



(11) **EP 2 287 180 B9**

(12) **KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(15) Korrekturinformation:  
**Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)**  
**Korrekturen, siehe**  
**Beschreibung Abschnitt(e) 20-21, 39**

(51) Int Cl.:  
**C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)**

(48) Corrigendum ausgegeben am:  
**06.11.2013 Patentblatt 2013/45**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des  
Hinweises auf die Patenterteilung:  
**07.08.2013 Patentblatt 2013/32**

(21) Anmeldenummer: **10009856.5**

(22) Anmeldetag: **06.05.2004**

(54) **Lol p 5-Derivate mit reduzierter Allergenität und erhaltener T-Zellreaktivität**

Lol p 5-derivatives with reduced allergenicity and conserved T-cell reactivity

Dérivés de Lol p 5 doté d'un effet allergénique réduit et d'une réactivité aux lymphocytes T conservée

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR**  
**HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR**

(30) Priorität: **04.06.2003 DE 10325508**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**23.02.2011 Patentblatt 2011/08**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
**04739147.9 / 1 629 006**

(73) Patentinhaber: **Merck Patent GmbH**  
**64293 Darmstadt (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Wald, Martin, Dr.**  
**20253 Hamburg (DE)**  
• **Cromwell, Oliver, Dr.**  
**23701 Suesel-Fassendorf (DE)**  
• **Nandy, Andreas, Dr.**  
**22175 Hamburg (DE)**  
• **Kahlert, Helga, Dr.**  
**22041 Hamburg (DE)**  
• **Weber, Bernhard, Dr.**  
**21031 Hamburg (DE)**

• **Fiebig, Helmut, Prof.**  
**21493 Schwarzenbek (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:  
**WO-A-03/025009**

• **SCHRAMM G ET AL: "Allergen engineering: variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity", 15. Februar 1999 (1999-02-15), JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, PAGE(S) 2406-2414, XP002216586, ISSN: 0022-1767 \* Discussion, Tabelle IV \***  
• **SWOBODA INES ET AL: "Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE-binding capacity: Candidates for grass pollen-specific immunotherapy", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 32, Nr. 1, Januar 2002 (2002-01), Seiten 270-280, XP002611819, ISSN: 0014-2980**  
• **SUPHIOGLU C ET AL: "Molecular basis of IgE-recognition of Lol p 5, a major allergen of ryegrass pollen", MOLECULAR IMMUNOLOGY 19980401 GB LNKD- DOI:10.1016/S0161-5890(98) 00050-9, Bd. 35, Nr. 5, 1. April 1998 (1998-04-01), Seiten 293-305, XP002611820, ISSN: 0161-5890**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**EP 2 287 180 B9**

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Verwendung von Varianten des Gruppe-5-Allergens Lol p 5 aus *Lolium perenne*, welche eine gegenüber dem bekannten Wildtyp-Allergen verringerte IgE-Reaktivität sowie eine weitgehend erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Bereich, der dem Aminosäuresequenz-Bereich 94 - 113 des Phl p 5a entspricht, oder die Bereiche, die den Aminosäuresequenz-Bereichen 94 - 113 und 175 - 198 des Phl p 5a entsprechen, im Vergleich zu dem bekannten Wildtyp-Allergen fehlen. Diese hypoallergenischen Allergenvarianten können zur spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) von Patienten mit Graspollenallergie oder zur präventiven Immuntherapie von Graspollenallergien eingesetzt werden.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2002).

**[0003]** Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

**[0004]** In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.

**[0005]** Im Fall von Wiesenlieschengras (*Phleum pratense*) sind bislang Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54), Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), Phl p 4 (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) und Phl p 13 (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) als Hauptallergene identifiziert worden.

**[0006]** Die dominierenden Hauptallergene des Wiesenlieschengrases (*Phleum pratense*) sind Phi p 1 und Phl p 5, wobei Phl p 5 in zwei hinsichtlich ihrer Molekularmasse differenten Formen 5a und 5b, die von unabhängigen Genen kodiert werden, vorkommt. Die deduzierten Aminosäuresequenzen sowohl von Phl p 5a als auch von Phl p 5b konnten mittels rekombinanter DNA - Technik bestimmt werden. Phl p 5a ist ein Protein von ca. 32 kDa und reagiert mit den IgE-Antikörpern von 85 - 90 % der Graspollenallergiker. Phl p 5a existiert in einer Serie von homologen Varianten, die sich durch Punktmutationen voneinander unterscheiden und wahrscheinlich unterschiedlichen allelen Formen entsprechen. Die Pollen der verwandten Grasspezies wie z. B. *Lolium perenne*, *Poa pratensis* u. a. enthalten Allergene, die dem Phl p 5a homolog sind und zusammen als Gruppe 5-Allergene bezeichnet werden. Die hohe strukturelle Homologie dieser Gruppe 5-Allergene der Gräserarten bedingt eine entsprechend hohe Kreuzreaktivität der Moleküle mit den IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern.

**[0007]** Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102 (4): 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

**[0008]** Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggf. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten.

Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit rekombinanten Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten T-Helferzellen-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert (immuntherapeutische DNA-Vakzinierung). Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort durch eine

solche DNA-Vakzine konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

[0009] Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand nun in der Bereitstellung neuer Varianten des Gruppe-5-Allergens Lol p 5 auf Protein- und DNA-Ebene, die sich bei weitgehendem Erhalt der T-Zell-Reaktivität durch eine reduzierte IgE-Aktivität auszeichnen und daher für die spezifische Immuntherapie sowie die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung geeignet sind.

## Abbildungen

### [0010]

**Abbildung 1:** Alignment von relevanten Bereichen Phl p 5a-homologer cDNA-Sequenzen von Spezies der *Pooideae*: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) und *Hordeum vulgare* (Hor v) Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge

Phl p 5a-, Poa p 5- und Lol p 5-Sequenzen: cDNA-Sequenzen aus "GenBank"-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA

Hor v- und Tri a-Sequenzen: EST-Sequenzen aus EST-Datenbank des Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, USA

Schwarzer Rahmen: Sequenzidentität zu Phl p 5a (bezogen auf GenBank AJ555152)

Punktierter Rahmen: Deletion entsprechend Aminosäuren 94-113 (bezogen auf GenBank AJ555152)

Gestrichelter Rahmen: Deletion entsprechend Aminosäuren 175-198 (bezogen auf GenBank AJ555152)

**Abbildung 2:** Alignment Phl p 5a-homologer Aminosäuresequenzen (Relevante Sequenzbereiche, deduziert aus DNA-Sequenzen) von Spezies der *Pooideae*: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) und *Hordeum vulgare* (Hor v)

Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge

Phl p 5a-, Poa p 5- und Lol p 5-Sequenzen: cDNA-Sequenzen aus "GenBank"-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA

Hor v- und Tri a-Sequenzen: EST-Sequenzen aus EST-Datenbank des Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, USA

Schwarzer Rahmen: Sequenzidentität zu Phl p 5a (bezogen auf GenBank AJ555152)

Punktierter Rahmen: Deletion entsprechend Aminosäuren 94-113 (bezogen auf GenBank AJ555152)

Gestrichelter Rahmen: Deletion entsprechend Aminosäuren 175-198 (bezogen auf GenBank AJ555152)

**Abbildung 3:** SDS-PAGE von gereinigten Deletionsmutanten in Form von Histidin-Fusionsproteinen

1) Marker

2) rPhl p 5a wt (His)

3) Phl p 5a DM-D94-113 (His)

4) Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 (His)

5) Phl p 5a DM-D175-198 (His)

6) Marker

**Abbildung 4:** SDS-PAGE der gereinigten Nicht-Fusionsproteine Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 und rPhl p 5a wt (oben) und Identitätstest mit aPhl p 5-Antikörpern (unten)

Der aPhl p 5 mAb Apha-1D11 bindet die Region 175-198

(nur rPhl p 5a wt ist positiv)

Der aPhl p 5a mAb Apha-3B2 bindet ein gemeinsames

Epitop der beiden Phl p 5a-Moleküle (beide Proteine positiv)

(mAb: Monoklonaler Antikörper)

**Abbildung 5:** Analytische SEC der Deletionsmutante Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)

Säule: Superdex 75 HR10/ 30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

Laufmittel: PBS

Pfeil: Ausschlussvolumen

**Abbildung 6:** Nicht-denaturierende Isoelektrische Fokussierung der Deletionsmutante Phl p 5a DM-D94-113,

175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)

- 1) IEF-Marker
- 2) rPhl p 5a wt
- 3) Phl p 5a DM-D94-113, 175-198

pI rPhl p 5a wt = 8.7

pI rPhl p 5a DM-D94-113, 175-198 = 6.4

**Abbildung 7:** Streifentest zur Überprüfung der IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 5a-Deletions-mutanten (nicht-denaturierend)  
P: Seren klinisch definierter Gräserpollen-Allergiker

**Abbildung 8:** Nachweis der reduzierten IgE-Reaktivität der Phl p 5a-Deletionsmutanten mittels EAST-Inhibitionstest mit zwei repräsentativen Einzelseren (a und b) und einem Serum-Pool (c)

- nPh p 5a/ b
- rPhl p 5a wt
- △- rPhl p 5a (His)
- ◇- Phl p 5a DM-Δ94-113 (His)
- ◇- Phl p 5a DM-Δ175-198 (His)
- Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198
- Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His)

P: Seren klinisch definierter Gräserpollen-Allergiker

**Abbildung 9:** Nachweis der Hypoallergenität der Phl p 5a-Deletionsmutante Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 mittels Basophilen-Aktivierungstest mit Basophilen von sechs verschiedenen Gräserpollen-Allergikern (P)

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

### Mutagenese und Klonierung von cDNA-Sequenzen

**[0011]** Ausgangspunkt für die - erfindungsgemäß besonders bevorzugten - hypoallergenen Phl p 5a-Varianten ist die cDNA einer Isoform des Phl p 5a Wildtypes, die mit Hilfe spezifischer Primer durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der Gesamt-cDNA von Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense*) isoliert wurde (NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) GenBank Nummer AJ555152) (SEQ ID NO 1). Von der cDNA-Sequenz konnte die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 2 deduziert werden. Das aus 284 Aminosäuren bestehende Phl p 5a wurde in *E. coli* cytosolisch als lösliches Protein exprimiert und nachfolgend gereinigt. Diese rekombinante Wildtyp-Form von Phl p 5a (rPhl p 5a wt) reagiert mit monoklonalen anti-Phl p 5 Antikörpern und mit IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern, die eine Reaktivität mit natürlichem gereinigtem Phl p 5a (nPhl p 5a) aufwiesen.

