

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Januar 2006 (26.01.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/008018 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/415**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/007481
- (22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juli 2005 (11.07.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 035 337.9 21. Juli 2004 (21.07.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FIEBIG, Helmut** [DE/DE]; Baeckerweg 10, 21493 Schwarzenbek (DE). **WALD, Martin** [DE/DE]; Roonstrasse 25, 20253 Hamburg (DE). **NANDY, Andreas** [DE/DE]; Nuesslerkamp 89, 22175 Hamburg (DE). **KAHLERT, Helga** [DE/DE]; Walddoerferstrasse 59, 22041 Hamburg (DE). **WEBER, Bernhard** [DE/DE]; Alte Holstenstrasse 9, 21031 Hamburg (DE). **CROMWELL, Oliver** [GB/DE]; Am Broock 17, 23701 Suesel-Fassendorf (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**; Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VARIANTS OF GROUP 1 ALLERGENS OF *POACEAE* WITH REDUCED ALLERGENICITY AND A MAINTAINED T-CELL REACTIVITY

(54) Bezeichnung: VARIANTEN DER GRUPPE 1-ALLERGENE AUS *POACEAE* MIT REDUZIERTER ALLERGENITÄT UND ERHALTENER T-ZELLREAKTIVITÄT

(57) Abstract: The invention relates to the production and use of variants of group 1 allergens of *Poaceae* (sweet-grass), which are characterised by a reduced IgE reactivity compared to the known wild-type allergens and a largely maintained reactivity to T-lymphocytes. Said hypoallergenic allergen variants can be used for the specific immunotherapy (hyposensitivity) of patients suffering from grass pollen allergies or for the preventive immunotherapy of grass pollen allergies.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Verwendung von Varianten der Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* (Süßgräser), welche durch eine gegenüber den bekannten Wildtyp-Allergenen verringerte IgE-Reaktivität und gleichzeitig eine weitgehend erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten gekennzeichnet sind. Diese hypoallergenen Allergenvarianten können zur spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) von Patienten mit Gräserpollenallergie oder zur präventiven Immuntherapie von Gräserpollenallergien eingesetzt werden.

WO 2006/008018 A1

Varianten der Gruppe 1-Allergene aus *Poaceae* mit reduzierter Allergenität und erhaltener T-Zellreaktivität

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Verwendung von Varianten der Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* (Süßgräser), welche durch eine gegenüber den bekannten Wildtyp-Allergenen verringerte IgE-Reaktivität und gleichzeitig eine weitgehend erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten gekennzeichnet sind.
- 10 Diese hypoallergenen Allergenvarianten können zur spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) von Patienten mit Gräserpollenallergie oder zur präventiven Immuntherapie von Gräserpollenallergien eingesetzt werden.
- 15 Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft Varianten des Hauptallergens Phl p 1 aus dem Pollen von Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*).

Hintergrund der Erfindung

- 20 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
- 25 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).
- 30 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.

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

Im Fall von Wiesenlieschgras (*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; Peter-
10 sen 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:
15 189-198) 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 Majorallergene identifiziert worden.

20 Die dominierenden Majorallergene des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*) sind Phl p 1 und Phl p 5. Da die Majorallergene der Gräser der Familie *Poaceae* untereinander hoch homolog sind und infolge dessen sehr ähnliche biochemische und immunologische Eigenschaften besitzen, werden diese verwandten Proteine als Gruppe 1- bzw. Gruppe 5-Allergene
25 zusammengefaßt.

Die Gruppe 1-Allergene reagieren mit den IgE-Antikörpern von mehr als 95 % der Gräserpollenallergiker und sind somit dominierende Majorallergene der Gräserpollen.

Die Gruppe 1-Allergene sind Glykoproteine mit einer Molekularmasse von
30 ca. 32 kDa und sind im Zytoplasma der Pollenkörner lokalisiert. Sowohl der Kontakt der Pollenkörner mit der Schleimhaut der oberen Atemwege als auch die Befeuchtung der Pollenkörner durch Regen führen zu einer

raschen Freisetzung dieser Allergene. Die rasche Freisetzung der Gruppe 1-Allergene, auch in Form von subzellulären Mikropartikeln, ermöglicht das Eindringen in die unteren Luftwege, was zur Auslösung von schweren Asthmaanfällen führen kann.

5

Die cDNA's der Gruppe 1-Allergene von *Phleum pratense* (Laffer et al., 1994, J. Allergy Clin. Immunol. 94: 689-698), *Lolium perenne* (Perez et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 16210-16250), *Holcus lanatus* (Schramm et al., 1997, J. Allergy Clin. Immunol. 1999:781-787), *Poa pratensis* (Sturaro u. Viotti, 1998, NCBI GenBank, Acc. No. AJ 131850), *Cynodon dactylon* (Smith et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 331-343), *Phalaris aquatica* (Suphioglu et al., 1995, Clin. Exp. Allergy 25 : 853-865) und *Oryza sativa* (Xu et al., 1995, Gene 164: 255-259) sind identifiziert worden.

10

15

Außer diesen Erstbeschreibungen der Sequenz sind in Datenbanken weitere Gruppe 1-Allergen-Sequenzen publiziert, die in einzelnen Positionen von den originären Sequenzen abweichen. Solche Isoformen sind auch von anderen Gräserpollenallergenen bekannt.

20

Die Gruppe 1-Allergene der Süßgräser (*Poaceae*) weisen aufgrund ihrer Homologie eine hohe Kreuzreaktivität mit humanen IgE-Antikörpern auf (Laffer et al., 1996, Mol. Immunology 33: 417-426). Diese immunologische Kreuzreaktivität basiert auf einer sehr ähnlichen Aminosäuresequenz, wie ein Sequenzvergleich von Phl p 1, dem Gruppe 1-Allergen des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*), mit Gruppe 1-Molekülen von ausgewählten Spezies in Abbildung 1 zeigt.

25

30

Sowohl für die Sequenzbereiche der hier bei der Konstruktion hypoallergener Varianten beschriebenen Deletionen der Phl p 1-Aminosäuresequenz als auch für deren flankierenden Sequenzbereiche existieren homologe Sequenzbereiche in den übrigen Gruppe 1-Allergenen der *Poaceae*. Weiterhin sind sowohl die Anzahl als auch die umgebenden Sequenzberei-

che der Cysteine der Gruppe 1-Allergene der *Poaceae* konserviert. Aufgrund von Sequenzhomologien werden die Gruppe 1-Allergene der *Poaceae* der Proteinfamilie der β -Expansine zugeordnet (Cosgrove D.J., 2000 Nature 407: 321-6).

5

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. Diese T-Zell-Epitope sind für die therapeutische Wirkung der Allergenpräparate bei der Hyposensibilisierung von entscheidender Bedeutung (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

10

15

20

25

Eine 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.

30

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).

Ein davon abweichendes Konzept für eine Hyposensibilisierung geht davon aus, dass eine protektive Immunantwort besonders durch blockierende IgG4-Antikörper induziert wird. Entsprechend dieser Hypothese sind rekombinante Phl p 1-Fragmente beschrieben worden, die zur Induktion einer protektiven IgG4-Antwort geeignet sein sollen (Ball et al., 1999, FASEB J. 13:1277-1290). Dieses Konzept unterscheidet sich vollständig von dem Konzept der hypoallergenen Allergenvarianten mit verringerter IgE-Reaktivität und erhaltener T-Zell-Reaktivität.

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). Experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort wurden an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand nun in der Bereitstellung neuartiger Varianten der Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* auf Protein- und DNA-Ebene, die sich bei weitgehendem Erhalt der T-Zell-Reaktivität durch eine reduzierte IgE-Aktivität auszeichnen und daher für die kurative und präventive spezifische Immuntherapie sowie die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung geeignet sind.

Abbildungen

Abbildung 1: Alignment Phl p 1-homologer Aminosäuresequenzen (Sequenzen reifer Proteine deduziert aus cDNA-Sequenzen) von Spezies der Poaceae: *Poa pratensis* (Poa p), *Holcus lanatus* (Hol l), *Lolium perenne* (Lol p), *Cynodon dactylon* (Cyn d), *Oryza sativa* (Ory s) und *Phalaris*

7. Phl p 1 NoCys D1-6, 115-119, 213-220 (+ His-tag)

8. Markerproteine

* Proben reduziert (Dithiotreitol)

5 Abbildung 5: Streifentest zur Überprüfung der IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 unter nicht-denaturierenden Bedingungen

1) rPhl p 1 Wt

2) Phl p 1 NoCys

10 3) Phl p 1 NoCys D213-220

4) Phl p 1 NoCys D1-6, 115-119, 213-220

5) rPhl p 1 Wt

TP: Gesamtproteinfärbung

P: Seren klinisch definierter Gräserpollen-Allergiker

15

Abbildung 6: Nachweis der reduzierten IgE-Reaktivität von Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mittels EAST-Inhibitionstest mit vier repräsentativen Seren von Gräserpollen-Allergikern (P)

20

Abbildung 7: Nachweis der Hypoallergenität von Phl p 1 NoCys mittels Basophilen-Aktivierungstest mit Basophilen von vier Gräserpollen-Allergikern (P)

25

Abbildung 8: Nachweis der Hypoallergenität von Phl p 1 NoCys Δ 213-220 mittels Basophilen-Aktivierungstest mit Basophilen von vier Gräserpollen-Allergikern (P)

30

Abbildung 9: Nachweis der Hypoallergenität von Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mittels Basophilen-Aktivierungstest mit Basophilen von vier Gräserpollen-Allergikern (P)

