



(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).

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 hypoallergenen Allergenvarianten können zur spezifischen Immuntherapie (Hypensibilisierung) 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 Wiesenlieschgrases (*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 Kreuzreakтивität der Moleküle mit den IgE-Antikörpern von Graspollenallergikern.

[0007] Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die spezifische Immuntherapie oder Hypensibilisierung 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 rekombinaner hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggf. auf die individuellen Sensibilierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinaner 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 Hypensibilisierung mit rekombinanen 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-Antikörpem (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)

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

pl rPhl p 5a wt = 8.7
 pl rPhl p 5a DM-D94-113, 175-198 = 6.4

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

15 **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)

- 20 -●- nPhl p 5a/ b
 -○- rPhl p 5a wt
 -Δ- 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)

25 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-Allergikem (P)

30 Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Mutagenese und Klonierung von cDNA-Sequenzen

35 **[0011]** Ausgangspunkt für die - erfindungsgemäß besonders bevorzugten - hypoallergenen Phl p 5a-Varianten ist die
 cDNA einer Isoform des Phl p 5a Wildtyps, die mit Hilfe spezifischer Primer durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
 aus der Gesamt-cDNA von Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense*) isoliert wurde (NCBI (National Centre
 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-Antikörpem von
 Grasspollenallergikern, die eine Reaktivität mit natürlichem gereinigtem Phl p 5a (nPhl p 5a) aufwiesen.

40 **[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
 45 Sequenz des cDNA-Moleküls deletiert, wodurch entsprechende Deletionen in den Polypeptidketten der in *E. coli* expri-
 mierten Proteine induziert wurden.

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

50 **[0014]** Bei diesem Verfahren wurden überraschenderweise zwei Deletionsvarianten des Phi 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 Serum-pool) 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,
 55 175-198 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 Spel verdaut und anschliessend ligiert (s. Tab. 1). Das Ligationsprodukt wurde unter Einsatz der Primem 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 Primem 1 und 4 verbunden, und das Produkt amplifiziert.

Die für die modifizierten Allergene kodierenden cDNA's wurden über die Restriktionsschnittstellen *Ehel* 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 Spel-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 Ni²⁺-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 Zielproteins 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-Δ94-113,175-198 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-Δ94-113, 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-Δ94-113, 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 Waschschritt 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-Δ94-113 (His), Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) und Phl p 5a DM-Δ94-113, 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 Patientenserien gar nicht oder nur sehr stark vermindert an die Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 (His) banden. Die reduzierte IgE-Bindung ist sowohl auf die Deletion Δ94-113 als auch auf die Deletion Δ175-198 zurückzuführen. Die Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ175-198 (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 Δ94-113 auf die IgE-Bindungsreakтивität ist weniger stark ausgeprägt, aber ebenfalls deutlich sichtbar. Die Deletionsvariante Phl p 5a DM-Δ94-113 (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 Δ175-198.

[0027] Somit wird deutlich, dass beide Deletionen zu der Verminderung der Gesamt-IgE-Bindungsreaktivität der Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113, 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 Einzelserien (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-A94-113 (His), Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) und Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His) sowie die des Nicht-Fusionsproteins Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 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 Grasspollenallergikem 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 Patientenserien 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, Δ94-113 und Δ175-198, verhindert wurde. Die Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113 (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-Δ94-113, 175-198 (His) konnte die Bindung von IgE-Antikörpem bei der höchsten eingesetzten Konzentration sogar nur um 0-10% inhibieren. Der Einsatz des Nicht-Fusionsprotein Phl p 5a DM-Δ94-113, 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-Δ94-113 (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-Antikörpem mit Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) reagierten (0-10% maximale Hemmung). Ebenso zeigte die Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113, 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-Antikörpem eines Serum-Pools von 20 Allergikem unterstreichen die Wichtigkeit der Deletionen Δ94-113 und Δ175-198 für die Verminderung der IgE-Bindung des Phl p 5a (Abb. 8 c). Beide Einzel-Deletionsmutanten, Phl p 5a DM-Δ94-113 (His) und Phl p 5a DM-Δ175-198 (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-Δ94-113, 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 Allergikem im Streifentest auf eine stark verminderte IgE-Bindungsreaktivität dieser

[0035] Phl p 5a-Variante bei sehr vielen, wenn nicht allen Grasspollen-Allergikem 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-Allergikem mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Dabei können allergene Substanzen spezifische IgE-Antikörper, welche mit den hochaffinen IgE-Rezeptoren der basophilen Granulozyten assoziiert, 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 Immunzytopen 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 fluoreszensmarkierten monoklonalen Antikörpers an das Oberflächenprotein und anschliessende Analyse durch Fluoreszensaktiviert Durchflusszytometrie hochsensitiv gemessen.

[0039] Als Referenzsubstanzen wurden hier sowohl das gereinigte natürliche Phl p 5a (nPhl p 5a) als auch rPhl p5a wt parallel zu den Testsubstanzen eingesetzt.

Die Testergebnisse der Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM Δ94-113, 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 aktiverter 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 Δ94-113, 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 Δ94-113, 175-198 in Relation zu den unveränderten Referenzmolekülen nPhl p 5a und rPhl p5a wt bei jedem Probanden ermittelt werden (Tab. 2).