**[0012]** Ausgehend von der beschriebenen cDNA von rPhl p 5a wt wurde eine Serie von differenten Deletionsvarianten (Deletionsmutanten) durch Restriktions-/ Ligationsverfahren und PCR hergestellt und in den Expressionsvektor pProExHTa (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert. Es wurden Abschnitte von 6 bis 72 bp Länge verteilt über die ganze Sequenz des cDNA-Moleküls deletiert, wodurch entsprechende Deletionen in den Polypeptidketten der in *E. coli* exprimierten Proteine induziert wurden.

**[0013]** Die Deletionsvarianten von Phl p 5a wurden mittels Immunoblot auf ihre Bindungsfähigkeit an IgE-Antikörper eines repräsentativen Serumpools von Graspollenallergikern untersucht.

**[0014]** Bei diesem Verfahren wurden überraschenderweise zwei Deletionsvarianten des Phl p 5a (Phl p 5a DM-Δ94-113, Deletion von Aminosäuren 94-113 und Phl p 5a DM-Δ175-198, Deletion von Aminosäuren 175-198 des rPhl p 5a wt) gefunden, die eine verminderte Bindung von IgE-Antikörpern (repräsentativer Serumpool) aufweisen. Diese beiden Phl p 5a-Deletionen dienten als Ausgangspunkt für die Konstruktion einer Doppel-Deletionsmutante, die beide wirksamen Deletionen enthält (Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198).

**[0015]** Die gentechnische Konstruktion von Phl p 5a DM-Δ94-113, Phl p 5a DM-Δ175-198 und Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 sowie deren biochemische und immunologische Charakterisierung sind im folgenden beschrieben.

**[0016]** Für die Konstruktion der Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ94-113 (SEQ ID NO 3, cDNA-Sequenz (795 bp), und SEQ ID NO 4, Aminosäuresequenz (264 aa)) wurden zunächst zwei Fragmente ausgehend von der cDNA von rPhl p 5a wt hergestellt. Das Fragment "F1-93", kodierend für Aminosäuren 1-93 von rPhl p 5a wt, wurde durch PCR mit Hilfe

der Primer 1 und 5, und das Fragment "F114-284" mit Hilfe der Primer 4 und 6 hergestellt (Primersequenzen s. Tab. 1). Die Fragmente "F1-93" und "F114-284" wurden in eine weitere PCR unter Einsatz der Primer 1 und 4 als Matrize eingesetzt, was in der Amplifikation der vollständigen cDNA kodierend für die Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ94-113 resultierte. Grundlage der Verbindung der Fragmente "F1-93" und "F114-284" durch PCR war ein beiden Fragmenten gemeinsamer Sequenzbereich. Dieser Sequenzbereich entstand dadurch, dass Fragment "F114-284" durch PCR mittels eines besonderen sense-Oligonukleotides amplifiziert wurde, welches im 5'-Bereich eine zusätzliche DNA-Sequenz kodierend für Aminosäuren 88-93 enthielt (Tab. 1).

**[0017]** Die cDNA-Sequenz kodierend für die Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ175-198 (SEQ ID NO 5, cDNA-Sequenz (783 bp), und SEQ ID NO 6, Aminosäuresequenz (260 aa)) wurde durch Restriktion und anschliessende Ligation von zwei getrennt hergestellten cDNA-Fragmenten generiert. Das 5'-terminale Fragment "F1-174" wurde mithilfe von Primer 1 und 2 und das 3'-terminale Fragment "F199-284" mit Hilfe von Primer 3 und 4 durch PCR hergestellt. Die cDNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *SpeI* verdaut und anschliessend ligiert (s. Tab. 1). Das Ligationsprodukt wurde unter Einsatz der Primer 1 und 4 durch PCR vermehrt.

**[0018]** Die cDNA der Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (SEQ ID NO 7, cDNA-Sequenz (723 bp), und SEQ ID NO 8, Aminosäuresequenz (240 aa)) wurde ebenfalls aus zwei cDNA-Fragmenten hergestellt. Das 5'-terminale Fragment wurde mit Primer 1 und 5 und mit rPhl p 5a wt-cDNA als Matrize, und das 3'-terminale Fragment mit Primer 4 und 6 mit Phl p 5a DM-Δ175-198-cDNA als Matrize generiert. Durch den gemeinsamen Sequenzbereich entsprechend Aminosäuren 88-93 des rPhl p 5a wt-Proteins wurden die Fragmente durch eine dritte PCR mit den Primer 1 und 4 verbunden, und das Produkt amplifiziert.

Die für die modifizierten Allergene kodierenden cDNA's wurden über die Restriktionsschnittstellen *EheI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert, und anschliessend vollständig sequenziert.

**[0019]** Die immunologische Kreuzreaktivität der Gruppe 5-Allergene der *Pooideae*, wie z.B. *Poa pratensis* und *Lolium perenne*, basiert auf einer sehr ähnlichen Aminosäuresequenz. Es gilt als gesichert, dass die entsprechenden Gene auf ein gemeinsames Progenitor-Gen zurückgehen. Sowohl für die Sequenzen der Deletionen Δ94-113 und Δ175-198 der Phl p 5a wt-Proteinsequenz (Bezug: GenBank AJ555152) als auch für deren flankierenden Sequenzbereiche existieren homologe Sequenzbereiche in den Gruppe 5-Allergenen der *Pooideae*. Die hohe Homologie der betreffenden Sequenzbereiche ist sowohl auf der Ebene der DNA- als auch Aminosäuresequenz nachweisbar (Abb. 1 und Abb. 2).

**[0020]**

**Tabelle 1:** Aufstellung der zur Herstellung von Deletionsvarianten eingesetzten PCR-Primer

Primer	SEQ ID NO	Richtung	Sequenz (5'→3')
1	9	sense	gcc gat cta ggc tac ggc ccg gcc
2	10	antisense	aac ata <u>act agt</u> ggc agc gac ctt gaa ggc ggc gtc
3	11	sense	atc ta <u>act agt</u> acg ggc ggc gcc tac gaga
4	12	antisense	aac ata aag ctt tca gac ttt gta gcc acc agt
5	13	antisense	gga gct gga ttc ggc ggc gcc ctt ggg
6	14	sense	gcc gcc gaa tcc agc tcc ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac
Die <i>SpeI</i> -Restriktionsstellen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet			

#### Expression und Reinigung rekombinanter Phl p 5a Moleküle

**[0021]** Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte als Histidin-Fusionsproteine mit integrierter Proteasespaltstelle (Expressionsvektor pProExHT; Invitrogen, Carlsbad, USA) zur optionalen Abspaltung des Histidin-Fusionsanteils (His) in *Escherichia coli* (Stamm JM109). rPhl p5a wt sowie die Deletionsmutanten wurden zunächst durch die spezifische Bindung der N-terminalen Histidinreste an eine Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Matrix (Immobilized-Metal-Ion-Affinity-Chromatography, IMAC) und nachfolgend durch präparative Gelfiltration (Size-Exclusion-Chromatography, SEC) gereinigt. Die Reinheit der eluierten Proteine wurde durch SDS-PAGE und analytische SEC kontrolliert. Die Ergebnisse zeigten, dass rPhl p 5a wt (His), Phl p 5a DM-Δ94-113 (His); Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) und Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His) mit hoher Reinheit und monomer dargestellt werden konnten (Abb. 3). Die Identität der Proteine wurde durch Phl p 5a-spezifische monoklonale Antikörper nachgewiesen.

**[0022]** Die Überprüfung der IgE-Reaktivität mittels IgE-Bindungstechniken (Immunoblotting, Streifentest, EAST-Inhi-

bitionstest und Basophilenaktivierungstest) sowie die Untersuchung der T-Zell-Reaktivität wurde außerdem mit Testsubstanzen ohne Histidin-Fusionsanteil durchgeführt.

Hierzu wurde die Deletionsvarianten parallel zu dem Vergleichsprotein rPhl p 5a-wt zunächst als Fusionsproteine hergestellt. Nachfolgend wurde jedoch der Histidin-Fusionsanteil enzymatisch abgespalten (TEV-Protease, Invitrogen, Carlsbad, USA), wodurch lediglich ein Glycin als Rest der Protease-Spaltsequenz an dem N-terminus des Zielprotein zurückblieb. Sowohl der abgespaltene Histidinanteil als auch die zur Spaltung verwendete Protease wurden durch IMAC vollständig abgetrennt. Nach einer präparativen SEC wurde die Reinheit und die Konformation der eluierten Proteine durch SDS-PAGE und analytische SEC überprüft, wie für rPhl p 5a wt und die Mutante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 in den Abbildungen 4 bzw. 5 dargestellt ist. Alle Proteine wurden rein und monomer dargestellt. Eine Untersuchung durch nicht-denaturierende Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Nicht-Fusionsproteine zeigte stets eine hohe Homogenität hinsichtlich der Oberflächenladung (s. Abb. 6, beispielhaft für Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198). Die Identität der rekombinanten Proteine wurde durch die monoklonalen Anti-Phl p 5-Antikörper (Allergopharma, Reinbek, Deutschland) Apha-1D11 oder Apha-3B2 (s. Abb. 4, beispielhaft für Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198) und N-terminale Sequenzierung nachgewiesen.

#### *Nachweis der reduzierten IgE-Bindung der Phl p 5a-Deletionsvarianten*

**[0023]** Eine einfache Testmethode zur Bestimmung der IgE-Reaktivität von allergenen Molekülen ist die Untersuchung der Bindung von spezifischem IgE aus Allergikerseren an membrangebundene Testproteine durch den Streifentest.

**[0024]** Dafür werden die Testsubstanzen in gleicher Konzentration und Menge nebeneinander an einen Streifen von Nitrocellulose-Membran unter nichtdenaturierenden Bedingungen gebunden. Eine Reihe solcher Membranstreifen kann parallel mit unterschiedlichen Allergikerseren inkubiert werden. Nach einem Waschschrift werden die spezifisch gebundenen IgE-Antikörper durch eine Farbreaktion, vermittelt von einem Anti-hIgE/ Alkalische Phosphatase-Konjugat, auf der Membran sichtbar gemacht.