Die Arbeiten, die zu den aufgefundenen Varianten führten, wurden anhand von Phl p 1 als Modellallergen durchgeführt. Aus den in Abb. 1 gezeigten Sequenz-Alignments wird deutlich, daß aufgrund der hohen Homologie innerhalb der Gruppe 1 dieselben Ergebnisse erhalten worden wären, wenn von einem anderen Gruppe 1-Allergen ausgegangen worden wäre.
5 So ist auch davon auszugehen, daß die vor- und nachstehend aufgeführten Ergebnisse auch auf Sec c 1 aus *Secale cereale* übertragbar sind bzw. unter Verwendung von Sec c 1 erhalten worden wären, auch wenn für dieses Gruppe 1-Allergen die Sequenz noch unbekannt ist.
10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Varianten der Gruppe-1-Allergene der *Poaceae*, welche durch eine gegenüber den bekannten Wildtyp-Allergenen verringerte IgE-Reaktivität sowie eine erhaltene Reaktivität mit T-Lymphozyten gekennzeichnet sind. Vorzugsweise sind diese Gruppe-1- Allergene Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1, Cyn d 1, Ory s 1 und Pha a 1 aus *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Holcus lanatus*, *Cynodon dactylon*, *Oryza sativa* und *Phalaris aquatica*. Stärker bevorzugt sind Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 bzw. Pha a 1 und ganz besonders bevorzugt Phl p 1.
15
20

Ausgangspunkt für die Konstruktion der hypoallergenen Varianten der Gruppe 1-Allergene ist die cDNA des Phl p 1 Wildtyps, die mit Hilfe spezifischer Primer durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der GesamtcDNA von Pollen von *Phleum pratense* isoliert wurde („GenBank“ Eintrag Z27090; NCBI, Bethesda, USA) (SEQ ID NO 1).
25

Von der cDNA-Sequenz des Phl p 1 Wildtyps wurde die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 2 deduziert.

Das aus 240 Aminosäuren bestehende, in der natürlichen Form glykosylierte Phl p 1 ist - wie alle Gruppe 1-Allergene (siehe Abb. 1) - durch die Existenz von sieben Cysteinen des reifen Moleküls gekennzeichnet. Mit der Ausnahme von Cyn d 1 und Ory s 1 haben diese Aminosäurepositionen bei
30

allen Gruppe 1-Allergenen die Nummern 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 (Petersen et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol 95: 987-994).

5 Phl p 1 konnte in *E. coli* als nicht-glykosyliertes Protein exprimiert werden. Das rekombinante Wildtyp-Protein (rPhl p 1 wt) reagierte mit IgE-Antikörpern von Gräserpollenallergikern, die eine Reaktivität mit natürlichem gereinigten Phl p 1 (nPhl p 1) aufwiesen (Petersen et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 315-321).

10

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Herstellung und Charakterisierung hypoallergener Phl p 1-Varianten

15 Ausgehend von der beschriebenen cDNA von rPhl p 1 wt wurden gentechnisch veränderte rekombinante Varianten von Phl p 1 hergestellt.

Die Aminosäuresequenz der rekombinanten Variante Phl p 1 NoCys (SEQ ID NO 4) weist anstelle der im Wildtyp vorkommenden sieben Cysteine sieben Serinreste auf (Abb. 2). Die Variante Phl p 1 NoCys diente als Ausgangspunkt für die Konstruktion von unterschiedlichen Deletionsmutanten. Bei diesen sind jeweils einzelne Abschnitte von 15 bis 90 bp Länge oder Kombinationen dieser Abschnitte der cDNA kodierend für Phl p 1 NoCys deletiert, wodurch entsprechende Deletionen der Aminosäuren 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 und 213-220 in den Polypeptidketten der in *E. coli* exprimierten Proteine resultieren: 25 Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (SEQ ID NO 5 und 6), Phl p 1 NoCys Δ 1-30 (SEQ ID NO 7 und 8), Phl p 1 NoCys Δ 92-104 (SEQ ID NO 9 und 10), Phl p 1 NoCys Δ 115-119 (SEQ ID NO 11 und 12), Phl p 1 NoCys Δ 175-185 (SEQ ID NO 13 und 14), Phl p 1 NoCys Δ 213-220 (SEQ ID NO 15 und 16), sowie 30 Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (SEQ ID NO 17 und 18).

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte als Histidin-Fusionsproteine in *Escherichia coli*. Die immunologische Charakterisierung wurde mit solchen Fusionsproteinen durchgeführt.

5 Zunächst wurden die rekombinanten Varianten nach Immobilisierung an eine Nitrocellulose-Membran auf die Fähigkeit, von IgE-Antikörpern eines repräsentativen Serumpools und von IgE-Antikörpern von individuellen Seren von Gräserpollenallergikern gebunden zu werden, untersucht (Streifentest). Bei diesem Verfahren wurde überraschenderweise eine
10 verminderte Bindung von IgE-Antikörpern an Phl p 1 NoCys beobachtet. Dieses Ergebnis wurde durch einen IgE-Inhibitionstest (EAST), bei dem die IgE-Bindungsfähigkeit eines nicht-immobilisierten Proteins an IgE-Antikörper in Lösung untersucht wird, bestätigt.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher insbesondere solche Gruppe 1-Allergenvarianten, bei denen die Cysteine der dem reifen Phl p 1 Protein entsprechenden Aminosäurepositionen 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 entfernt oder gegen eine andere Aminosäure ersetzt werden. Besonders bevorzugt sind dabei entsprechende Varianten von Phl p 1, Poa p 1,
20 Hol p 1, Lol p 1 oder Pha a 1, insbesondere von Phl p 1.

Eine verminderte Bindung von IgE-Antikörpern wird bereits dann erhalten, wenn mindestens zwei der 7 Cysteine ersatzlos entfernt oder gegen eine andere Aminosäure ersetzt werden. Vorzugsweise werden jedoch alle 7
25 Cysteine gegen Serin ausgetauscht.

Mittels eines Aktivierungstests von basophilen Granulozyten von Gräserpollenallergikern wurden die Auswirkungen der reduzierten IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 1 NoCys auf die funktionelle Wirkung bei der
30 Vernetzung von membrangebundenem IgE der Effektorzellen und deren Aktivierung *in vitro* untersucht. Phl p 1 NoCys zeigte hier eine deutlich

geringere Aktivierung von basophilen Granulozyten im Vergleich zu rPhl p 1 wt und somit eine funktionell reduzierte Allergenität.

5 Die auf Basis von Phl p 1 NoCys hergestellten unterschiedlichen Deletionsmutanten wurden nach dem gleichen Verfahren hinsichtlich der IgE-Bindungsfähigkeit (Streifentest, EAST) und der funktionellen Wirkung (Basophilenaktivierung) untersucht. Überraschenderweise zeigten die Deletionsmutanten besonders starke hypoallergene Eigenschaften.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher weiterhin solche Gruppe 1-Allergenvarianten, bei denen - wahlweise zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Varianten mit entferntem bzw. ersetzttem Cys - mindestens ein Bereich oder eine Kombination von Bereichen, die den Aminosäuren 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 und 213-220 der Primärsequenz des reifen Phl p 1 Proteins entsprechen, gegenüber dem Wildtyp-Allergen
15 fehlen.

Besonders bevorzugt sind dabei die entsprechenden Deletionsmutanten der Gruppe 1-Allergene Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 und Pha a 1. Ganz besonders bevorzugt sind die entsprechenden Phl p 1-Varianten.

20 Insbesondere bevorzugt und daher ebenfalls Erfindungsgegenstand sind diejenigen Gruppe 1-Allergenvarianten, bei denen ausschließlich die Aminosäuren 213-220 bzw. gleichzeitig die Aminosäuren 1-6 und 115-119 entsprechend der reifen Phl p 1-Sequenz fehlen. Stärker bevorzugt sind
25 hierbei wieder die Allergene Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 und Pha a 1, wobei Phl p 1 ganz besonders bevorzugt ist.

Die der Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie zugrundeliegende T-Zell-Reaktivität der hypoallergenen Phl p 1-Varianten wurde durch einen
30 Proliferationstest mit Phl p 1-spezifischen T-Lymphozyten von Gräserpollenallergikern *in vitro* überprüft. Die modifizierten Allergene zeigten eine

weitgehend erhaltene T-Zell-Reaktivität, was eine immuntherapeutische Verwendung der hypoallergenen Phl p 1-Varianten ermöglicht.

5 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).

10 Naturgemäß sind über die in der vorliegenden Patentanmeldung beschriebenen Variationen von Gruppe-1-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
15 anderen Proteinen oder Peptiden handeln.

Gegenstand ist weiterhin ein DNA-Molekül, kodierend für eine zuvor beschriebene Allergenvariante, ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend dieses DNA-Molekül sowie ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor. Geeignete
20 Wirtsorganismen können pro- oder eukaryontische, ein- oder mehrzellige Organismen wie Bakterien oder Hefen sein. Ein erfindungsgemäß bevorzugter Wirtsorganismus ist *E. coli*.

25 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Allergenvariante durch Kultivieren des besagten Wirtsorganismus und Gewinnung der entsprechenden Allergenvariante aus der Kultur.

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

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

5 Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind, bzw. zur immuntherapeutischen Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

Handelt es sich um pharmazeutische Zubereitungen des zweiten Typs

10 (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.