Die relative allergene Wirksamkeit (Pr, Relative Potency) der Deletionsvariante Phl p 5a DM Δ94-113, 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-Δ94-113, 175-198 mittels Basophilen-Aktivierungstest

| | Testsubstanz A ₅₀ [pM] ^a | | | Pr-Wert ^b Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 | Pr-Wert ^b Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 |
|--------------------|--|--------------|------------------------------|---|---|
| Donor ^c | nPhl p 5a | rPhl p 5a wt | Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 | relativ zu rPhl p 5a wt ^d | relativ zu nPhl p 5a ^e |
| 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 | 0,0002^f | 0,00003^f |
| 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 | 0,0829 | 0,0617 |

^a Allergenkonzentration bei 50 % der Zahl maximal aktiverter Basophilen

^b Relative Potency

^c Klinisch definierte Gräserpollen-Allergiker

^d Berechnet von A50 rPhl p 5a wt/ A50 Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198

^e Berechnet von A50 nPhl p 5a/ A50 Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198

^f 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 p5- oder rPhl p 5-Molekülen nach üblichen Verfahren etabliert.

In einem Proliferationstest wurden die unterschiedlichen T-Zell-Linien mit den Referenz-Allergenen nPhl p5a und rPhl p5a wt sowie der Doppel-Deletionsmutante Phl p 5a DM Δ94-113, 175-198 stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von [³H]-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 ^b | TCL | Stimulationsindex ^a | | |
|----|--------------------|-------|--------------------------------|--------------|------------------------------|
| | | | nPhl p 5a | rPhl p 5a wt | Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 |
| 5 | A | 3.2 | 9,8 | 4,9 | 4,4 |
| 10 | B | 8.2 | 21,0 | 15,5 | 13,3 |
| C | C | 11.2 | 5,2 | 4,7 | 7,2 |
| 15 | C | 11.3 | 3,3 | 2,9 | 3,5 |
| D | C | 11.43 | 3,0 | 3,9 | 2,6 |
| 20 | D | 19.1 | 6,5 | 4,7 | 7,5 |
| E | D | 19.2 | 9,6 | 3,3 | 2,6 |
| 25 | E | 23.22 | 21,8 | 29,0 | 20,8 |
| F | E | 23.50 | 7,5 | 8,4 | 6,6 |
| | F | 89.23 | 1,8 | 3,5 | 1,8 |

^a Berechnet von [³H]-Messwerten. cpm-Messwerte Allergen-stimulierter Zellkulturen/ cpm-Messwerte unstimulierter Zellkulturen

^b 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 Suspensionsen, 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 ccgcccggcta caccggcgcc | 60 |
| | gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag | 120 |
| 5 | aagatcaacg ccggcttcaa ggccgccttg gccgctgccc ccggcgtccc gccagcggac | 180 |
| | aagtacagga cgttcgtcgc aaccccgcc gcggcctcca acaaggcctt cgccggaggc | 240 |
| | ctctcggcg agcccaaggg cgccgcccga tccagctcca aggccgcgt cacctccaag | 300 |
| 10 | ctcgacgccc cctacaagct cgccatacaag acagccgagg gcgcgacgccc tgaggccaag | 360 |
| | tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgcgtccca tcatacgccgg caccctcgag | 420 |
| | gtccacgccc tcaagccgc ggccgaggag gtcaagggtta tccctgcccgg cgagctgcag | 480 |
| 15 | gtcatcgaga aggtcgacgc cgccattcaag gtcgctgcca ccgcgcgcca ccgcgcgccc | 540 |
| | gccaacgaca agttcacgt ctgcaggcc gcattcaaca acgcccataa ggccgacacg | 600 |
| 20 | ggccgcgcct acgagagcta caagttcatc cccgcctgg aggccgcgt caagcaggcc | 660 |
| | tacgcgcaca ccgtcgccac cgccgcggag gtcaagtaca ccgtcttga gaccgcgtg | 720 |
| | aaaaaggcca tcaccgcatt gtccgaggcc cagaaggctg ccaagccgc tgccgctgcc | 780 |
| 25 | accgcacccg caacccgcgc cgttggcgcc gccacccgcg ccgcacccgc cgctactgg | 840 |
| | ggctacaaaag 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 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 |
| Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala 165 170 175 | | | |
| Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe 180 185 190 | | | |
| 10 Asn Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys 195 200 205 | | | |
| 15 Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr 210 215 220 | | | |
| 20 Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu 225 230 235 240 | | | |
| Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro 245 250 255 | | | |
| 25 Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr 260 265 270 | | | |
| 30 Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val 275 280 | | | |
| <210> 3 | | | |
| <211> 795 | | | |
| <212> DNA | | | |
| 35 <213> Phleum pratense | | | |
| <400> 3 | | | |
| 40 gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgcggctta caccggcc 60 | | | |
| gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag 120 | | | |
| aagatcaacg ccggcttcaa ggcggccttg gccgctgccg ccggcggtccc gccagcggac 180 | | | |
| 45 aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgccggagggc 240 | | | |
| ctctcgggcg agcccaaggg cgccgcccggaa tccagctccg gcgacgccc tgaggccaag 300 | | | |
| tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgcgtccgca tcatcgccgg caccctcgag 360 | | | |
| 50 gtccacgccc tcaagcccgc ggccgaggag gtcaagggtta tccctgccgg cgagctgcag 420 | | | |
| gtcatcgaga aggtcgacgc cgccattcaag gtcgctgcca ccggccgcca cgccgcgccc 480 | | | |

