



Csökkentett IgE-reaktivitást mutató rovarméreg-allergének és
eljárás előállításukra

KIVONAT

A találmány csökkentett IgE-reaktivitást mutató rekombináns rovarméreg-allergénekre és előállítási eljárásukra vonatkozik.

Az előállítási eljárás körülményeitől függően a természetessel azonos vagy attól eltérő hajtogatódással rendelkező allergéneket kapnak. A természetestől eltérő hajtogatódással rendelkező allergének csökkentett IgE-reaktivitást, illetve allergenitást mutatnak, így allergiák immunterápiás kezelésére, míg a természetessel megegyező hajtogatódással rendelkező allergének diagnosztikai célokra alkalmazhatók.

Csökkentett IgE-reaktivitást mutató rovarméreg-allergének és eljárás előállításukra

A találmány rekombináns rovarméreg-allergénekre és ezek előállítási eljárására vonatkozik, amely allergének az előállítási eljárás kivitelezésétől függően a természetessel azonos vagy a természetestől eltérő hajtogatódás (konformáció) alapján megkülönböztethetők.

A természetes molekulának megfelelő hajtogatódási formák az allergiás betegeknek, különösen a rovarméregre allergiás betegeknek az egyes allergének megkülönböztetése alapján végzett (*in vitro* vagy *in vivo*) diagnosztizálásában alkalmazhatók.

A természetestől eltérő hajtogatódási formák specifikus immunterápiában mellékhatásmentes terápiás szerekként alkalmazhatók. Ezáltal ezek a rekombináns hajtogatódási variánsok biztosabb kezelést eredményeznek, mint a természetes anyagok. Az eljárást úgy tervezik, hogy a biotechnológiai előállítás a gyógyászati anyagok esetén szükséges (GMP) körülmények között legyen lehetséges.

A rovarcsípések által okozott allergiákat főként darazsak és mézelő méhek okozzák, és ezek súlyos szisztémás tünetekhez, egészen a potenciálisan halállal végződő anafilaxiáig vezethetnek [Müller U. R.: *Insect sting allergy*, Gustav Fischer Verlag, 1990]. Az 1-típusú allergiákat kiváltó anyagok lehetnek a rovarméregben található proteinek, glikoproteinek vagy polipeptidek. Ezek az allergének injektálás után a szenzibilizált személy esetén a hízósejtek felületén megkötött IgE molekulákkal reagálnak. Ha az ilyen FcεRI által megkötött IgE molekulákat az allergén egymással összeköti, ez a mediátorok (pl. hisztamin, leukotriének) és citokinek effektorsejtekből való kiáramlását eredményezi, ami a megfelelő klinikai tünetekhez vezet.

A méhméreg-allergén komponenseiként hatnak a melittin



peptid mellett a hialuronidáz és a foszfolipáz enzimek [Haber-
mann E., *Science*, **177**:314-322 (1972)]. A darázs esetén fő
aktív allergénként szintén egy, a méhméregben találhatóhoz ha-
sonló hialuronidáz [Hoffmann D. R., *J. Allergy Clin. Immunol.*,
78:337-343 (1986)] és egy foszfolipáz A1 fordul elő. A darázs-
méreg legfontosabb fő allergénje az antigén 5, amelynek eddig
semmiféle enzimatis aktivitását nem mutatták ki [King et
al., *Biochemistry*, **17**:5165-5174 (1978)]. Az összes említett
allergént már molekulárbiológiai szempontból jellemezték, és a
megfelelő cDNS molekulákat klónozták [többek között Fang et
al., *PNAS*, 895-899 (1988); Soldatova et al., *FEBS*, 145-149
(1993); Kuchler et al., *Eur. J. Biochem.*, **184**:249-254 (1989)].
A cDNS-szekvenciák segítségével rekombináns allergéneket lehet
előállítani, amelyek az allergiák diagnosztizálásában és terá-
piájában alkalmazhatók [Scheiner & Kraft, *Allergy*, **50**:384-391
(1995)].