15 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-1-Allergenvarianten nicht reagieren. Zur parenteralen Anwendung

20 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

25 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

30 Aluminiumhydroxid, erhalten werden.

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-1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind bzw. zur immuntherapeutischen Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

Die Herstellung der Varianten Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (Abb. 3) sowie deren immunologische Charakterisierung ist im folgenden beispielhaft für die hypoallergenen Phl p 1-Varianten mit den oben beschriebenen gentechnischen Modifikationen dargestellt.

Expression und Reinigung rekombinanter Phl p 1-Varianten

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte als Histidin-Fusionsproteine (Expressionsvektor pProExHT; Invitrogen, Carlsbad, USA) in *Escherichia coli* (Stamm JM109). rPhl p 1 wt sowie die Varianten 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 (Abb. 4a). Die Identität der gereinigten Proteine wurde durch die Bindung eines Phl p 1-spezifischen monoklonalen Antikörpers nachgewiesen (Abb. 4b).

30

Nachweis der reduzierten IgE-Bindung der rekombinanten Phl p 1-Varianten

5 Eine einfache Testmethode zur Bestimmung der IgE-Reaktivität von spezifischem IgE aus Allergikerseren an membrangebundene Testproteine ist der Streifentest.

Dafür werden die Testsubstanzen in gleicher Konzentration und Menge nebeneinander an einen Streifen von Nitrocellulose-Membran unter nicht-denaturierenden Bedingungen gebunden. Eine Reihe solcher Membran-

10 streifen kann parallel mit unterschiedlichen Allergikerseren inkubiert werden. Nach einem Waschschrift werden die spezifisch gebundenen IgE-Antikörper durch eine Farbreaktion, vermittelt von einem Anti-human IgE/Alkalische Phosphatase-Konjugat, auf der Membran sichtbar gemacht.

15 Beispielhaft für die beschriebenen modifizierten Phl p 1-Moleküle werden hier die Ergebnisse des Streifentests bezüglich Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 unter Einsatz von individuellen Gräserpollen-Allergikerseren dargestellt (Abb. 5). Es kamen nur Seren von Allergikern mit einem starken IgE-Titer gegen

20 natürliches Phl p 1 zur Anwendung. Die IgE-Antikörper dieser Patienten reagieren ebenso mit dem rekombinanten Äquivalent rPhl p 1 wt.

Es wird deutlich, dass die Phl p 1-spezifischen IgE-Antikörper aller Patientenseren die rekombinante Variante Phl p 1 NoCys vermindert binden, nicht

25 aber das Wildtypallergen Phl p 1.

Eine noch stärkere Reduktion der IgE-Bindungsfähigkeit wird durch das zusätzliche Entfernen bestimmter Sequenzabschnitte erzielt, was anhand an der Variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 dargestellt ist. Die Variante

30 Phl p 1 NoCys Δ 213-220 zeigt mit allen überprüften Allergikerseren eine sehr stark verminderte IgE-Bindungsfähigkeit gegenüber dem nicht-

- veränderten rekombinanten Wildtyp-Protein. Eine weitere Reduktion der IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 1 an IgE-Antikörper bestimmter Seren kann durch Kombination mehrerer Deletionen erzielt werden, was an dem Testergebnis der Variante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mit dem
- 5 Gräserpollen-Allergikerserum P14 erkennbar ist (Abb. 5).
Somit wird deutlich, dass sowohl die Substitution von Cysteinen als auch die Deletion von spezifischen Sequenzabschnitten die IgE-Bindungsfähigkeit des Phl p 1-Moleküls herabsetzt.
- 10 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.
- 15 Der EAST-Hemmtest wird wie folgt ausgeführt. Mikrotiterplatten werden mit Allergenen, hier nPhl p 1, 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
- 20 (Serum-Pool) oder als Einzels Serum, wird in geeigneter Verdünnung mit den Allergen-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Die Menge der Allergen-gebundenen IgE-Antikörper wird über ein Anti-IgE/ Alkalische Phosphatase-Konjugat durch die Umsetzung eines Substrates zu einem farbigen Endprodukt photometrisch quantifiziert.
- 25 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.
- 30 Beispielhaft für die beschriebenen modifizierten Phl p 1-Moleküle werden hier die Testergebnisse bezüglich Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-

220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 im Vergleich zu dem Referenzmolekül nPhl p 1 dargestellt.

5 Die in Abbildung 6 dargestellten repräsentativen IgE-Inhibitionstests mit vier Individualseren von Gräserpollen-Allergikern zeigen, dass selbst mit hohen Konzentrationen der Variante Phl p 1 NoCys (bis 5 μ g/ ml) nur ca. 20-50% der maximalen Hemmwirkung des unveränderten natürlichen Allergens nPhl p1 erzielt wurde. Die niedrigere maximale Hemmwirkung deutet auf einen Verlust von IgE-Epitopen hin.

10 Die Kurvenverläufe der Varianten Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 zeigen eine noch geringere IgE-Bindungsfähigkeit dieser Phl p 1-Varianten auf. Eine Hemmwirkung konnte individuell variierend nicht oder nur in sehr geringer Stärke (0-20% der maximalen Hemmwirkung) nachgewiesen werden.

15 Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Streifentests kann somit belegt werden, dass durch Einfügen zusätzlicher gezielter Deletionen die IgE-Bindungsfähigkeit von Phl p 1 weiter reduziert wird.

20 *Nachweis der Hypoallergenität der rekombinanten Phl p 1-Varianten durch Basophilen-Aktivierungstest*

25 Die funktionelle Reduktion der Allergenität wurde mittels eines Basophilenaktivierungstests *in vitro* bestimmt. Für den Basophilenaktivierungstest wird heparinisiertes Vollblut von Gräserpollen-Allergikern mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die allergenen Substanzen werden von den Fc ϵ RI-gebundenen IgE-Antikörpern der Basophilen spezifisch gebunden und führen zu einer Vernetzung der Fc ϵ RI-Moleküle.

30 Diese Allergen-induzierte IgE-vermittelte Fc ϵ RI-Vernetzung führt zur Aktivierung der Basophilen. Die Aktivierung ist der erste Schritt in der allergischen Reaktion dieser Effektorzellen. Die anschließende

Signaltransduktion resultiert in der Degranulation der Effektorzellen und somit dem Auslösen der allergischen Reaktionen *in vivo*.

5 *In vitro* kann die Allergen-induzierte Aktivierung von basophilen Granulozyten durch Quantifizierung der Expression eines mit der Signaltransduktion der IgE-Rezeptor-Vernetzung gekoppelten Oberflächenproteins (CD203c) nachgewiesen werden (Kahlert et al., 2003, *Clin. Exp. Allergy* 33: 1266-72). Die Zahl der exprimierten CD203c-Proteine auf einer Zelle und der Prozentwert der aktivierten Zellen eines Zellpools wird über die Bindung eines
10 fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers an den Oberflächenmarker und anschließende Analyse durch fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie hochsensitiv gemessen.

Als Referenzsubstanzen wurde hier das gereinigte natürliche Phl p 1 (nPhl p 1) parallel zu den Testsubstanzen eingesetzt. Beispielfhaft für die be-
15 beschriebenen modifizierten Phl p 1-Moleküle werden hier die Ergebnisse Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 dargestellt.

20 Repräsentative Testergebnisse der Variante Phl p 1 NoCys mit Basophilen von vier klinisch definierten Allergikern sind in Abbildung 7 als Kurvenverläufe gezeigt. Die Reduktion der allergenen Wirksamkeit der Variante Phl p 1 NoCys relativ zu nPhl p 1 Wildtyp wird durch die Verschiebung der Aktivierungskurven deutlich.

25 Die Testergebnisse der Varianten Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 weisen im Einklang mit den Ergebnissen des Streifentests und des IgE-Inhibitionstests auf eine noch stärkere Reduktion der relativen allergenen Wirksamkeit hin, wie in Abbildung 8 und 9 anhand repräsentativer Kurvenläufe gezeigt wird.

30 Während in einem Konzentrationsbereich der Testsubstanzen von 100-1000 pM durch das natürliche Allergen bereits ein maximaler Anteil von Basophilen aktiviert wurde, konnte keine oder eine nur sehr geringe

Basophilen-Aktivierung bei Einsatz der modifizierten Allergene

Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 nachgewiesen werden.

5 Die allergene Wirksamkeit der Variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 war, wie über die A50-Werte der Kurvenverläufe berechnet werden kann, ~ 100-1000 fach und die der Variante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mehr als 1000 fach gegenüber der Referenz nPhl p 1 erniedrigt (A50: Allergenkonzentration bei 50% der Zahl maximal aktivierter Basophilen).

10

T-Zell-Reaktivität der hypoallergen Phl p 1-Varianten

15 T-Helfer-Lymphozyten reagieren mit Peptidfragmenten der Allergene (ca. 12-25 Aminosäuren), die durch enzymatischen Abbau in Antigen-präsentierenden 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 Proliferation und für die funktionelle Differenzierung (TH1 und TH2). Die
20 Beeinflussung der allergenspezifischen T-Lymphozyten durch die Behandlung mit Allergen oder einem Allergenderivat bei der Hyposensibilisierung wird als Schlüssel für die therapeutische Wirksamkeit angesehen.

25 Zur Untersuchung der T-Zell-Reaktivität werden oligoklonale T-Zell-Linien von Graspollen-Allergikern unter Stimulation mit nPhl p 1 - oder rPhl p 1 wt -Molekülen nach üblichen Verfahren etabliert. In einem Proliferationstest wurden die unterschiedlichen T-Zell-Linien mit den Referenz-Allergenen nPhl p 1 und rPhl p 1 wt sowie den modifizierten rekombinanten Phl p 1-Varianten stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von
30 [³H]-Thymidin mit den üblichen Verfahren bestimmt.