55

EP 2 287 180 B9

| | | | |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----|
| gccaacgaca agttcaccgt | cttcgaggcc gccttcaaca acgccatcaa | ggcgagcacg | 540 |
| ggcggcgccct acgagagcta | caagttcatc cccgcctgg aggccgcccgt | caagcaggcc | 600 |
| 5 tacgccccca | cgtcgccac cgccggag gtcaagtaca | ccgtcttga gaccgcgctg | 660 |
| aaaaaggcca | tcaccgccat gtccgaggcc cagaaggctg | ccaagcccgc tgccgctgcc | 720 |
| 10 accgcccacccg | caacctccgc cgtnnccg | gccacccggcg ccgcccaccgc cgctactgg | 780 |
| ggctacaaag tctga | | | 795 |

<210> 4

<211> 264

<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 | | | |

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

| | | | |
|--|--|--|--|
| 30 Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala | | | |
| 35 40 45 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 35 Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr | | | |
| 50 55 60 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 35 Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly | | | |
| 65 70 75 80 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 40 Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr | | | |
| 85 90 95 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 45 Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu | | | |
| 100 105 110 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 50 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala | | | |
| 115 120 125 | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| 55 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 Ala Ala Asn Ala Ala Pro | | | |
|---|--|--|--|

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

10 Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala
 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

20 Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala
 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

30 <212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 5

| | | |
|----|---|-----|
| 35 | gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgcggctta caccggcc | 60 |
| | gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag | 120 |
| 40 | aagatcaacg ccggcttcaa ggcggcattg gccgctgccg cggcggtccc gccagcggac | 180 |
| | aagtacagga cgttcgtcgc aacttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgccggaggc | 240 |
| | ctctcggcgc agcccaaggg cgccgcccga tccagctcca aggccgcgt cacctccaag | 300 |
| 45 | ctcgacgccc cctacaagct cgcctacaag acagccgagg ggcgcacgcc tgaggccaag | 360 |
| | tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgcgtccca tcatacgccgg caccctcgag | 420 |
| | gtccacgccc tcaagccccg ggccgaggag gtcaagggtta tccctgcccgg cgagctgcag | 480 |
| 50 | gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgcgtccca ccagcacggg cggccctac | 540 |
| | gagagctaca agttcatccc cgcctggag gccgcgtca agcaggccta cggccacc | 600 |

EP 2 287 180 B9

gtcgccacccg cgccggaggt caagtacacc gtcttgaga cccgcgtgaa aaaggccatc 660
 accgccccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgtg cgcgtgccac cgccaccgca 720
 5 acctccgccc ttggcgccgc caccggcgcc gccaccggcg ctactggtgg ctacaaagtc 780
 tga 783

10 <210> 6

<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

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

25 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

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

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

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

45 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

50 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

| | 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 Ala Thr Ala Thr Ala 225 | 230 | 235 |
| 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 ccggccggcta caccggcgcc gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag aagatcaacg ccggcttcaa ggccgccttg gccgctgccg ccggcggtccc gccagcgac aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgccggaggc ctctcggcg agcccaaggg cgccgcccga tccagctccg gcgcgacgccc tgaggccaag tacgacgcct acgtcgccac cctaagcggag gcgcgtccgca tcatacgccgg caccctcgag gtccacgccc tcaagccgc ggccgaggag gtcaaggta tccctgccgg cgagctgcag gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccagcacggg cggcgccctac gagagctaca agttcatccc cgccttggag gcccgggtca agcaggccta cgcggccacc gtcgccaccc cgccggagggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 50 accgccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgctg ccgcgtccac cgcaccgc acctccgccc ttggcgccgc caccggcgcc gccacccggc ctactggtg ggctacaaagtc 55 tga | 60 | 120 |
| 55 | <210> 8 <211> 240 | 180 | 240 |
| 55 | | 300 | 360 |
| 55 | | 420 | 480 |
| 55 | | 540 | 600 |
| 55 | | 660 | 720 |
| 55 | | 723 | |

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 | 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 | | |

5 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 10 <400> 9
 gccgatctag gctacggccc ggcc 24
 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 15 <400> 10
 aacataacta gtggcagcga ccttgaaggc ggcgtc 36
 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Phleum pratense
 <400> 11
 atctaacttag tacggcgcc gcctacgaga 30
 25 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 30 <400> 12
 aacataaaagc tttcagactt tgttagccacc agt 33
 <210> 13
 <211> 27
 35 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 <400> 13
 ggagctggat tcggcggcgc ccttggg 27
 40 <210> 14
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 45 <400> 14
 gccgcccgaat 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 rekom-

binant erhalten werden.