**[0025]** Die IgE-Reaktivität der rekombinanten Proteine Phl p 5a wt (His), Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113 (His), Phl p 5a DM- $\Delta$ 175-198 (His) und Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 (His) wurde im Streifentest unter Einsatz von 43 individuellen Grasspollen-Allergikerseren vergleichend untersucht (Abb. 7).

Alle 43 Allergikerseren enthielten Phl p 5a-spezifische IgE-Antikörper, die mit dem natürlichen Phl p 5a (nPhl p 5a, hier nicht gezeigt) und dem rekombinanten Äquivalent rPhl p 5a wt (His) stark reagierten. Überraschenderweise wurde deutlich, dass die Phl p 5a-spezifischen IgE-Antikörper aller 43 Patientenseren gar nicht oder nur sehr stark vermindert an die Deletionsvariante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 (His) banden. Die reduzierte IgE-Bindung ist sowohl auf die Deletion  $\Delta$ 94-113 als auch auf die Deletion  $\Delta$ 175-198 zurückzuführen. Die Deletionsvariante Phl p 5a DM- $\Delta$ 175-198 (His) zeigt bei diesem Test bei 35 von 43 Allergikerseren eine klar erkennbar verminderte IgE-Bindungsfähigkeit. In einigen Tests war der Einfluß der Deletion von Aminosäuren 175-198 so hoch, dass die IgE-Bindung fast vollständig verhindert wurde (Bsp.: P3, P20, P28)

**[0026]** Der Einfluß der Deletion  $\Delta$ 94-113 auf die IgE-Bindungsreaktivität ist weniger stark ausgeprägt, aber ebenfalls deutlich sichtbar. Die Deletionsvariante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113 (His) wurde von IgE von 19 der 43 individuellen Allergikerseren deutlich schwächer als die Referenz rPhl p 5a wt (His) gebunden (Bsp.: P31, P37, P42). Die Reduktion der IgE-Bindung war allerdings in vielen Einzeltests weniger drastisch ausgeprägt als die Reduktion verursacht durch  $\Delta$ 175-198.

**[0027]** Somit wird deutlich, dass beide Deletionen zu der Verminderung der Gesamt-IgE-Bindungsreaktivität der Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 (His) beitragen.

**[0028]** Im Gegensatz zu dem Streifentest können mit dem EAST-Hemmtest (Enzyme Allergosorbent Test) Allergen/IgE-Interaktionen in Lösung untersucht werden, womit eine störende Maskierung von Epitopen der Testsubstanz durch die Immobilisierung an die Membran grundsätzlich ausgeschlossen werden kann. Der EAST-Hemmtest wird wie folgt ausgeführt. Mikrotiterplatten werden mit Allergenen, hier natürliches Phl p 5 (nPhl p 5a/b, Gemisch aus Phl p 5a und Phl p 5b), beschichtet. Nach Entfernung der nicht gebundenen Allergenmoleküle durch Waschen wird die Platte zur Vermeidung späterer unspezifischer Bindungen mit Rinderserumalbumin blockiert. IgE-Antikörper von Allergikern, als repräsentativer Pool von Einzelseren (Serum-Pool) oder als Einzelserum, wird in geeigneter Verdünnung mit den Allergen-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Die Menge der Allergengebundenen IgE-Antikörper wird über ein Zweitantikörper-gekoppeltes Enzym (Anti-hIgE/ Alkalische Phosphatase-Konjugat) durch die Umsetzung eines Substrates zu einem farbigen Endprodukt photometrisch quantifiziert. Die Bindung der IgE-Antikörper wird durch ein lösliches Allergen bzw. die zu prüfende Substanz (rekombinantes modifiziertes Allergen) in Abhängigkeit von der Konzentration substanzspezifisch gehemmt. Immunchemisch identische Substanzen zeigen identische Hemmkurven.

**[0029]** Als Referenzmoleküle dienten in dieser Arbeit nPhl p 5, rPhl p 5a wt, sowie das Histidin-Fusionsprotein rPhl p 5a wt (His). Neben anderen Molekülen wurde die IgE-Bindung der Histidin-Fusionsproteine Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113 (His), Phl p 5a DM- $\Delta$ 175-198 (His) und Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 (His) sowie die des Nicht-Fusionsproteins Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 vergleichend zu diesen Referenzen untersucht.

**[0030]** In Abb. 8a-c sind repräsentativ die spezifischen Hemmkurven von Testsubstanzen dargestellt, die mit zwei Individualseren und einem Serum-Pool von Grasspollenallergikern erhoben wurden. nPhl p 5a/b zeigte in allen Tests die stärkste Hemmwirkung (ca. 80-95% Hemmwirkung bei 10 µg/ml Konzentration). Die Hemmwirkung von rPhl p 5a war mit 70-80% maximaler Hemmung deutlich geringer. Dieser Effekt wird durch die Zusammensetzung von nPhl p 5a/b verursacht, welches neben der Isoform Phl p 5a auch die Isoform Phl p 5b enthält. Die spezifischen IgE-Antikörper gegen Phl p 5b können durch rPhl p 5a wt nicht inhibiert werden.

Der Histidin-Fusionsanteil zeigte keinen Einfluß auf die IgE-Bindung. Dies wird durch die identischen Hemmkurven von rPhl p 5a wt (His) und rPhl p 5a wt in allen Tests deutlich. Somit ist die Gültigkeit von Tests mit Histidin-Fusionsproteinen gezeigt.

**[0031]** Generell konnten zwei Gruppen von Patientenseren bezüglich der qualitativen IgE-Bindung unterschieden werden.

Die erste Gruppe wird von dem Individualserum P15 repräsentiert (Abb. 8 a). Diese Allergikerseren enthielten IgE-Antikörper, deren Bindung an Phl p 5a durch beide Deletionen,  $\Delta 94-113$  und  $\Delta 175-198$ , vermindert wurde. Die Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta 94-113$  (His) zeigte hier nur eine maximale Hemmwirkung von ca. 50% und die Deletionsmutante Phl p 5a DM-175-198 (His) eine Hemmwirkung von nur 20-30%.

**[0032]** Die Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta 94-113, 175-198$  (His) konnte die Bindung von IgE-Antikörpern bei der höchsten eingesetzten Konzentration sogar nur um 0-10% inhibieren. Der Einsatz des Nicht-Fusionsprotein Phl p 5a DM- $\Delta 94-113, 175-198$  bestätigte dieses Ergebnis (0-10% maximale IgE-Hemmung).

**[0033]** Die zweite Gruppe von Allergikerseren, repräsentiert durch Individualserum P44 (Abb. 8 b), unterschied sich von der ersten Gruppe dadurch, dass die in den Seren enthaltenen IgE-Antikörper mit Phl p 5a DM- $\Delta 94-113$  (His) ebenso gut reagierten wie mit der Referenz rPhl p 5a wt (His) (70-80% maximale Hemmung), während keine oder nicht-nachweisbare Mengen von IgE-Antikörpern mit Phl p 5a DM- $\Delta 175-198$  (His) reagierten (0-10% maximale Hemmung).

Ebenso zeigte die Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta 94-113, 175-198$  mit dieser Gruppe von Allergikerseren eine stark verminderte Hemmwirkung (0-10%), was sowohl für das Fusionsprotein als auch für das Fusionsanteil-freie Protein gezeigt werden konnte.

Offensichtlich enthielten die Seren dieser Allergiker IgE-Antikörper die hauptsächlich gegen Epitope des C-terminalen Teils des Moleküls gerichtet sind.

**[0034]** Die Messdaten der IgE-Bindungsreaktivität von IgE-Antikörpern eines Serum-Pools von 20 Allergikern unterstreichen die Wichtigkeit der Deletionen  $\Delta 94-113$  und  $\Delta 175-198$  für die Verminderung der IgE-Bindung des Phl p 5a (Abb. 8 c). Beide Einzel-Deletionsmutanten, Phl p 5a DM- $\Delta 94-113$  (His) und Phl p 5a DM- $\Delta 175-198$  (His) zeigen mit 40-50% bzw. ca. 30% eine geringere maximale Hemmwirkung als rPhl p 5a wt (ca. 70%). Die Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta 94-113, 175-198$  wurde von den IgE-Antikörpern des Serum-Pools nur sehr schwach gebunden (10-15% maximale Hemmung), was übereinstimmend mit dem Test von 43 Allergikern im Streifentest auf eine stark verminderte IgE-Bindungsreaktivität dieser

**[0035]** Phl p 5a-Variante bei sehr vielen, wenn nicht allen Grasspollen-Allergikern hinweist.

#### *Nachweis der Hypoallergenität der Deletionsmutanten durch Basophilen-Aktivierungstest*

**[0036]** Mittels eines Basophilen-Aktivierungstests wurden die Auswirkungen der reduzierten IgE-Bindungsfähigkeit der Deletionsmutanten auf die funktionelle Wirkung bei der Vernetzung von membrangebundenem IgE der Effektorzellen und deren Aktivierung untersucht. Damit wurde die funktionelle Reduktion der Allergenität mit einem sensitiven In-vitro-Test gemessen.

**[0037]** Für den Basophilen-Aktivierungstest wird heparinisiertes Vollblut von Grasspollen-Allergikern mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Dabei können allergene Substanzen spezifische IgE-Antikörper, welche mit den hochaffinen IgE-Rezeptoren der basophilen Granulozyten assoziiert, sind binden.

Die durch die Allergenmoleküle ausgelöste Vernetzung der IgE/Rezeptor-Komplexe führt zu einer Signaltransduktion, die in der Degranulation der Effektorzellen und somit dem Auslösen der allergischen Reaktionen in vivo resultiert.

**[0038]** In vitro kann die Allergen-induzierte Aktivierung von basophilen Immunozyten durch Quantifizierung der Expression eines mit der Signaltransduktion der IgE-Rezeptor-Vernetzung gekoppelten Oberflächenproteins (CD203c) nachgewiesen werden (Kahlert et al., Clinical Immunology and Allergy in Medicine Proceedings of the EAACI 2002 (2003) Naples, Italy 739-744). Die Zahl der exprimierten Oberflächenproteine auf einer Zelle und der Prozentwert der aktivierten Zellen eines Zellpools wird über die Bindung eines fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers an das Oberflächenprotein und anschließende Analyse durch Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie hochsensitiv gemessen.