Beispielhaft für die beschriebenen modifizierten Phl p 1-Moleküle sind hier die Ergebnisse des Proliferationstest von Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 dargestellt.

5 Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse mit T-Zell-Linien von acht Gräserpollen-Allergikern zeigen, dass die T-Lymphozyten durch die rekombinanten Allergenvarianten zur Proliferation stimuliert werden konnten. Die T-Zellreaktivität von Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 ist im Vergleich zu den
10 *unveränderten natürlichen und rekombinanten Wildtyp-Allergenen* nur wenig erniedrigt, was die Erhaltung der entscheidenden T-Zell-Epitope nachweist.

15 **Tabelle 1:** Nachweis der T-Zellreaktivität von Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mittels Proliferationstests mit Phl p 1-reaktiven T-Zell-Linien (TCL)

Donor ²	TCL	Stimulationsindex ¹				
		nPhl p 1	rPhl p 1 Wt	Phl p 1 NoCys	Phl p 1 NoCys Δ 213-220	Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220
A	11.16	3,2	4,7	3,7	3,5	3,9
B	21.1	23,5	13,9	12,1	13,0	12,3
C	60.51	3,9	5,7	3,9	4,2	2,0
D	104.8	2,6	4,6	4,1	3,4	3,0
E	10.27	26,4	27,8	32,7	30,8	31,4
F	41.8	2,7	4,9	3,5	3,0	3,1
G	55.74	7,6	8,4	4,9	4,6	4,5
25 H	57.43	3,1	4,0	3,0	2,6	2,9

¹ Berechnet von [³H]-Messwerten. cpm-Messwerte Allergen-stimulierter Zellkulturen/ cpm-Messwerte unstimulierter Zellkulturen

² Donor: Klinisch definierte Gräserpollen-Allergiker

30

Gentechnische Konstruktion von hypoallergenen Phl p 1-Varianten

Beispiel 1: Phl p 1 NoCys

5 Zur Konstruktion der Variante Phl p 1 NoCys (SEQ ID NO 3 und 4) wurden sechs PCR-Schritte ausgehend von der cDNA von rPhl p 1 wt („GenBank“ Eintrag Z27090; NCBI, Bethesda, USA) durchgeführt. Die Punktmutationen wurden eingeführt, indem spezifische PCR-Primer eingesetzt wurden, die anstelle von für Cystein kodierenden Kodons solche für Serin enthielten
10 (Primersequenzen s. Tab. 2).

Schritt 1 - Herstellung des N-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S] (bp 1-212)“: Durch Amplifizierung langer überlappender Oligonukleotide (P 1-63, P 49-111, P 97-158 und P 144-212) mittels PCR
15 wurde ein DNA-Fragment mit den Mutationen C41S, C57S, C69S generiert.

Schritt 2 - Herstellung des C-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 [C69S, C72S, C77S, C83S] (bp 193-720)“: PCR der Phl p 1 wt-cDNA mit den Primern P 193-261 und P 703-720 *HindIII*.

20 Schritt 3 - Herstellung der DNA kodierend für „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S] (bp 1-720)“: PCR der überlappenden Fragmente „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S] (bp 1-212)“ und „Phl p 1 [C69S, C72S, C77S, C83S] (bp 193-720)“ mit den Primern P 1-63 und P 703-720 *HindIII*.

25 Schritt 4 - Herstellung des N-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S, C139S] (bp 1-428)“: PCR der cDNA von „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S] (bp 1-720)“ mit den Primern P 1-63 und P 406-428 *as*.

30 Schritt 5 - Herstellung des C-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 [C139S] (bp 406-720)“:

PCR der cDNA von rPhl p 1 wt mit den Primern P 406-428s und P 703-720 *HindIII*.

Schritt 6 - Herstellung der vollständigen DNA kodierend für Phl p 1 NoCys:
5 PCR der überlappenden Fragmente „Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S, C139S] (bp 1-428)“ und „Phl p 1 [C139S] (bp 406-720) mit den Primern P 1-63 und P 703-720 *HindIII*“.

Die für Phl p 1 NoCys kodierende DNA wurden mit dem Restriktionsenzym
10 *HindIII* verdaut und über die Restriktionsschnittstellen *EheI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert, und anschließend vollständig sequenziert.

Tabelle 2: Aufstellung der zur Herstellung von Phl p 1 NoCys, Phl p 1
15 NoCys Δ 213-220 und Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 eingesetzten PCR-Primer

Primer	Richtung	SEQ ID NO	Sequenz (5'→3')
20 P 1-18 ¹	sense	19	atc ccg aag gtc ccg ccg
P 1-63	sense	20	atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg
P 49-111	antisense	21	ggt gtc ctt ggg acc ggc ggc cgt cgg ctt gcc gta cca ggt gct ctt cgc gtc cag cca ctt
P 97-158	sense	22	ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag ccc ccg ttc agc gg
25 P 144-212	antisense	23	gag ccg ct gcc ccg gcc gga ctt gaa gat ggg ggt ggt gcc gga gcc ggt cat gcc gct gaa cgg ggg c
P 193-261	sense	24	tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag ccc
P 703-720 <i>HindIII</i>	antisense	25	ggt aag ctt tca ctt gga ctc gta ggc ggt
P 406-428 as	antisense	26	tcc ggg tac ttg gac ttg acg cg
P 406-428 s	sense	27	cgc gtc aag tcc aag tac ccg ga
30 P 22-63 (Δ 1-18)	sense	28	ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg
P 250-318	antisense	29	gtc gaa gtg gta cgc ggc gat ggg ctc ctc gtt gtc gtc ggt gat gtg gac cac cac ggg ctc gcc gga

P 301-384 sense (Δ 343-357)	30	gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc
P 613-720 antisense (Δ 637-660) <i>HindIII</i>	31	ggt aag ctt tca ctt gga ctc gla ggc ggt gtc ggc ctt cca gcc ctc ggg gat gac gtc ctt ggc ctc gcc gcg gac ggt gaa ggg gcc ctt gag

5 ¹Zahlenangaben: Positionen der Primer bezogen auf die Nukleotid-Sequenz des Phl p 1 Wildtyp-Proteins (ohne Signalpeptid; „GenBank“ Eintrag Z27090; NCBI, Bethesda, USA). Primersequenzen teilweise kodonoptimiert für *E. coli*.

10

Beispiel 2: Phl p 1 NoCys Δ 213-220

Die DNA-Sequenz kodierend für die Deletionsvariante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 (SEQ ID NO 15 und 16) wurde mittels PCR der DNA von
15 Phl p 1 NoCys unter Einsatz des 5'-Primers P 1-18 sowie des spezifisch um den zu deletierenden Sequenzbereich verkürzten 3'-Primers P 613-720 (Δ 637-660) *HindIII* generiert.

Die cDNA wurden mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut und über die Restriktionsschnittstellen *EheI* und *HindIII* in den Expressionsvektor
20 pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert, und anschließend vollständig sequenziert.

Beispiel 3: Gentechnische Konstruktion von Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220

25

Die DNA-Sequenz kodierend für die Deletionsvariante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (SEQ ID NO 5 und 6) wurde mittels PCR unter Einsatz
30 von spezifisch um den zu deletierenden Sequenzbereich verkürzten Oligonukleotiden in drei Schritten generiert.

Schritt 1 - Herstellung des N-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (bp 1-300)“: PCR der cDNA von Phl p 1 NoCys mit den Primern P22-63 (Δ 1-18) und P 250-318.

5 Schritt 2 - Herstellung des C-terminalen DNA-Fragments „Phl p 1 NoCys Δ 115-119, 213-220 (bp 283-663)“: PCR von Phl p 1 NoCys mit den Primern P 301-384 (Δ 343-357) und P 613-720 (Δ 637-660) *HindIII*.

10 Schritt 3 - Herstellung der vollständigen DNA kodierend für Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220:

PCR der überlappenden Fragmente „Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (bp 1-300)“ und „Phl p 1 NoCys Δ 115-119, 213-220 (bp 283-663)“ mit den Primern P22-63 (Δ 1-18) und P 703-720 *HindIII*.

15 Die für Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 kodierenden DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut und über die Restriktionsschnittstellen Ehel und *HindIII* in den Expressionsvektor pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert, und anschließend vollständig sequenziert.

20 Die DNA der Varianten Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (SEQ ID NO 5 und 6), Phl p 1 NoCys Δ 1-30 (SEQ ID NO 7 und 8), Phl p 1 NoCys Δ 92-104 (SEQ ID NO 9 und 10), Phl p 1 NoCys Δ 115-119 (SEQ ID NO 11 und 12), Phl p 1 NoCys Δ 175-185 (SEQ ID NO 13 und 14) wurden in entsprechender Weise
25 hergestellt, kloniert und sequenziert.

