEPICSPLSRMTLS	SEQ ID No. 39
VCDECVSRELLAL	SEQ ID No. 40
WCLEPECAPGLL	SEQ ID No. 41
VCDECVSRELLAL	SEQ ID No. 42
DCLSKGQADLDC	SEQ ID No. 43
SCQGREVRRRECW	SEQ ID No. 44
WCREVWLGESETIMDCE	SEQ ID No. 45
ACREVWLGESETIMDCD -	SEQ ID No. 46
GCAEPKCWQALHQKLP -	SEQ ID No. 47
<i>Peptide P1 mimotope (PTmAb0005 phage panning)</i>	<i>SEQ NO.</i>
ECRGNMQMQDHCPTTD	SEQ ID No. 48
QCNAVLEGLQMVDHCWN	SEQ ID No. 49
CCVADPETQMTPSSEMF	SEQ ID No. 50
HCKNEFKGQWYSCSD	SEQ ID No. 51
QCRQFVMNQSEKEFGQC	SEQ ID No. 52
NCFMKNQLADLELCPRE	SEQ ID No. 53
SCAYTAQRQCSDVNPG	SEQ ID No. 54
GCFMKNQADLELCPRTAA	SEQ ID No. 55
ACFMKNQADLELCPRVAA	SEQ ID No. 56
GCFMKNQLADLELCPRVAA	SEQ ID No. 57
GCFMKNQLADWELCPRAAA	SEQ ID No. 58
ECFMKNQLADSELCPRVAA	SEQ ID No. 59
GCFMKNQLADPELCPREAE	SEQ ID No. 60
GCFMKNQLVDLELCPRGAA	SEQ ID No. 61
GCFMKNQLADLELCPREAA	SEQ ID No. 62
GCFMKNQADLELCPRGAA	SEQ ID No. 63
GCFMKNQADLELCPREAA	SEQ ID No. 64

5

Therefore, mimotopes of IgE Cε2 that are capable of binding to PTmAb0005 or PTmAb0011, and immunogens comprising these mimotopes, form an important

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

aspect of the present invention. Vaccines comprising mimotopes that are capable of binding to PTmAb0005 or PTmAb0011 are useful in the treatment of allergy.

Without limiting the broader definition of P1 mimotopes, from these and other phage-sequences, a core pattern has been identified for a sub-set of a P1-like peptide.

- 5 This pattern is a sub-set of P1 mimotopes, and describes its mimotopes in terms of the chemical properties of the amino acids in each position which are desirable for recognition to that particular anti-P1 monoclonal antibody:

y h x d h h a n a n x y

wherein:

- 10 *y*.....*y* Can be cyclised.
h Hydrophobic (cys;pro;gly;ala;val;ile;leu;trp;met;phe).
d Ionic bond donating (arg;lys;his;gln;asn;trp;tyr;thr;ser).
a Acidic (asp;glu).
n Ionically neutral/ non-polar (all except asp,glu,lys,arg).
 15 *x* Any amino acid (n=0 - 3).

Accordingly, in one embodiment, mimotopes of P1 may be described by the general core feature *y h x d h h a n a n x y* described above. The peptide P1 or mimotope thereof may be optionally flanked by other amino acids at either end to aid conjugation or for any other purpose.

- 20 A particularly preferred mimotopes of P1 is P15s (SEQ ID NO. 17), whose Q, M, and first D residues have been shown to be critical for PTmAb0011 and PTmAb0005 binding activity (see examples). Hence a mimotope formula for P15s, in which the non-essential residues were replaced by similar amino acids (as outlined above) would be:

25 Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃

wherein X₁ is selected from V, I, L, M, F or A; X₂ is selected from D or E; and X₃ is selected from L, I, V, M, A or F.

- Also forming an important aspect of the present invention is the use of PTmAb0005 and PTmAb0011 in the identification of novel mimotopes of IgE, for
 30 subsequent use in allergy therapy. As PTmAb0005 is commercially available, this ligand does not form a composition of the present invention, however, pharmaceutical

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

compositions comprising PTmAb0005, and its use in the identification of P1 mimotopes, form two important aspects of the present invention.

Mimotopes of P2, P3, P4 and P5 also form an important aspect of the present invention. For example P16 and P17, are mimotopes of P2 and P3 respectively. These peptides, when suitably presented on carriers, are both capable of inducing strong anti-IgE antibody responses which are non anaphylactogenic.

In a preferred embodiment, the peptides incorporating the above identified epitopes or peptidic or non-peptidic mimotopes of the present invention will be of a small size, such that they mimic a region selected from the whole Ce2 domain. It is envisaged that peptidic mimotopes, therefore, should be less than 100 amino acids in length, preferably shorter than 75 amino acids, more preferably less than 50 amino acids, and most preferable within the range of 4 to 25 amino acids long. Specific examples of preferred peptide mimotopes are PT1079 and P15q, which are respectively 21 and 13 amino acids long. Non-peptidic mimotopes are envisaged to be of a similar size, in terms of molecular volume, to their peptidic counterparts.

It will be apparent to the man skilled in the art that techniques may be used to confirm the status of a specific construct as a mimotope. Such techniques include the following: The putative mimotope can be assayed to ascertain the immunogenicity of the construct, in that antisera raised by the putative mimotope cross-react with the native IgE molecule, and are also functional in blocking allergic mediator release from allergic effector cells. The specificity of these responses can be confirmed by competition experiments by blocking the activity of the antiserum with the mimotope itself or the native IgE, and/or specific monoclonal antibodies that are known to bind the surface exposed epitope within Ce2 of IgE. Specific examples of such monoclonal antibodies for use in the competition assays include, for example, PTmAb0005 and PTmAb0011, which would confirm the status of the putative mimotope as a mimotope of the C-D loop of the Ce2 domain of IgE.

In one embodiment of the present invention at least one peptide as hereinbefore described, incorporating an IgE epitope or mimotope, is linked to carrier molecules to form immunogens for vaccination protocols. Preferably the carrier molecules are not related to the native IgE molecule. The peptides or mimotopes may

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

be linked via chemical covalent conjugation or by expression of genetically engineered fusion partners, optionally *via* a linker sequence.

The covalent coupling of the peptide to the immunogenic carrier can be carried out in a manner well known in the art. Thus, for example, for direct covalent coupling it is possible to utilise a carbodiimide, glutaraldehyde or (N-[γ -maleimidobutyryloxy]) succinimide ester, utilising common commercially available heterobifunctional linkers such as CDAP and SPDP (using manufacturers instructions). After the coupling reaction, the immunogen can easily be isolated and purified by means of a dialysis method, a gel filtration method, a fractionation method etc.

The types of carriers used in the immunogens of the present invention will be readily known to the man skilled in the art. The function of the carrier is to provide cytokine help in order to help induce an immune response against the IgE peptide. A non-exhaustive list of carriers which may be used in the present invention include: Keyhole limpet Haemocyanin (KLH), serum albumins such as bovine serum albumin (BSA), inactivated bacterial toxins such as tetanus or diphtheria toxins (TT and DT), or recombinant fragments thereof (for example, Domain 1 of Fragment C of TT, or the translocation domain of DT), or the purified protein derivative of tuberculin (PPD). Alternatively the mimotopes or epitopes may be directly conjugated to liposome carriers, which may additionally comprise immunogens capable of providing T-cell help. Preferably the ratio of peptides to carrier is in the order of 1:1 to 20:1, and preferably each carrier should carry between 3-15 peptides.

In an embodiment of the invention a preferred carrier is Protein D from *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 B1). Protein D is an IgD-binding protein from *Haemophilus influenzae* and has been patented by Forsgren (WO 91/18926, granted EP 0 594 610 B1). In some circumstances, for example in recombinant immunogen expression systems it may be desirable to use fragments of protein D, for example Protein D 1/3rd (comprising the N-terminal 100-110 amino acids of protein D (GB 9717953.5)).

Another preferred method of presenting the IgE peptides of the present invention is in the context of a recombinant fusion molecule. For example, EP 0 421 635 B describes the use of chimeric hepadnavirus core antigen particles to present foreign peptide sequences in a virus-like particle. As such, immunogens of the present

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

invention may comprise IgE peptides presented in chimeric particles consisting of hepatitis B core antigen. Additionally, the recombinant fusion proteins may comprise the mimotopes of the present invention and a carrier protein, such as NS1 of the influenza virus. For any recombinantly expressed protein which forms part of the present invention, the nucleic acid which encodes said immunogen also forms an aspect of the present invention.

Peptides used in the present invention can be readily synthesised by solid phase procedures well known in the art. Suitable syntheses may be performed by utilising "T-boc" or "F-moc" procedures. Cyclic peptides can be synthesised by the solid phase procedure employing the well-known "F-moc" procedure and polyamide resin in the fully automated apparatus. Alternatively, those skilled in the art will know the necessary laboratory procedures to perform the process manually. Techniques and procedures for solid phase synthesis are described in 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach' by E. Atherton and R.C. Sheppard, published by IRL at Oxford University Press (1989). Alternatively, the peptides may be produced by recombinant methods, including expressing nucleic acid molecules encoding the mimotopes in a bacterial or mammalian cell line, followed by purification of the expressed mimotope. Techniques for recombinant expression of peptides and proteins are known in the art, and are described in Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

The immunogens of the present invention may comprise the peptides as previously described, including mimotopes, or may be immunologically cross-reactive derivatives or fragments thereof. Also forming part of the present invention are portions of nucleic acid which encode the immunogens of the present invention or peptides, mimotopes or derivatives thereof. In addition, the immunogens of the present invention may comprise more than one type of epitope, i.e. P1 and P2, in the same immunogen, or the mimotope itself may comprise more than one type of epitope.

The present invention, therefore, provides the use of novel peptides encompassing the epitopes or mimotopes of the present invention (as defined above), in the manufacture of pharmaceutical compositions for the prophylaxis or therapy of

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

allergies. Immunogens comprising the mimotopes or peptides of the present invention, and carrier molecules are also provided for use in vaccines for the immunoprophylaxis or therapy of allergies. Accordingly, the mimotopes, peptides or immunogens of the present invention are provided for use in medicine, and in the
5 medical treatment or prophylaxis of allergic disease. Accordingly, there is provided a method of treatment of allergy comprising the administration to a patient suffering from or susceptible to allergy, of a vaccine or medicament of the present invention.

Vaccines of the present invention, may advantageously also include an adjuvant. Suitable adjuvants for vaccines of the present invention comprise those
10 adjuvants that are capable of enhancing the antibody responses against the IgE peptide immunogen. Adjuvants are well known in the art (Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X). Preferred adjuvants for use with immunogens of the present invention include
15 aluminium or calcium salts (for example hydroxide or phosphate salts). Other adjuvants include saponin adjuvants such as QS21 (US 5,057,540) and 3D-MPL (GB 2220 211).

The vaccines of the present invention will be generally administered for both priming and boosting doses. It is expected that the boosting doses will be adequately
20 spaced, or preferably given yearly or at such times where the levels of circulating antibody fall below a desired level. Boosting doses may consist of the peptide in the absence of the original carrier molecule. Such booster constructs may comprise an alternative carrier or may be in the absence of any carrier.

In a further aspect of the present invention there is provided a vaccine as
25 herein described for use in medicine.

The vaccine preparation of the present invention may be used to protect or treat a mammal susceptible to, or suffering from allergies, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection *via* the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or
30 *via* mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts. A preferred route of administration is via the transdermal route, for example by skin patches.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

The amount of protein in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccinees. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected that each dose will
5 comprise 1-1000 μg of protein, preferably 1-500 μg , preferably 1-100 μg , of which 1 to 50 μg is the most preferable range. An optimal amount for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisations adequately spaced.

10 Pharmaceutical compositions comprising the ligands, described above, also form an aspect of the present invention. Also provided are the use of the ligands in medicine, and in the manufacture of medicaments for the treatment of allergies.

Aspects of the present invention may also be used in diagnostic assays. For example, panels of ligands which recognise the different peptides of the present
15 invention may be used in assaying titres of anti-IgE present in serum taken from patients. Moreover, the peptides may themselves be used to type the circulating anti-IgE. It may in some circumstances be appropriate to assay circulating anti-IgE levels, for example in atopic patients, and as such the peptides and poly/mono-clonal antibodies of the present invention may be used in the diagnosis of atopy. In addition,
20 the peptides may be used to affinity remove circulating anti-IgE from the blood of patients before re-infusion of the blood back into the patient.

Also forming part of the present invention is a method of identifying peptide immunogens for the immunoprophylaxis or therapy of allergy comprising using a computer model of the structure of IgE, and identifying those peptides of the IgE
25 which are surface exposed. These regions may then be formulated into immunogens and used in medicine. Accordingly, the use of PTmAb0005 and PTmAb0011 in the identification of peptides for use in allergy immunoprophylaxis or therapy forms part of the present invention.

Vaccine preparation is generally described in New Trends and Developments
30 in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Conjugation of proteins to macromolecules is disclosed by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor et al., U.S. Patent 4, 474,757.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

The numbering system for IgE amino acid residues is often that described by Dorrington KJ and Bennich H (1978) *Immunol Rev* **41** 3-25; and also Bennich H and Bahr-Lindaström, H von (1978) *Prog Immunol* **11** 49-58. However, subsequent determination of the gene and cDNA sequence of human IgE (Max, E.E. *et al* 1982, Cell **29** 691-699; Flanagan J.G. and Rabbitts, T.H., 1982, *supra*; Kenten, J.H. *et al* 1982, *supra*) revealed an extra leucine at position 273 (Kabat numbering) in Cε2 which was not reported in the earlier papers. The numbering scheme used by the present inventors may, therefore, differ from that used by Dorrington KJ and Bennich.

10 **Description of drawings**

- FIG 1, IgE amino acid surface exposure using the Padlan and Davies 1986 model.
FIG 2, Chemistry Scheme 1, solid phase peptide synthesis.
FIG 3, Chemistry Scheme 2 and Scheme 3, Modified carrier preparation.
FIG 4, Chemistry Scheme 4, Peptide/carrier conjugation.
- 15 FIG 5, C67-8 Anti-IgE Data. (A) Anti-plate bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 25µg BSA-IgE C67-8 (conjugated using PTL chemistry) or 3µg HepB core-IgE C67-8 construct. (B) Anti-receptor bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 25µg BSA-IgE C67-8 (conjugated using PTL chemistry) or 3µg HepB core-IgE C67-8 construct.
- 20 FIG 6, Competition assay with soluble IgE and IgE C67-8 peptide. Sera from BSA-IgE C67-8 or HBC-IgEC67-8 immunised mice were pre-incubated with soluble IgE (10µg/ml) or IgE C67-8 peptide (25µM) or the irrelevant peptide PT326 (25µM) and added to IgE-coated ELISA plates. Data are mean ± S.E.M (n = 10).
- FIG 7, PT1079 Anti-IgE Data. (A) Anti-plate bound IgE reactivity of serum from
25 Balb C mice immunised with 25µg BSA-PT1079 (conjugated using PTL chemistry) or 3µg HepB core-1079 construct. (B) Anti-receptor bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 25µg BSA-1079 (conjugated using PTL chemistry) or 3µg HepB core-1079 construct.
- FIG 8, Competition assay with soluble IgE and PT1079 peptide. Sera from BSA-1079
30 or HBC-1079 immunised mice were pre-incubated with soluble IgE (10µg/ml) or PT1079 peptide (25µM) or the irrelevant peptide PT326 (25µM) and added to IgE-coated ELISA plates. Data are mean ± S.E.M (n = 10).

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

- FIG 9, PT1078 Anti-IgE Data. (A) Anti-plate bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 25µg BSA-PT1078 (conjugated using PTL chemistry). (B) Anti-receptor bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 25µg BSA-1078 (conjugated using PTL chemistry).
- 5 FIG 10, Competition assay with soluble IgE and PT1078 peptide. Sera from BSA-1078 immunised mice were pre-incubated with soluble IgE (10µg/ml) or PT1078 peptide (25µM) or the irrelevant peptide PT326 (25µM) and added to IgE-coated ELISA plates. Data are mean ± S.E.M (n = 10).
- FIG 11, PT1079gs Anti-IgE Data. (A) Anti-plate bound IgE reactivity of serum from
10 Balb C mice immunised with 3µg HBC-1079gs, (B) Anti-receptor bound IgE reactivity of serum from Balb C mice immunised with 3µg HBC-1079gs.
- FIG 12, Competition assay with soluble IgE and PT1079 peptide. Sera from HBC-1079gs immunised mice were pre-incubated with soluble IgE (10µg/ml) or PT1079 peptide (25µM) or the irrelevant peptide PT326 (25µM) and added to IgE-coated
15 ELISA plates. Data are mean ± S.E.M (n = 10).
- FIG 13, Inhibitory Activity of Mouse BSA-C67-8 induced Antisera. Cells from a LolP1-sensitive donor were treated with mouse serum (diluted 1/50) and then triggered to release histamine with LolP1. Data are mean ± S.E.M. (n = 10).
- FIG 14, Inhibitory Activity of Mouse Antisera induced by BSA-1078 and BSA 1079.
20 Cells from a LolP1-sensitive donor were treated with mouse serum (BSA and BSA-1078 anti-sera diluted 1/50; BSA-1079 antiserum diluted 1/1250) and then triggered to release histamine with LolP1. Data are mean ± S.E.M. (n = 10).
- FIG 15, Inhibitory Activity of Mouse Antisera induced by HBC-C67-8, HBC-1078, HBC-1079 and HBC-1079gs. Cells from a LolP1-sensitive donor were treated with
25 mouse serum (HBC wild type (wt) and HBC-IgEC67-8 antisera diluted 1/50; HBC-1079 and HBC-1079gs antisera diluted 1/1250) and then triggered to release histamine with LolP1. Data are mean ± S.E.M. (n = 10).
- FIG 16 shows the concentration dependent binding of antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 to IgE.
- 30 FIG 17, shows the concentration dependent inhibition of IgE binding to an FcεR1α/IgG construct with antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 compared to control.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

FIG 18, shows the concentration dependent inhibition of IgE binding to clipped ectodomain of FcεR1α-bound directly to plastic plates, by antibody PTmAb0005, compared to control.

FIG 19, shows IgE binding to FcεR2 (CD23) by antibody PTmAb0005 (GE-1) and PTmAb0011.

FIG 20, shows the concentration-dependent blocking of histamine release from allergic human blood basophils with antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 compared to control.

FIG 21, inhibition of LolP1 triggered histamine release in allergic human basophils by both PTmAb0005 and PTmAb0011.

FIG 22, PTmAb0011 binding to different IgE; (A) PTmAb0011 Binding to Chimaeric IgE; (B) PTmAb0011 Binding to Myeloma IgE; (C) PTmAb0011 Binding to Antigen Orientated IgE; (D) PTmAb0011 Binding to Heat Denatured IgE.

FIG 23, Inhibition of IgE Binding to FcεR1α by PTmAb0011.

FIG 24, Binding of PTmAb0011 to Receptor Bound IgE.