3. DNA-Molekül, kodierend für eine Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2.
5. 4. Rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 3, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.
10. 5. Ein nicht menschlicher Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 3 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 4.
15. 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.
20. 7. Allergenvariante gemäß Anspruch 1 oder 2 als Arzneimittel.
25. 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.
30. 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.
35. 10. DNA-Molekül gemäß Anspruch 3 als Arzneimittel.
40. 11. Rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 4 als Arzneimittel.
45. 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.
50. 13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 12, enthaltend Aluminiumhydroxid, ein immunstimulatorisches CpG-haltiges Oligonukleotid oder eine Kombination beider als Hilfsstoffe.
55. 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.
- 5 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.
- 10 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 10. DNA molecule according to Claim 3 as medicament.
- 15 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.
- 20 13. Pharmaceutical composition according to Claim 12, comprising aluminium hydroxide, an immunostimulatory CpG-containing oligonucleotide or a combination of the two as adjuvants.
- 25 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.

30 **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 région 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.
- 45 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.
- 55 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.

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

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

10 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.

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

20 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.

25

30

35

40

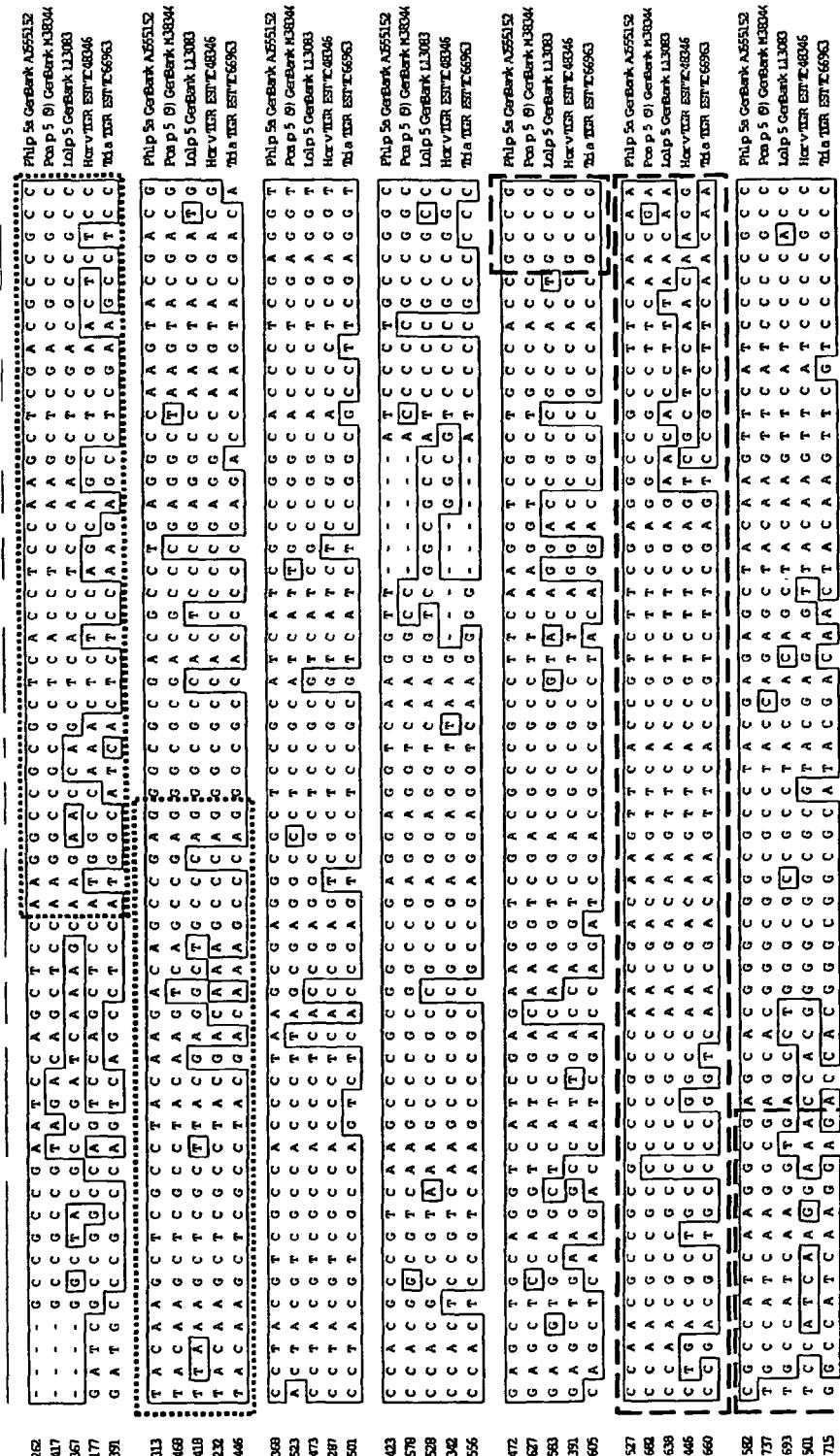
45

50

55

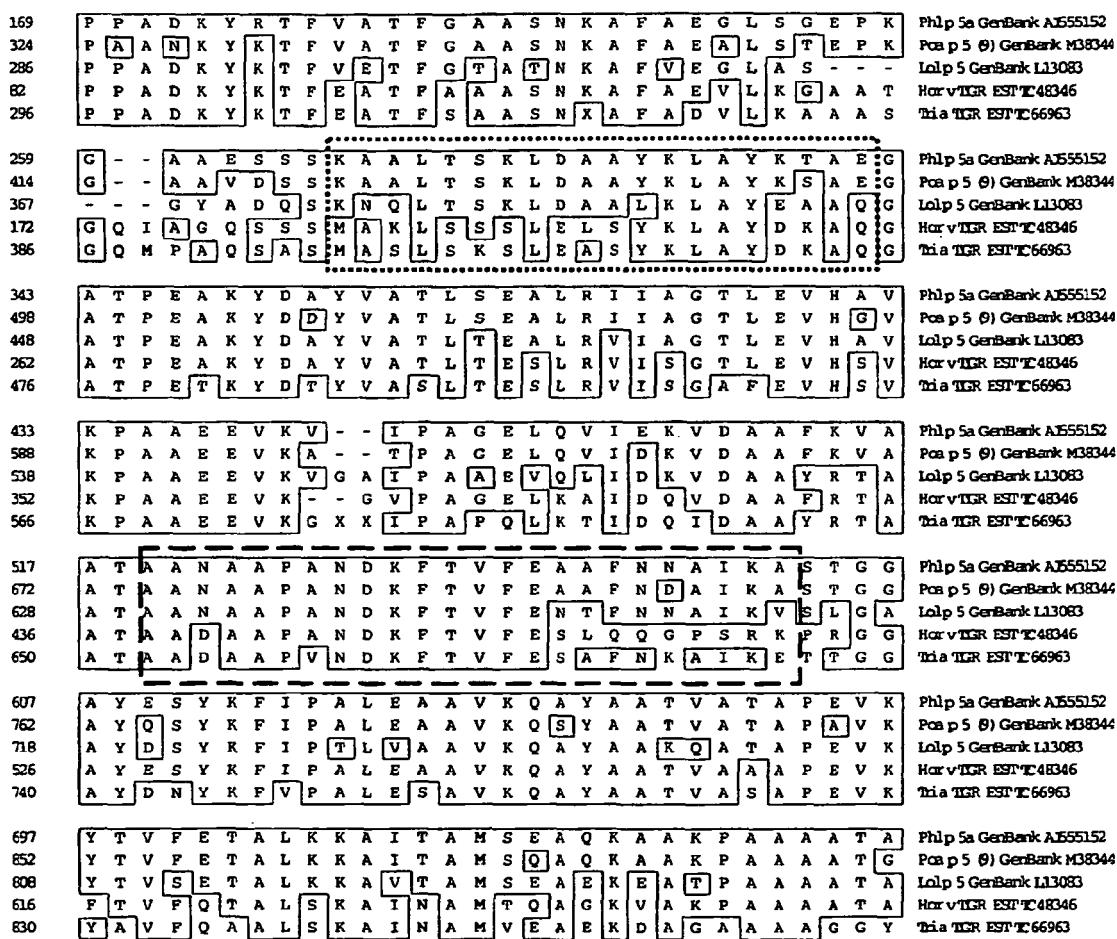
Figur 1:

Alignment von relevanten Bereichen Ph1 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)



Figur 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)