**[0039]** Als Referenzsubstanzen wurden hier sowohl das gereinigte natürliche Phl p 5a (nPhl p 5a) als auch rPhl p 5a wt parallel zu den Testsubstanzen eingesetzt.

Die Testergebnisse der Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM  $\Delta 94-113, 175-198$  mit Basophilen von sechs Probanden sind in der Abbildung 9 als Kurvenverläufe dargestellt. Die Testergebnisse mit Basophilen von insgesamt 10 klinisch

definierten Allergikern sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die A50-Werte (A50: Allergenkonzentration bei 50% der Zahl maximal aktivierter Basophilen) der Referenzmoleküle lagen individuell variierend zwischen ~1,3-15 pM für rPhl p 5a wt und ~0,3-10 pM für nPhl p 5a (Tab. 2). Dagegen lagen die A50-Werte der Deletionsvariante Phl p 5a DM  $\Delta$ 94-113,175-198 zwischen ~18-8400 pM.

Aus den ermittelten A50-Werten der drei eingesetzten Substanzen konnte die allergene Wirksamkeit der Deletionsvariante Phl p 5a DM  $\Delta$ 94-113, 175-198 in Relation zu den unveränderten Referenzmolekülen nPhl p 5a und rPhl p 5a wt bei jedem Probanden ermittelt werden (Tab. 2).

Die relative allergene Wirksamkeit (Pr, Relative Potency) der Deletionsvariante Phl p 5a DM  $\Delta$ 94-113, 175-198 war zwischen ~12-5000 fach gegenüber der Referenz rPhl p 5a wt bzw. ~16-32000 fach gegenüber der Referenz nPhl p 5a erniedrigt (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Nachweis der Hypoallergenität der Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 mittels Basophilen-Aktivierungstest

Donor <sup>c</sup>	Testsubstanz A <sub>50</sub> [pM] <sup>a</sup>			Pr-Wert <sup>b</sup> Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198	Pr-Wert <sup>b</sup> Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198
	nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198	relativ zu rPhl p 5a wt <sup>d</sup>	relativ zu nPhl p 5a <sup>e</sup>
P13	4,08	5,34	477,2	0,0111	0,0085
P17	6,44	2,68	466,6	0,0057	0,0137
P20	0,26	1,68	8433,0	<b>0,0002<sup>f</sup></b>	<b>0,00003<sup>f</sup></b>
P23	1,02	1,26	39,2	0,0321	0,0260
P24	1,22	2,57	58,1	0,0442	0,0209
P28	9,43	11,35	198,2	0,0573	0,0476
P29	1,77	2,34	33,7	0,0694	0,0525
P31	10,15	14,66	3967,0	0,0037	0,0026
P34	3,48	2,54	165,1	0,0153	0,0211
P40	1,08	1,45	17,5	<b>0,0829</b>	<b>0,0617</b>
<sup>a</sup> Allergenkonzentration bei 50 % der Zahl maximal aktivierter Basophilen <sup>b</sup> Relative Potency <sup>c</sup> Klinisch definierte Gräserpollen-Allergiker <sup>d</sup> Berechnet von A50 rPhl p 5a wt/ A50 Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 <sup>e</sup> Berechnet von A50 nPhl p 5a/ A50 Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 <sup>f</sup> Fett: minimale und maximale Werte					

#### T-Zell-Reaktivität

**[0040]** T-Helfer-Lymphozyten reagieren mit Peptidfragmenten der Allergene (ca. 12-25 Aminosäuren), die durch enzymatischen Abbau in Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) entstehen und nach Einlagerung der geeigneten Peptide in die individuellen MHC-Klasse II-Moleküle an der Oberfläche der APZ den T-Zellen präsentiert werden. Diese allergenspezifische Aktivierung der T-Helfer-Lymphozyten ist die Voraussetzung für nachfolgende Reaktionen (Proliferation, Anergie, Apoptose) und für die funktionell Differenzierung (TH1 und TH2). Die Beeinflussung der allergenspezifischen T-Lymphozyten durch die Behandlung mit einem Allergen oder einer Allergenvariante bei der Hyposensibilisierung wird als Schlüssel für die therapeutische Wirksamkeit angesehen.

**[0041]** Zur Untersuchung der T-Zell-Reaktivität werden oligoklonale T-Zell-Linien (TCL) von Graminaenpollen-Allergikern unter Stimulation mit nPhl p 5- oder rPhl p 5-Molekülen nach üblichen Verfahren etabliert.

In einem Proliferationstest wurden die unterschiedlichen T-Zell-Linien mit den Referenz-Allergenen nPhl p 5a und rPhl p 5a wt sowie der Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM  $\Delta$ 94-113, 175-198 stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin mit den üblichen Verfahren bestimmt.



**Tabelle 3:** Nachweis der T-Zellreaktivität der Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 mittels Proliferationstests mit Phl p 5-spezifischen T-Zell-Linien (TCL)

Donor <sup>b</sup>	TCL	Stimulationsindex <sup>a</sup>		
		nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198
A	3.2	9,8	4,9	4,4
B	8.2	21,0	15,5	13,3
C	11.2	5,2	4,7	7,2
C	11.3	3,3	2,9	3,5
C	11.43	3,0	3,9	2,6
D	19.1	6,5	4,7	7,5
D	19.2	9,6	3,3	2,6
E	23.22	21,8	29,0	20,8
E	23.50	7,5	8,4	6,6
F	89.23	1,8	3,5	1,8
<sup>a</sup> Berechnet von [ <sup>3</sup> H]-Messwerten. cpm-Messwerte Allergen-stimulierter Zellkulturen/ cpm-Messwerte unstimulierter Zellkulturen				
<sup>b</sup> Donor: Klinisch definierte Gräserpollen-Allergiker				

**[0042]** Die Ergebnisse mit zehn TCL von sechs Allergikern zeigen, dass diese TCL durch Phl p 5a DM Δ94-113, 175-198 in vergleichbarer Stärke zur Proliferation stimuliert wurden wie durch das unveränderte natürliche bzw. das rekombinante Wildtyp-Allergen (Tab. 3).

**[0043]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Varianten des Gruppe-5-Allergens Lol p 5, welche durch eine gegenüber den bekannten Wildtyp-Allergenen verringerte IgE-Reaktivität sowie eine erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten gekennzeichnet sind.

**[0044]** Da es sich als besonders günstig im Sinne der Erfindung herausgestellt hat, wenn bei den Gruppe-5-Allergenen Aminosäuresequenz-Bereiche fehlen bzw. entfernt werden, die den Aminosäuresequenz-Bereichen 94 - 113 und 175 - 198 des Phl p 5a entsprechen, sind insbesondere solche Allergenvarianten Gegenstand dieser Erfindung. Dabei können der erstgenannte oder der zweitgenannte Bereich einzeln, aber auch beide genannten Bereiche gleichzeitig fehlen, wobei letztere Ausführungsform ganz besonders bevorzugt ist.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe-5-Allergene aus *Pooideae* können diese Bereiche eindeutig in Sequenzalignments der Phl p 5a-Sequenz mit Sequenzen anderer Gruppe-5-Allergene identifiziert werden. Vorzugsweise stammen die vorbeschriebenen Allergenvarianten von Phl p 5a ab bzw. entsprechen den Sequenzen gemäß SEQ ID NO 4, 6 oder 8.

**[0045]** Es bietet sich an, die erfindungsgemäßen Allergenvarianten, ausgehend von der klonierten DNA-Sequenz mit Hilfe gentechnischer Methoden herzustellen. Grundsätzlich kann es sich aber auch um chemische Modifikationen des nativen Allergenextrakts handeln (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382).

**[0046]** Naturgemäß sind über die in der vorliegenden Patentanmeldung beschriebenen Variationen von Gruppe-5-Allergenen auch weitere Veränderungen an anderen Positionen - etwa zur Erhöhung der Hypoallergenität - möglich. Bei diesen Modifikationen kann es sich beispielsweise um Aminosäure-Insertionen, -Deletionen und -Austausche, Aufspaltungen des Proteins in Fragmente sowie Fusionen des Proteins oder seiner Fragmente mit anderen Proteinen oder Peptiden handeln.

**[0047]** Bei der Herstellung der hier genauer beschriebenen Allergenvarianten wurde zum Zwecke einer verbesserten Reinigung der überexprimierten Proteine gentechnisch ein His-Tag eingeführt.

**[0048]** Gegenstand ist weiterhin ein DNA-Molekül, kodierend für eine zuvor beschriebene Allergenvariante, insbesondere entsprechend einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 3, 5 oder 7, ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend dieses DNA-Molekül sowie ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor. Geeignete Wirtsorganismen können pro- oder eukaryontische, ein- oder mehrzellige Organismen wie Bakterien oder Hefen sein. Ein erfindungsgemäß bevorzugter Wirtsorganismus ist *E. coli*.

**[0049]** Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Allergenvariante durch

Kultivieren des besagten Wirtsorganismus und Gewinnung der entsprechenden Allergenvariante aus der Kultur.

**[0050]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem die zuvor beschriebenen Allergenvarianten, DNA-Moleküle und Expressionsvektoren in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.

**[0051]** Weiterhin sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zubereitungen enthaltend mindestens eine dieser Allergenvarianten bzw. ein entsprechendes DNA-Molekül oder einen entsprechenden Expressionsvektor sowie gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind, bzw. zur immuntherapeutischen Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

Handelt es sich um pharmazeutische Zubereitungen des zweiten Typs (enthaltend mindestens ein DNA-Molekül oder einen Expressionsvektor), so enthalten diese Zubereitungen vorzugsweise weiterhin Aluminiumhydroxid, ein immunstimulatorisches CpG-haltiges Oligonukleotid oder eine Kombination beider als Hilfsstoffe.

**[0052]** Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne dieser Erfindung können als Therapeutika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und mit erfindungsgemäßen Gruppe-5-Allergenvarianten nicht reagieren. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Die erfindungsgemäßen Allergenvarianten können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.

Weiterhin können durch entsprechende Formulierung der erfindungsgemäßen Allergenvarianten Depotpräparate, beispielsweise durch Adsorption an Aluminiumhydroxid, erhalten werden.