FIG 25, (A) The effect of PTmAb0011 on IgE binding to FcεR2 on RPMI 8866 cells. RPMI 8866 cells (1×10^6 /ml) were incubated for an hour on ice with chimaeric IgE (1 μg/ml) and anti-IgE mAb (10 to 0 μg/ml). The IgE and anti-IgE were pre-incubated for an hour at room temperature prior to addition to the cells. Bound IgE was detected with FITC-goat anti-human IgE. The results show the mean channel fluorescence (MCF) of duplicate samples as determined by flow cytometric analysis of 10,000 live gated events. (B) Non P1 specific antibody PTmAb0017.

FIG 26, The effects of PTmAb0011 on IgE binding to FcεR2 on primary human B-cells. Peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 /ml) were incubated for an hour on ice with chimaeric IgE (1 μg/ml) and anti-IgE mAb (10 to 0 μg/ml; open) or equivalent concentrations of isotype matched control mAb (solid). The IgE and anti-IgE were pre-incubated for an hour at room temperature prior to addition to the cells. Bound IgE was detected with FITC-goat anti-human IgE and the primary B-cells were elucidated with PE-conjugated anti-CD19. The results show the mean channel fluorescence (MCF) of duplicate samples as determined by flow cytometric analysis of 5,000 live gated events.

FIG 27, Effects of PTmAb0011 on IgE secretion from primary human B-cells.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Peripheral blood mononuclear cells (2×10^5 /well) were cultured in medium supplemented with IL-4 (10ng/ml) and anti-CD40 antibody (1 μ g/ml). PTmAb0011 or an isotype matched control mAb were added (1 μ g/ml) for 14 days and then cell supernatant harvested and analysed for total IgE content by ELISA. The results are expressed as a percentage of the amount of IgE secreted in the absence of any antibody.

FIG 28, Anaphylactogenicity of anti-human IgE monoclonal antibodies in allergic (A) and non-allergic (B) human basophils. PBMC from allergic donors or from non-allergic donors passively sensitised with 1 μ g/ml chimeric IgE were treated with mAbs for 30 min. at 37°C. Histamine release was determined by specific EIA. Data are mean of 3 separate experiments each with different donors.

FIG 29, Anaphylactogenicity of anti-human IgE antibodies in sensitised (A) and non-sensitised (B) human lung mast cells. Sensitised or non-sensitised crude human lung mast cell suspensions were treated with antibodies for 45 min. at 37°C. Tryptase release in supernatants was determined by colorimetric assay. Data are means of duplicate determinations from a single representative experiment.

FIG 30, Anaphylactogenicity of anti-human IgE antibodies in RBL J41 cells through human Fc ϵ R1 (A) and mouse Fc ϵ R1 (B). RBL J41 cells were sensitised either with chimeric human IgE or with mouse IgE and treated with antibodies for 30 min. at 37°C. β -hexosaminidase release was determined in supernatants by colorimetric assay. Data are means of triplicate determinations from a single representative experiment.

FIG 31, Inhibition of allergen-triggered histamine release in human basophils by PTmAb0011. PBMC were incubated with PTmAb0011 either directly (allergic assay (A)) or together with IgE (blocking assay (B)) for 30 min. at 37°C. Cells were subsequently triggered with antigen for 30 min. at 37°C and histamine release determined by specific EIA. Data are mean \pm s.e.m. from 3 separate experiments from different donors.

FIG 32, Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis in Monkey skin by PTmAb0011 and PTmAb0005. Monoclonal antibody Dec7B (stanworth decapeptide) was used as a control.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

The present invention is illustrated by but not limited to the following examples.

Part 1 Mimotopes and immunogens of the present invention

5 **Example 1.**

1.1 *Surface exposed epitope identification, chemical conjugation and serological methods*

The surface exposed epitopes of the Ce2 domain of IgE were identified using the modelled structure of human IgE described by Padlan and Davies (*Mol. Immunol.*, 23, 1063-75, 1986). Peptides were identified which were both continuous and solvent exposed. This was achieved by using Molecular Simulations software (MSI) to calculate the accessibility for each IgE amino acid, the accessible surface was averaged over a sliding window of five residues, and thereby identifying regions of the IgE peptides which had an average over that 5-mer of greater than 80Å². The results of the test are shown in figure 1.

Results

From figure 1, and also from repeats of the same procedure using the 1990 Helm et al. model (2IgE model structure deposited 2/10/90 with PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)), there are a number of native peptides which may be used as immunogens for raising antibodies against IgE.

Table 1, Native surface exposed and continuous IgE peptides

<i>Peptide Name</i>	<i>Sequence</i>	<i>Location sequence and IgE Domain</i>	<i>SEQ ID NO.</i>
P1	EDGQVMDVD	Ce2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Ce2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	Ce2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Ce2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Ce2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Ce2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Ce2 (Phe231-Thr235)	7

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

These peptides, or mimotopes thereof, were synthesised and either conjugated to carrier proteins, or put into Hepatitis Core antigen constructs to form recombinant peptide expressing virus-like particles.

5 1.2 Synthesis of IgE peptide/Protein D conjugates using a succinimide-maleimide cross-linker

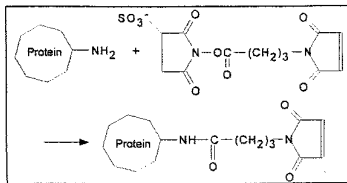
Protein D may be conjugated directly to IgE peptides to form antigens of the present invention by using a maleimide-succinimide cross-linker. This chemistry allows controlled NH₂ activation of carrier residues by fixing a succinimide group. The

10 Maleimide group is a cysteine-binding site. Therefore, for the purpose of the following examples, the IgE peptides to be conjugated require the addition of an N-terminal cysteine.

The coupling reagent is a selective heterobifunctional cross-linker, one end of the compound activating amino group of the protein carrier by an succinimidyl ester and
15 the other end coupling sulphydryl group of the peptide by a maleimido group. The reaction scheme is as the following :

a. Activation of the protein by reaction between lysine and succinimidyl ester :

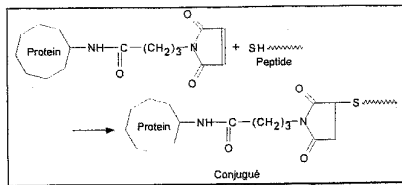
20



WO 00/50460

PCT/EP00/01455

- b. Coupling between activated protein and the peptide cysteine by reaction with the maleimido group :



5

1.3 Preparation of IgE peptide-Protein D conjugate

The protein D is dissolved in a phosphate buffer saline at a pH 7.2 at a concentration of 2.5 mg/ml. The coupling reagent (N-[γ -maleimidobutyryloxy] succinimide ester - GMBS) is dissolved at 102.5 mg/ml in DMSO and added to the protein solution. 1.025 mg of GMBS is used for 1 mg of Protein D. The reaction solution is incubated 1 hour at room temperature. The by-products are removed by a desalting step onto a sephacryl 200HR permeation gel. The eluant used is a phosphate buffer saline Tween 80 0.1 % pH 6.8. The activated protein is collected and pooled. The peptides (as identified in table 1 or derivatives or mimotopes thereof) is dissolved at 4 mg/ml in 0.1 M acetic acid to avoid di-sulfide bond formation. A molar ratio of between 2 to 20 peptides per 1 molecule of activated Protein D is used for the coupling. The peptide solution is slowly added to the protein and the mixture is incubated 1 h at 25°C. The pH is kept at a value of 6.6 during the coupling phase. A quenching step is performed by addition of cysteine (0.1 mg cysteine per mg of activated PD dissolved at 4 mg/ml in acetic acid 0.1 M), 30 minutes at 25°C and a pH of 6.5. Two dialyses against NaCl 150 mM Tween 80 0.1 % are performed to remove the excess of cysteine or peptide.

The last step is sterilising filtration on a 0.22 μ m membrane. The final product is a clear filtrable solution conserved at 4°C. The final ratio of peptide/PD may be determined by amino acid analysis.

25

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

In an analogous fashion the peptides of the present invention may be conjugated to other carriers including BSA.

A mimotope of P1 was synthesised CLEDGQVMDVDLL (P15, SEQ ID NO. 8)

5 which was conjugated to both Protein D and BSA using techniques described above.

1.4 ELISA methods

Anti-peptide or Anti-peptide carrier ELISA

The anti-peptide and anti-carrier immune responses were investigated using an ELISA technique outlined below. Microtiterplates (Nunc) are coated with the specific antigen in PBS (4° overnight) with either: Streptavidin at 2µg/ml (followed by incubation with biotinylated peptide (1µM) for 1 hour at 37°C), Wash 3X PBS-Tween 20 0.1%. Saturate plates with PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1% (Sat buffer) for 1 hr at 37°. Add 1° antibody = sera in two-step dilution (in Sat buffer), incubate 1 hr 30 minutes at 37°. Wash 3X. Add 2° anti-mouse Ig (or anti-mouse isotype specific monoclonal antibody) coupled to HRP. Incubate 1 hr at 37°. Wash 5X. Reveal with TMB (BioRad) for 10 minutes at room temperature in the dark. Block reaction with 0.4N H₂SO₄.

Method for the Detection of Anti-Human IgE Reactivity in Mouse Serum (IgE plate bound ELISA)

ELISA plates are coated with human chimaeric IgE at 1µg/ml in pH 9.6 carbonate/bicarbonate coating buffer for 1 hour at 37°C or overnight at 4°C. Non-specific binding sites are blocked with PBS/0.05% Tween-20 containing 5% w/v Marvel milk powder for 1 hour at 37°C. Serial dilutions of mouse serum in PBS/0.05% Tween-20/1% w/v BSA/4% New Born Calf serum are then added for 1 hour at 37°C. Polyclonal serum binding is detected with goat anti-mouse IgG-Biotin (1/2000) followed by Streptavidin-HRP (1/1000). Conjugated antibody is detected with TMB substrate at 450nm. A standard curve of PTmAb0011 is included on each plate so that the anti-IgE reactivity in serum samples can be calculated in µg/ml.

30

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Method for the Detection of Anti-Human Receptor-Bound IgE Reactivity in Mouse Serum

ELISA plates are coated with recombinant human FcεR1α at 0.5μg/ml in pH 9.6 carbonate/bicarbonate coating buffer for 1 hour at 37°C or overnight at 4°C. Non-specific binding sites are blocked with PBS/0.05% Tween-20 containing 5% w/v Marvel low fat milk powder for 1 hour at 37°C. Human IgE at 1μg/ml is then added for 1 hour at 37°C. Serial dilutions of mouse serum in PBS/0.05% Tween-20/1% w/v BSA/4% New Born Calf serum are then added for 1 hour at 37°C. Polyclonal serum binding is detected with goat anti-mouse IgG-Biotin (1/2000) followed by Streptavidin-HRP (1/1000). Conjugated antibody is detected with TMB substrate at 450nm. A standard curve of PTmAb0011 is included on each plate so that the anti-IgE reactivity in serum samples can be calculated in μg/ml.

Competition of IgE Binding with Mimotope Peptides, Soluble IgE or PTmAb0011

Single dilutions of polyclonal mouse serum are mixed with single concentrations of either mimotope peptide or human IgE in a pre-blocked polypropylene 96-well plate. Mixtures are incubated for 1 hour at 37°C and then added to IgE-coated ELISA plates for 1 hour at 37°C. Polyclonal serum binding is detected with goat anti-mouse IgG-Biotin (1/2000) followed by Streptavidin-HRP (1/1000). Conjugated antibody is detected with TMB substrate at 450nm. For competition between serum and PTmAb0011 for IgE binding, mixtures of serum and PTmAb0011-biotin are added to IgE-coated ELISA plates. PTmAb0011 binding is detected with Streptavidin-HRP (1/1000).

1.5 Human Basophil Assays

Two types of assay were performed with human basophils (HBA), one to determine the anaphylactogenicity of the monoclonal antibodies, consisting of adding the antibodies to isolated PBMC; and a second to measure the inhibition of *Lol P I* (a strong allergen) triggered histamine release by pre-incubation of the HBA with the monoclonal antibodies.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Blood is collected by venepuncture from allergic donors into tubes containing 0.1 volumes 2.7% EDTA, pH 7.0. It is then diluted 1/2 with an equal volume of HBH medium containing 0.1% human serum albumin (HBH/HSA). The resulting cell suspension is layered over 50% volume Ficoll-Paque and centrifuged at 400g for 30 minutes at room temperature. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) layer at the interface is collected and the pellet is discarded. The cells are washed once in HBH/HSA, counted, and re-suspended in HBH/HSA at a cell density of 2.0×10^6 per ml. 100 μ l cell suspension are added to wells of a V-bottom 96-well plate containing 100 μ l diluted test sample or monoclonal antibody. Each test sample is tested at a range of dilutions with 6 wells for each dilution. Well contents are mixed briefly using a plate shaker, before incubation at 37°C for 30 minutes with shaking at 120 rpm.

For each serum dilution 3 wells are triggered by addition of 10 μ l *Lol p 1* extract (final dilution 1/10000) and 3 wells have 10 μ l HBH/HSA added for assessment of anaphylactogenicity. Well contents are again mixed briefly using a plate shaker, before incubation at 37°C for a further 30 minutes with shaking at 120 rpm. Incubations are terminated by centrifugation at 500g for 5 min. Supernatants are removed for histamine assay using a commercially available histamine EIA measuring kit (Immunotech). Control wells containing cells without test sample are routinely included to determine spontaneous and triggered release. Wells containing cells + 0.05% Igepal detergent are also included to determine total cell histamine.

The results are expressed as following:

Anaphylactogenesis assay

Histamine release due to test samples =
% histamine release from test sample treated cells – % spontaneous histamine release.

Blocking assay

The degree of inhibition of histamine release can be calculated using the formula:

% inhibition
= $1 - \frac{\text{histamine release from test sample treated cells}^*}{\text{histamine release from antigen stimulated cells}^*} \times 100$

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Values corrected for spontaneous release.

Example 2. *Immunisation of mice with P15 conjugates (P15-BSA or P15-PD) induces production of anti-human IgE antibodies.*

5

The conjugates comprising the mimotope P15 (25µg protein/dose), described in 1.4, were administered into groups of 10 BalbC mice, adjuvanted with and oil in water emulsion containing QS21 and 3D-MPL described in WO 95/17210. Boosting was

10 be performed on day 21 and on day 42 and sera can be harvested on day 42 and 56. The immune response anti-peptide and anti-plate bound IgE was followed using methods described in Example 1.

Results

15 The results for anti peptide and anti-IgE responses measured at day 14 post third vaccination are shown in table 2.

Table 2, P15 Immunogenicity results

Mimotope conjugate	Anti-peptide responses (Mid point titre)			Anti-IgE responses (µg/ml (PTmAb0011))		
	Average	Std Dev.	Geomean	Average	Std Dev.	Geomean
P15-PD (n=16)	41391	26858	36154	1.6	4.5	0.3
P15-BSA (n=10)	49591	9259	48719	2.2	2.5	1.0

20 **Example 3.** *Anti-IgE induced in mice after immunisation with conjugate are non anaphylactogenic*

Several dilutions of complete sera or IgG purified from conjugate immunised mice can be tested in presence of basophils from freshly harvested peripheral blood from allergic patients.

25

The anaphylactogenicity can be evaluated by the measuring of the histamine released induced by the antibodies to be tested as described below:

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

- Erythrocytes are removed from peripheral blood on glucose dextran gradient
 - Cells are washed and plated with samples to be tested (for example allergen, antibodies, allergen plus antibodies,...)
 - After incubation , supernatants are collected and histamine release is measured
- 5 according to manufacturer's instructions (Immunotech , histamine enzyme immunoassay kit)

Neither antiserum generated with P15-BSA or P15-PD was shown to be anaphylactogenic.

- 10 **Example 4, Anti-IgE induced in mice after immunisation with conjugate are capable of blocking IgE mediated histamine release induced by allergen triggering of basophil from allergic patient.**

Histamine release can be measured in basophil samples triggered with various concentrations of allergen in presence or absence of several dilutions of complete sera or IgG purified from conjugate immunised mice. Blocking activity of anti-P15 antibodies in the antiserum was evaluated by the measuring of the inhibition of the histamine release induced by the allergen. Histamine release and inhibition was measured as described in example 3. As P15 is a mimotope of P1, PTmAb0011 was used as a control as it is known to bind to the same epitope (P1). The results are shown in table 3.

Table 3, Histamine release inhibition from allergic human basophils

Antiserum	Dilution	% inhibition of histamine release
P15-PD (mouse 4.12)	1/30	79
P15-PD (mouse 4.5)	1/30	57
P15-BSA (mouse 7.3)	1/30	67
P15-BSA (mouse 7.5)	1/30	57
PTmAb0011	0.1µg/ml	56
PTmAb0011	1µg/ml	90
anti-BSA serum	1/30	40
anti-PD serum	1/30	40

25

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Example 5, Immunogenicity of Mimotopes of P2 and P3

The following mimotopes were conjugated to BSA using techniques described in example 1.2, and mice were immunised with the conjugates using the same formulation and schedule as that described in example 2.

P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 mimotope	SEQ ID NO. 24
P17	CSQKHWSLDR-T-NH ₂	P3 mimotope	SEQ ID NO. 26

The mice were bled after the last immunisation and tested for anti-IgE reactivity in the IgE plate bound ELISA. The individual, average (Av), geometric (GM), results are summarised below (SD = standard deviation).

Table 4, P16 and P17 immunogenicity results

Anti peptide immune responses/mouse (14 days after third vaccination), Mid point titres.													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Av	SD	GM
P 1 6	1891	649	1299	2349	591	1474	4605	918	4177	865	1882	1436	1478
P 1 7	100	4349	2850	3434	6133	2231	5085	2991	13070	8874	5446	3515	4656

Example 6, Production of mimotopes of P1, and immunogenicity/functional activity thereof**6.1 Production of immunogens**

Mimotopes of P1 were derived either by phage display techniques or by rational design by molecular modelling of the C-D loop of Cε2 domain of IgE. The following

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

peptides were synthesised and formulated into both BSA-peptide conjugates and also into HepB core antigen recombinant constructs.

Name of peptide	Sequence	SEQ ID NO.	
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 mimotope	12
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	P1 mimotope	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 mimotope	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 mimotope	16

- 5 The peptides/protein carrier constructs were produced as follows. Acylhydrazine peptide derivatives were prepared on the solid phase as shown in scheme 1 (Figure 2). These peptide derivatives can be readily prepared using the well-known 'Fmoc' procedure, utilising either polyamide or polyethyleneglycol-polystyrene (PEG-PS) supports in a fully automated apparatus, through techniques well known in the art
- 10 [techniques and procedures for solid phase synthesis are described in 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach' by E. Atherton and R.C. Sheppard, published by IRL at Oxford University Press (1989)]. Acid mediated cleavage afforded the linear, deprotected, modified peptide. This could be readily oxidised and purified to yield the disulphide-bridged modified epitope using methodology outlined
- 15 in 'Methods in Molecular Biology, Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols (ed. M.W. Pennington and B.M. Dunn), chapter 7, pp91-171 by D. Andreau et al.