A találmány szerinti megoldással kapcsolatban az antigén
5 fő allergénként különösen fontos, mivel a találmány példa-
szerűen ezt a molekulát alkalmazza. Egy kb. 25 kD méretű, nem
glikozilezett proteintről van szó. Az elsődleges szekvencia 8
ciszteinmaradékot tartalmaz, ami négy diszulfid-híd jelen-
létére utal [Hoffmann D. R., *J. Allergy Clin. Immunol.*,
92:707-716 (1993)]. A rovarméreg-allergiák hatékony terápiás
kezelésének egy klasszikus eszköze a specifikus immunterápia
vagy hiposzenzibilizálás [Müller U. R., *Insect sting allergy*,
Gustav Fischer Verlag, 1990]. Ilyen esetben a betegnek termé-
szetes allergénkivonat emelkedő dózisait injektálják szub-
kután. Ennél a módszernél azonban fennáll az allergiás reak-
ciótól az anafilaxiás sokkig terjedő válaszreakció veszélye.
Mivel éppen a rovarcsípés-hiposzenzibilizálás esetén kell erő-
teljes reakciókkal számolni, jelenleg kizárólag stacioner
kezelést alkalmaznak.

A terápia optimalizálása különösen a rovarcsípés-allergiák
esetén lenne lehetséges rekombináns úton előállított allergé-



nekkel. Meghatározott, adott esetben a beteg egyedi szenzibilizálási mintájához hozzáigazított, nagy tisztaságú, rekombináns úton előállított allergénekből [Scheiner & Kraft, 1995] álló koktélok helyettesíthetnék a természetes allergénforrásokból származó kivonatokat. Az ilyen rekombináns allergénnel végzett biztosabb hiposzzenzibilizáláshoz vezető reális perspektívák célzott, mutált rekombináns allergéneket kíván, amelyek esetén az IgE-epitop specifikusan ki van iktatva, anélkül hogy a terápia szempontjából esszenciális T-sejt epitop károsodna [Schramm et al., *J. Immunol.*, **162**:2406-2414 (1999)]. Az *E. coliban* történő heterológ expresszióról ismeretes, hogy a legtöbb eukarióta protein a „természetes” konformációt nem vagy csak kis mértékben veszi fel. E hiányos hajtogatódás egyik következménye, hogy ezek a proteinek gyakran oldhatatlanok. Ezt különösen a ciszteintartalmú proteinek esetén kell figyelembe venni [Kuchler et al., *Eur. J. Biochem.*, **184**:249-254 (1989)]. Különösen az antigén 5-ről ismertették, hogy a baktériumokban történt expresszálas oldhatatlan aggregátumokat eredményez, amelyek nem a természetes konformációval rendelkeznek [Monsalve et al., *Protein Express Purif.*, **16(3)**:410-416 (1999)]. Az ilyen oldhatatlan aggregátumok sem a diagnosztizálásban, sem a terápiában nem használható.

Gyakran az *E. coliban* oldhatatlan proteineket kutatási célból eukarióta expressziós rendszerben, például élesztőben vagy rovarsejtben fejezik ki [Monsalve et al., *Protein Express. Purif.*, **16(3)**:410-416 (1999); Soldatova et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**:691-698 (1998)]. Az eukarióta expressziós rendszereknek hátrányuk mindenek előtt a hiperglikozilálás [Grobe et al., *Eur. J. Biochem.*, **263**:33-40 (1999)], proteolitikus degradációs folyamatok és az összehasonlíthatóan csekély mértékű hozam [Glover & Hames (szerk.) *Expression Systems*, IRL Press, Oxford-New York-Tokyo]. Ezért ezek a proteinek gyógyszerészeti-gyógyászati diagnosztikában és terápiában nem alkalmasak allergológiai alkalmazásra.