**[0053]** Schließlich ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung mindestens einer erfindungsgemäßen Allergenvariante bzw. eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls oder eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind bzw. zur immuntherapeutischen Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

## Sequenz-Protokoll

### **[0054]**

<110> Merck Patent GmbH

<120> Phl p 5a-Derivate mit reduzierter Allergenität und erhaltener T-Zellreaktivität

<130> P 03/109

<140> DE 10325508.7

<141> 2003-06-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 855

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 1

EP 2 287 180 B9

	gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgccggcta ccccccgcc	60
	gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag	120
5	aagatcaacg ccggcttcaa ggcggccttg gccgctgccg ccggcgctccc gccagcggac	180
	aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc	240
	ctctcggggc agcccaaggc cgccgccgaa tccagctcca aggcgcgctt cacctccaag	300
10	ctcgacgccg cctacaagct cgcttacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag	360
	tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	420
	gtccacgccg tcaagcccg gcgcgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag	480
15	gtcatcgaga aggtcgacgc cgcttcaag gtcgctgcca ccgccgcaa cgcgcgccc	540
	gccaacgaca agttcacctt cttcgaggcc gccttcaaca acgcatcaa ggcgagcacg	600
20	ggcggcgcct acgagagcta caagttcatc cccgccctgg aggcgcgctt caagcaggcc	660
	tacgccgcca ccgtcgccac cgcgccggag gtcaagtaca ccgtctttga gaccgcgctg	720
	aaaaaggcca tcaccgcat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagccgc tgccgctgcc	780
25	accgccaccg caacctccgc cgttggcgcg gccaccggcg ccgccaccgc cgctactggt	840
	ggctacaaag tctga	855
30	<210> 2 <211> 284 <212> PRT <213> Phleum pratense	
35	<400> 2	
40		
45		
50		
55		

EP 2 287 180 B9

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly  
1 5 10 15

5 Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr  
20 25 30

10 Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala  
35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr  
50 55 60

15 Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly  
65 70 75 80

20 Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala  
85 90 95

Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala  
100 105 110

25 Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu  
115 120 125

30 Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val  
130 135 140

Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln

35

40

45

50

55

EP 2 287 180 B9

	145		150		155		160									
5	Val	Ile	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala
					165					170					175	
10	Asn	Ala	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Lys	Phe	Thr	Val	Phe	Glu	Ala	Ala	Phe
					180				185					190		
15	Asn	Asn	Ala	Ile	Lys	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly	Ala	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Lys
					195			200					205			
20	Phe	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Thr
					210			215				220				
25	Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Glu	Val	Lys	Tyr	Thr	Val	Phe	Glu	Thr	Ala	Leu
					225			230			235					240
30	Lys	Lys	Ala	Ile	Thr	Ala	Met	Ser	Glu	Ala	Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Pro
					245					250					255	
35	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Thr
					260				265				270			
40	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val				
					275			280								

<210> 3

<211> 795

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 3

40	gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgccggcta ccccccgcc	60
	gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag	120
	aagatcaacg ccggcttcaa ggcggccttg gccgctgccc ccggcgctccc gccagcggac	180
45	aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcgaggggc	240
	ctctcggggc agcccaaggg cgcgcgccaa tccagctccg gcgcgacgcc tgaggccaag	300
	tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	360
50	gtccacgccc tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag	420
	gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccgccgcaa cgccgcgccc	480

55

EP 2 287 180 B9

gccaacgaca agttcacctg cttcgaggcc gccttcaaca acgccaatcaa ggcgagcacg 540  
 ggcggcgccct acgagagcta caagttcatc cccgccctgg aggcgcgcgt caagcaggcc 600  
 5 tacgccgcca ccgtcgccac cgcgccggag gtcaagtaca ccgtctttga gaccgcgctg 660  
 aaaaaggcca tcaccgccat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagcccgc tgccgctgcc 720  
 accgccaccg caacctccgc cgttggcgcg gccaccggcg ccgccaccgc cgctactggt 780  
 10 ggctacaaag tctga 795

<210> 4

<211> 264

15 <212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

20 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr  
 25 20 25 30  
 Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala  
 35 35 40 45  
 Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr  
 50 55 60  
 Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly  
 35 65 70 75 80  
 Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr  
 40 85 90 95  
 Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala  
 45 115 120 125  
 Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys  
 50 130 135 140  
 Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro

55

# EP 2 287 180 B9

	145		150		155		160
5	Ala Asn Asp Lys	Phe Thr Val Phe Glu	Ala Ala Phe Asn Asn	Ala Ile			
		165	170	175			
	Lys Ala Ser Thr	Gly Gly Ala Tyr	Glu Ser Tyr Lys	Phe Ile Pro Ala			
10		180	185	190			
	Leu Glu Ala Ala	Val Lys Gln Ala Tyr	Ala Ala Thr Val	Ala Thr Ala			
		195	200	205			
15	Pro Glu Val Lys	Tyr Thr Val Phe Glu	Thr Ala Leu Lys	Lys Ala Ile			
		210	215	220			
	Thr Ala Met Ser	Glu Ala Gln Lys	Ala Ala Lys Pro	Ala Ala Ala			
20		225	230	235	240		
	Thr Ala Thr Ala	Thr Ser Ala Val	Gly Ala Ala Thr	Gly Ala Ala Thr			
		245	250	255			
25	Ala Ala Thr Gly	Gly Tyr Lys Val					
		260					

<210> 5  
 <211> 783  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

<400> 5

35	gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgcccggcta ccccccgcc	60
	gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag	120
	aagatcaacg ccggttcaa ggcggccttg gccgctgccg ccggcgctccc gccagcggac	180
40	aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc	240
	ctctcgggcg agcccaaggg cgccgccgaa tccagctcca aggcgcgcgt cacctccaag	300
	ctcgacgccg cctacaagct cgcctacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag	360
45	tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	420
	gtccacgccg tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag	480
50	gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcc aagcacggg cggcgcctac	540
	gagagctaca agttcatccc cgccctggag gccgcggtca agcaggccta cgccgccacc	600

EP 2 287 180 B9

gtcgccaccg cgccggaggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 660  
accgccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgtg ccgctgccac cgccaccgca 720  
5 acctccgccg ttggcgcggc caccggcgcc gccaccgccg ctactggtgg ctacaaagtc 780  
tga 783

<210> 6  
10 <211> 260  
<212> PRT  
<213> Phleum pratense

15 <400> 6

Ala	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gly	Pro	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Gly	1	5	10	15
Tyr	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Ala	Gly	Lys	Ala	Thr	20	25	30	
Thr	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Phe	Lys	Ala	35	40	45	
Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Pro	Pro	Ala	Asp	Lys	Tyr	Arg	Thr	50	55	60	
Phe	Val	Ala	Thr	Phe	Gly	Ala	Ala	Ser	Asn	Lys	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly	65	70	75	80
Leu	Ser	Gly	Glu	Pro	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Ala	85	90	95	
Leu	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Ala	Ala	Tyr	Lys	Leu	Ala	Tyr	Lys	Thr	Ala	100	105	110	
Glu	Gly	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala	Lys	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Val	Ala	Thr	Leu	115	120	125	
Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ile	Ile	Ala	Gly	Thr	Leu	Glu	Val	His	Ala	Val	130	135	140	
Lys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Gly	Glu	Leu	Gln	145	150	155	160
Val	Ile	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Thr				



EP 2 287 180 B9

	165	170	175
5	Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala 180 185 190		
10	Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys 195 200 205		
15	Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser 210 215 220		
20	Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala 225 230 235 240		
25	Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly 245 250 255		
30	Gly Tyr Lys Val 260		
35	<210> 7 <211> 723 <212> DNA <213> Phleum pratense		
40	<400> 7		
45	gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg cgcgcggcta ccccccgcc 60		
50	gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag 120		
55	aagatcaacg ccggttcaa ggcggccttg gccgctgccg ccggcgctccc gccagcggac 180		
60	aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcgaggggc 240		
65	ctctcggggc agcccaaggg cgccgccgaa tccagctccg gcgcgacgcc tgaggccaag 300		
70	tacgagcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag 360		
75	gtccacgccg tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag 420		
80	gtcatcgaga aggtcgacgc cgcccttcaag gtcgctgcc aagcacggg cggcgccctac 480		
85	gagagctaca agttcatccc cgccctggag gccgcccgtca agcaggccta cgccgccacc 540		
90	gtcgccaccg cgccggaggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 600		
95	accgccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgtg ccgctgccac cgccaccgca 660		
100	acctcgccg ttggcgcggc caccggcgcc gccaccgcc ctactggtgg ctacaaagtc 720		
105	tga 723		
110	<210> 8 <211> 240		

EP 2 287 180 B9

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

5

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly  
1 5 10 15

10

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr  
20 25 30

15

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala  
35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr  
50 55 60

20

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly  
65 70 75 80

25

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr  
85 90 95

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu  
100 105 110

30

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala  
115 120 125

35

Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys  
130 135 140

Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ala Tyr  
145 150 155 160

40

Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala  
165 170 175

45

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe  
180 185 190

50

Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys  
195 200 205

Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val  
210 215 220

55

Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val  
225 230 235 240

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

5

<400> 9  
 gccgatctag gctacggccc ggcc 24

10

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

15

<400> 10  
 aacataacta gtggcagcga cctgaaggc ggcgtc 36

20

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

25

<400> 11  
 atctaactag tacggcgccg gcctacgaga 30

30

<210> 12  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

<400> 12  
 aacataaagc ttccagactt ttagccacc agt 33

35

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

40

<400> 13  
 ggagctggat tcggcgccgc cctggg 27

45

<210> 14  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Phleum pratense

<400> 14  
 gccgccgaat ccagctccgg cgcgacgcct gaggccaagt acgac 45

50

## Patentansprüche

1. Varianten des Gruppe-5-Allergens Lol p 5, welche eine gegenüber dem bekannten Wildtyp-Allergen verringerte IgE-Reaktivität sowie eine weitgehend erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten aufweisen, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Bereich, der dem Aminosäuresequenz-Bereich 94 - 113 des Phl p 5a entspricht, oder die Bereiche, die den Aminosäuresequenz-Bereichen 94 - 113 und 175 - 198 des Phl p 5a entsprechen, im Vergleich zu dem bekannten Wildtyp-Allergen fehlen.
2. Allergenvarianten gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie durch gentechnische Methoden rekomb-

binant erhalten werden.

3. DNA-Molekül, kodierend für eine Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2.

4. Rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 3, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.

5. Ein nicht menschlicher Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 3 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 4.