The peptides thus synthesised can then be conjugated to protein carriers (in this case Bovine Serum Albumin, BSA) using the following technique:

20

6.2 Modified Carrier Synthesis

- Introduction of the aryl aldehyde functionality utilised the succinimido active ester (BAL-OSu) prepared as shown in scheme 2 (FIG 3, see WO 98/17628 for further details). Substitution of the amino functions of BSA (bovine serum albumin) to ~50%
- 25 gave routinely soluble modified protein. Greater substitution of the BSA led to insoluble constructs. BSA and BAL-OSu were mixed in equimolar concentration in DMSO/buffer (see scheme 3, FIG. 3) for 2 hrs. This experimentally derived protocol

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

gave ~50% substitution of BSA as judged by the Fluorescamine test for free amino groups.

6.3 Peptide-BSA construct:

Simple combination of modified peptide and derivatised BSA afforded peptide-BSA constructs readily isolated by dialysis (scheme 4, FIG. 4). SDS-PAGE was used to confirm an increase in molecular weight.

6.4 Hepatitis Core antigen constructs

Hepatitis Core antigen recombinant constructs (HBC) were also prepared, using molecular biology techniques described in EP 0 421 635 B. In these HBC experiments PT1079 was modified to remove the terminal lysine.

Peptide	Sequence	SEQ ID NO.
PT1078HBC	CLEDGQVMDVDCPREAAEGD	65
PT1079HBC	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	66

The expression of the P1-mimotope peptides was confirmed by BIAcore experiments with PTmAb0005 and PTmAb0011. The immunogenicity results were generated using doses of only 3 µg/dose of HBC.

6.5 Immunogenicity studies

The mimotope/HBC and mimotope/BSA constructs were purified and formulated into vaccines and adjuvanted with an oil in water emulsion containing QS21 and 3D-MPL described in WO 95/17210 the (25µg BSA conjugate dose). These vaccines were administered into groups of 10 BalbC mice, and boosting was performed on day 14 and on day 28 and sera was harvested on day 42. The immune response to anti-plate bound IgE and receptor orientated IgE, was then followed using the techniques described in example 1.4. Also, the activity of the antiserum in the inhibition of histamine release from allergic basophils was measured in the techniques described in 1.5.

6.6 Results

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

All BSA and HBC constructs induced high titres of anti-IgE antibodies, when the IgE was bound directly to the ELISA plate, and when orientated on the high affinity receptor. Moreover, all of these responses were confirmed to be specific, in that they were competed by free IgE and the mimotope itself, and not by non-specific peptides.

- 5 The anti-IgE induced by these immunogens were capable of inhibiting histamine release from human basophils derived from an allergic donor (rye grass, LOLP1).

For the results for C67-8 see figures 5, 6, 13 and 15. For the results for PT1078 see figures 9, 10, 14 and 15. For the results for PT1079 see figures 7, 8, 14 and 15. For the results for PT1079GS see figures 11, 12 and 15.

Moreover, the immune responses generated by these peptide mimotopes were not anaphylactogenic.

Table 5. Anaphylactogenicity of the P1 mimotope antisera

Immunogen	Serum Dilution	% Histamine Release
Spontaneous Release		0.25 ± 0.06
Naïve serum	1/50	1.9 ± 0.4
BSA	1/50	2.15 ± 0.65
BSA-IgE C67-8	1/50	2.9 ± 1.1
BSA-1078	1/50	5.00 ± 1.40
BSA-1079	1/1250	0.43 ± 0.04
HBCwt	1/50	3.5 ± 1.0
HBC-1079	1/1250	0.12 ± 0.04
HBC-1079gs	1/1250	0.02 ± 0.02
HBC-IgE C67-8	1/50	2.14 ± 0.26

- 15 *Footnote to table.* Cells from a LolP1-sensitive donor were treated with diluted mouse serum for 30 mins. Released histamine was determined by a commercially available histamine specific EIA. Data are mean ± S.E.M. (n = 10).

Part 2 *Ligands that bind to the epitopes and mimotopes of the present invention*

- 20 Peptide immunogens are described in part 1, which after administered to a mammal in the form of a vaccine, induce immune responses which (a) recognise IgE, and (b) are capable of inhibiting histamine release in vitro. Part 2 describes ligands that are capable of binding to the epitopes or mimotopes of the present invention, and

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

describes their function. Two monoclonal antibodies have been identified, PTmAb0005 and PTmAb0011, which recognise the c-d loop of Cε2 of IgE. Mimotopes of this peptide have been shown in part 1 to be immunogenic and functional in active vaccination. This section describes the characterisation of these
5 monoclonal antibodies and provides evidence of their utility in passive vaccination.

The target epitope of the antibodies was identified using phage panning techniques, namely sequence alignment of multiple bacteriophage targets, and subsequently refined and confirmed by domain mapping and site directed mutagenesis. The
10 functional activity of the antibodies has been confirmed not only *in vitro* by assaying for anti-IgE recognition and inhibition of allergic mediator release; but also *in vivo* in monkey Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) studies.

Example 7,

15 7.1 Phage mapping of monoclonal antibody target

Phage display libraries were used to map the binding sites of the monoclonal antibodies using three different phage libraries, displaying either the XCX₁₅, XCX₁₀ or XAX₁₀ peptide sequence (where X is any amino acid) at the N-terminus of the phage gVIIIp. Tables 6 and 7 show the results of selecting for peptide ligands with the anti
20 human IgE monoclonal antibodies PTmAb0005 and respectively. Amino acid pattern similarities between the peptides and human IgE revealed a strong homology match with the c-d loop in the Cε2 domain of IgE. The homology pattern produced from the phage returns was: Q h h a h a h (where h = hydrophobic amino acid and a = acidic amino acid) and this aligned to the sequence QVMDVDL (SEQ ID NO. 17) in the C-
25 D loop of the human IgE Cε2 domain.

IgEC67, the peptide derived from phage panning experiments and which had the highest affinity to PTmAb0005 was also epitope mapped. This was performed by introducing random mutations by PCR mutagenesis and sub-cloning into the Fuse 5
30 vector for minor filamentous phage protein gIIIp display. The IgEC67 mutants were ranked in order of binding to PTmAb0005, as shown in Table 8. These, and other

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

results, confirmed the importance of the amino acids within IgEC67 which aligned with the Cε2 epitope. For example the L8P, D10G, L11M, E12G and L13R mutants all reduced binding to the anti-IgE PTmAb0005 (Data not shown). Mutations in other sites had little effect on the affinity to PTmAb0005.

5

Random sub-libraries were made of the highest affinity PTmAb0005 and PTmAb0011 phage display derived peptides to enhance the affinity of the peptide to the antibodies by adapting methods described previously (Yu, J. and Smith, G. P. (1996) "Affinity maturation of phage-displayed peptide ligands." Methods in Enzymology, 267, 3-27). This involved a DNA sub-cloning transfer from the major coat protein (gVIIIp) filamentous phage display vector to a lower copy number minor coat protein (gIIIp) display vector with a random PCR step. Sub-libraries were made of several phage sequences including the highest affinity PTmAb0005 ligand IgEC67 and IgE C67-8. Affinity matured sequences for C67 and C67-8 are shown in tables 8 and 9 respectively. Included in the tables are ranking orders and also BIAcore affinities where available. IgEC67-8 capable of inducing an anti-human IgE response in mice when the peptide expressing phage was used as an immunogen.

10

15

7.2 Confirmation of target by domain mapping

A number of constructs were generated in order to map the binding specificities of PTmAb0005 and PTmAb0011 with respect to the IgE constant domains. The following constructs were generated: Cε2-4, Cε2-3, Cε3-4, Cε3-4L (Cε3-4 plus linker sequence between domains Cε2 and Cε3) and Cε2 alone.

20

25

30

Fragments encompassing various domain(s) of human IgE Fc were cloned using cDNA derived from the hybridoma line JW8/5/13, which expresses a chimaeric human IgE (Neuberger, MS et al (1985) Nature 314 268-270; Bruggemann, M et al (1987) J Exp Med 166 1351-61). The IgE Fc fragments were amplified using appropriate primer pairs and JW8/5/3 cDNA as template. The cε2-4 fragment encodes amino acids (aa) S225-K547. The cε3-4 fragment encodes aa G335-547. The cε3-4L fragment (domains 3 - 4 plus the linker sequence that joins cε2 to cε3) encodes aa E322-K547. The cε2-3 fragment encodes aa S225-G436. The cε2 fragment encodes aa

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

S225-S324. All constructs contain a COOH terminal hexahistidine tail for detection and purification purposes. These fragments were cloned into a eukaryotic expression vector in frame with a CD33 derived leader encoding sequence to direct secretion of the expressed fragment. This enabled expression in mammalian cell lines. The vector was derived from pcDNA3.1+ (Invitrogen). To express the cloned fragments, the appropriate clones were transfected into COS-7 cells and the resulting conditioned medium harvested 48-60 hours post transfection.

The binding of PTmAb0005 and PTmAb0011 to the expressed IgE domains was investigated by ELISA assay, by binding the constructs to an ELISA plate followed by incubation with the monoclonal antibodies, and revelation with an anti-mouse antibody. Also, binding to denatured constructs was investigated by the well known technique of Western blot.

The results for PTmAb0005 showed strong binding to Cε2-4, Cε2-3 and Cε2 in their native forms, and also bound to Cε2-4 and Cε2 after denaturation in western blot. No binding to Cε3-4 or Cε3-4L was observed in either assay.

PTmAb0011 also bound to Cε2-4, Cε2-3 and Cε2 in their native form; and also bound to Cε2-4 and Cε2 in their denatured forms.

It is clear therefore that both antibodies recognised a target epitope present in the Cε2 domain of IgE.

7.3 Confirmation of target by site directed mutagenesis

Domain mapping studies demonstrated that both mAbs were able to bind to the Cε2 domain alone. Analysis of sequences derived from biopanning of phage displayed peptide libraries revealed that PTmAb0005 derived sequences showed striking similarity to P1. This region forms a loop between the C-D β strands of Cε2 in the IgE model structure. Site-directed mutagenesis studies were undertaken to validate this sequence as the epitope for PTmAb0005 and PTmAb0011.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Analysis of the panned phage sequences and a comparison of the IgE model structure (Helm *et al* 1990, *supra*) with the known structure of human IgG1 Fc (Deisenhoffer, J., 1981, *Biochemistry*, 20, 2361-2370) led to the identification of three residues that were likely to be involved in antibody recognition. These residues are glutamine (Q) 273, methionine (M) 275 and aspartate (D) 276. Each of these was changed to alanine (A) and at least one other amino acid residue as shown below.

Q273: A and E (glutamate)

M275: A; Q and K (lysine)

D276: A and N (asparagine)

The alanine mutations changed both the structure and chemistry of the target residue whilst the other mutations maintained structure (as closely as possible) but altered the charge, e.g Q273E. Here, glutamate has essentially the same structure as glutamine but is negatively charged instead of neutral.

Each mutation was generated independently in a Cε2-4 construct. Each mutant polypeptide was expressed to a similar level as the wild type (WT) Cε2-4 and each was able to bind to recombinant FcεR1α ectodomain as efficiently as the WT Cε2-4 product in ELISA based assays. Together, these data demonstrated that the mutations had no effect on the production/secretion of the polypeptides in the expression system and did not grossly affect the structure of the Cε2-4 fragment.

All mutations essentially abrogated binding to both PTmAb0005 and PTmAb0011 except D276N which reduced binding to PTmAb0005 by only ~50% (Table 10). Mutation of an alternative glutamine residue within Cε2, Q317, was carried out to act as a control in these experiments. Q317E and Q317K mutants were generated and found to have no affect on the ability of PTmAb0005 and PTmAb0011 to recognise Cε2-4. Similarly, recognition of FcεR1α was not affected.

Thus, the binding activities of PTmAb0005 and PTmAb0011 are specifically affected by mutations within the C-D loop of Cε2.

In summary, the sequence P1 comprises the major binding determinant for both PTmAb0005 and PTmAb0011.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Table 10, recognition of IgE domain constructs by PTmAb0005 and PTmAb0011.

Mutation	Recognition by PTmAb0005	Recognition by PTmAb0011	Recognition by FcεR1α ectodomain
WT ce2-4	++++	++++	++++
Q273A	-	-	++++
Q273E	-	-	++++
M275A	+/-	+/-	++++
M275Q	+/-	+/-	++++
M275K	+/-	+/-	++++
D276A	-	-	++++
D276N	++	-	++++
Q317E	++++	++++	++++
Q317K	++++	++++	++++

7.4 Refined modelling of the C-D loop of IgE Cε2

As the exact structure of human IgE has not been determined yet (although a model is available) there are likely to be errors in this model structure after inspection at a detailed level. The present inventors, therefore, have refined this model of the Cε2 loop region of IgE by mapping this loop onto the equivalent region of Cγ2 of human IgG1 (Deisenhoffer J 1981 *supra*).

10 From this new information about the confines of the structural features, a cyclised peptide was designed which when synthesised should adopt a conformation which closely resembles that of the C-D loop of Cε2 in the context of the full IgE molecule. This peptide, Ac-CLEDGVQMDVDLCPREAAEGDK(Ac)-NH₂, was named PT1079 (SEQ ID NO. 14).

15

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

The affinity of PT1079 to both PTmAb0005 and PTmAb0011 was measured using a BIAcore technique and was found to exhibit very strong recognition to both of these monoclonal antibodies (recognised by both PTmAb0005 and PTmAb0011 with apparent affinities of ~20nM and ~250nM respectively). Control, derivative peptides of PT1079, where the site of cyclisation was shifted by only one amino acid residue, thereby decreasing the length of peptide between the cyclisation sites by one amino acid residue (PT1078), reduced the binding of the peptide to either PTmAb0005 or PTmAb0011. Also, PT1078 was modified such that an additional residue was added so that the loop region had the same number of residues as PT1079, however this modification failed to restore binding to PTmAb0005 or PTmAb0011. Thus indicating the importance of correct presentation of the peptides of the present invention to adopt a shape which closely resembles the native target in the context of the whole IgE molecule.

mimotopes	phage	C I N K Q M A D L E L C	sp'l pos.
	model	C M N K Q L A D L E L C	-- C67-8
		K C R E W L G E S E T I M D C	-- C67
		C E D G Q V M D V D L C	-- EEC39-I
			-- PT1079
epitope		y h(x x x)d h h a n a n(x x x)y	<u>pattern</u>
		(0-3) (0-3)	(δ/i)
		W E D G [] S	C _ε 2 c _d loop

Underlined - has been verified by site-directed mutagenesis.

15

Summary

The work described herein shows that the monoclonal antibodies PTmAb0005 and PTmAb0011 specifically recognise P1. These antibodies have been used in phage display studies to identify mimotopes of the c-d loop of the Cε2 domain of IgE which are recognised by the monoclonal antibodies with high affinity.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

7.5 *Functional characteristics of characteristics of PTmAb0005 and PTmAb0011*

The following experiments describe the functional characteristics of PTmAb0005 and
5 PTmAb0011. Accordingly, the use of the targets of these antibodies will induce
PTmAb0005 and PTmAb0011 like immune responses. The vaccination using these
peptide based immunogens will, therefore, have the same functional characteristics.

Example 8,

10

8.1 *Materials and Methods*

8.1.1 *FcεRIα binding assay (Protein A plates)*

In this assay, a recombinant form of the ectodomain of the alpha chain of the high
affinity receptor for IgE (alpha ectodomain) is utilised to bind chimaeric IgE. The
15 carboxyl terminus of the alpha ectodomain is fused to a human IgG1 Fc sequence.
This enables the recombinant molecule to be bound to protein A coated microtitre
plates via the Fc region. Hence, the majority of the alpha ectodomain molecules
should be available for binding ligand and provides a system for the analysis of IgE -
receptor interactions. The format described below is aimed at detecting the (high
20 affinity) receptor blocking activity of anti-IgE antibodies.

8.1.2 *ELISA protocol for detection of binding of IgE to the alpha chain ectodomain of
the high affinity receptor*

Coat protein A plates with 100µl/well α-ecto-Ig fusion protein diluted to 0.25µg/ml in
25 blocking buffer (PBS/5% BSA/0.05% Tween-20). Incubate 1 hour at 37°C. Dilute
chimaeric IgE to 0.03125µg/ml in 10% pig serum. Dilute anti-IgE antibody to
appropriate test concentration(s) in this IgE solution. Incubate 1 hour at room
temperature. Wash plates three times with PBS/0.05% Tween-20 using plate washer.
Add 100µl/well of IgE:anti-IgE solution (quadruplicates of each anti-IgE
30 concentration are assayed). Incubate 1 hour at 37°C. Wash plates three times with
PBS/0.05% Tween-20 using plate washer. Add 100µl/well of goat anti-mouse lambda
chain HRPO conjugated antibody diluted 1:6000 dilution in blocking buffer. Incubate

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

1 hour at 37°C. Wash plates three times with PBS/0.05% Tween-20 using plate washer. Add 200µl/well of OPD substrate and incubate at room temperature in the dark for 2-10 minutes. Stop the reaction by the addition of 25µl 25% H₂SO₄. Mix stopped reactions on plateshaker – SLOW speed. Read OD at 490nm.

5

A figure for the percentage of inhibition of binding of IgE to its receptor can be calculated. A maximum binding value for IgE is determined from the average of a set of wells that contained IgE in 10% pig serum alone (i.e no anti-IgE).

10 The % inhibition value is calculated thus:

$$(\text{max IgE value} - \text{average of anti-IgE replicates}) / \text{max IgE value} \times 100$$

8.1.3 FcεRIα binding assay (Clipped ectodomain)

15 This assay is essentially identical to the previous assay except that the FcεRIα ectodomain/IgG construct is treated with the proteolytic enzyme Factor X to cleave the two moieties. The IgG Fc moiety is removed using protein A beads, and the Factor X is removed using streptavidin beads, thus leaving an essentially pure alpha chain ectodomain product. In this assay format, the alpha ectodomain is bound directly to
20 plastic microtitre plates, all other assay details are as described above.

8.1.4 CD23-binding assay (FcεRII, low affinity receptor).

This assay was performed on either RPMI 8866 cells or primary human B-cells; two formats may be used, one for the detection of mAbs that bind to IgE associated with
25 FcεRII, and a second that analysed whether the mAbs interfered with IgE association with FcεRII. For the first assay cells were loaded with chimaeric IgE (1 µg/ml) for an hour on ice in PBS, 1% FBS, 0.1% NaN₃. Excess IgE was removed and anti-IgE mAb added. Bound mAb was elucidated with FITC-conjugated rat anti-mouse IgG₁ antibody. For the second assay, chimaeric IgE (1 µg/ml) was pre-incubated with anti-
30 IgE mAb for an hour at room temperature, with gentle mixing, prior to addition to the cells. The mixture was incubated with the cells for an hour on ice and then washed to remove unbound IgE. Bound IgE was detected with FITC-goat anti-human IgE or

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

bound anti-IgE mAb was detected with FITC-conjugated rat anti-mouse IgG₁ antibody. Where studies were performed on PBMCs, constituent B-cells were identified with a PE-conjugated anti-CD19 antibody. Samples were analysed by flow cytometry.