A találmány szerinti eljárás termékei, amelyek természetes konformációval rendelkeznek, az allergiás betegségek, különösen rovarcsípés-allergia *in vitro* és *in vivo* diagnosztizálásában előnyösen alkalmazhatók. Ez a természetessel azonos hajtogatódási forma az IgE-antitestek detektálásához rendelkezésre áll a megalapozott eljárásokban.

Másrészt a találmány szerinti megoldás segítségével előállított variánsok, amelyek lényegében nem vagy csak csekély IgE-reaktív konformációval rendelkeznek, specifikus immunterápiában hipoallergén komponensként alkalmazhatók. A „hipoallergén” kifejezésen - a találmány értelmében - csökkentett vagy hiányzó, (a természetben előfordulóhoz képest) előnyösen 5-95%-ban, különösen 20-85%-ban csökkentett allergenitást értünk, ami csökkent IgE-választ feltételez.

A találmány esetén olyan módszerről van szó, amellyel rekombináns allergének baktériumokban (*E. coli*) állíthatók elő. Az oldhatatlan protein-aggregátumok nagyfokú töményítése jelenti az első tisztítási lépést. Ezeket az aggregátumokat azután redukálószer hozzáadása nélkül denaturáljuk. A következő dializálási körülményektől függően különböző hajtogatódási formákat kapunk. Döntő az, hogy itt monomer és oldható molekulákról van szó. Az egyik oldható hajtogatódási változat a természetes allergénnel összevethető IgE-reaktivitással rendelkezik, és ennél fogva diagnosztikai célokra alkalmazható. Ilyen terméket ciszteintartalmú oldat dialízisével kapunk.

A többi oldható hajtogatódási változat szerkezetileg különbözik a természetes allergéntől, és semmilyen vagy csökkent IgE-reaktivitással rendelkeznek. Ennek alapján az ilyen változatok jobb immunterápiát tesznek lehetővé. Az ilyen hipoallergén terméket a találmány értelmében savas pufferrel, előnyösen 3,5 és 6,5 pH-tartományban, különösen 4,0 és 5,5 közötti pH-értéknél végzett dialízissel állítjuk elő.

A találmány tehát rekombináns rovarallergénekre vonatkozik, amelyekre jellemző, hogy csökkent IgE-reaktivitással,



illette allergenitással rendelkeznek. A találmány értelmében ezen proteinek allergenitása a természetes allergénhez képest 95%-ig terjedő mértékben csökkentett.

A találmány különösen rekombináns, darázs, különösen *Ves-pula vulgaris* és *Ves-pula germanica* fajból származó rovar-allergénre vonatkozik.

A találmány tárgya továbbá eljárás lényegében véve tiszta, rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, amelynek során az allergén proteineket baktériumsejtekben, oldhatatlan formában, „inklúziós test”-ek formájában állítjuk elő, az oldhatatlan aggregátumokat denaturáljuk, és a denaturált terméket dialízis útján a különböző hajtogatódási konformációknak megfelelő oldható, monomer allergénekké alakítjuk és izoláljuk. A denaturálást előnyösen guanidínium-klorid segítségével, redukálószer hozzáadása nélkül végezzük.

A találmány tárgya különösen eljárás csökkentett allergenitást, illetve IgE-reaktivitást mutató rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, amelyek dialíziséhez savas puffert, előnyösen 4,5 és 5,0 közötti pH-jú nátriumacetát-puffert alkalmazunk.

A találmány tárgya ezenkívül eljárás normális allergenitást, illetve IgE-reaktivitást mutató rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, amelyek dialíziséhez ciszteintartalmú oldatokat alkalmazunk.

A találmány ezenkívül rekombináns darázméreg-allergénre vonatkozik, amely a megfelelő fenti vagy az alábbiakban ismerttetendő eljárással állítható elő.

A találmány továbbá gyógyszerkészítményekre vonatkozik, amelyek megfelelő, csökkentett vagy gyengített IgE-reaktivitást mutató rekombináns allergéneket, valamint alkalmas segéd- és vivőanyagokat tartalmaznak.