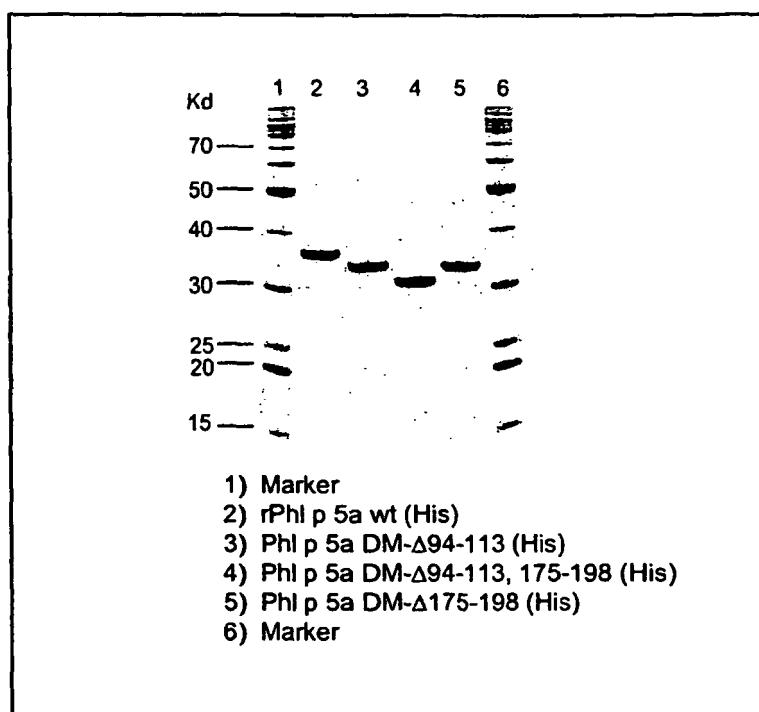


Nummerierung: Nukleotidpositionen der DNA-Einträge

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

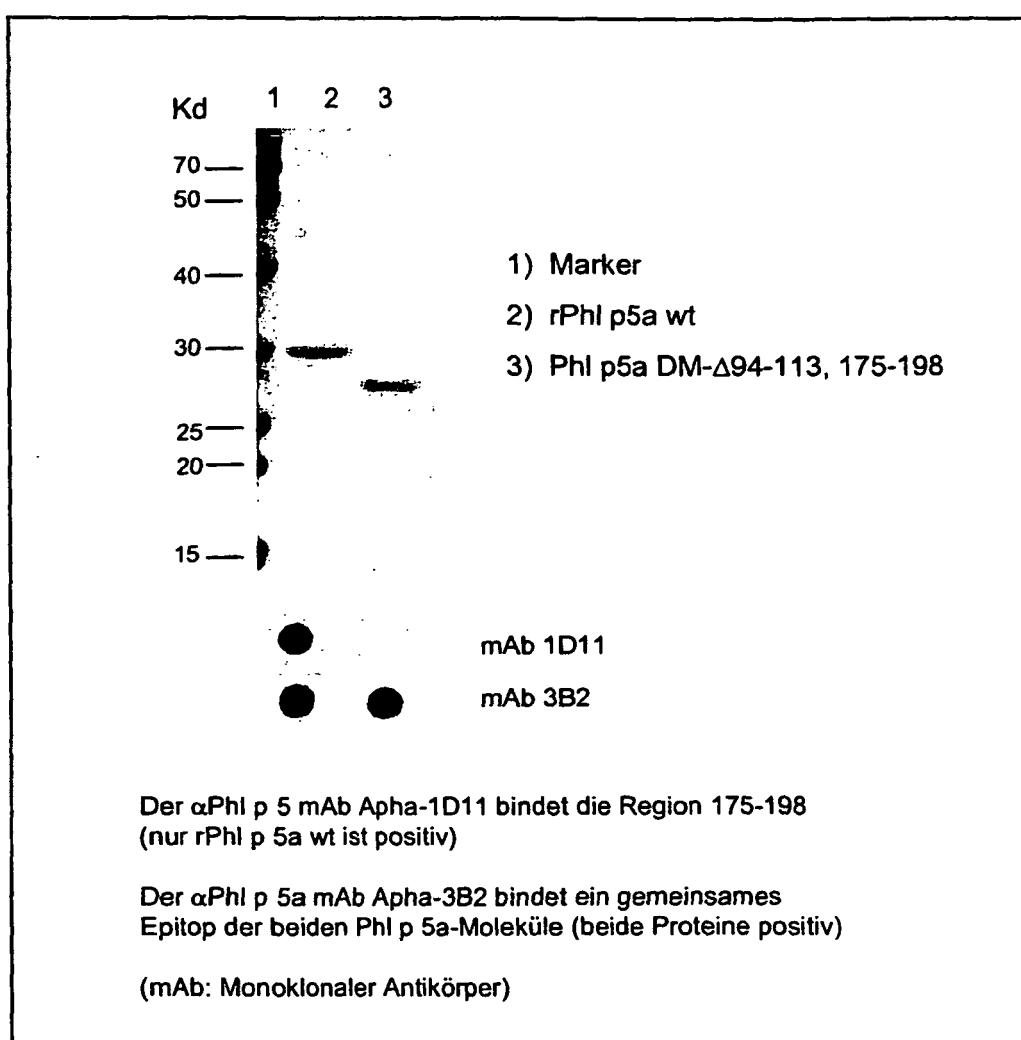
Figur 3:

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



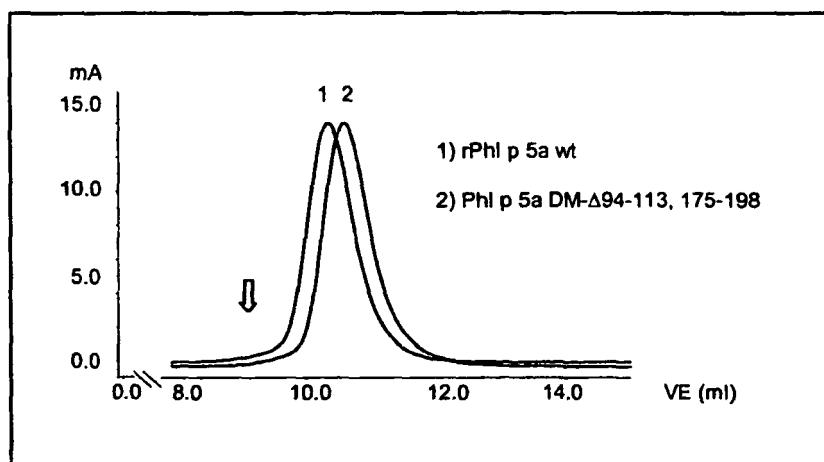
Figur 4:

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



Figur 5:

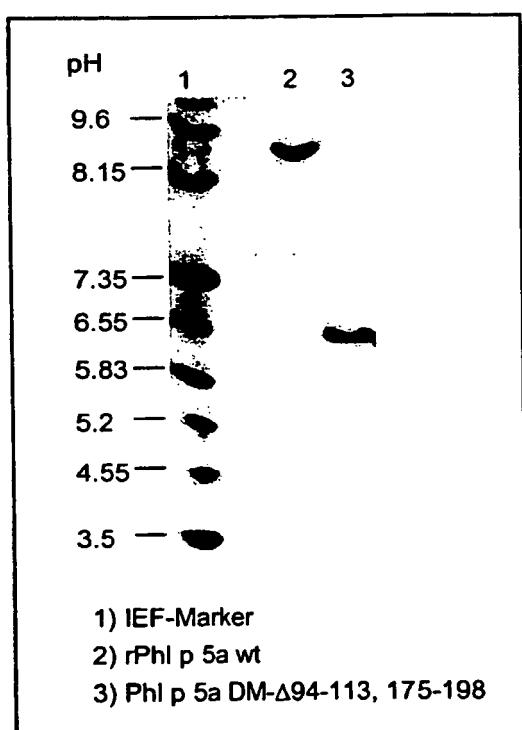
Analytische SEC der Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)