30

Patentansprüche

1. Varianten der Gruppe 1-Allergene der *Poaceae*, welche durch ein gegenüber dem bekannten Wildtyp-Allergen verringerte IgE-Reaktivität sowie eine weitgehend erhaltene Reaktivität der T-Lymphozyten gekennzeichnet sind.
5
2. Allergenvarianten gemäß Anspruch 1 ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*,
10 *Holcus lanatus*, *Cynodon dactylon*, *Oryza sativa* und *Phalaris aquatica*.
3. Allergenvarianten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Cysteine der dem reifen Phl p 1 Protein entsprechenden Aminosäurepositionen 41, 57, 69, 72,
15 77, 83 und 139 fehlen.
4. Allergenvarianten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Cysteine der dem reifen Phl p 1 Protein entsprechenden Aminosäurepositionen 41, 57, 69, 72,
20 77, 83 und 139 durch eine andere Aminosäure substituiert werden.
5. Allergenvarianten gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Cysteine der dem reifen Phl p 1 Protein entsprechenden Aminosäurepositionen 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 durch Serin
25 substituiert werden.
6. Allergenvarianten, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem reifen Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 oder Pha a 1, bei denen die
30 Sequenzveränderungen gemäß Anspruch 5 vorliegen.

- 5
7. Phl p 1-Variante gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Cysteine 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 des reifen Proteins durch Serin substituiert werden (Variante Phl p 1 NoCys gemäß SEQ ID NO 4).
- 10
8. Allergenvarianten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Bereich oder eine Kombination von Bereichen, die den Aminosäuren 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 und 213-220 der Primärsequenz des reifen Phl p 1 Proteins entsprechen, gegenüber dem Wildtyp-Allergen fehlen.
- 15
9. Allergenvarianten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-8, bei denen die Aminosäuren 213-220 entsprechend der reifen Phl p 1-Sequenz fehlen.
- 20
10. Allergenvarianten, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem reifen Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 oder Pha a 1, bei denen die Sequenzveränderungen gemäß Anspruch 8 oder 9 vorliegen.
- 25
11. Phl p 1-Variante gemäß Anspruch 10, bei der die Cysteine 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 des reifen Proteins durch Serin ersetzt werden und Aminosäuren 213-220 fehlen (Variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 gemäß SEQ ID NO 16).
- 30
12. Allergenvarianten gemäß Anspruch 8, bei denen die Aminosäuren 1-6, 115-119 und 213-220 entsprechend der reifen Phl p 1-Sequenz fehlen.
13. Allergenvarianten, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus dem reifen Phl p 1, Poa p 1, Hol p 1, Lol p 1 oder Pha a 1, bei denen die Sequenzveränderungen gemäß Anspruch 12 vorliegen.

14. Phl p 1-Variante gemäß Anspruch 13 , bei der die Cysteine 41, 57, 69, 72, 77, 83 und 139 des reifen Proteins durch Serin ersetzt werden und Aminosäuren 1-6, 115-119 und 213-220 fehlen (Variante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119 und 213-220 gemäß SEQ ID NO 18).
- 5
15. Allergenvarianten gemäß Anspruch 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch gentechnische Methoden rekombinant erhalten wurden.
- 10
16. DNA-Moleküle, kodierend für Allergenvarianten gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 1-15.
- 15
17. Rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 16, funktionell verbunden mit einer Expressions-Kontrollsequenz.
18. Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 16 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 15.
- 20
19. Verfahren zur Herstellung einer Allergenvariante gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 1-15 durch Kultivierung eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 18 und Gewinnung der entsprechenden Allergenvariante aus der Kultur.
- 25
20. Allergenvariante gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 1-15 als Arzneimittel.
- 30
21. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens eine Allergenvariante entsprechend einem oder mehreren der Ansprüche 1-15 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur präventiven und therapeutischen Behandlung von Allergien an deren

Auslösung Gruppe 1-Allergene der *Poaceae* Spezies beteiligt sind.

5 22. Verwendung mindestens einer Allergenvariante gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und Therapie von Allergien an deren Auslösung Gruppe 1-Allergene von Spezies der *Poaceae* beteiligt sind.

23. DNA-Molekül gemäß Anspruch 16 als Arzneimittel.

10 24. Rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 17 als Arzneimittel.

15 25. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 16 oder mindestens ein Expressionsvektor gemäß Anspruch 24 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe 1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20 26. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 16 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 24 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe 1-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention
25 solcher Allergien.

30

Abbildung 1

1	:	I	P	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	:	P	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
1	:	I	A	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	:	P	Poa p 1 GenBank AJ131850	
1	:	I	A	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	:	P	Hol I 1 GenBank AJ012714	
1	:	I	A	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	E	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	:	P	Lol p 1 GenBank M35687	
1	:	A	M	G	D	:	K	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	A	T	E	Y	G	S	D	P	Cyn d 1 GenBank AF177379
1	:	G	P	P	K	V	P	P	G	P	N	I	T	I	S	Y	G	D	K	W	L	E	A	K	A	T	W	Y	G	A	:	P	Ory s 1 GenBank AF261270.1
1	:	I	A	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	E	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	:	P	Pha a 1 GenBank S80654	
30	T	A	A	G	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M	T	G	C	G	N	T	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
30	T	G	A	G	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	A	P	F	S	G	M	T	G	C	G	N	T	Poa p 1 GenBank AJ131850	
30	T	G	A	G	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M	T	G	C	G	N	T	Hol I 1 GenBank AJ012714	
30	T	G	A	G	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	A	P	F	N	G	M	T	G	C	G	N	T	Lol p 1 GenBank M35687	
31	R	G	A	A	P	D	H	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	A	P	F	D	G	M	T	G	C	G	N	E	P	Cyn d 1 GenBank AF177379	
31	K	G	A	A	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	A	P	F	L	G	M	N	S	C	G	N	D	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
30	T	G	A	G	P	K	D	N	G	G	A	C	G	Y	K	D	V	D	K	A	P	F	N	G	M	T	G	C	G	N	T	Pha a 1 GenBank S80654	
61	P	I	F	K	S	G	R	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	T	K	P	E	A	C	S	G	E	P	V	V	V	H	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
61	P	I	F	K	S	G	R	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	T	K	P	E	S	C	S	G	E	P	V	L	V	H	Poa p 1 GenBank AJ131850	
61	P	I	F	K	S	G	R	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	T	K	P	E	S	C	S	G	E	P	I	V	V	H	Hol I 1 GenBank AJ012714	
61	P	I	F	K	D	G	R	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	T	K	P	E	S	C	S	G	E	A	V	I	V	I	Lol p 1 GenBank M35687	
62	P	I	F	K	D	G	L	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	K	E	P	A	E	C	S	G	E	P	V	L	I	K	Cyn d 1 GenBank AF177379	
62	P	I	F	K	D	G	K	G	C	G	S	C	F	E	I	K	C	S	K	P	E	A	C	S	D	K	P	A	L	I	H	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
61	P	I	F	K	D	G	R	G	C	G	S	C	F	E	L	K	C	S	K	P	E	S	C	S	G	E	P	I	I	V	H	Pha a 1 GenBank S80654	
92	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	I	A	F	G	S	M	A	K	K	G	D	E	Q	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
92	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	K	A	F	G	A	M	A	K	K	G	E	E	Q	Poa p 1 GenBank AJ131850	
92	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	L	D	L	S	G	K	A	F	G	A	M	A	K	K	G	E	E	Q	Hol I 1 GenBank AJ012714	
92	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	P	Y	H	F	D	L	S	G	H	A	F	G	S	M	A	K	K	G	E	E	Q	Lol p 1 GenBank M35687	
93	I	T	D	K	N	Y	E	H	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	K	A	F	G	A	M	A	K	K	G	E	E	D	Cyn d 1 GenBank AF177379	
93	V	T	D	M	N	D	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	L	A	F	G	A	M	A	K	D	G	K	D	E	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
92	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	P	Y	H	F	D	L	S	G	H	A	F	G	S	M	A	K	K	G	E	E	E	Pha a 1 GenBank S80654	
123	K	L	R	S	A	G	E	V	E	I	Q	F	R	R	V	K	C	K	Y	P	E	G	T	K	V	T	F	H	V	E	K	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
123	K	L	R	S	A	G	E	L	E	L	K	F	R	R	V	K	C	E	Y	P	E	G	T	K	V	T	F	H	V	E	K	Poa p 1 GenBank AJ131850	
123	K	L	R	S	A	G	E	L	E	L	K	F	R	R	V	K	C	E	Y	P	K	G	T	K	V	T	F	H	V	E	K	Hol I 1 GenBank AJ012714	
123	N	V	R	S	A	G	E	L	E	L	Q	F	R	R	V	K	C	K	Y	P	D	D	T	K	P	T	F	H	V	E	K	Lol p 1 GenBank M35687	
124	K	L	R	K	A	G	E	L	M	L	Q	F	R	R	V	K	C	E	Y	P	S	D	T	K	I	T	F	H	V	E	K	Cyn d 1 GenBank AF177379	
124	E	L	R	K	A	G	I	I	D	I	Q	F	R	R	V	K	C	K	Y	P	A	D	T	K	I	T	F	H	I	E	K	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
123	N	V	R	G	A	G	E	L	E	L	Q	F	R	R	V	K	C	K	Y	P	D	G	T	K	P	T	F	H	V	E	K	Pha a 1 GenBank S80654	
154	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	F	V	A	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	K	G	K	D	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
154	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	Y	V	I	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	K	G	K	D	Poa p 1 GenBank AJ131850	
154	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	Y	V	D	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	K	G	K	D	Hol I 1 GenBank AJ012714	
154	G	S	N	P	N	Y	L	A	I	L	V	K	Y	V	D	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	K	G	K	D	Lol p 1 GenBank M35687	
155	G	S	S	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	Y	A	A	G	D	G	N	I	V	G	V	D	I	K	P	K	G	S	D	Cyn d 1 GenBank AF177379	
155	A	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	Y	V	A	G	D	G	D	V	V	E	V	E	I	K	E	K	G	S	E	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
154	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	Y	V	D	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	K	G	K	D	Pha a 1 GenBank S80654	
185	K	W	I	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	E	V	L	K	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	Phi p 1 Wt GenBank Z27090	
185	K	W	I	E	L	K	E	S	W	G	S	I	W	R	V	D	T	P	D	K	L	I	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	Poa p 1 GenBank AJ131850	
185	K	W	I	E	L	K	E	S	W	G	A	V	W	R	V	D	T	P	D	K	L	I	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	Hol I 1 GenBank AJ012714	
185	K	W	I	E	L	K	E	S	W	G	A	V	W	R	I	D	T	P	D	K	L	I	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	Lol p 1 GenBank M35687	
186	V	F	L	P	M	K	L	S	W	G	A	I	W	R	M	D	P	P	K	P	L	K	G	P	F	T	I	R	L	T	S	Cyn d 1 GenBank AF177379	
186	E	W	K	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	K	P	L	K	G	P	F	S	V	R	V	T	T	Ory s 1 GenBank AF261270.1	
185	K	W	I	E	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	D	K	L	I	G	P	F	T	V	R	Y	T	T	Pha a 1 GenBank S80654	
216	E	G	G	T	K	G	E	A	K	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	E	S	:	:	:	:	K	Phi p 1 Wt GenBank Z27090			
216	E	G	G	T	K	G	E	A	E	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	A	S	:	:	:	:	K	Poa p 1 GenBank AJ131850			
216	E	G	G	T	K	V	E	A	E	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	E	S	:	:	:	:	K	Hol I 1 GenBank AJ012714			
216	E	G	G	T	K	S	E	V	E	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	S	Y	S	A	K	:	:	:	:	K	Lol p 1 GenBank M35687		
217	E	S	G	G	H	V	E	Q	E	D	V	I	P	E	D	W	K	P	D	T	V	Y	K	S	K	I	Q	E	:	:	Cyn d 1 GenBank AF177379		
217	E	G	G	E	K	I	I	A	E	D	A	I	P	D	G	W	K	A</															