Végül a találmány egy megfelelő, fenti vagy az alábbiakban ismerttetendő eljárással előállítható rovarméregallergének alkalmazására vonatkozik rovarcsípésallergiák *in vivo* és *in*



vitro diagnosztizálására.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük az eljárást:

Példaképpen *Vespula vulgaris* antigén 5 (Ves v 5) és *Vespula germanica* antigén 5 (Ves g 5) darázméreg-allergéneket pSE420 expressziós vektorba klónoztunk, és K12 baktériumtörzs M15 pREP4-be transzformáltuk. Az eljárás folyamatábráját az 1. ábra mutatja.

A rekombináns allergének előállításához a törzs előtenyészetét használtuk az expressziós tenyészet oltásához. Az expressziót IPTG-vel indukáltuk, rázatólombikban, 37 °C-on, LB-tápközegben, korlátozott oxigénellátással, 90 ford./perc rázatással hajtottuk végre. A baktériumokat 5 óra hosszat végzett expresszáltatás után centrifugálással (5000g, 10 perc, 20 °C) összegyűjtöttük. A baktériumok feltárásához a sejteket pufferben (50 mmol/l Tris-HCl, 25 töm./térf.% szacharóz, pH=8,0), lizozim (10 µg/g nedvestömeg) hozzáadása mellett újra szuszpendáltuk, majd azonos térfogatú detergens-oldatot (0,2 mol/l NaCl, 1 töm./térf.% DOC, 1 töm./térf.% Nonidet P40) adtunk hozzá. A feltáró oldatot ezután ultrahanggal kezeltük (3 perc jégen, 130 Watt, 0,5 sec impulzus). Mivel az expressziós termékek elsődlegesen oldhatatlan aggregátumok (zárványtestek vagy inklúziós testek) formájában vannak jelen, nagy sűrűségük alapján a többi komponenstől (sejtfalkomponensek, riboszómák stb.) 3000g-vel végzett centrifugálással elválaszthatók. A további tisztítást három egymás utáni, detergens-tartalmú oldattal (1 térf.% Triton X-100) végzett mosási lépéssel végeztük. Végül a tisztított zárványtesteket denaturáló puffer (6 mol/l guanídium-klorid, 20 mmol/l Tris-HCl, pH=8,0) hozzáadásával feltártuk, és 2 óra hosszat szobahőmérsékleten rázattuk.

Az IgE-reaktív hajtogatódási formák kinyeréséhez a denaturáló keveréket dializáló csőbe (kizárási küszöbérték: 12-14 kD) töltöttük, és 100-szoros térfogatú ciszteinoldattal (5 mmol/l cisztein) szemben, keverés közben, 12 óra hosszat szo-



bahőmérsékleten dializáltuk. Végül a cisztein eltávolítására desztillált vízzel szemben dializáltuk.

A csökkentett IgE-reaktivitású konformációk kinyerésére az első dialízist 20 mmol/l-es nátriumacetát-pufferrel (pH=5,0) szemben végeztük. Ez után szintén végzünk egy desztillált vízzel szembeni dializálást. Az elvétel után a vízoldható allergéneket centrifugálással választottuk el a kicsapódott aggregátumoktól. A felülúszó tartalmazza a kívánt oldható rekombináns allergéneket. Nátriumacetát-puffer helyett más olyan savas pufferek is alkalmazhatók, amelyek pH-tartománya 3,5 és 6,5, előnyösen 4,0 és 5,5 közé esik. Ilyen pufferrendszereket a szakirodalom megfelelően ismertet.

A két eljárásban kapott kicsapott rekombináns allergének még egyszer denaturálhatók, és ugyanazon séma szerint kezelhetők. Ezzel a kihozatal jelentősen növelhető.