6. Verfahren zur Herstellung einer Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2, durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 5 und Gewinnung der entsprechenden Allergenvariante aus der Kultur.

7. Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2 als Arzneimittel.

8. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens eine Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind.

9. Verwendung mindestens einer Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind.

10. DNA-Molekül gemäß Anspruch 3 als Arzneimittel.

11. Rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 4 als Arzneimittel.

12. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 oder mindestens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 12, enthaltend Aluminiumhydroxid, ein immunstimulatorisches CpG-haltiges Oligonukleotid oder eine Kombination beider als Hilfsstoffe.

14. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 10 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-5-Allergene der *Pooideae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

## Claims

1. Variants of the group 5 allergen Lol p 5 which have reduced IgE reactivity compared with the known wild-type allergen and substantially retained reactivity with T-lymphocytes, **characterised in that** a region which corresponds to amino-acid sequence region 94 -113 of Phl p 5a or the regions which correspond to amino-acid sequence regions 94 - 113 and 175 - 198 of Phl p 5a are missing compared with the known wild-type allergen.

2. Allergen variants according to Claim 1, **characterised in that** they are obtained by recombinant genetic engineering methods.

3. DNA molecule encoding for an allergen variant according to Claim 1 or 2.

4. Recombinant expression vector containing a DNA molecule according to Claim 3, functionally connected to an expression control sequence.

5. Non-human host organism transformed with a DNA molecule according to Claim 3 or an expression vector according to Claim 4.

6. Process for the preparation of an allergen variant according to Claim 1 or 2 by cultivation of a host organism according to Claim 5 and isolation of the corresponding allergen variant from the culture.
7. Allergen variant according to Claim 1 or 2 as medicament.
8. Pharmaceutical composition comprising at least one allergen variant according to Claim 1 or 2 and optionally further active compounds and/or adjuvants for the treatment of allergies in the triggering of which group 5 allergens of the *Pooideae* are involved.
9. Use of at least one allergen variant according to Claim 1 or 2 for the preparation of a medicament for the treatment of allergies in the triggering of which group 5 allergens of the *Pooideae* are involved.
10. DNA molecule according to Claim 3 as medicament.
11. Recombinant expression vector according to Claim 4 as medicament.
12. Pharmaceutical composition comprising at least one DNA molecule according to Claim 10 or at least one expression vector according to Claim 11 and optionally further active compounds and/or adjuvants for the immunotherapeutic DNA vaccination of patients having allergies in the triggering of which group 5 allergens of the *Pooideae* are involved and/or for the prevention of such allergies.
13. Pharmaceutical composition according to Claim 12, comprising aluminium hydroxide, an immunostimulatory CpG-containing oligonucleotide or a combination of the two as adjuvants.
14. Use of at least one DNA molecule according to Claim 10 or at least one expression vector according to Claim 11 for the preparation of a medicament for the immunotherapeutic DNA vaccination of patients having allergies in the triggering of which group 5 allergens of the *Pooideae* are involved and/or for the prevention of such allergies.

## Revendications

1. Variantes de l'allergène de groupe 5 Lol p 5 qui ont une réactivité IgE réduite par comparaison avec l'allergène de type sauvage connu et une réactivité substantiellement conservée avec les lymphocytes T, **caractérisées en ce qu'une** région qui correspond à la région de séquence d'acides aminés 94 - 113 de Phl p 5a ou les régions qui correspondent aux régions de séquence d'acides aminés 94 - 113 et 175 - 198 de Phl p 5a sont manquantes par comparaison avec l'allergène de type sauvage connu.
2. Variantes d'allergène selon la revendication 1, **caractérisées en ce qu'elles** sont obtenues par des méthodes de génie génétique recombinant.
3. Molécule d'ADN codant pour une variante d'allergène selon la revendication 1 ou 2.
4. Vecteur d'expression recombinant contenant une molécule d'ADN selon la revendication 3, lié fonctionnellement à une séquence de contrôle d'expression.
5. Organisme hôte non humain transformé avec une molécule d'ADN selon la revendication 3 ou un vecteur d'expression selon la revendication 4.
6. Procédé pour la préparation d'une variante d'allergène selon la revendication 1 ou 2 par mise en culture d'un organisme hôte selon la revendication 5 et par isolation de la variante d'allergène correspondante vis-à-vis de la culture.
7. Variante d'allergène selon la revendication 1 ou 2 comme médicament.
8. Composition pharmaceutique comprenant au moins une variante d'allergène selon la revendication 1 ou 2 et optionnellement d'autres composés actifs et/ou adjuvants pour le traitement d'allergies dans la sélection de quel groupe 5 des allergènes de *Pooideae* sont impliqués.

9. Utilisation d'au moins une variante d'allergène selon la revendication 1 ou 2 pour la préparation d'un médicament pour le traitement d'allergies dans la sélection de quel groupe 5 des allergènes de *Pooideae* sont impliqués.

10. Molécule d'ADN selon la revendication 3 comme médicament.

11. Vecteur d'expression recombinant selon la revendication 4 comme médicament.

12. Composition pharmaceutique comprenant au moins une molécule d'ADN selon la revendication 10 ou au moins un vecteur d'expression selon la revendication 11 et optionnellement d'autres composés actifs et/ou adjuvants pour la vaccination par ADN immunothérapeutique de patients ayant des allergies dans la sélection de quel groupe 5 des allergènes de *Pooideae* sont impliqués et/ou pour la prévention de telles allergies.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, comprenant hydroxyde d'aluminium, un oligonucléotide contenant CpG immuno-stimulateur ou une combinaison des deux en tant qu'adjuvants.

14. Utilisation d'au moins une molécule d'ADN selon la revendication 10 ou d'au moins un vecteur d'expression selon la revendication 11 pour la préparation d'un médicament pour la vaccination par ADN immunothérapeutique de patients ayant des allergies dans la sélection de quel groupe 5 des allergènes de *Pooideae* sont impliqués et/ou pour la prévention de telles allergies.

**Figur 1:**

Alignment von relevanten Bereichen Phl p 5a-homologer cDNA-Sequenzen von Spezies der Poideae: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) und *Hordeum vulgare* (Hor v)

62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	
113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232
233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312
313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352
353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392
393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432
433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472
473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512
513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552
553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592
593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632
633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672
673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712
713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752
753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792
793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832
833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872
873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912
913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952
953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992
993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032
1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072
1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112
1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152
1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192
1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232
1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272
1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312
1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352
1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392
1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432
1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472
1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512
1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540</												

**Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge**

Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge  
 Phl p 5a-, Paa p 5- und Lol p 5-Sequenzen: cDNA-Sequenzen aus "GenBank"-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA  
 Hor v- und Tri a-Sequenzen: EST-Sequenzen aus EST-Datenbank des Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, USA  
 Schwarzer Rahmen: Sequenzidentität zu Phl p 5a (bezogen auf GenBank AJ555152)

**Punktierter Rahmen:** Deletion entsprechend Aminosäuren 94-113 (bezogen auf GenBank AJ555152)

Figur 2:

Alignment Phi p 5a-homologer Aminosäuresequenzen (Relevante Sequenzbereiche, deduziert aus DNA-Sequenzen) von Spezies der Pooideae: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) und *Hordeum vulgare* (Hor v)

169	P P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G L S G E P K	Phi p 5a GenBank AJ555152
324	P A A N K Y K T F V A T F G A A S N K A F A E A L S T E P K	Poa p 5 (9) GenBank M38344
286	P P A D K Y K T F V E T F G T A T N K A F V E G L A S - -	Lol p 5 GenBank L13083
82	P P A D K Y K T F E A T F A A A S N K A F A E V L K G A A A T	Hor v TIGR EST TC48346
296	P P A D K Y K T F E A T F S A A S N X A F A D V L K A A A S	Tri a TIGR EST TC66963
259	G - - A A E S S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K T A E G	Phi p 5a GenBank AJ555152
414	G - - A A V D S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K S A E G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
367	- - G Y A D Q S K N Q L T S K L D A A L K L A Y E A A Q G	Lol p 5 GenBank L13083
172	G Q I A G Q S S S M A K L S S S L E L S Y K L A Y D K A Q G	Hor v TIGR EST TC48346
386	G Q M P A Q S A S M A S L S K S L E A S Y K L A Y D K A Q G	Tri a TIGR EST TC66963
343	A T P E A K Y D A Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H A V	Phi p 5a GenBank AJ555152
498	A T P E A K Y D D Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H G V	Poa p 5 (9) GenBank M38344
448	A T P E A K Y D A Y V A T L T E A L R V I A G T L E V H A V	Lol p 5 GenBank L13083
262	A T P E A K Y D A Y V A T L T E S L R V I S G T L E V H S V	Hor v TIGR EST TC48346
476	A T P E T K Y D T Y V A S L T E S L R V I S G A F E V H S V	Tri a TIGR EST TC66963
433	K P A A E E V K V - - I P A G E L Q V I E K V D A A F K V A	Phi p 5a GenBank AJ555152
588	K P A A E E V K A - - T P A G E L Q V I D K V D A A F K V A	Poa p 5 (9) GenBank M38344
538	K P A A E E V K V G A I P A A E V Q L I D K V D A A Y R T A	Lol p 5 GenBank L13083
352	K P A A E E V K - - G V P A G E L K A I D Q V D A A F R T A	Hor v TIGR EST TC48346
566	K P A A E E V K G X K I P A P Q L K T I D Q I D A A Y R T A	Tri a TIGR EST TC66963
517	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G	Phi p 5a GenBank AJ555152
672	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
628	A T A A N A A P A N D K F T V F E N T F N N A I K V S L G A	Lol p 5 GenBank L13083
436	A T A A D A A P A N D K F T V F E S L Q Q G P S R K P R G G	Hor v TIGR EST TC48346
650	A T A A D A A P V N D K F T V F E S A F N K A I K E T T G G	Tri a TIGR EST TC66963
607	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A T A P E V K	Phi p 5a GenBank AJ555152
762	A Y Q S Y K F I P A L E A A V K Q S Y A A T V A T A P A V K	Poa p 5 (9) GenBank M38344
718	A Y D S Y K F I P T L V A A V K Q A Y A A K Q A T A P E V K	Lol p 5 GenBank L13083
526	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A S A P E V K	Hor v TIGR EST TC48346
740	A Y D N Y K F V P A L E S A V K Q A Y A A T V A S A P E V K	Tri a TIGR EST TC66963
697	Y T V F E T A L K K A I T A M S E A Q R A A K P A A A A T A	Phi p 5a GenBank AJ555152
852	Y T V F E T A L K K A I T A M S Q A Q R A A K P A A A A T G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
808	Y T V S E T A L K K A V T A M S E A E K E A T P A A A A T A	Lol p 5 GenBank L13083
616	F T V F Q T A L S K A I N A M T Q A G K V A K P A A A A T A	Hor v TIGR EST TC48346
830	Y A V F Q A A L S K A I N A M V E A E K D A G A A A A G G Y	Tri a TIGR EST TC66963