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

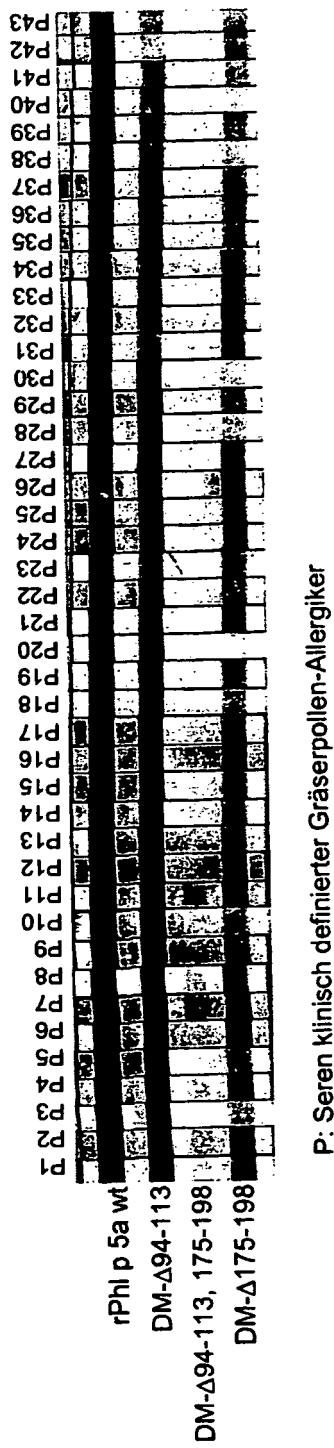
Figur 6:

Nicht-denaturierende Isoelektrische Fokussierung der Deletionsmutante Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 und des rekombinanten Phl p 5a-Wildtypes (gereinigte Nicht-Fusionsproteine)



pI rPhl p 5a wt = 8.7
pI rPhl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 = 6.4

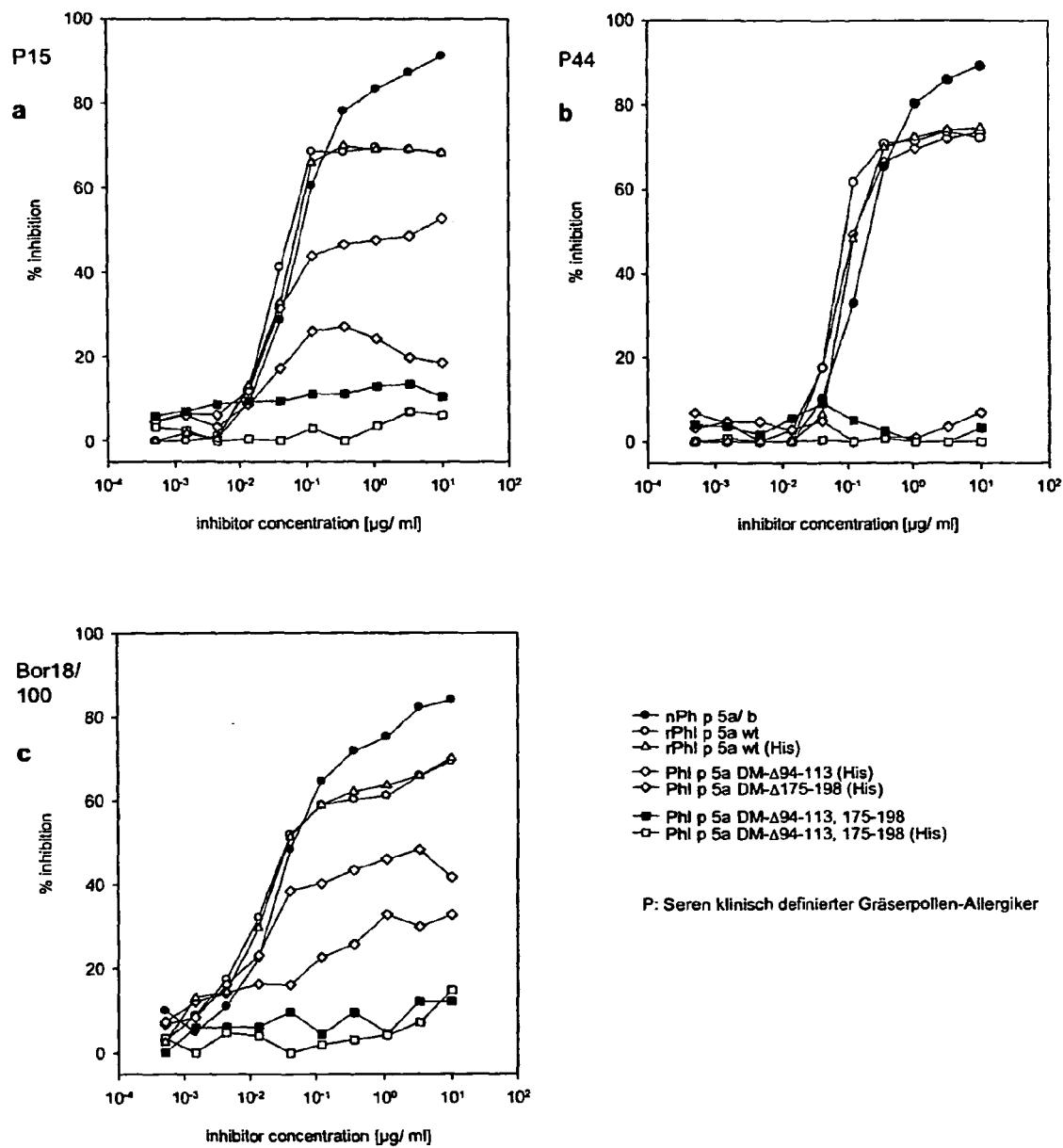
Figur 7:
Streifentest zur Überprüfung der IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 5a-Deletions-mutanten (nicht-denaturierend)