A dializálási lépések után a termékek kb. 95%-os tisztaságúak. A bázikus rovarméregallergének további tisztítása történhet kationcserélő kromatográfiával (puffer pH=7,2), például Source S tölteten (Pharmacia, Freiburg, Németország) és gélszűréssel. A gélszűrés a minimális mennyiségű nagy- és kis-molekulájú szennyeződések eltávolítása mellett a sómentesítést is szolgálja.

A termékek minőségi ellenőrzése az alábbi táblázatban az antigén 5-nek megfelelően összeállított, jellemző tulajdonságok alapján történik.



Tulajdonság	Hajtogatódási forma a természetesnek megfelelő IgE-reaktivitással	Hajtogatódási forma csökkentett IgE-reaktivitással
Látszólagos moltömeg SDS-PAGE (nem-redukáló körülmények)	25 kD	26-27 kD
Sókoncentráció Soure S-ről való eluáláshoz	320 mmol/l NaCl	400 mmol/l NaCl
Hasítás proteáz V8-cal	15 kD fragmens + peptidek	<10 kD peptidek
Antigén-5-specifikus monoklonális antitestek	Detektálás 8E3, 1E11 segítségével	Detektálás csak 8E3 segítségével lehetséges
IgE-reaktivitás allergiás-szérummal	>95%	<10%
Allergén-potenciál	természetes antigén 5-höz hasonló	>10-szer csekélyebb, mint a természetes antigén 5

A találmány szerinti eljárás mindenféle rovarméreg-allergén esetén használható. Az alkalmazott tisztítási, valamint a rekombináns klónozási és expressziós módszerek szakember számára ismertek és hozzáférhetők, és hasonló, ismert eljárási módszerekkel helyettesíthetők.



Szabadalmi igénypontok

1. Rekombináns rovarméreg-allergének, amelyek csökkentett IgE-reaktivitással és allergenitással rendelkeznek.

2. Az 1. igénypont szerinti rovarméreg-allergének, amelyek allergenitása a természetes allergénekhez képest 95%-os mértékig csökkentett.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti rekombináns darázs rovarméreg-allergén.

4. A 3. igénypont szerinti *Vespula vulgaris* és *Vespula germanica* antigén 5 rekombináns főallergén.

5. Eljárás lényegében véve tiszta rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, azzal jellemezve, hogy az allergén proteinek baktériumsejtekben, oldhatatlan formában, zárványtestekként állítjuk elő, a kapott oldhatatlan aggregátumokat denaturáljuk, és a denaturált termékeket dialízissel különböző hajtogatódási konformációknak megfelelő oldható, monomer allergénekre bontjuk és elválasztjuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a denaturálást guanídium-kloriddal, redukálószer hozzáadása nélkül végezzük.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás csökkentett allergenitással és IgE-reaktivitással rendelkező rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, azzal jellemezve, hogy a dialízishez savas puffert alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy 4,5 és 5,0 közötti pH-értékkel rendelkező nátriumacetát-puffert alkalmazunk.

9. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás normális allergenitással és IgE-reaktivitással rendelkező rekombináns rovarméreg-allergének előállítására, azzal jellemezve, hogy a dialízishez ciszteintartalmú oldatot alkalmazunk.

10. Az 5-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy *Vespula* faj, különösen *Vespula vulgaris*,



Vespula germanica, *Paravespula* faj vagy *Apis mellifera* allergénjét alkalmazzuk.

11. Rekombináns darázméreg-allergén, amely a 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárással állítható elő.

12. Gyógyszerkészítmény, amely valamely, az 1-4. és 11. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns allergént, valamint segéd- és vivőanyagokat tartalmaz.