5

8.2 Results

The results for both PTmAb0005 and PTmAb0011 are shown in figures 16 to 21.

Figure 16 shows the concentration dependent binding of monoclonal antibody to plate bound IgE. Figure 17 shows the concentration dependent inhibition of IgE binding to an FcεR1α/IgG construct with PTmAb0005 and PTmAb0011. Figure 18 shows the inhibition of IgE binding to clipped ectodomain of FcεR1α-bound directly to plastic plates, by antibody PTmAb0005 and PTmAb0011. Figure 19 shows the lack of inhibition of IgE binding to FcεRII (CD23) by antibody PTmAb0005 (clone GE-1) and PTmAb0011. Figure 20 and 21, shows the concentration-dependent blocking of histamine release from allergic human blood basophils with antibody PTmAb0005 and PTmAb0011.

PTmAb0011 is a mouse monoclonal antibody with specificity for human IgE, showing no cross-reactivity with other human Ig isotypes or rat/mouse IgE. PTmAb0011 binds to both native and heat-treated IgE, when bound to an ELISA plate in a random orientation, indicating that its recognition site on IgE is not heat labile. PTmAb0011 also recognises IgE when bound via antigen to the ELISA plate. Importantly this mAb can completely block the interaction between human IgE and the α-chain binding component of the high affinity IgE receptor (*FcεRI*). However, this mAb still recognises human IgE when pre-bound to FcεRI, indicating that the mAb binding site is not lost upon receptor binding.

Example 9,

9.1 Analysis of IgE binding properties of PTmAb0011 by normal and Antigen orientated ELISA

As described in Example 1, the normal IgE binding ELISA method was performed by coating plates with human chimaeric IgE, myeloma IgE, human Ig isotypes or rodent

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

IgE (1 µg/ml in pH 9.6 carbonate/bicarbonate coating buffer). For antigen orientated ELISAs, NP-BSA was coated at a saturating concentration prior to the addition of chimaeric IgE (1 µg/ml). Alternatively, soluble human FcεRI α-chain was coated (0.25 µg/ml) followed by chimaeric IgE. The remaining ELISA was carried out as described in Experiment 1 (ELISA protocol for the detection of mouse anti-human IgE mAbs).

9.2 Results

Figure 22 illustrates that PTmAb0011 binds to both human/mouse chimaeric IgE and human myeloma IgE when bound to an ELISA plate in a random orientated manner. Similarly, binding to antigen orientated IgE (i.e IgE bound to plate bound NP-BSA) is dose dependent. PTmAb0011 was also analysed for its ability to recognise chimaeric IgE following heat treatment at 56°C for a range of time periods. Figure 22 also shows that the binding capacity of PTmAb0011 for IgE is unaffected by heat treatment.

The mAb characterisation was further extended to determine whether PTmAb0011 was able to inhibit the interaction of IgE with the α-chain component of the high affinity IgE receptor (Fig 23). Pre-incubation of IgE with PTmAb0011 prior to addition to plate bound FcεRI α-chain, resulted in a dose dependent inhibition of the interaction of IgE with FcεRI α-chain. PTmAb0011 was also (Figure 24) recognises FcεRI α-chain associated IgE in a dose dependent manner.

Example 10

10.1 Analysis of IgE secretion from primary human B-cells

PBMCs were plated at 2×10^5 cells per well in 96 U-well plates, in medium supplemented with both IL-4 and anti-CD40. PTmAb0011 or isotype matched control mAb was added and cells incubated for 14 days prior to harvesting of supernatants for IgE analysis. Total IgE levels were measured by coating ELISA plates with rabbit anti-human IgE antibody (10 µg/ml) in 0.5M carbonate/bicarbonate buffer (pH9.6). Washed plates were blocked with PBS, 0.05% Tween 20, 5% BSA. Both cell supernatants and IgE standard were incubated with saturating amounts of

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

PTmAb0011 (10 μ g/ml) for an hour at room temperature prior to addition to the ELISA plate to allow for IgE/anti-IgE complexes to be formed. Following incubation and washing steps, bound IgE was detected with HRP-sheep anti-human IgE, followed by OPD substrate. Levels of IgE in the cell supernatants were then estimated relative to the standard curve.

10.2 Results

IgE was pre-incubated with PTmAb0011 over a dose range from 10 μ g/ml to 0.5 μ g/ml and examined for its effect on subsequent IgE binding to Fc ϵ R1I on the human B-cell line RPMI8866. Figure 25 illustrates that pre-incubation of IgE with PTmAb0011 enhances IgE binding to Fc ϵ R1I. A non P1 specific monoclonal antibody (PTmAb0017) did not enhance the binding of IgE to the Fc ϵ R1I receptor. PTmAb0011 also enhances IgE binding to Fc ϵ R1I on primary B-cells (Figure 26).

15 10.3 Effects of PTmAb0011 on IgE secretion from primary human B-cells

Peripheral blood mononuclear cells were cultured with PTmAb0011, in the presence of additional IL-4 and anti-CD40 antibody to promote B-cell isotype switch to IgE secretion. An ELISA assay was developed that allowed for measurement of total IgE levels, that is free IgE and PTmAb0011 complexed IgE. To achieve such quantitation secreted IgE was pre-incubated with saturating levels of PTmAb0011 to allow for all of the IgE to be complexed. The total IgE within the tissue culture supernatant was quantitated relative to a standard curve of IgE that had also been complexed with saturating levels of PTmAb0011. Figure 27, illustrates that in three different donors, incubation of primary B-cells with PTmAb0011 (1 μ g/ml) resulted in a significant reduction in the total levels of secreted IgE. No such inhibition was seen with the isotype matched control antibody.

10.4 Determination of histamine release from human basophils

Two assay formats were adopted. BMC from non-allergic donors were passively sensitised with 1 μ g/ml chimeric IgE for 30min at 37°C, washed and treated with monoclonal antibodies for 30min at 37°C. Alternatively BMC from LolP1-sensitive

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

donors were treated directly with monoclonal antibodies for 30min at 37°C. Reactions were terminated by centrifugation. Histamine release in cell supernatants was determined by specific immunoassay (Immunotech 2562). Total cellular histamine content was determined in cells lysed with 0.5% Igepal detergent.

5

10.5 Basophil blocking assay

The ability of anti-IgE antibodies to block binding of chimeric IgE to FcεR1 on human basophils was determined by incubation of PBMC from non-allergic donors with chimeric IgE in the presence of monoclonal antibodies and IL-3 for 30min at 37°C. Cells were washed and histamine release was triggered with NP-BSA for a further 30min at 37°C. Reactions were terminated by centrifugation and histamine release measured as above.

10.6 Allergic basophil inhibition assay

The ability of anti-IgE antibodies to inhibit allergen-triggered degranulation was investigated by pre-incubating PBMC from LolP1-sensitive donors with monoclonal antibodies for 30min at 37°C prior to triggering with LolP1.

10.7 Determination of tryptase release from human lung mast cells

Crude mast cell suspensions were prepared from human lung tissue by enzymatic digestion with a cocktail comprising hyaluronidase, pronase and DNase. Cells were either used directly or pre-sensitised with chimeric IgE prior to treatment with anti-IgE antibodies. Mast cell degranulation was determined by colorimetric assay of the granule enzyme tryptase.

20

10.8 Determination of β-hexosaminidase release from RBL cells transfected with human FcεR1α

Transfected cell line RBL J41 was obtained from Dr B. Helm, University of Sheffield. Cells were passively sensitised with either mouse monoclonal IgE anti-DNP or human

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

chimeric IgE anti-NP and triggered with anti-human IgE antibodies. Degranulation was measured by the colorimetric assay of β -hexosaminidase release.

10.9 Results

5

10.9.1 Anaphylactogenicity of anti-IgE monoclonal antibodies in human basophils

A number of different anti-IgE monoclonal antibodies were assayed for their ability to trigger histamine release from both allergic and non-allergic basophils (figure 28). In contrast to the other antibodies, PTmAb0011 was consistently unable to generate significant histamine release.

10

10.9.2 Anaphylactogenicity of anti-IgE monoclonal antibodies in human lung mast cells

PTmAb0011 was also unable to release significant amounts of tryptase in both sensitised and non-sensitised human lung mast cells (figure 29). Polyclonal anti-human IgE gave 60-70% release in these cells.

15

10.9.3 Anaphylactogenicity of anti-IgE monoclonal antibodies in RBL cells transfected with human *FcεR1α*

RBL J41 cells, passively sensitised with chimeric human IgE anti-NP, could be triggered with antigen NP-BSA and with polyclonal anti-human IgE but not with PTmAb0011 (figure 30). In contrast, when cells were sensitised with mouse IgE anti-DNP, both anti-human IgE antibodies were without effect. The cells could still be triggered by antigen DNP-BSA.

20

25 10.9.4 Basophil blocking assay

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

PTmAb0011 was able to block the binding of IgE to FcεR1 in non-allergic basophils and thus to inhibit subsequent triggering with NP-BSA antigen. The IC₅₀ value of this activity was around 60ng/ml (figure 31). PTmAb0011 was also able to potently inhibit LolP1-triggered histamine release from allergic basophils with an IC₅₀ value of 40ng/ml (figure 31).

Example 11, *Monkey passive cutaneous anaphylaxis studies*

PTmAb0005 and PTmAb0011 have also been tested for *in vivo* activity. Briefly, the local skin mast cells of African green monkeys were shaved and sensitised with intradermal administration of 100ng of anti-NP IgE (human IgE anti-nitrophenylacetyl (NP) purchased from Serotech) into both arms. After 24 hours, a dose range of the monoclonal antibodies to be tested were injected at the same injection site as the human IgE on one arm. Control sites on the opposite arm of the same animals received either phosphate buffered saline (PBS) or non-specific human IgE (specific for Human Cytomegalovirus (CMV) or Human Immunodeficiency Virus (HIV)). After 5 hours, 10 mg of a BSA-NP conjugate (purchase from Biosearch Laboratories) was administered by intravenous injection. After 15-30 minutes, the control animals develop a readily observable roughly circular oedema from the anaphylaxis, which is measurable in millimeters. Results are expressed in either the mean oedema diameter of groups of three monkeys or as a percentage inhibition in comparison to PBS controls. Dec7B, is described in EP 0 477 231 B, which recognises a peptide 496-506 in the Cε4 domain of human IgE, was used as a positive control.

Amount of sample to be tested (µg)	Mean diameter of oedema (mm)				
	mAb0005	mAb0011	Dec7B	IgE α-CMV control	IgE α-HIV control
20	0	0	0	19.5	21
10	0	0	20	20.7	22
1	4	4.5	25	22.7	23
0.1	14.3	15.7	20	21.8	22.5
0.05	17.8	18.7	22.5	21.5	22.8
PBS	23.2	28.2	26	24.5	22.5

The percentage inhibition of anaphylaxis are shown in Figure 32.

Table 6 -PTmAb0005 peptide ligands identified from primary phage display biopannings with affinities

Human IgE Ce2 EDGQVMDVD - SEQ ID NO. 1

Name	Library	Rank (ECL)		BIAcore K _d (μM)		SEQ ID NO.
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
IgEC67	XCX15	243	0.1	4.8	13	
IgEC26	XCX15	43	3	53.4	67	
IgEC29	XCX15	40	>600	>600	68	
IgEC42	XCX15	15	19.4	>500	69	
IgEC69	XCX15	11	6.6	6.4	70	
IgEC9	XCX15	10	-	-	71	
IgEC13	XCX15	5	>1000	>1000	72	
IgEC56	XCX15	0	60	>1000	73	
IgEC43	XCX15	0	-	-	74	
IgEC81	XCX15	0	78	6.3	75	
IgEC83	XCX15	0	-	-	76	
IgEC70	XCX15	0	-	-	77	
IgEC64	XCX15	0	-	-	78	
IgEC73	XCX15	0	>600	>600	79	
IgEC72	XCX15	0	-	-	80	
IgEC66	XCX15	0	>600	>600	81	
IgEC75	XCX15	0	-	-	82	
ESC18	XCX15	0	-	-	83	
ESC45	XCX15	0	-	-	84	

5

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Name	Library	Rank (ECL)		PTmAB BIA core K_D (μ M)		SEQ ID NO.
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
ESC12	XCX15	0	-	-	-	85
ESC43	XCX15	0	-	-	-	86
ESC1	XCX15	0	-	-	-	87
ESC4	XCX15	0	-	-	-	88
ESC46	XCX15	0	-	-	-	89
ESC20	XCX15	0	-	-	-	90
ESD36	XCX10	0	-	-	-	91
ESD14	XCX10	0	-	-	-	92
ESD38	XCX10	0	-	-	-	93
ESD15	XCX10	0	-	-	-	94
ESD6/10/40	XCX10	0	-	-	-	95
ESB4/35	XAX10	0	70	700	-	96
ESB25	XAX10	0	60	>1000	-	97
ESB10/38	XAX10	0	139	>1000	-	98
ESB8	XAX10	0	257	>1000	-	99
ESB29/36	XAX10	0	-	-	-	100
ESB15	XAX10	0	-	-	-	101
ESB26	XAX10	0	-	-	-	102
ESB12	XAX10	0	-	-	-	103
ESB1/getc	XAX10	0	-	-	-	104
ESB7	XAX10	0	-	-	-	105
ESB18	XAX10	0	-	-	-	106
ESB9	XAX10	0	-	-	-	107

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Name	Library	Rank (ECL)		PTm/AB BIAcore K_p (µM)		SEQ ID NO.
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
ESB40	XAX10	0	-	-	-	108
SB21/33/31	XAX10	0	-	-	-	109
ESB32	XAX10	0	-	-	-	110
ESB4/35	XAX10	0	-	-	-	111
ESB24	XAX10	0	-	-	-	112
ESB13	XAX10	0	-	-	-	113

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Table 7 - PTmAb0011 peptide ligands identified from primary phase display biopannings with affinities.

Human IgE C α 2 EDGQVMDVD (SEQ ID NO. 1)

Name	Library	Sequence	Rank (ECL)		PTmAb BIAcore K _d (μM)		SEQ ID NO.
			PTmAb0011	PTmAb0011	PTmAb0011	PTmAb0011	
BEC39/50/129	XCX15	SCREVLGGSEMIMDCDE;	1611	2.4	>1000	114	
BEC131	XCX15	SCPAPREGDLCAPTTV;	910	42	>1000	115	
BEC147	XCX15	FCPEPICSPLSRMTLS;	883	-	-	116	
BEC40	XCX15	ECNQLSGSLRHVDLNC;	547	-	-	117	
BEC115/3/48	XCX15	RCDDQLPRDSYTFCMMS;	438	-	-	118	
BEC36	XCX15	HCQQVFPFDYLLWCQRG;	158	-	-	119	
BEC17/47/25	XCX15	DCEFPMSVLLQKLP;	147	-	-	120	
BEC40A	XCX15	NCODQMLREDAGCWSKI;	80	-	-	121	
BEC31/48/53	XCX15	HCPEEYSPATRVCCGR;	75	-	-	122	
BEC2/23/44/132	XCX15	DCDWINPPDPHFVKDT;	33	7	>600	123	
BEC41	XCX15	ACFSRNGQVTDVPHSCY;	31	-	-	124	
BEC135	XCX15	KCPTYKPNDRCLWVPV;	19	-	-	125	
BEC116	XCX15	YCPKYPLEGDCLLDNDY;	4	-	-	126	
BEC21/19	XCX15	RCEEWLCPAPAFAPP;	3	27.8	14.9	127	
BEC55	XCX15	TCGQSELRCASLETHHV;	0	-	-	128	
BEC5	XCX15	NCNDNMLDCMPAWSS;	0	-	-	129	
BEB33	XAX10	DALDERAWRARA;	15	117	>600	130	
BED183	XCX10	SCQGREVRRECW;	596	-	-	131	
BED35/53/164	XCX10	VCDECVSRELAL;	330	-	-	132	

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Name	Library	Rank (ECL)		PTmAb BLAcore K_D (μ M)		SEQ ID NO.
		PTmAb0011	PTmAb0011	PTmAb0011	PTmAb0005	
EED38	XCX10	330	-	-	-	133
EED147/173	XCX10	281	-	-	-	134
EED35/53/164	XCX10	118	-	-	-	135
EED36	XCX10	52	-	-	-	136
EED131/138/102	XCX10	32	-	-	-	137
EED18/47/48	XCX10	31	-	-	-	138
EED132	XCX10	28	-	-	-	139
EED139	XCX10	26	-	-	-	140
EED134	XCX10	14	-	-	-	141
EED33	XCX10	7	-	-	-	142
EED50	XCX10	6	-	-	-	143
EED34/104	XCX10	3	-	-	-	144
EED41/56	XCX10	0	-	-	-	145
EED51	XCX10	0	-	-	-	146
EED57	XCX10	0	-	-	-	147

53

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Table 8—IgEC67 mutants with improved affinity for PTmAb0005 and PTmAb0011

Mutants from the original sequence are shown in blue

5 Human IgE Cε2 EDGQVMDYVD (SEQ ID NO. 1)

Name	Sequence	PTmAb Rank		BIAcore K _d ^{Rel} (μM)		SEQ ID NO.
		0005	0011	0005	0011	
IgEC67	CFMINKQLADLLCPRE	-	-	0.1	4.8	13
IgEC67-8	CFMINKQLADLLCPRE	4.36	2.4	0.0094	0.066	12
IgEC67-10	ADGAGCFMINKQADLELCPRFAAAEA;	4.2	2.3	-	-	148
IgEC67-1	ADGAGCFMINKQADLELCPRFAAAEA;	4.1	2.2	-	-	149
IgEC67-2	ADGAACFMINKQADLELCPRFAAAEA;	3.2	1.8	-	-	150
IgEC67-3	ADGAGCFMINKQLADLELCPRFAAAEA;	3	1.7	-	-	151
IgEC67-12	ADGAGCFMINKQLADLELCPRFAAAEA;	3	1.9	-	-	152
IgEC67-9	ADGAGCFMINKQLADLELCPRFAAAEA;	2.7	2.4	-	-	153
IgEC67-4	ADGAGCFMINKQLADPELCPRFAAAEA;	2.4	1.3	-	-	154
IgEC67-5	ADGAGCFMINKQLVDELCPRFAAAEA;	1.9	1.6	-	-	155
IgEC67-6	ADGAGCFMINKQLADWELCPRAAAEA;	1.9	1.6	-	-	156
IgEC67-11	ADGAGCFMINKQADWELCPRAAAEA;	1.8	1.9	-	-	157
IgEC67-14	ADGAGCFMINKQADLELCPRFAAAEA;	1.2	0.9	-	-	158
IgEC67-13	ADGAGCFMINKQLADSELCPRFAAAEA;	1.1	0.8	-	-	159
IgEC67-7	ADGAGCFMINKQLADLELCPRFAAAEA;	1	1	-	-	160