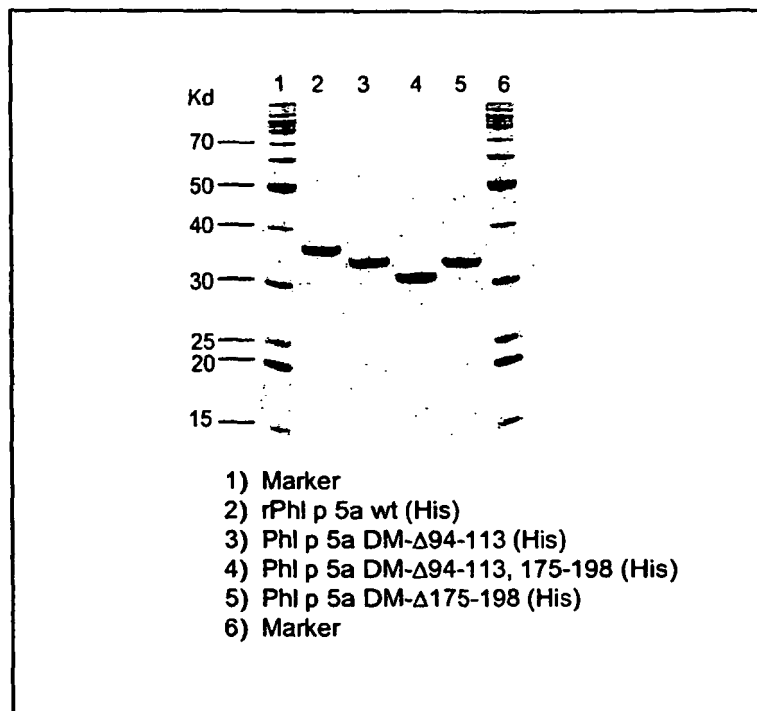
Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge

Phi p 5a-, Poa p 5- und Lol p 5-Sequenzen: cDNA-Sequenzen aus „GenBank“-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA



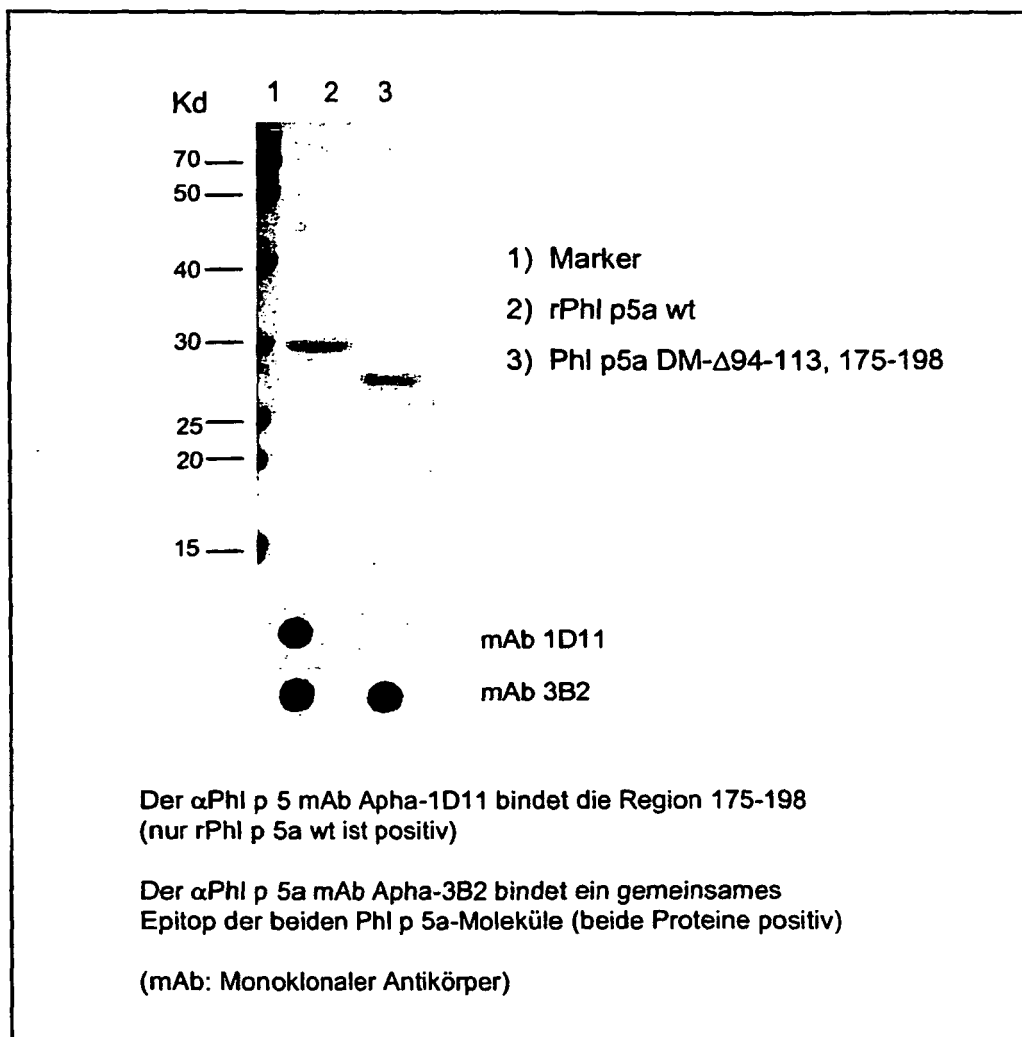
**Figur 3:**

**SDS-PAGE von gereinigten Deletionsmutanten in Form von Histidin-Fusionsproteinen**



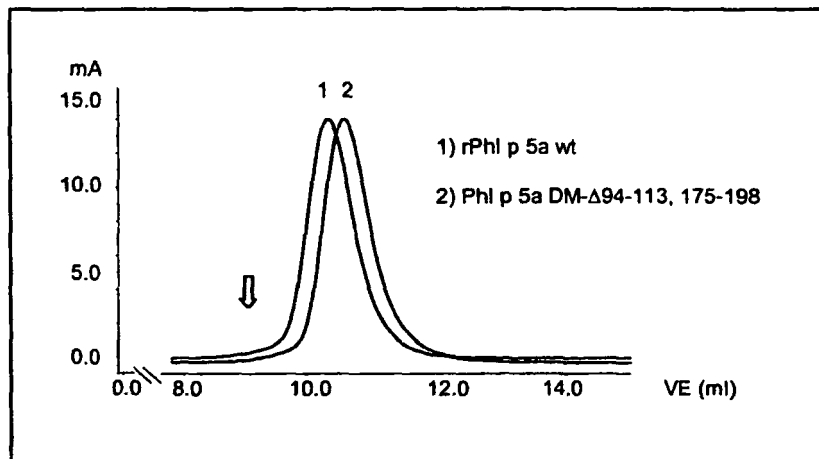
**Figur 4:**

SDS-PAGE der gereinigten Nicht-Fusionsproteine Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 und rPhl p 5a wt (oben) und Identitätstest mit  $\alpha$ Phl p 5-Antikörpern (unten)



**Figur 5:**

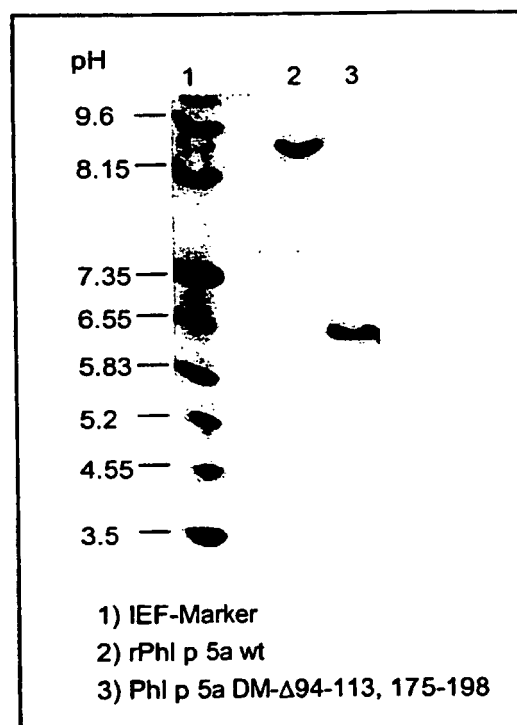
Analytische SEC der Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)



Säule: Superdex 75 HR10/ 30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)  
 Laufmittel: PBS  
 Pfeil: Ausschlussvolumen