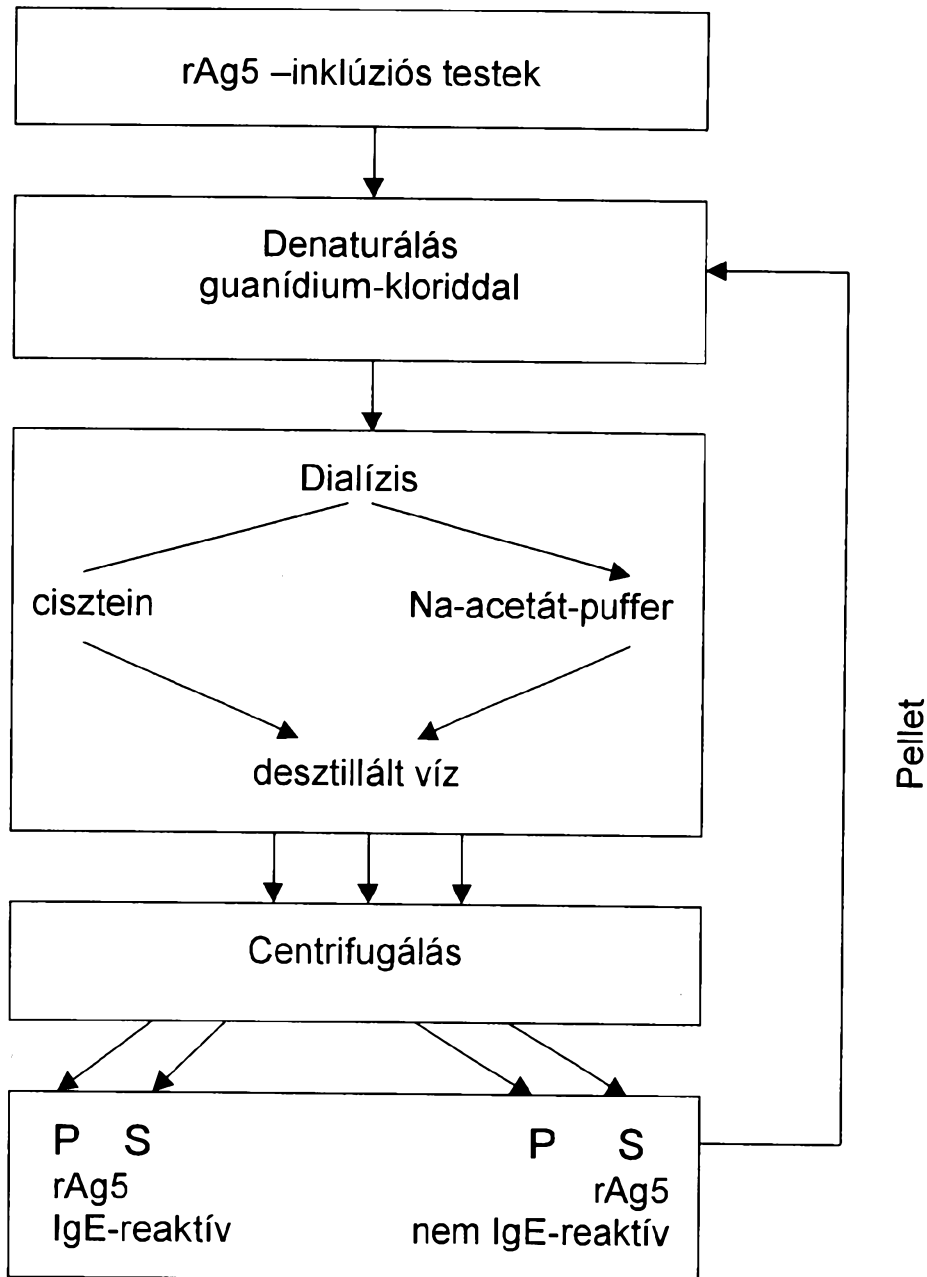
13. A 9. igénypont szerinti eljárással előállítható rovarméreg-allergének alkalmazása rovarcsípés-allergiák *in vitro* diagnosztizálására.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
Dr. Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő

1. ábra

Az eljárás folyamatábrája



rAg5 = rekombináns antigén 5

P = pellet

S = felülúszó