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Table 9 - IgEC67-8 Mutants with Improved Affinity for PmAb0005

Human IgE Cε2 EDGQVMDVD (SEQ ID NO. 1)

Clone	Rel. Rank A	Rel. Rank B	SEQ ID NO.
IgEC67-8	1.00	1.00	12
Mutants with improved affinity for PmAb0005			
1-3	1.73	1.31	161
2-13	1.56	2.14	162
3-11	1.54	2.02	163
3-1, 3-9, 3-10	1.54	1.85	164
1-11	1.45	1.32	165
2-15	1.44	1.57	166
4-9	1.38	1.70	167
1-4, 1-2, 1-12	1.37	1.39	168
5-16	1.29	1.83	169
4-1	1.24	1.52	170
2-12	1.22	1.50	171
1-9, 2-5	1.21	1.41	172
2-9, 2-6	1.19	1.54	173
1-16	1.14	1.17	174
1-5	1.13	1.73	175
4-2, 4-3	1.11	1.60	176
1-10	1.10	1.08	177

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Clone	Rel. Rank A	Rel. Rank B	SEQ ID NO.
Mutants with similar affinity for PTmAB0005			
5-11	1.09	1.97	178
1-8	1.08	1.32	179
5-10	1.05	1.83	180
5-2	1.04	1.24	181
1-1	1.04	1.29	182
2-3	1.03	1.31	183
2-8, 1-13, 4-11, 1-14	1.00	1.00	184
1-6	0.95	1.16	185
1-7	0.91	1.25	186
2-11, 2-4, 2-10, 2-7	0.79	1.39	187
4-4	0.69	1.03	188
Mutants with affinity for streptavidin			
6-9, 5-1, 6-2, 6-8, 6-4	1.53	1.19	189
6-12, 5-8	0.93	0.67	190
6-10	0.91	0.69	191

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Applicant's or agent's file reference RE/B45172	International application No.
--	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>11</u> , line <u>12-17</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depository institution European Collection of Cell Cultures	
Address of depository institution (including postal code and country) Vaccine Research and Production Laboratory Public Health Laboratory Service Centre For Applied Microbiology Research Porton Down, Salisbury Wiltshire SP4 0JG, GB	
Date of deposit 08 March 1999 (08/03/99)	Accession Number 99030805
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Claims

1. A peptide comprising an isolated surface exposed epitope of the Cε2 domain of IgE, or mimotope thereof.
2. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P1 (SEQ ID No. 1), or mimotope thereof.
3. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P2 (SEQ ID No. 2), or mimotope thereof.
4. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P3 (SEQ ID No. 3), or mimotope thereof.
5. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P4 (SEQ ID No. 4), or mimotope thereof.
6. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P5 (SEQ ID No. 5), or mimotope thereof.
7. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P6 (SEQ ID No. 6), or mimotope thereof.
8. A peptide as claimed in claim 1 wherein the surface exposed epitope of Cε2 is P7 (SEQ ID No. 7), or mimotope thereof.
9. A mimotope as claimed in any one of claims 1 to 8 wherein the mimotope is a peptide.
10. A peptide as claimed in claim 1 wherein the isolated epitope is derived from a loop structure of the Cε2 domain of IgE.
11. A peptide as claimed in claim 10 wherein the loop structure of the Cε2 domain of IgE is the A-B or the C-D loop.
12. A peptide as claimed in claim 2 wherein the mimotope of P1 is a peptide of the general formula: $h x d h h a n a n x y$;
wherein: *h* is a hydrophobic amino acid residue; *d* is an ionic bond donating amino acid residue; *a* is an acidic amino acid residue; *n* is an ionically neutral/ non-polar amino acid residue; and *x* is an amino acid.
13. A peptide as claimed in claim 2, wherein the mimotope of P1 is a peptide of the general formula:
Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

wherein X₁ is selected from V, I, L, M, F or A; X₂ is selected from D or E; and X₃ is selected from L, I, V, M, A or F.

14. A peptide as claimed in claim 2 wherein the mimotope of P1 is selected from the group comprising P15q (SEQ ID No. 11), PT1079 (SEQ ID No. 13), PT1079GS (SEQ ID No. 15), PT1078 (SEQ ID No. 16), PT15 (SEQ ID No. 8).
- 5 15. A peptide as claimed in claim 3, wherein the mimotope of P2 is P16 (SEQ ID No. 24).
16. A peptide as claimed in claim 4 wherein the mimotope of P3 is P17 (SEQ ID No. 26).
- 10 17. An immunogen for the treatment of allergy comprising a peptide or mimotope as claimed in any one of claims 1 to 16, additionally comprising a carrier molecule.
18. An immunogen as claimed in claim 17, wherein the carrier molecule is selected from Protein D or Hepatitis B core antigen.
19. An immunogen as claimed in claim 17 or 18, wherein the immunogen is a
- 15 chemical conjugate of the peptide or mimotope as claimed in claims 1 to 16, or wherein the immunogen is expressed as a fusion protein.
20. An immunogen as claimed in any one of claims 17 to 19, wherein the peptide or peptide mimotope is presented within the primary sequence of the carrier.
21. A vaccine for the treatment of allergy comprising an immunogen as claimed in
- 20 any one of claims 17 to 20, further comprising an adjuvant.
22. A ligand which is capable of recognising a surface exposed epitope of the Cε2 domain of IgE, characterised in that the ligand is not PTmAb0005.
23. A ligand as claimed in claim 22, wherein the ligand is PTmAb0011 deposited under the Budapest Treaty patent deposit at ECACC on 8th March
- 25 1999 under Accession No. 99030805.
24. A pharmaceutical composition comprising a ligand which is capable of recognising a surface exposed epitope of the Cε2 domain of IgE.
25. A pharmaceutical composition as claimed in claim 24 wherein the ligand is capable of recognising the C-D Loop of the Cε2 domain of IgE.
- 30 26. A pharmaceutical composition as claimed in claim 25, wherein the ligand is a monoclonal antibody selected from PTmAb0005 or PTmAb0011.
27. A peptide as claimed in any one of claims 1 to 16 for use in medicine.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

28. A vaccine as claimed in claim 21 for use in medicine.
29. An immunogen as claimed in any one of claims 17 to 20, for use in medicine.
30. Use of a peptide as claimed in any one of claims 1 to 16 in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of allergy.
- 5 31. A ligand which is capable of recognising a surface exposed epitope of the Cε2 domain of IgE for use in medicine.
32. Use of a ligand which is capable of recognising a surface exposed epitope of the Cε2 domain of IgE in the manufacture of a medicament for the treatment of allergy.
33. Use of a ligand as claimed in claim 31 or 32, wherein the ligand is PTmAb0005 or
- 10 PTmAb0011.
34. Use of PTmAb0005 or PTmAb0011 in the identification of mimotopes of P1.
35. A peptide which is capable of being recognised by PTmAb0005 or PTmAb0011.
36. An immunogen comprising a peptide as claimed in claim 35.
37. Use of a peptide as claimed in claims 1-16 in diagnostics or in the affinity
- 15 purification of circulating anti-IgE antibodies from blood.
38. A method of manufacturing a vaccine comprising the manufacture of an immunogen as claimed in any one of claims 17 to 20, and formulating the immunogen with an adjuvant.
39. A method for treating a patient suffering from or susceptible to allergy,
- 20 comprising the administration of a peptide as claimed in any one of claims 1 to 16, to the patient.
40. A method for treating a patient suffering from or susceptible to allergy, comprising the administration of a vaccine as claimed in claim 21 to the patient.
41. A method of treating a patient suffering from or susceptible to allergy comprising
- 25 administration of a pharmaceutical composition as claimed in any one of claims 24 to 26, to the patient.

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

1/32

Fig. 1 IgE amino acid surface exposure using the Padlan and Davies 1986 model.

Residue	Surface Area	average/5	>50	>80	
ARG_1	270.322723				
ASP_2	139.374542				
PHE_3	64.298927	117.361489	1	1	
THR_4	46.170193	64.494911	1	0	
PRO_5	66.64106	39.0209532	0	0	
PRO_6	5.989833	29.3644934	0	0	
THR_7	12.004753	21.4426604	0	0	
VAL_8	16.016628	8.6200336	0	0	
LYS_9	6.561028	10.2708042	0	0	
ILE_10	2.527926	9.5044914	0	0	
LEU_11	14.243686	13.375776	0	0	
GLN_12	8.173189	19.2992118	0	0	
SER_13	35.373051	29.1890154	0	0	
SER_14	36.178207	32.6313328	0	0	
CYS_15	51.976944	39.0100884	0	0	
ASP_16	31.455273	45.6135238	0	0	
GLY_17	40.066967	50.0871888	1	0	
GLY_18	68.390228	46.9957994	0	0	
GLY_19	58.546532	59.6253914	1	0	P5
HIS_20	36.519997	63.4215874	1	0	P5
PHE_21	94.603233	68.1998406	1	0	P5
PRO_22	59.047947	65.8523506	1	0	P5
PRO_23	92.281494	62.0824146	1	0	P5
THR_24	46.809082	50.1635586	1	0	P5
ILE_25	17.670317	38.6392736	0	0	
GLN_26	35.008953	21.6261078	0	0	
LEU_27	1.426522	12.5259452	0	0	
LEU_28	7.215665	10.5518628	0	0	
CYS_29	1.308269	3.5500722	0	0	
LEU_30	7.799905	4.8164434	0	0	
VAL_31	0	4.0672202	0	0	
SER_32	7.758378	3.8055664	0	0	
GLY_33	3.469549	9.5755666	0	0	
TYR_34	0	20.7786542	0	0	
THR_35	36.649906	28.9967052	0	0	
PRO_36	56.015438	50.2230378	1	0	P6
GLY_37	48.048633	57.590085	1	0	P6
THR_38	109.601212	73.50021	1	0	P6
ILE_39	36.835236	70.1846368	1	0	P6
ASN_40	116.200531	73.2560022	1	0	P6
ILE_41	39.437572	51.7217026	1	0	P6
THR_42	64.20546	49.2710734	0	0	
TRP_43	1.929714	35.2314448	0	0	
LEU_44	24.58209	49.7665942	0	0	
GLU_45	46.002388	50.9119188	1	0	
ASP_46	112.113319	74.3084848	1	0	
GLY_47	69.932083	91.0816862	1	1	
GLN_48	118.912544	85.9516244	1	1	P1
VAL_49	108.448097	91.6210626	1	1	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

2/32

MET_50	20.352079	89.4386316	1	1
ASP_51	140.46051	77.095856	1	0
VAL_52	59.019928	65.664336	1	0
ASP_53	57.198666	72.8180802	1	0
LEU_54	51.290497	45.9930286	0	0
SER_55	56.1208	49.3437382	0	0
THR_56	6.335252	47.723164	0	0
ALA_57	75.773476	43.8934994	0	0
SER_58	49.095795	51.656078	1	0
THR_59	32.142174	59.4056414	1	0
THR_60	94.933693	72.6291262	1	0
GLN_61	45.083069	73.3905916	1	0 P2
GLU_62	141.8909	99.7907822	1	1
GLY_63	52.903122	90.626043	1	1
GLU_64	164.143127	83.4067496	1	1
LEU_65	49.109997	57.2201384	1	0
ALA_66	8.986602	47.5504318	0	0
SER_67	10.957844	17.0083172	0	0
THR_68	4.554589	7.3021006	0	0
GLN_69	11.432554	7.2534874	0	0
SER_70	0.578914	5.0619186	0	0
GLU_71	8.743536	8.9567614	0	0
LEU_72	0	10.8120506	0	0
THR_73	24.028803	23.2812776	0	0
LEU_74	20.709	37.264713	0	0
SER_75	62.925049	69.575269	1	0
GLN_76	78.660713	79.6644746	1	0
LYS_77	160.55278	78.1594206	1	0
HIS_78	75.474831	77.9196576	1	0
TRP_79	13.18373	76.6092892	1	0 P3
LEU_80	61.726234	70.354977	1	0
SER_81	72.108871	73.244224	1	0
ASP_82	129.281219	81.9731098	1	1
ARG_83	89.921066	69.9061278	1	0
THR_84	56.828159	58.6259284	1	0
TYR_85	1.391324	32.7696846	0	0
THR_86	15.707874	23.8688072	0	0
CYS_87	0	12.5031754	0	0
GLN_88	45.416679	24.6922706	0	0
VAL_89	0	22.314276	0	0
THR_90	62.3368	48.4045714	0	0
TYR_91	3.817901	45.5941352	0	0
GLN_92	130.451477	47.9061642	0	0
GLY_93	31.364498	62.7324992	1	0
HIS_94	11.560145	91.805003	1	1
THR_95	136.468475	85.5324108	1	1
PHE_96	149.18042	87.190961	1	1
GLU_97	99.088516	90.6138422	1	1
ASP_98	39.457249	75.8683994	1	0
SER_99	28.674551	62.1985202	1	0
THR_100	62.741261	62.538042	1	0
LYS_101	80.831024	61.892236	1	0
LYS_102	100.786125	65.3434144	1	0 P4
CYS_103	36.428219	66.2248162	1	0
ALA_104	45.930443	63.0386422	1	0
ASP_105	67.14827	64.611715	1	0

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

3/32

SER_106	64.900154	71.4769134	1	0	
---------	-----------	------------	---	---	--

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

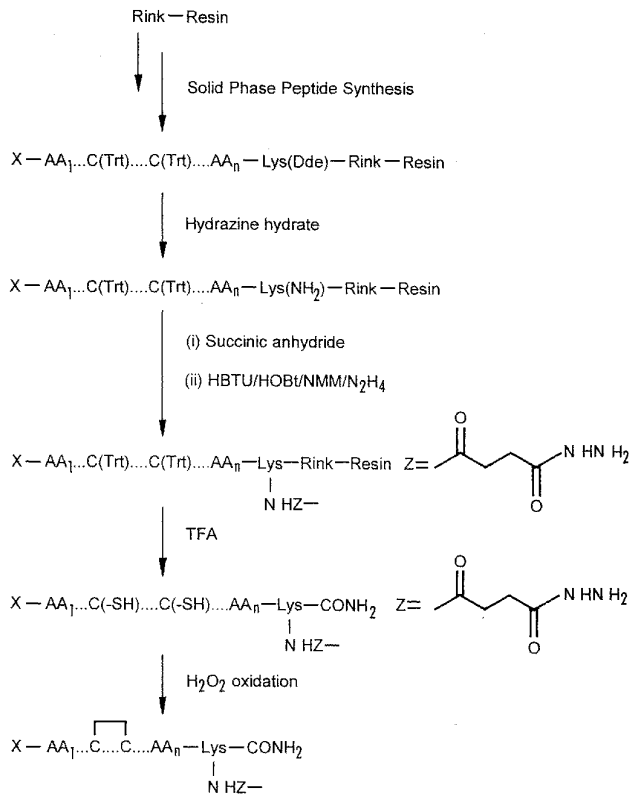
WO 00/50460

PCT/EP00/01455

4/32

Fig. 2 Scheme 1, solid phase peptide synthesis

Scheme 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

5/32

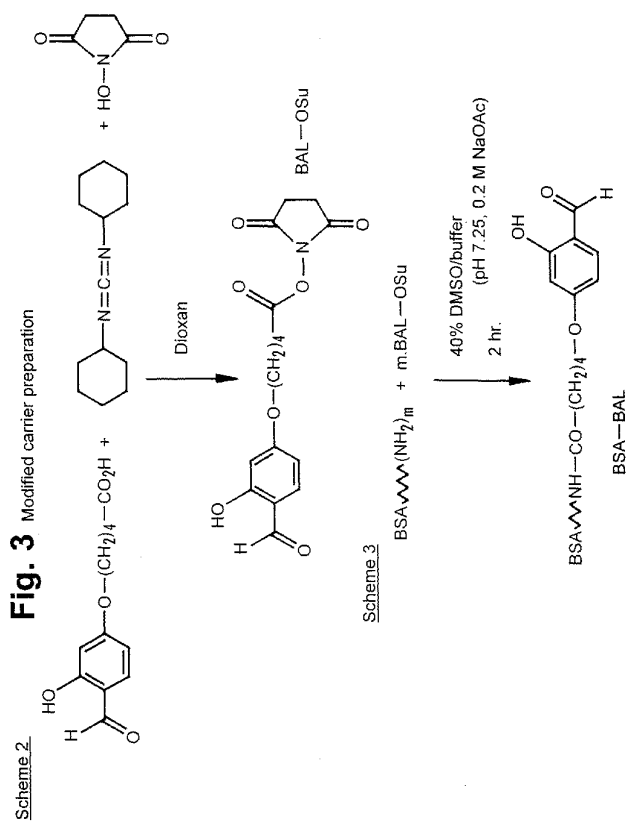


Fig. 4 Chemistry Scheme 4, Peptide/carrier conjugation

Scheme 4

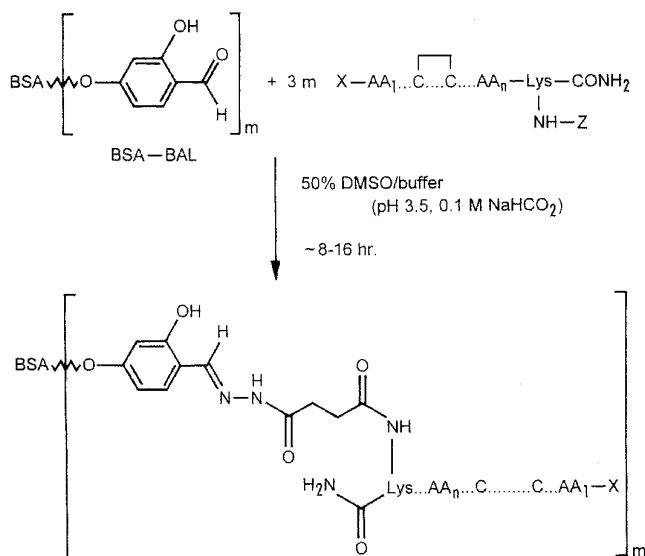


Fig. 5 C67-8 Anti-IgE Data

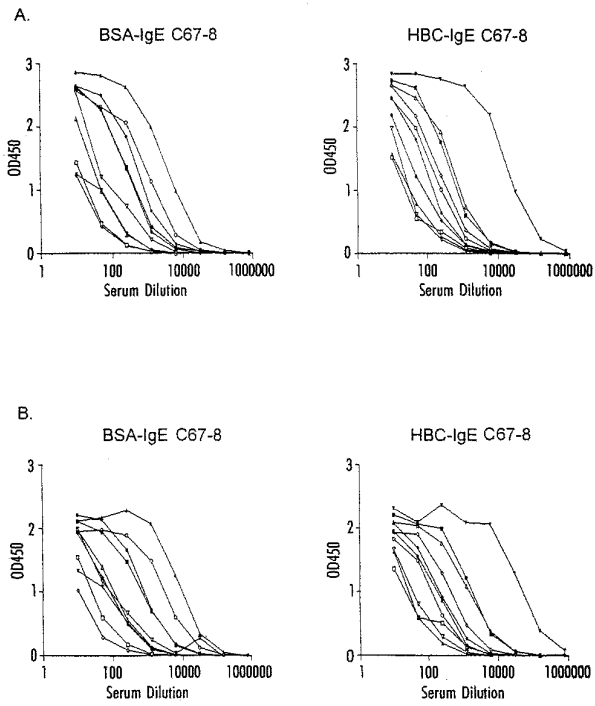
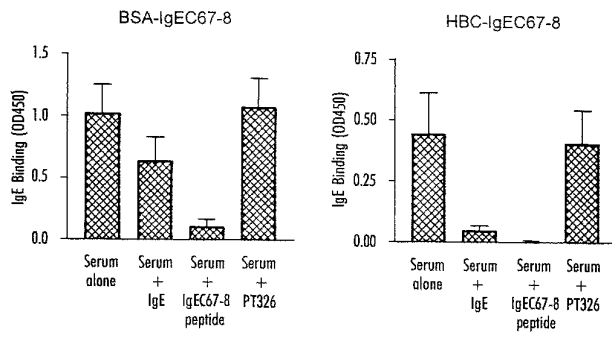


Fig. 6 Competition assay with soluble IgE and IgE C67-8 peptide.