P: Seren klinisch definierter Gräserpollen-Allergiker

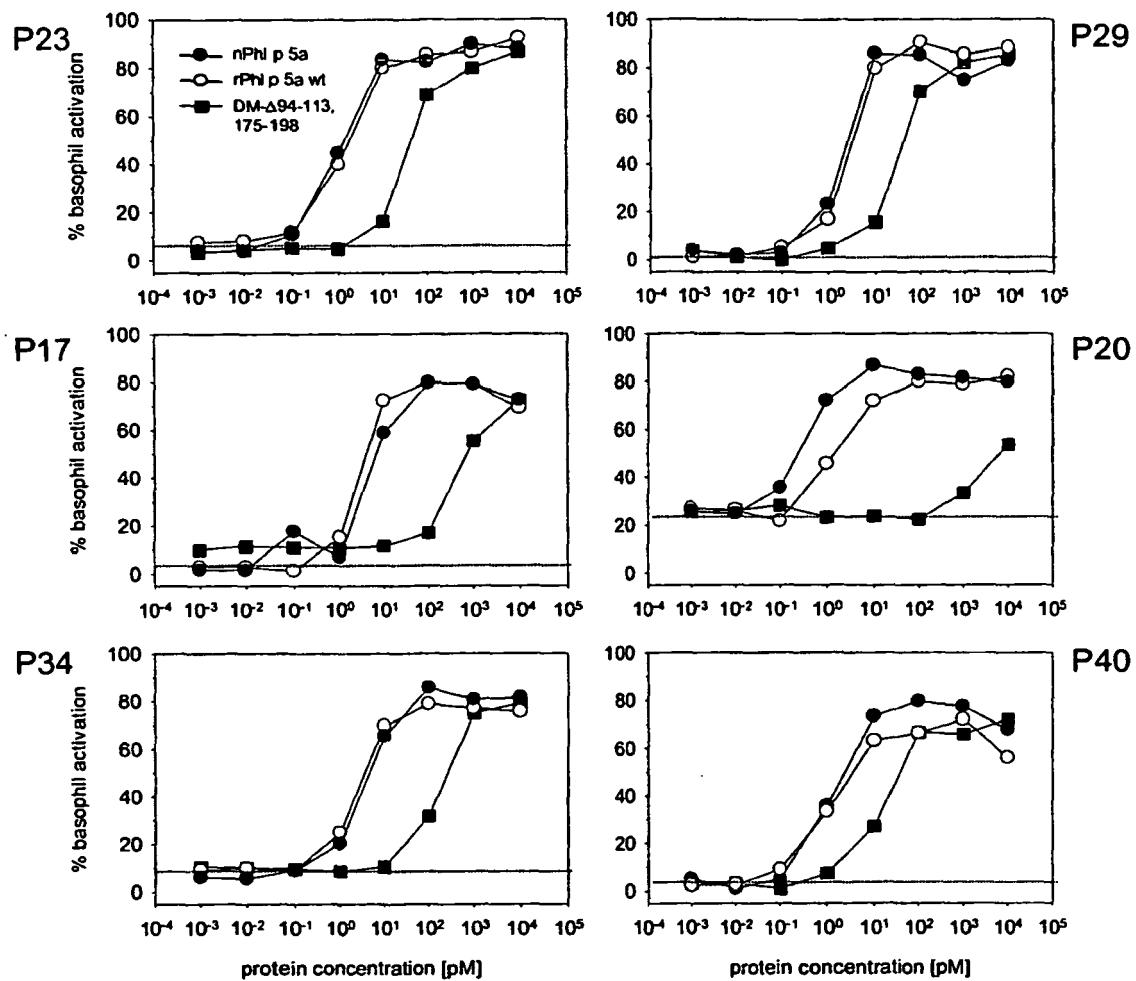
Figur 8:

Nachweis der reduzierten IgE-Reaktivität der Phi 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-Δ94-113, 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] [0045]
- **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]