**Figur 6:**

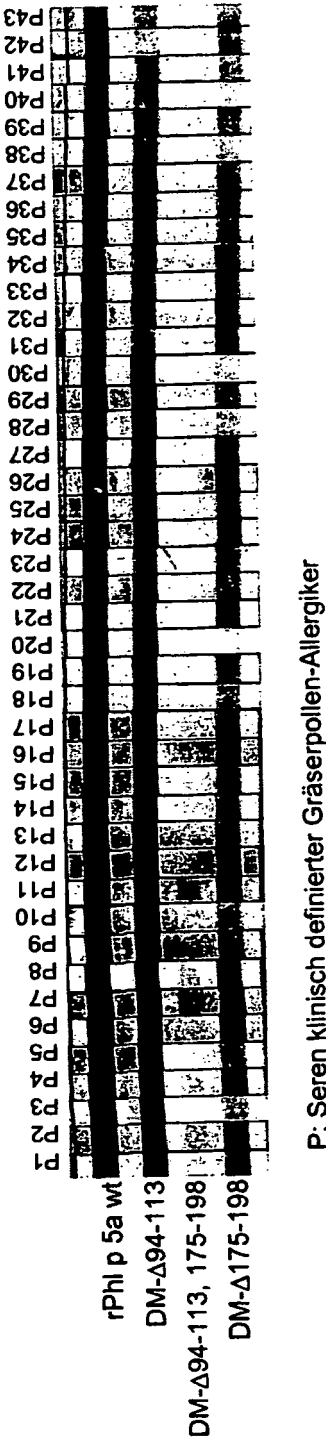
Nicht-denaturierende Isoelektrische Fokussierung der Deletionsmutante Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)



pI rPhl p 5a wt = 8.7

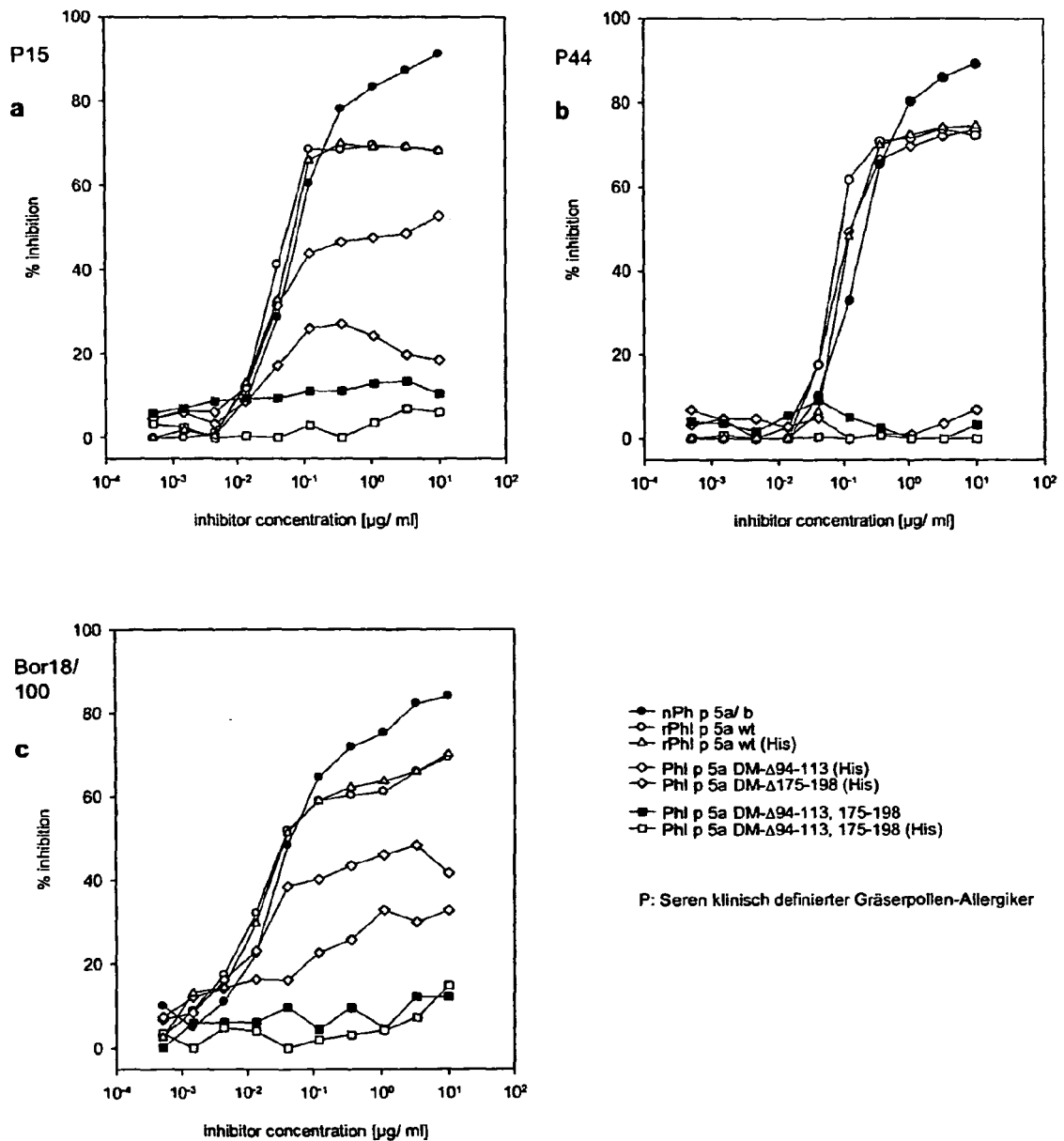
pI rPhl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 = 6.4

**Figur 7:**  
Streifentest zur Überprüfung der IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 5a-Deletions-  
mutanten (nicht-denaturierend)



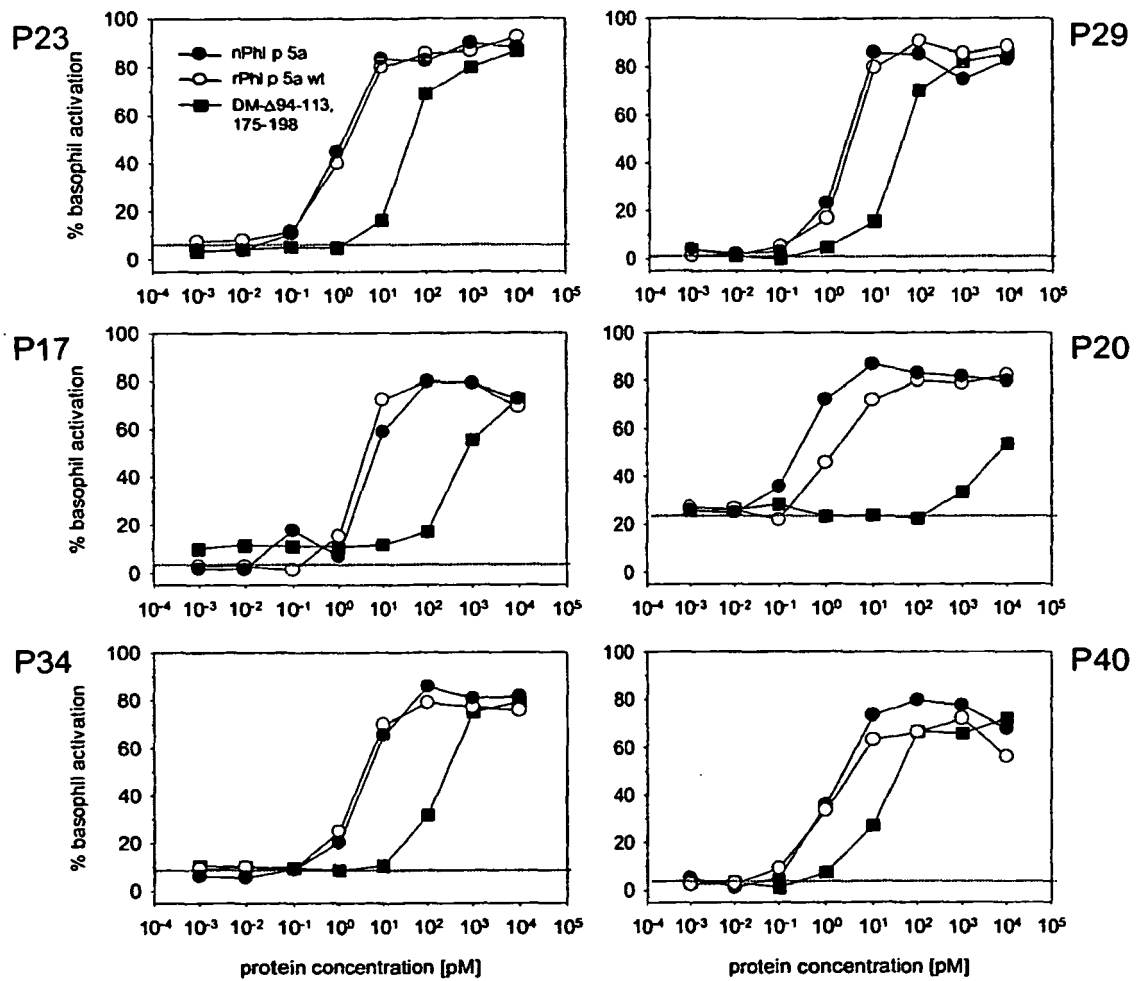
Figur 8:

Nachweis der reduzierten IgE-Reaktivität der Phl p 5a-Deletionsmutanten mittels EAST-Inhibitionstest mit zwei repräsentativen Einzelseren (a und b) und einem Serum-Pool (c)



**Figur 9:**

Nachweis der Hypoallergenität der Phl p 5a-Deletionsmutante  
Phl p 5a DM- $\Delta$ 94-113, 175-198 mittels Basophilen-Aktivierungstest mit  
Basophilen von sechs verschiedenen Gräserpollen-Allergikern (P)



## IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

### In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 10325508 [0054]

### In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **FREIDHOFF et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1986, vol. 78, 1190-2002 [0002]
- **PETERSEN et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993, vol. 92, 789-796 [0005]
- **MATTHIESEN ; LÖWENSTEIN.** *Clin. Exp. Allergy*, 1991, vol. 21, 297-307 [0005]
- **PETERSEN et al.** *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, vol. 98, 105-109 [0005]
- **PETERSEN et al.** *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995, vol. 108, 49-54 [0005]
- **DOLECEK et al.** *FEBS*, 1993, vol. 335 (3), 299-304 [0005]
- **HAAVIK et al.** *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1985, vol. 78, 260-268 [0005]
- **VALENTA et al.** *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, vol. 97, 287-294 [0005]
- **FISCHER et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, vol. 98, 189-198 [0005]
- **SUCK et al.** *Clin. Exp. Allergy*, 2000, vol. 30, 324-332 [0005]
- **SUCK et al.** *Clin. Exp. Allergy*, 2000, vol. 30, 1395-1402 [0005]
- **FIEBIG.** *Allergo J.*, 1995, vol. 4 (6), 336-339 [0007]
- **BOUSQUET et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, vol. 102 (4), 558-562 [0007]
- **FIEBIG.** *Allergo J.*, 1995, vol. 4 (7), 377-382 [0007]
- **SCHRAMM et al.** *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 2406-2414 [0008]
- **HSU et al.** *Nature Medicine*, 1996, vol. 2 (5), 540-544 [0008]
- **KAHLERT et al.** *Clinical Immunology and Allergy in Medicine Proceedings of the EAACI 2002 (2003) Naples, Italy*, 2002, 739-744 [0038]