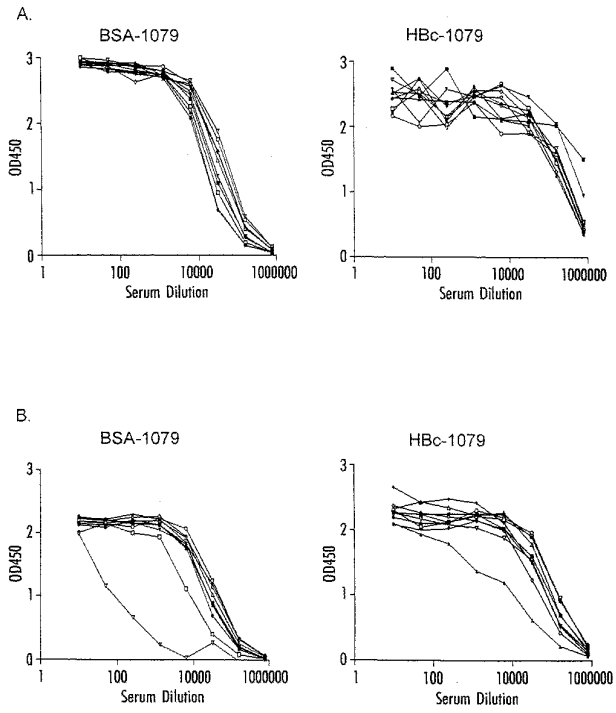


WO 00/50460

PCT/EP00/01455

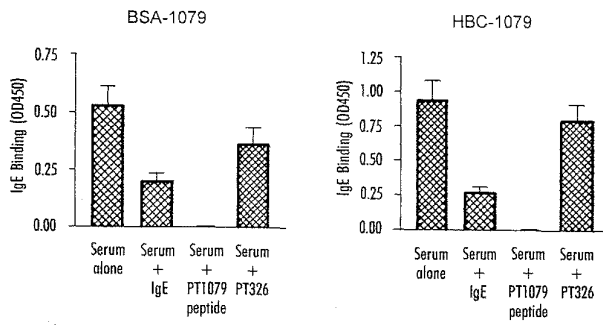
9/32

Fig. 7 PT1079 Anti-IgE Data



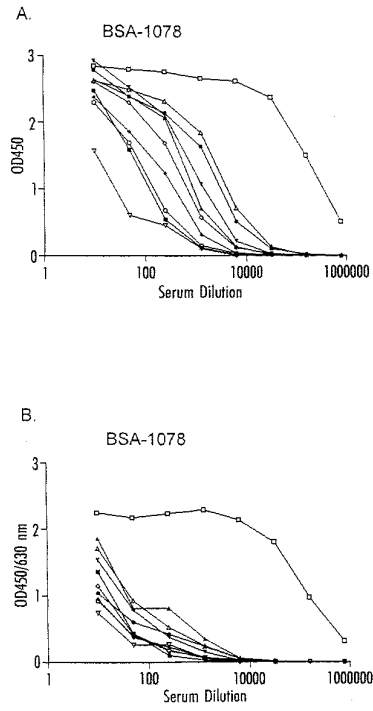
SUBSTITUTE SHEET (RULE 25)

Fig. 8 Competition assay with soluble IgE and PT1079 peptide.



11/32

Fig. 9 PT1078 Anti-IgE Data



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12/32

Fig. 10 Competition assay with soluble IgE and PT1078 peptide.

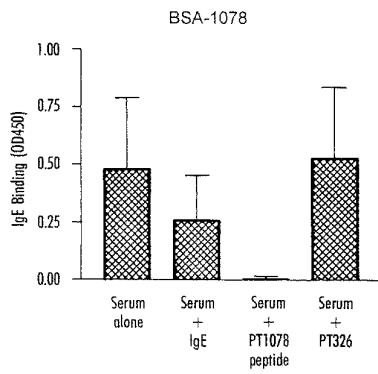


Fig. 11 PT1079gs Anti-IgE Data

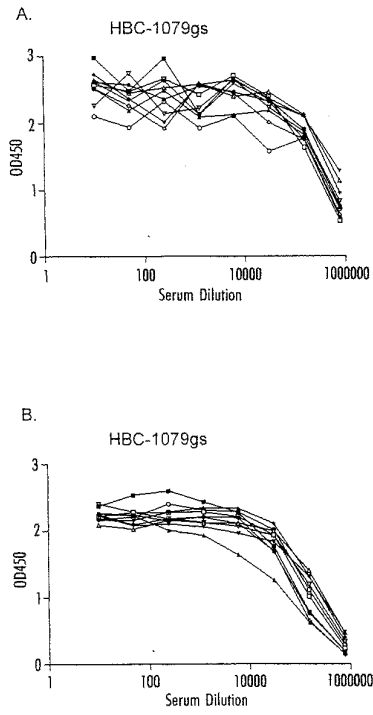


Fig. 12 Competition assay with soluble IgE and PT1079 peptide.

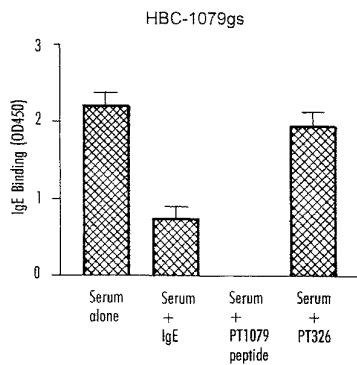
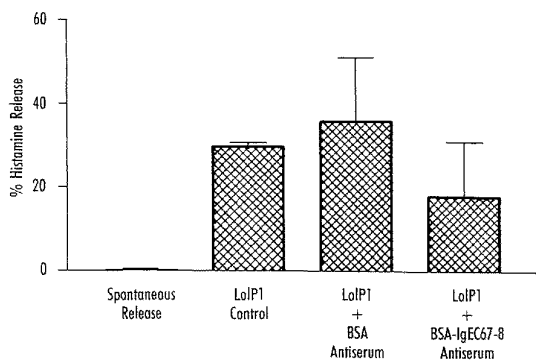


Fig. 13 Inhibitory Activity of Mouse BSA-C67-8 induced Antisera



WO 00/50460

PCT/EP00/01455

15/32

Fig. 14 Inhibitory Activity of Mouse Antisera induced by BSA-1078 and BSA-1079.

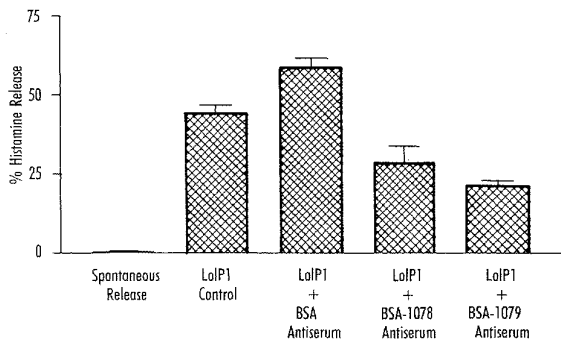
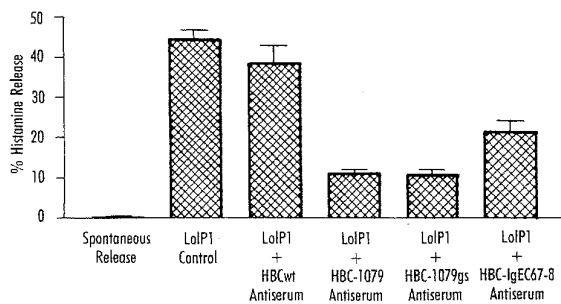


Fig.15 Inhibitory Activity of Mouse Antisera induced by HBC-C67-8, HBC-1078, HBC-1079 and HBC-1079gs



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 16 shows the concentration dependent binding of antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 to IgE.

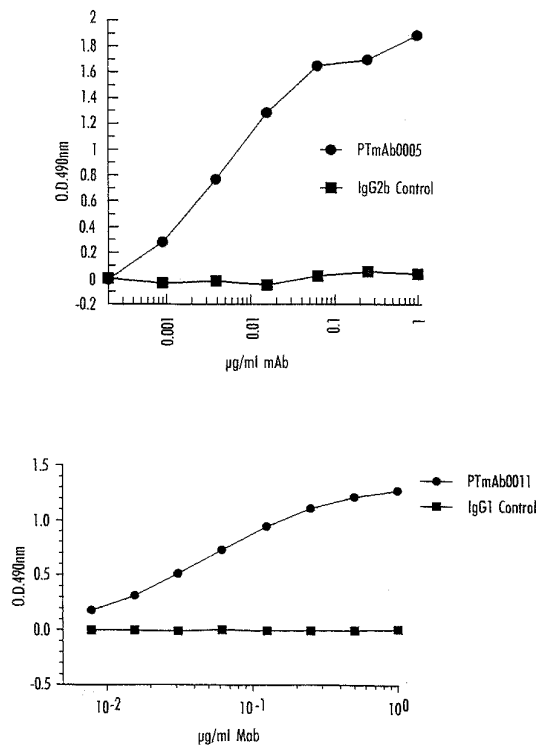


Fig. 17 shows the concentration dependent inhibition of IgE binding to an FcεR1α/IgG construct with antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 compared to control.

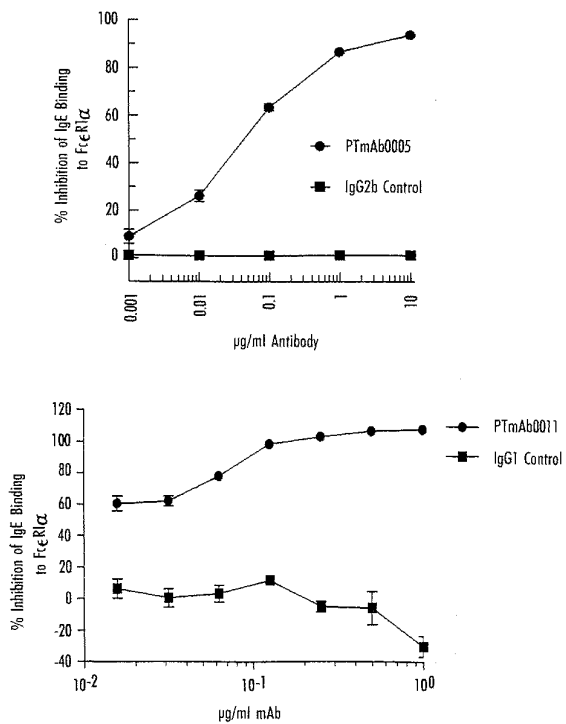
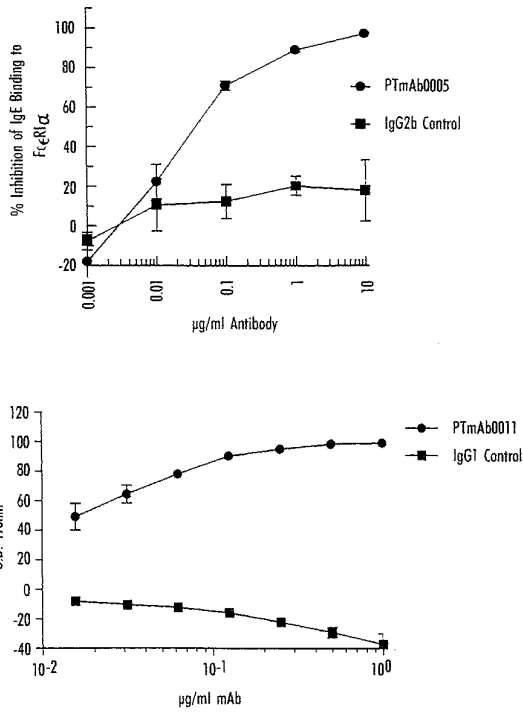


Fig. 18 shows the concentration dependent inhibition of IgE binding to clipped ectodomain of FcεR1α-bound directly to plastic plates, by antibody PTmAb0005, compared to control.

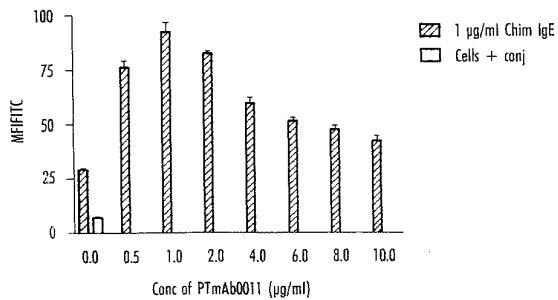
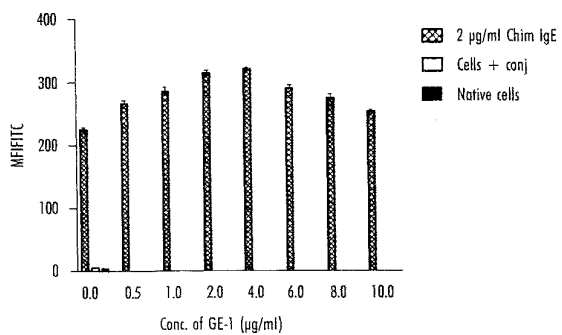


WO 00/50460

PCT/EP00/01455

19/32

Fig. 19 shows IgE binding to FcεRII (CD23) by antibody PTmAb0005 (GE-1) and PTmAb0011.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 20 shows the concentration-dependent blocking of histamine release from allergic human blood basophils with antibody PTmAb0005 and PTmAb0011 compared to control.

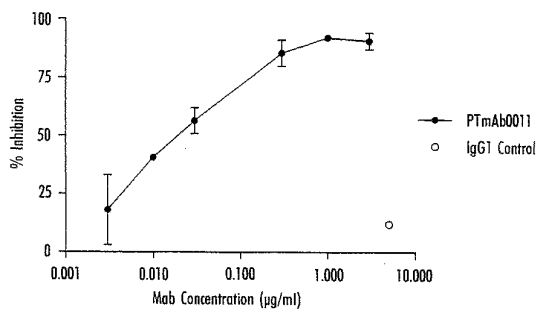
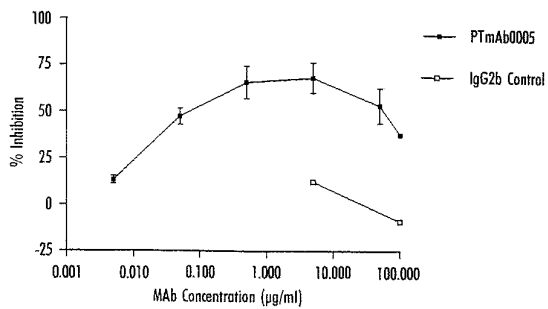
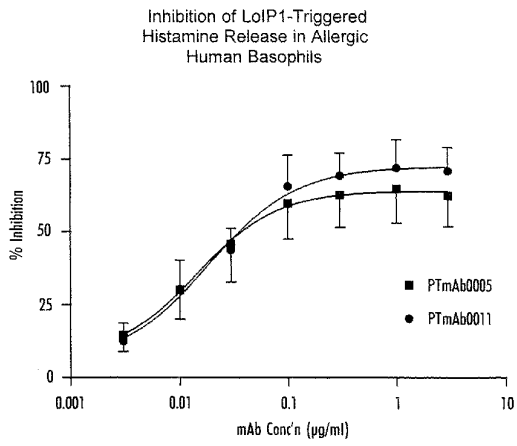


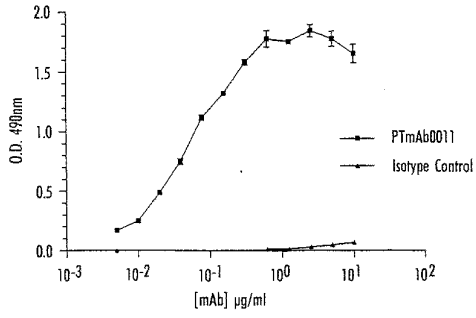
Fig. 21



22/32

Fig. 22 PTmAb0011 binding to different IgE.

A. Chimaeric IgE



B. Binding to Myeloma IgE

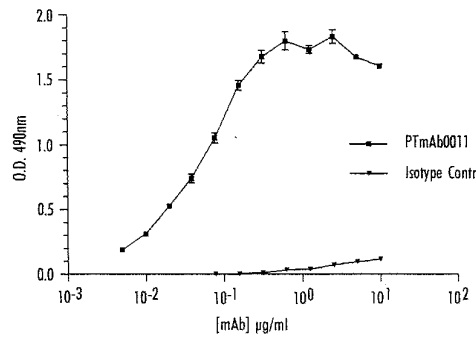
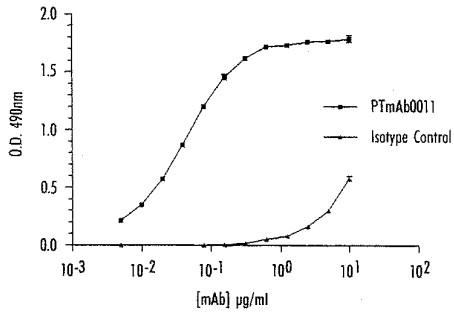
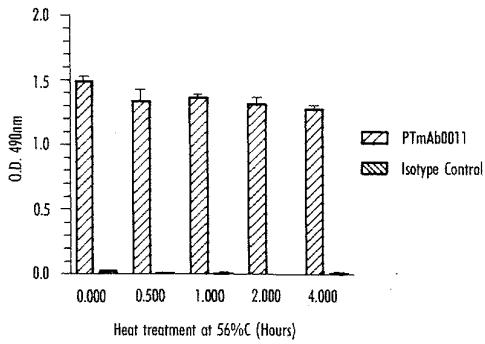


Fig. 22

C. Binding to Antigen Orientated IgE



D. Binding to Heat Denatured IgE



24/32

Fig. 23 Inhibition of IgE Binding to FcεR1α by PTmAb0011.