Abbildung 2

		10	20	30	
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T				Phl p 1 NoCys
		40	50	60	
31	A A G P K D N G G A C G Y K D V D K P P F S G M T G C G N T				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
31	A A G P K D N G G A S G Y K D V D K P P F S G M T G S G N T				Phl p 1 NoCys
		70	80	90	
61	P I F K S G R G C G S C F E I K C T K P E A C S G E P V V V				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
61	P I F K S G R G S G S S F E I K S T K P E A S S G E P V V V				Phl p 1 NoCys
		100	110	120	
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D				Phl p 1 NoCys
		130	140	150	
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K C K Y P E G T K V T F H				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K S K Y P E G T K V T F H				Phl p 1 NoCys
		160	170	180	
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E				Phl p 1 NoCys
		190	200	210	
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T				Phl p 1 NoCys
		220	230	240	
211	V R Y T T E G G T K G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K				Phl p 1 Wt GenBank Z27090
211	V R Y T T E G G T K G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K				Phl p 1 NoCys

Abbildung 3

		10	20	30	
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T				Phl p 1 NoCys
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T				Phl p 1 NoCys d213-220
1	: : : : : G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		40	50	60	
31	A A G P K D N G G A S G Y K D V D K P P F S G M T G S G N T				Phl p 1 NoCys
31	A A G P K D N G G A S G Y K D V D K P P F S G M T G S G N T				Phl p 1 NoCys d213-220
25	A A G P K D N G G A S G Y K D V D K P P F S G M T G S G N T				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		70	80	90	
61	P I F K S G R G S G S S F E I K S T K P E A S S G E P V V V				Phl p 1 NoCys
61	P I F K S G R G S G S S F E I K S T K P E A S S G E P V V V				Phl p 1 NoCys d213-220
55	P I F K S G R G S G S S F E I K S T K P E A S S G E P V V V				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		100	110	120	
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D				Phl p 1 NoCys
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D				Phl p 1 NoCys d213-220
85	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S : : : : D				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		130	140	150	
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K S K Y P E G T K V T F H				Phl p 1 NoCys
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K S K Y P E G T K V T F H				Phl p 1 NoCys d213-220
110	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K S K Y P E G T K V T F H				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		160	170	180	
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E				Phl p 1 NoCys
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E				Phl p 1 NoCys d213-220
140	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		190	200	210	
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T				Phl p 1 NoCys
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T				Phl p 1 NoCys d213-220
170	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		220	230	240	
211	V R Y T T E G G T K G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K				Phl p 1 NoCys
211	V R : : : : : G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K				Phl p 1 NoCys d213-220
200	V R : : : : : G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K				Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220

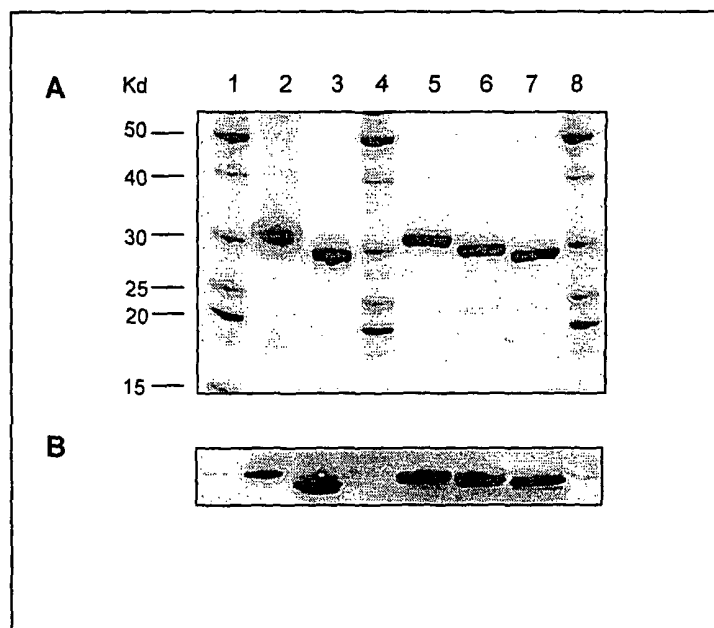
Abbildung 4:

Abbildung 5:

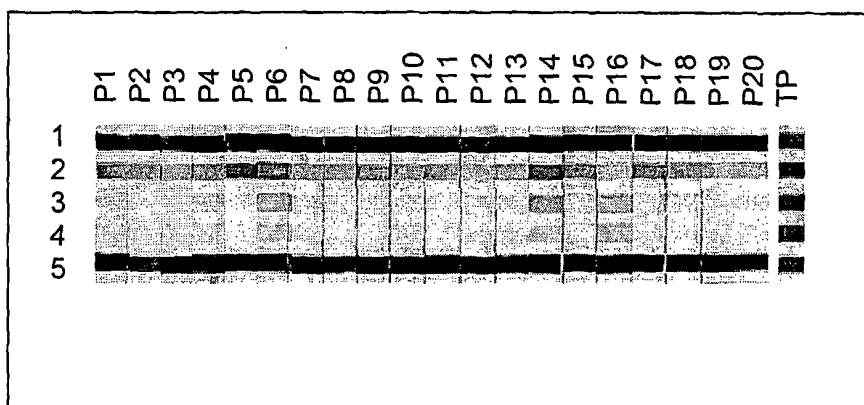
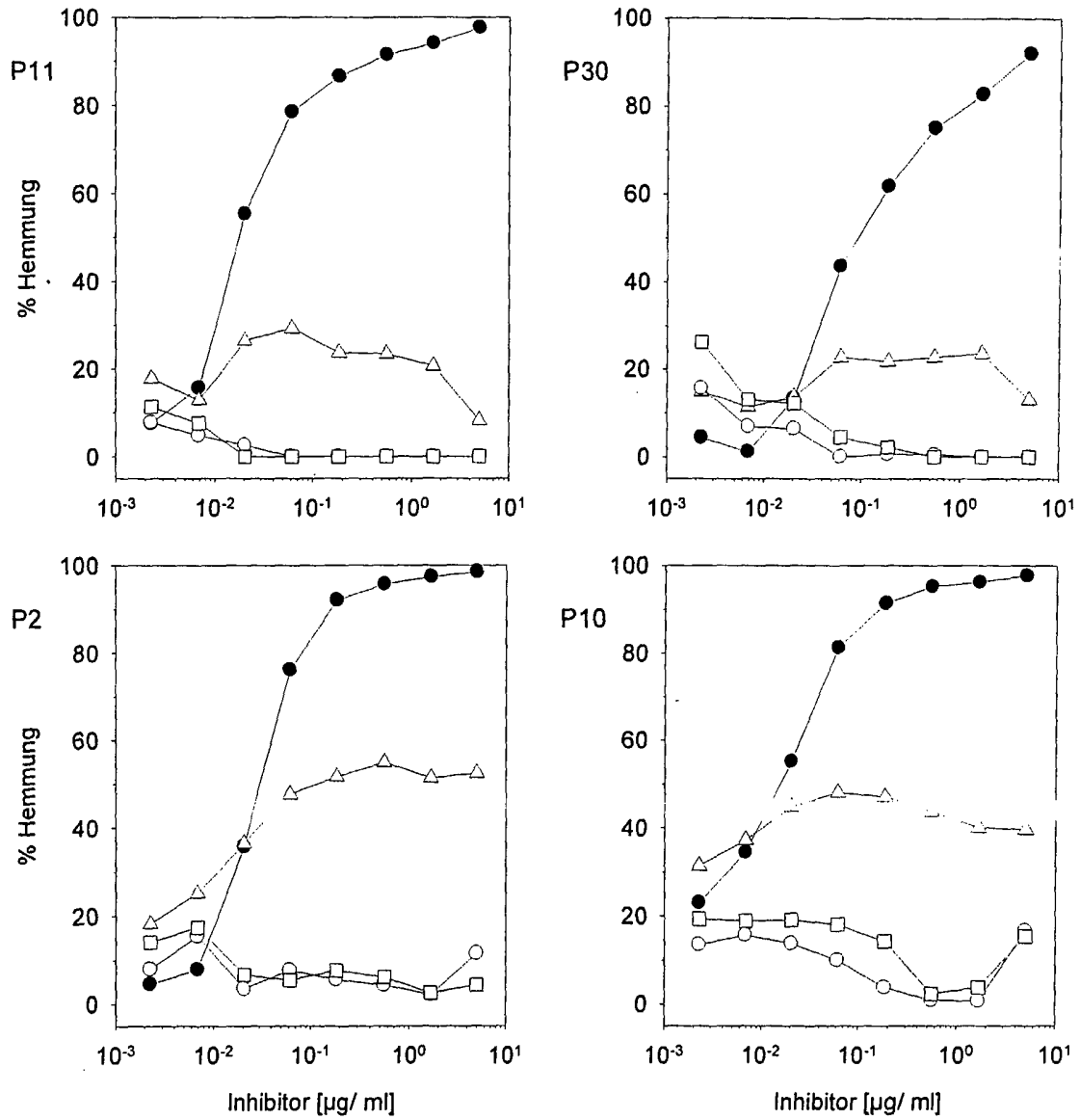