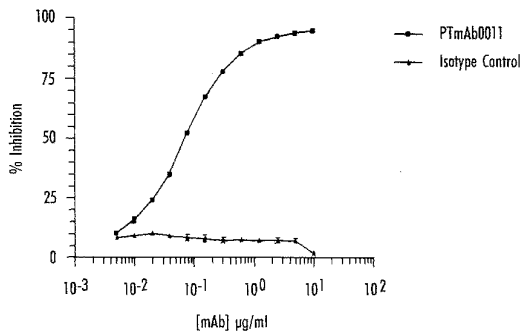
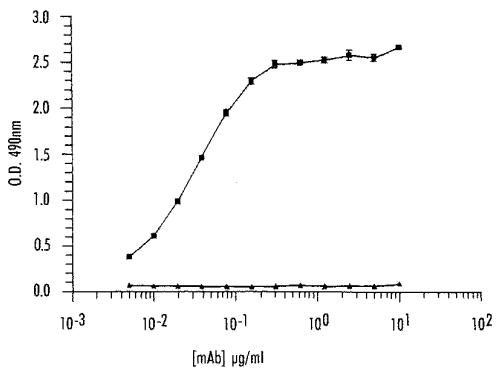
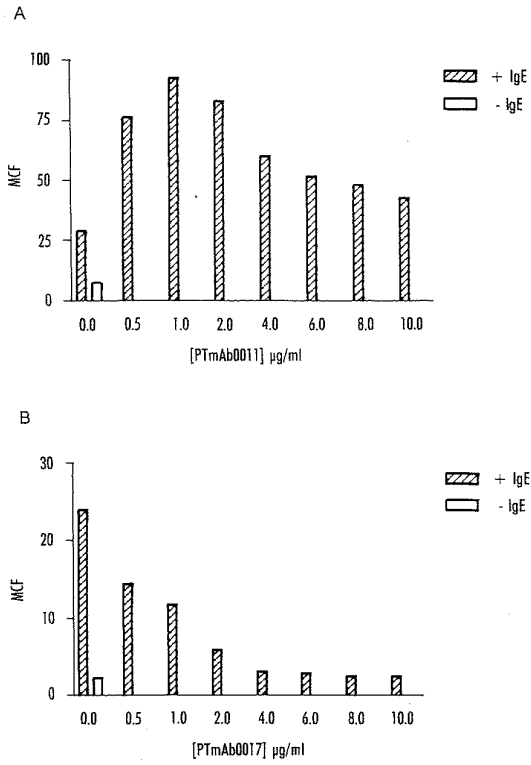


Fig. 24 Binding of PTmAb0011 to Receptor Bound IgE.



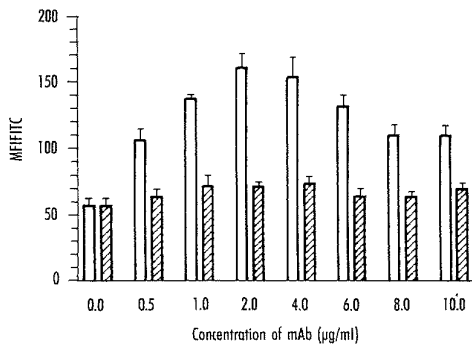
25/32

Fig. 25 The effect of PTmAb0011 on IgE binding to FcεRII on RPMI 8866 cells.



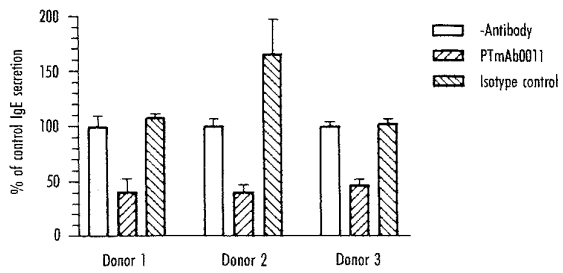
26/32

Fig. 26 Analysis of the effects of PTmAb0011 on IgE binding to FcεRII on primary human B-cells.



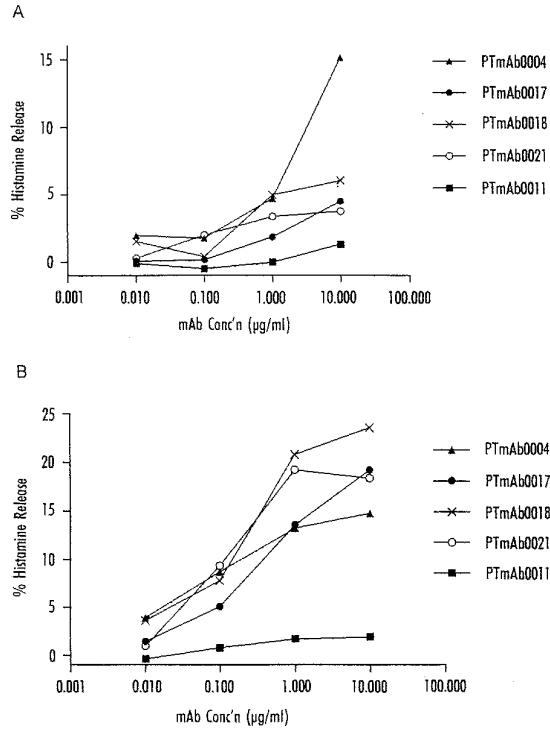
27/32

Fig. 27 Effects of PTmAb0011 on IgE secretion from primary human B-cells.



28/32

Fig. 28 Anaphylactogenicity of anti-human IgE monoclonal antibodies in allergic (A) and non-allergic (B) human basophils

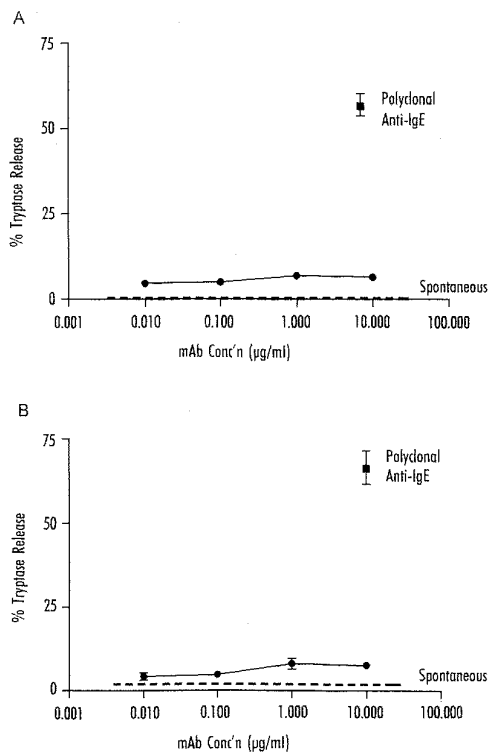


WO 00/50460

PCT/EP00/01455

29/32

Fig. 29 Anaphylactogenicity of anti-human IgE antibodies in sensitised (A) and non-sensitised (B) human lung mast cells



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 30 Anaphylactogenicity of anti-human IgE antibodies in RBL J41 cells through human FcεRI (A) and mouse FcεRI (B)

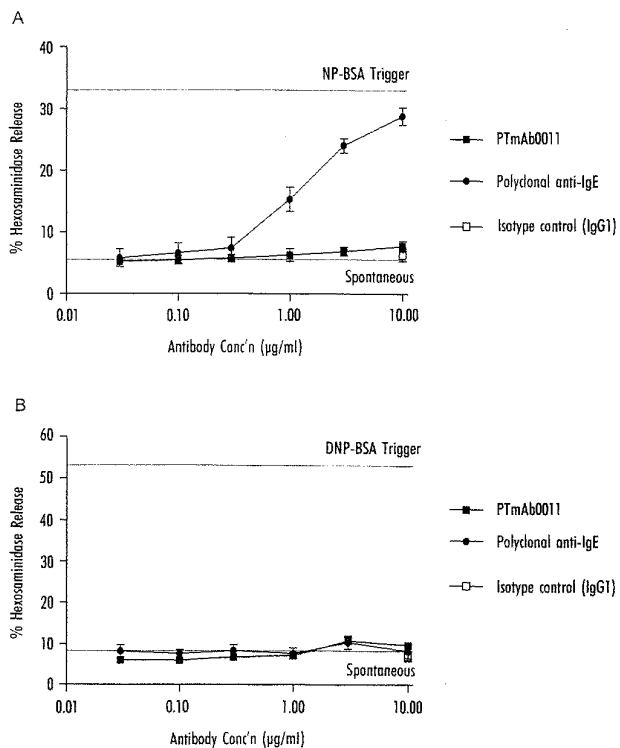
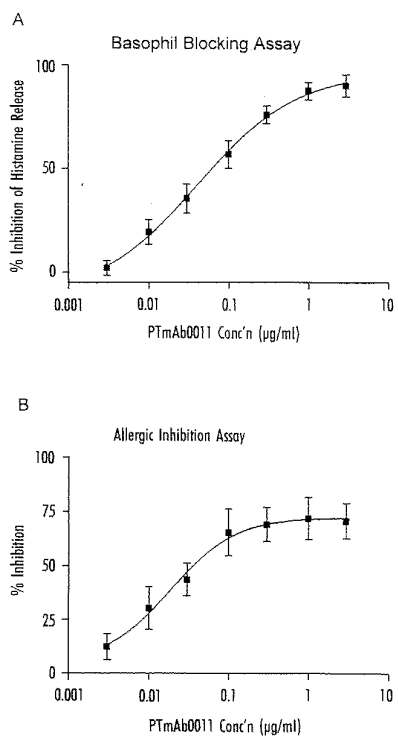
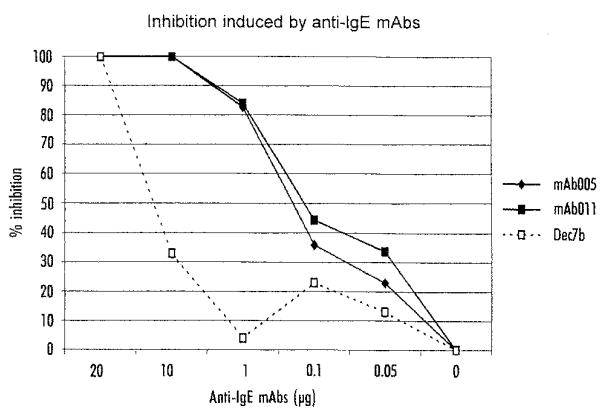


Fig. 31 Inhibition of allergen-triggered histamine release in human basophils by PTmAb0011



32/32

Fig. 32 Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis in Monkey skin by PTmAb0011 and PTmAb0005.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

SEQUENCE LISTING

5 <110> SmithKline Beecham Biologicals s.a.
Peptide Therapeutics
<120> Vaccine

10 <130> B45172
<160> 193
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

15 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20 <400> 1
Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
1 5

25 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30 <400> 2
Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
1 5

35 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40 <400> 3
Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
1 5 10

45 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50 <400> 4
Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
1 5 10

55 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60 <400> 5
Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr
1 5

65 <210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences
<400> 6

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Pro Gly Thr Ile Asn Ile
 1 5
 5 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 7
 Phe Thr Pro Pro Thr
 10 1 5
 15 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 8
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Leu
 20 1 5 10
 25 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 9
 Leu Leu Asp Val Asp Met Val Gln Gly Asp Glu Leu Cys
 30 1 5 10
 35 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 10
 Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
 40 1 5 10
 45 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 11
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
 50 1 5 10
 55 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 12
 Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
 60 1 5 10 15
 65 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 13
 Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 5
 <400> 14
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 10 Ala Ala Glu Gly Asp Lys
 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 15
 <400> 15
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 20 Ser Gly Gly Pro
 20
 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 25
 <400> 16
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 30 Ala Glu Gly Asp Lys
 20
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 35
 <400> 17
 Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 1 5
 40
 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 45
 <400> 18
 Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 50 Glu
 55
 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 19
 60 Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp
 65
 <210> 20
 <211> 17

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 20
 5 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Val Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 21
 15 Asn Cys Gln Asp Leu Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 Met

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 22
 25 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 23
 35 Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
 1 5 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 24
 45 Cys Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 25
 55 Thr Thr Gln Glu Gly Glu
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 26
 65 Cys Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
 1 5 10

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

    <210> 27
    <211> 22
    <212> PRT
5    <213> Human and artificial sequences

    <400> 27
    Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp
    1           5           10           15
10   Ser Asn Pro Arg Gly Val
    20

    <210> 28
    <211> 6
    <212> PRT
15   <213> Human and artificial sequences

    <400> 28
    Gly Gly His Phe Pro Pro
    1           5
20

    <210> 29
    <211> 13
    <212> PRT
25   <213> Human and artificial sequences

    <400> 29
    Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys
    1           5           10
30

    <210> 30
    <211> 13
    <212> PRT
35   <213> Human and artificial sequences

    <400> 30
    Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys
    1           5           10
40

    <210> 31
    <211> 16
    <212> PRT
45   <213> Human and artificial sequences

    <400> 31
    Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
    1           5           10           15
50

    <210> 32
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 32
55   His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
    1           5           10           15
    Gly

60   <210> 33
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

65   <400> 33
    Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys

```

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

1 5 10 15
 1 Glu

5 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 34
 Glu Cys Asn Gln Asn Leu Ser Gly Ser Leu Arg His Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 Cys

15 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 35
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro

25 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 36
 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu

35 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 37
 Arg Cys Asp Gln Gln Leu Pro Arg Asp Ser Tyr Thr Phe Cys Met Met
 1 5 10 15
 Ser

50 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

55 <400> 38
 Ser Cys Pro Ala Phe Pro Arg Glu Gly Asp Leu Cys Ala Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Val

60 <210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

65 <400> 39
 Phe Cys Pro Glu Pro Ile Cys Ser Pro Pro Leu Ser Arg Met Thr Leu

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

1 5 10 15

Ser

5 <210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

10 <400> 40
Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

15 <210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

20 <400> 41
Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
1 5 10

25 <210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

30 <400> 42
Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

35 <210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

40 <400> 43
Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
1 5 10

45 <210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

50 <400> 44
Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
1 5 10

55 <210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

60 <400> 45
Trp Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Glu

65 <210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 46

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp

5

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10

<400> 47
 Gly Cys Ala Glu Pro Lys Cys Trp Gln Ala Leu His Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro

15

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20

<400> 48
 Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Asp

25

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30

<400> 49
 Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
 1 5 10 15
 Asn

35

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40

<400> 50
 Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
 1 5 10 15
 Phe

45

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50

<400> 51
 His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
 1 5 10 15
 Asp

55

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60

<400> 52

65

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Cys

5 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 53
 Asn Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu

15 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 54
 Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly

25 <210> 55
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 55
 Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Thr Ala Ala

35 <210> 56
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 56
 Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Val Ala Ala

45 <210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50 <400> 57
 Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Val Ala Ala

55 <210> 58
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 58

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Trp Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala
 5
 <210> 59
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 10
 <400> 59
 Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Val Ala Ala
 15
 <210> 60
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 20
 <400> 60
 Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 25 Glu Ala Glu
 <210> 61
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 30
 <400> 61
 Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 35 Gly Ala Ala
 <210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 40
 <400> 62
 Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 45 Glu Ala Ala
 <210> 63
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 50
 <400> 63
 Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 55 Gly Ala Ala
 <210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 60
 65 <400> 64

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala

5

<210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10

<400> 65
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Glu Gly Asp
 20

15

<210> 66
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20

<400> 66
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Gly Asp
 20

25

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30

<400> 67
 Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
 1 5 10 15
 Asn

35

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40

<400> 68
 Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
 1 5 10 15
 Phe

45

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50

<400> 69
 Glu Cys Leu Lys Ile Glu Gln Gln Cys Ala Asp Ile Val Glu Ile Pro
 1 5 10 15
 Arg

55

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60

<400> 70

65

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 71
 Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Asp

15 <210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 72
 Glu Cys Leu Val Tyr Gly Gln Met Ala Asp Cys Ala Ala Gly Gly Trp
 1 5 10 15
 Pro

25 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 73
 Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Cys

35 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 74
 His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
 1 5 10 15
 Asp

45 <210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50 <400> 75
 Cys Cys Val Thr Asp Val Gln Thr Thr Asn Met Asp Val Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Gln

55 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 76

65

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

Thr Cys Cys Val Thr Asp Ile Pro Pro Asp Tyr Glu Gln Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly

5

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10

<400> 77
 Cys Cys Glu Ser Asp Ile Pro Leu Asn Glu Leu His Ala Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 Pro

15

<210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20

<400> 78
 Cys Cys Lys Ser Asp Ile Pro Ser Pro Val Thr Gln Phe Asn Thr Met
 1 5 10 15
 Lys

25

<210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30

<400> 79
 Cys Cys Gln Ser Asp Val Pro His Gln Pro Gly Ile Asn Asp Leu His
 1 5 10 15
 Val

35

<210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40

<400> 80
 Cys Cys Met Ser Asp Thr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Pro Val Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser

45

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50

<400> 81
 Cys Cys Met Ser Asp Ser Pro Ala Asp Pro Asn Arg Gly Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Trp

55

<210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60

<400> 82

65

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Cys Cys Leu Ser Asp Asp Ala Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg
 1 5 10
 5 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 83
 10 Cys Cys Ile Thr Asp Val Pro Gln Gly Val Met Tyr Lys Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Asp
 15 <210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 84
 20 Glu Cys Lys Val Asp Gly Gln Leu Ser Asp Ser Pro Leu Leu Arg Asn
 1 5 10 15
 Asn
 25 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 30 <400> 85
 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Asp Pro Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg
 35 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 86
 40 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Tyr Thr Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg
 45 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 87
 55 Cys Cys Val Asp Asp Thr Pro Asn Ser Gly Leu Ala Met Arg Val Ser
 1 5 10 15
 Lys
 60 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 88
 65 Cys Cys Glu Val Asp Asp Phe Pro Thr His His Pro Gly Trp Thr Leu
 1 5 10 15

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

Arg

5 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 89
 10 Ser Cys Asn Leu Asn His Gln Ser Cys Asp Ile Pro Pro Val Lys Gln
 1 5 10 15
 Ile

15 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 90
 20 Cys Cys Met Ala Asp Gln Glu Leu Asp Leu Gly His Asn Ala Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala

25 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 91
 30 Cys Cys Val Met Asp Leu Glu Leu Ala Ser Gly Phe
 1 5 10

35 <210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 92
 40 Cys Cys Val Met Asp Ile Glu Val Arg Gly Ser Ala
 1 5 10

45 <210> 93
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 93
 50 Cys Cys Gln Arg Asp Val Glu Leu Val Phe Gly Ser
 1 5 10

55 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 94
 60 Cys Cys Arg Ala Asp Phe Glu Val Gly Asn Gly Gly
 1 5 10

65 <210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

WO 00/50460

<400> 95
 Cys Cys Val Ser Asp Glu Pro Ala Gly Val Arg Asp
 1 5 10

5 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

10 <400> 96
 Gly Ala Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
 1 5 10

15 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

20 <400> 97
 Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln Leu Ser Asp Leu Pro
 1 5 10

25 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

30 <400> 98
 Val Ala Gly Gly Gln Val Val Asp Arg Glu Leu Lys
 1 5 10

35 <210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

40 <400> 99
 Lys Ala Gly Glu Gln Ala Met Asp Met Glu Leu Arg
 1 5 10

45 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

50 <400> 100
 Arg Gly Arg Asn Gln Ile Met Asp Leu Glu Ile
 1 5 10

55 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

60 <400> 101
 Gln Ile Asp Arg Gln Ile Thr Asp Thr Leu Leu
 1 5 10

65 <210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 102
 Arg Glu Gln Gln Ile Ser Asp Val Pro Arg Val
 1 5 10

PCT/EP00/01455

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Human and artificial sequences

 <400> 103
 Cys Gln Ala Met Asp Ala Glu Ile Leu Asn Gln Val
 1 5 10
 10
 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 15
 <400> 104
 Gly Gln Met Met Asp Thr Glu Leu Leu Asn Arg
 1 5 10
 20
 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 25
 <400> 105
 Ser Met Glu Gly Gln Val Arg Asp Ile Gln Val
 1 5 10
 30
 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 35
 <400> 106
 Tyr Gln Gln Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ala Glu
 1 5 10
 40
 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 45
 <400> 107
 Ser Met Gly Gln Lys Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10
 50
 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 55
 <400> 108
 Ser Met Gly Gln Glu Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10
 60
 <210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 65
 <400> 109
 Ala Glu Asn Asp Gln Met Val Asp Trp Glu Ile
 1 5 10
 <210> 110
 <211> 11

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 110
5 Gly Gly Trp Gln Glu Ser Asp Ile Pro Gly Arg
1 5 10

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 111
15 Gly Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 112
20 His Cys Cys Arg Ile Asp Arg Glu Val Ser Gly Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 12
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 113
30 Cys Ala Pro Gly Met Gly Cys Trp Glu Ser Val Lys
1 5 10

<210> 114
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 114
40 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Glu

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 115
50 Ser Cys Pro Ala Phe Pro Arg Glu Gly Asp Leu Cys Ala Pro Pro Thr
1 5 10 15
Val

<210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 116
60 Phe Cys Pro Glu Pro Ile Cys Ser Pro Pro Leu Ser Arg Met Thr Leu
1 5 10 15
65 Ser

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

5 <210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 117
 Glu Cys Asn Gln Asn Leu Ser Gly Ser Leu Arg His Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 10 Cys

15 <210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 118
 Arg Cys Asp Gln Gln Leu Pro Arg Asp Ser Tyr Thr Phe Cys Met Met
 1 5 10 15
 20 Ser

25 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 119
 His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
 1 5 10 15
 30 Gly

35 <210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 120
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 40 Pro

45 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 121
 Asn Cys Gln Asp Gln Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 50 Ile

55 <210> 122
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 122
 His Cys Glu Glu Pro Glu Tyr Ser Pro Ala Thr Arg Val Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 60 Arg

65 Arg

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

5 <210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 123
 Asp Cys Asp Trp Ile Asn Pro Pro Asp Pro Pro His Phe Trp Lys Asp
 1 5 10 15
 10 Thr

15 <210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 124
 Ala Cys Phe Ser Arg Asn Gly Gln Val Thr Asp Val Pro His Ser Cys
 1 5 10 15
 20 Tyr

25 <210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 125
 Lys Cys Pro Thr Tyr Pro Lys Pro Asn Asp Arg Cys Leu Trp Pro Val
 1 5 10 15
 30 Pro

35 <210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 126
 Tyr Cys Pro Lys Tyr Pro Leu Glu Gly Asp Cys Leu Leu Asp Asn Asp
 1 5 10 15
 40 Tyr

45 <210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 127
 Arg Cys Glu Glu Trp Leu Cys Ile Pro Pro Ala Pro Ala Phe Ala Pro
 1 5 10 15
 50 Pro

55 <210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 128
 Thr Cys Gly Gln Ser Glu Leu Arg Cys Ala Ser Leu Glu Thr His His
 1 5 10 15
 60 Val

65 Val

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

    <210> 129
    <211> 16
    <212> PRT
5    <213> Human and artificial sequences
    <400> 129
    Asn Cys Asn Asp Asn Pro Met Leu Asp Cys Met Pro Ala Trp Ser Ser
    1          5          10          15
10    <210> 130
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
15    <400> 130
    Asp Ala Leu Asp Glu Arg Ala Trp Arg Ala Arg Ala
    1          5          10
20    <210> 131
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
25    <400> 131
    Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
    1          5          10
30    <210> 132
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
35    <400> 132
    Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
    1          5          10
40    <210> 133
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
45    <400> 133
    Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
    1          5          10
50    <210> 134
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
55    <400> 134
    Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
    1          5          10
60    <210> 135
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
    <400> 135
    Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
    1          5          10
65    <210> 136
    <211> 12

```

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
    <400> 136
5  Gly Cys Pro Thr Trp Pro Arg Val.Gly Asp His Cys
   1           5           10
    <210> 137
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
10
    <400> 137
   Arg Cys Gln Ser Ala Arg Val Val Pro Glu Cys Trp
15  1           5           10
    <210> 138
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
20
    <400> 138
   Ser Cys Ala Pro Ser Gly Asp Cys Gly Tyr Lys Gly
25  1           5           10
    <210> 139
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
30
    <400> 139
   Gly Cys Pro Met Trp Pro Gln Pro Asp Asp Glu Cys
35  1           5           10
    <210> 140
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
40
    <400> 140
   Glu Cys Pro Arg Trp Pro Leu Met Gly Asp Gly Cys
45  1           5           10
    <210> 141
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
50
    <400> 141
   Gly Cys Gln Val Gly Glu Leu Val Trp Cys Arg Glu
55  1           5           10
    <210> 142
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences
60
    <400> 142
   Gln Cys Val Arg Asp Gly Thr Arg Lys Val Cys Met
65  1           5           10
    <210> 143
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

```

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<400> 143
 Thr Cys Leu Val Asp Arg Gln Glu Ser Asp Val Cys
 1 5 10
 5 <210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 10 <400> 144
 Asp Cys Val Val Asp Gly Asp Arg Leu Val Cys Leu
 1 5 10
 15 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 20 <400> 145
 Arg Cys Glu Gln Gly Ala Leu Arg Cys Val Gly Glu
 1 5 10
 25 <210> 146
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 30 <400> 146
 Val Cys Pro Pro Gly Trp Lys Asn Leu Gly Cys Asn
 1 5 10
 35 <210> 147
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 40 <400> 147
 Met Cys Gln Gly Trp Glu Ile Val Ser Glu Cys Trp
 1 5 10
 45 <210> 148
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 50 <400> 148
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25
 55 <210> 149
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 60 <400> 149
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Thr Ala Ala Glu Ala
 20 25
 65 <210> 150
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

    <400> 150
Ala Asp Gly Ala Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1          5          10          15
5 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20          25

    <210> 151
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 151
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1          5          10          15
15 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20          25

    <210> 152
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 152
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1          5          10          15
25 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20          25

    <210> 153
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 153
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1          5          10          15
35 Met Cys Pro Arg Asp Asp Ala Glu Ala
 20          25

    <210> 154
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 154
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu
 1          5          10          15
45 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Glu Glu Ala
 20          25

    <210> 155
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 155
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu
 1          5          10          15
60 Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20          25

    <210> 156
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

```

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<400> 156
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Asn Gln Leu Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 157
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 157
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 15 Met Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 158
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 158
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 159
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 159
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 160
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 160
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 45 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 161
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 161
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Met Gln Met Ala Asp Gln Glu
 1 5 10 15
 60 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 162
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 65

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

    <400> 162
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ser Asp Phe Glu
 1      5      10      15
5 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20      25

    <210> 163
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 163
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1      5      10      15
15 Leu Cys Thr Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20      25

    <210> 164
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 164
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1      5      10      15
25 Leu Cys Pro Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20      25

    <210> 165
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 165
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1      5      10      15
35 Leu Cys Pro Arg Gly Gly Ala Glu Ala
 20      25

    <210> 166
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 166
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1      5      10      15
45 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20      25

    <210> 167
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

    <400> 167
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1      5      10      15
60 Leu Cys Pro Ser Gln Ala Ala Glu Ala
 20      25

    <210> 168
    <211> 25
    <212> PRT
    <213> Human and artificial sequences

```

WO 00/50460 PCT/EP00/01455

<400> 169
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

<210> 169
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 169
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Pro Arg Glu Pro Ala Glu Ala
 20 25

<210> 170
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 170
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Lys Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 20 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Trp Glu Ala
 25

<210> 171
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 171
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 30 Leu Cys Ala Arg Glu Val Ala Glu Ala
 20 25

<210> 172
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 172
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asp Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 40 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

<210> 173
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

<400> 173
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Arg Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20 25

<210> 174
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<400> 174
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Lys Asn Lys Gln Met Val Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Ala Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 175
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 175
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Gln Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 176
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 176
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Arg Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Pro Gly Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 177
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 177
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Pro Ala Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 178
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 178
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Pro Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 179
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

 <400> 179
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 60 Leu Cys Gln Ala Arg Ala Ala Glu Ala
 20 25

 <210> 180
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

```

<400> 180
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1           5           10           15
5 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20           25

<210> 181
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 181
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1           5           10           15
15 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20           25

<210> 182
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 182
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1           5           10           15
25 Leu Cys Gln Arg Glu Thr Ala Glu Ala
 20           25

<210> 183
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 183
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1           5           10           15
35 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20           25

<210> 184
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 184
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1           5           10           15
45 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20           25

<210> 185
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

<400> 185
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Arg Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1           5           10           15
60 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20           25

<210> 186
<211> 25
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences

```

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<400> 186
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Ala Arg Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 187
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 187
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Leu Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Ser Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 188
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 188
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 25 Leu Cys Gly Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 189
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 189
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Ser Pro Gln Leu Ala Asp Trp Lys
 1 5 10 15
 35 Arg Cys Met Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 190
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 190
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Thr Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 45 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 191
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences
 <400> 191
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Arg Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 60 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 192
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Human and artificial sequences

WO 00/50460

PCT/EP00/01455

<400> 192
Cys Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Lys Pro Pro Thr Ile Gln Cys
1 5 10 15
5
<210> 193
<211> 20
<212> PRT
<213> Human and artificial sequences
10
<400> 193
Cys Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile
1 5 10 15
15
Gln Leu Leu Cys
20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/01455	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C07K16/00 G01N33/577	C07K16/42 G01N33/68	A61K39/00 A61P37/08
			A61K39/385 A61K39/395
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
STRAND, CHEM ABS Data, MEDLINE, LIFESCIENCES, CANCERLIT, AIDSLINE, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	SHAKIB F ET AL: "Elucidation of the epitope locations of human autoanti-IgE: recognition of two epitopes located within the C epsilon 2 and the C epsilon 4 domains." INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, (1991) 95 (2-3) 102-8. 1991, XP000929202 page 102, right-hand column, line 9 page 103, left-hand column, line 1-5 page 105, right-hand column, line 3 -page 107, left-hand column, line 5,28-44 figures 1,5 --- -/-		1-11,22, 27, 30-32,36
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	
"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
27 July 2000		04/08/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-0940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Covone, M	

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/01455

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 171 299 A (HAMBURGER ROBERT N) 16 October 1979 (1979-10-16) column 2, line 64 -column 3, line 3 column 3, line 14-23 column 5, line 49-55 -----	1,2,4,5, 9-12,27, 30,39
X	WO 99 04265 A (SAHIN UGUR ;TURECI OZLEM (DE); PFREUNDSCHUH MICHAEL (DE); GOUT IVA) 28 January 1999 (1999-01-28) page 85, line 43 -----	2,12
A	WO 98 24808 A (UNITED STATES DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, USA;PADLAN, EDUARDO) 11 June 1998 (1998-06-11) page 3, line 10-24 page 4, line 21-23 page 11, line 16-29 -----	1-41
A	HEUSSER C ET AL: "Therapeutic potential of anti-IgE antibodies." CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, (1997 DEC) 9 (6) 805-13. REF: 76 , 1997, XP002125679 page 805, right-hand column, paragraph 2 page 807, left-hand column, paragraphs 3,4 page 811, right-hand column, paragraph 3 -----	1-41

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/EP 00 01455

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 34 (partially) 37 (completely) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, and claims 39-41 (completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Present claims 1-9 encompass mimotopes which compounds have only been defined by reference to a desirable characteristic or property, namely any entity which when formulated into an immunogen, is capable of inducing an immune response, which response is capable of recognising the peptides disclosed (see page 6 of the application). The claims cover all products and compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products and compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define a compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products and compounds disclosed in claims 13, 14, 15 and 16.

Further the initial phase of the search for the subject-matter of claim 12 revealed more than 100 sequences corresponding to more than 50 documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claim 12 may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claim is impossible. Consequently, the search has been restricted to those parts of the claim 12 which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the products having the properties disclosed in claim 13.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members			International Application No PCT/EP 00/01455	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 4171299 A	16-10-1979	AU 514308 B	05-02-1981	
		AU 1230376 A	29-09-1977	
		BE 840193 A	30-09-1976	
		CA 1087171 A	07-10-1980	
		CA 1079721 A	17-06-1980	
		CH 624093 A	15-07-1981	
		DE 2602443 A	21-10-1976	
		FR 2305989 A	29-10-1976	
		GB 1539102 A	24-01-1979	
		JP 1278969 C	29-08-1985	
		JP 51118702 A	18-10-1976	
		JP 60002318 B	21-01-1985	
		MX 3790 E	20-07-1981	
		NL 7603384 A	06-10-1976	
		SE 430058 B	17-10-1983	
		SE 7603897 A	05-10-1976	
US 4161522 A	17-07-1979			
WO 9904265 A	28-01-1999	US 6043084 A	28-03-2000	
		AU 8571598 A	10-02-1999	
		EP 0996857 A	03-05-2000	
WO 9824808 A	11-06-1998	AU 6532498 A	29-06-1998	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/02	C 0 7 K 14/02	
C 0 7 K 16/42	C 0 7 K 16/42	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/48	R
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
	A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 9910538.9
(32)優先日 平成11年5月7日(1999.5.7)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9918594.4
(32)優先日 平成11年8月7日(1999.8.7)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9918603.3
(32)優先日 平成11年8月7日(1999.8.7)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9921046.0
(32)優先日 平成11年9月7日(1999.9.7)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9921047.8
(32)優先日 平成11年9月7日(1999.9.7)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9925619.0
(32)優先日 平成11年10月29日(1999.10.29)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 9927698.2
(32)優先日 平成11年11月23日(1999.11.23)
(33)優先権主張国 英国(GB)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (74)代理人 100092624
弁理士 鶴田 準一
(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(74)代理人 100081330
弁理士 樋口 外治
(72)発明者 ダイソン, マイケル

- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 フリード, マーティン
- イギリス国, ミドルセックス ティーダブリュ8 9イーピー, プレントフォード, ニュー ホラ
イズンズ コート 2, スミスクライン ビーチャム, コーポレイト インテレクチュアル プロ
パティ
- (72)発明者 グリーンウッド, ジュディス
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 ヒューイット, エレン
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 ラumont, アラン
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 メイソン, ショーン
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 ランドール, ロジャー
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 ターネル, ウィリアム ゴードン
- イギリス国, ケンブリッジ シービー1 9ピーティー, フルボーン ロード 100, ピーター
ハウス テクノロジー パーク, ペプチド セラピューティクス リミティド
- (72)発明者 バン メシュラン, マルセル ポーレト
- ベルギー国, ベ - 1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミスクライ
ン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 ビナル イグレック ドゥ パソール, カルロータ
- ベルギー国, ベ - 1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミスクライ
ン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA02 BA08 BA18 BA19 BA23
BA44 DA01 NA14 ZB052 ZB072 ZB132
- 4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 BB35 CC22 CC23 DD02 DD21 DD62
DD63 EE01 EE06 FF24
- 4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA41
CA40 DA76 DA86 EA28 EA50 FA34 FA44 FA51 FA72 FA74
GA22

专利名称(译)	来自IgE的C-epsilon-2结构域的表位或模拟表位，其拮抗剂及其治疗用途		
公开(公告)号	JP2004538238A	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2000601038	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 多肽疗法有限公司三通德		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME		
[标]发明人	ダイソンマイケル フリードマーティン グリーンウッドジュディス ヒューイトエレン ラモントアラン メイソンショーン ランドールロジャー ターネルウィリアムゴードン バンメシュランマルセルポーレト ビナルイグレックドウバソールカルロータ		
发明人	ダイソン,マイケル フリード,マーティン グリーンウッド,ジュディス ヒューイト,エレン ラモント,アラン メイソン,ショーン ランドール,ロジャー ターネル,ウィリアム ゴードン バン メシュラン,マルセル ポーレト ビナル イグレック ドウ バソール,カルロータ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61P31/00 A61P37/00 A61P37/08 B01J20/281 C07K7/00 C07K14/02 C07K16/00 C07K16/42 C07K19/00 G01N30/88 G01N30/48		
CPC分类号	C07K16/00 A61K47/6425 A61K47/646 A61K2039/505 A61K2039/6068 C07K16/4291 C07K2317/52		
FI分类号	C07K7/00.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P31/00 A61P37/00 A61P37/08 C07K14/02 C07K16/42 C07K19/00 G01N30/48.R G01N33/53.N A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB132 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB35 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD02 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA44 4H045/FA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22		
代理人(译)	石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	1999004405 1999-02-25 GB 1999007151 1999-03-29 GB 1999010537 1999-05-07 GB 1999010538 1999-05-07 GB		

1999018594 1999-08-07 GB
1999018603 1999-08-07 GB
1999021046 1999-09-07 GB
1999021047 1999-09-07 GB
1999025619 1999-10-29 GB
1999027698 1999-11-23 GB

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及提供用于治疗，预防或改善过敏性疾病的新型药物。特别地，新型药物是掺入IgE的Cε2结构域的表面暴露区域的表位或模拟表位的分离的肽。发明人发现这些新区域可以是被动和主动免疫预防或免疫疗法的靶标。本发明还涉及制备药物的方法，含有它们的药物组合物及其在医药中的用途。形成本发明的一个方面的是配体，尤其是单克隆抗体，其能够结合本发明的表面暴露的IgE区域，以及它们在医学中作为被动免疫疗法或免疫预防的用途。

ペプチド名	配列	位置配列及びIgEドメイン	配列番号
P1	EDGQVMDVD	Cε2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Cε2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQXHWLSDRT	Cε2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Cε2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Cε2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Cε2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Cε2 (Phe231-Thr235)	7