Abbildung 6:



- nPhl p 1
- △ Phl p 1 NoCys
- Phl p 1 NoCys Δ213-220
- Phl p 1 NoCys Δ1-6, 115-119, 213-220

Abbildung 7:

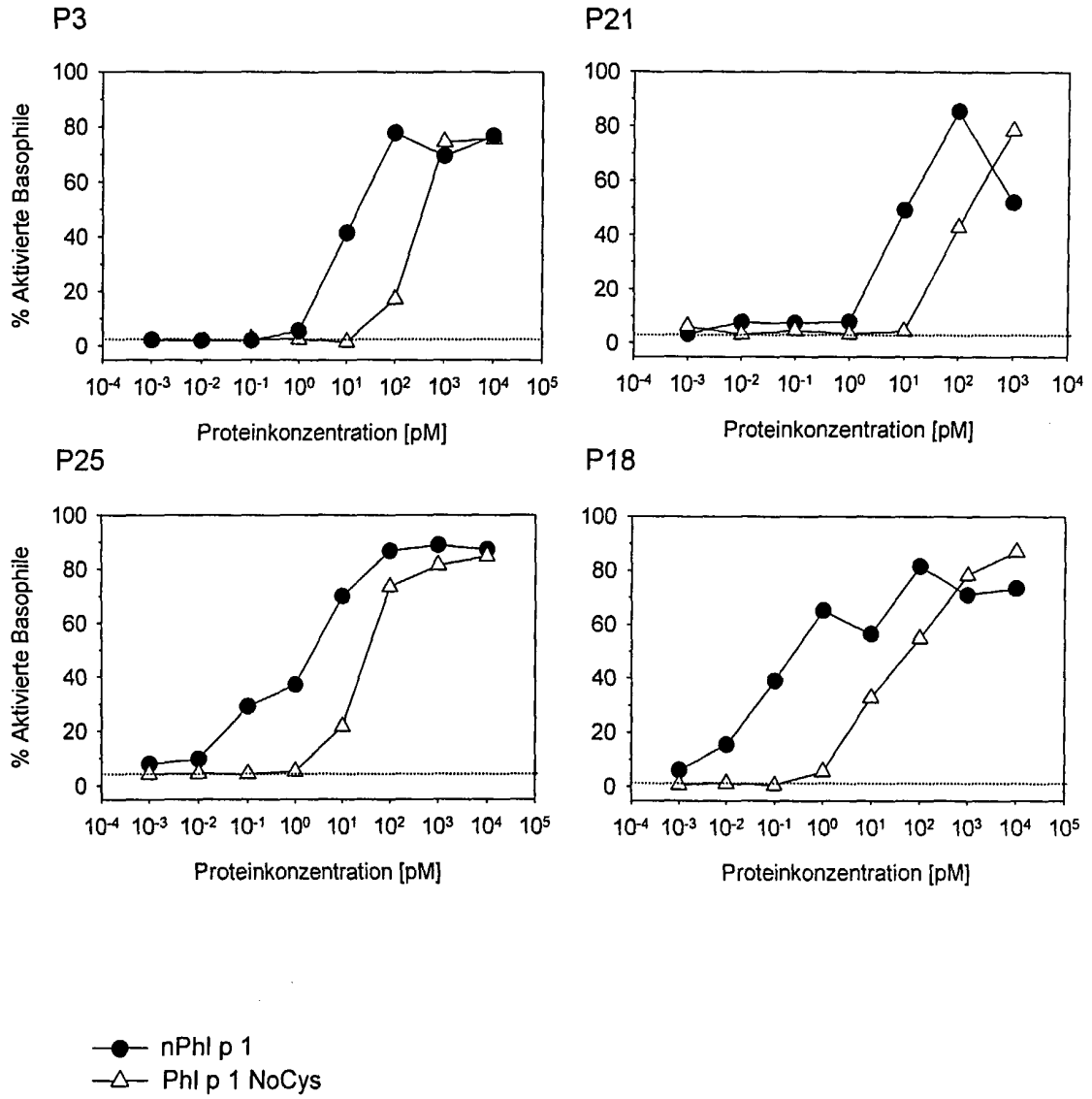


Abbildung 8:

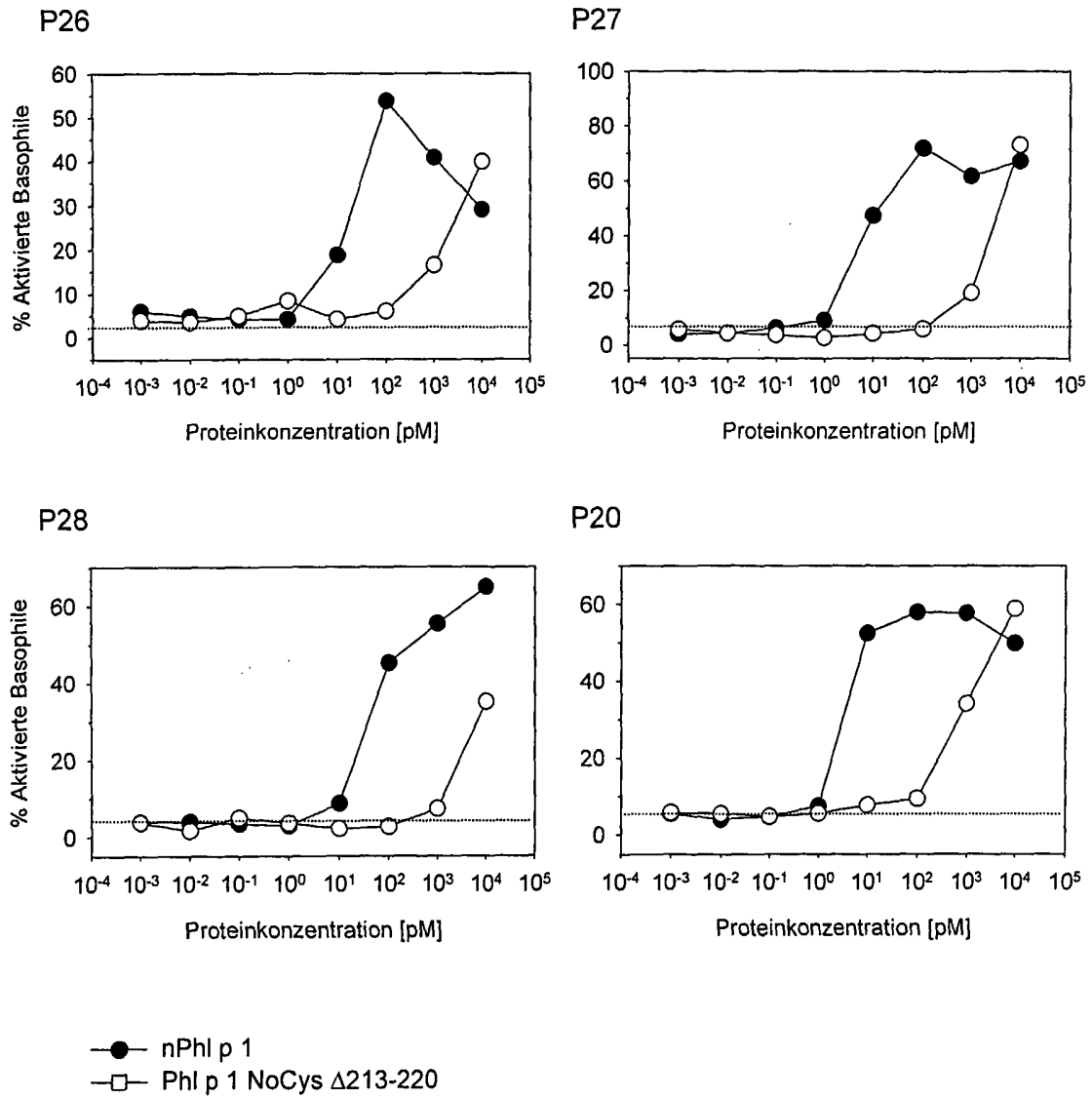
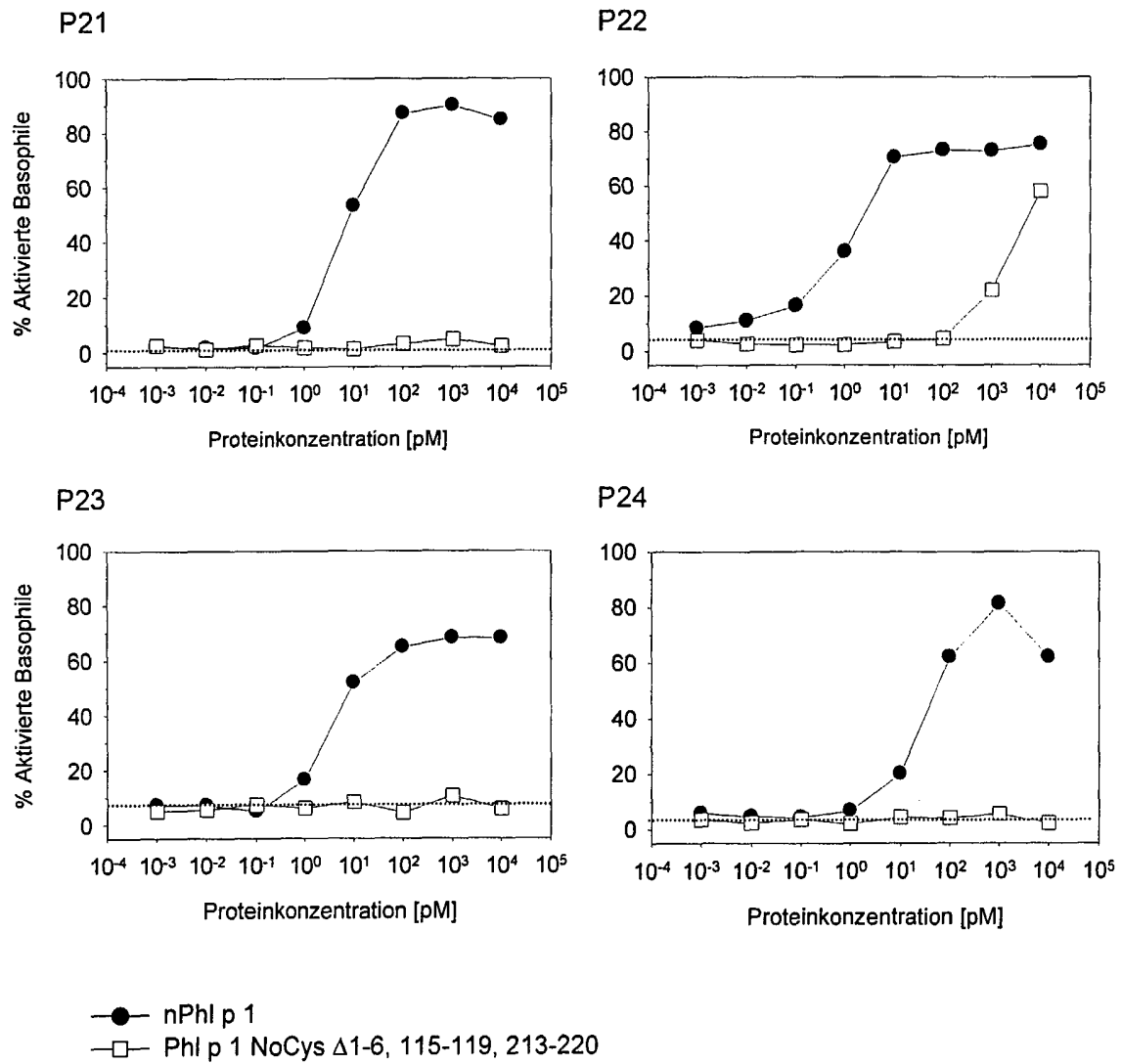


Abbildung 9:



Sequenz-Protokoll

<110> Merck Patent GmbH

<120> Varianten der Gruppe 1-Allergene aus Poaceae mit reduzierter Allergenität und erhaltener T-Zellreaktivität

<130> P 04/107

<140> DE 102004035337.9

<141> 2004-07-17

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(723)

<223>

<400> 1

atc	ccc	aag	gtc	ccc	ccc	ggc	ccg	aac	atc	acg	gcg	acc	tac	ggc	gac	48
Ile	Pro	Lys	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Asn	Ile	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gly	Asp	
1				5				10						15		

aag	tgg	ctg	gac	gcg	aag	agc	acc	tgg	tac	ggc	aag	ccg	acg	gcc	gcc	96
Lys	Trp	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Pro	Thr	Ala	Ala	
			20					25						30		

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg tgc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tgc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
 Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

tcc ggc cgg ggc tgc ggc tcc tgc ttc gag atc aag tgc acc aag ccc 240
 Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80

gag gcc tgc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac 288
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gag ctc tcc ggc atc gcg ttc 336
 Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc 384
 Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tgc aag tac ccg gag ggc 432
 Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

acc aag gtc acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg 480
 Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gag ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg 528
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

gag atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg 576
 Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc 624
 Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag 672
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220

gag gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gag acc gcc tac gag tcc aag 720
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

tga 723

<210> 2
 <211> 240
 <212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

<210> 3

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(723)

<223>

<400> 3

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc	240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro	
65 70 75 80	
gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac	288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn	
85 90 95	
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc	336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe	
100 105 110	
ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc	384
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly	
115 120 125	
gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc	432
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly	
130 135 140	
acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg	480

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg 528
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg 576
 Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc 624
 Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag 672
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220

gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag 720
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

tga 723

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

<210> 5

<211> 705

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(705)

<223>

<400> 5

ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg aag 48
 Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
 1 5 10 15

agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc 96

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
20 25 30

ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg 144
Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
35 40 45

acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc 192
Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
50 55 60

tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag 240
Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
65 70 75 80

ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac gag gag ccc atc gcc gcg 288
Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
85 90 95

tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag 336
Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys
100 105 110

ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc 384
Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe
115 120 125

cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc cac 432
Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His
130 135 140

gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt 480
Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe
145 150 155 160

gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag ggc 528
Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly
165 170 175

aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg 576
Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg
180 185 190

atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc 624
Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr
195 200 205

acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc 672
Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly
210 215 220

tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 705
Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
225 230

<210> 6

<211> 234

<212> PRT

Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
225 230

<210> 7

<211> 633

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(633)

<223>

<400> 7

gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg	48
Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val	
1 5 10 15	
gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc	96
Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile	
20 25 30	
ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc	144
Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr	
35 40 45	
aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac	192
Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp	
50 55 60	
gac aac gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc	240
Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile	
65 70 75 80	
gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc	288
Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser	
85 90 95	
gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg	336
Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro	
100 105 110	
gag ggc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac	384
Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn	
115 120 125	
tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg	432
Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val	
130 135 140	
gcg gtg gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag	480

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys
 145 150 155 160

gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag 528
 Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys
 165 170 175

ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag 576
 Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu
 180 185 190

gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag 624
 Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu
 195 200 205

tcc aag tga 633
 Ser Lys
 210

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val
 1 5 10 15

Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile
 20 25 30

Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr
 35 40 45

Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp
 50 55 60

Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser
 85 90 95

Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro
 100 105 110

Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
 115 120 125

Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val
 130 135 140

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys
 145 150 155 160

Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys
 165 170 175

Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu
 180 185 190

Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu
 195 200 205

Ser Lys
 210

<210> 9

<211> 684

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(684)

<223>

<400> 9

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac 48
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
 Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc 240
 Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac ttc gac ctc tcc ggc 288
 Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Phe Asp Leu Ser Gly
 85 90 95

atc gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc 336
 Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg
 100 105 110

agc gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac 384
 Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr
 115 120 125

ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc 432
 Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
 130 135 140

aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg 480
 Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val
 145 150 155 160

gtg gcg gtg gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc 528
 Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu
 165 170 175

aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc 576
 Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu
 180 185 190

aag ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc 624
 Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly
 195 200 205

gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac 672
 Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr
 210 215 220

gag tcc aag tga 684
 Glu Ser Lys
 225

<210> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 10

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Phe Asp Leu Ser Gly
 85 90 95

Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg
 100 105 110

Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr
 115 120 125

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
 130 135 140

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val
 145 150 155 160

Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu
 165 170 175

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu
 180 185 190

Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly
 195 200 205

Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr
 210 215 220

Glu Ser Lys
 225

<210> 11

<211> 708

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(708)

<223>

<400> 11

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc	240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro	
65 70 75 80	
gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac	288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn	
85 90 95	
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc	336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe	
100 105 110	
ggg tcc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag	384
Gly Ser Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln	
115 120 125	
ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc	432
Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe	
130 135 140	
cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag	480
His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys	
145 150 155 160	
ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag	528
Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys	
165 170 175	
ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg	576
Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp	
180 185 190	

His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys
 145 150 155 160

Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys
 165 170 175

Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp
 180 185 190

Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr
 195 200 205

Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu
 210 215 220

Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(690)

<223>

<400> 13

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac 48
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
 Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc 240

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Trp Ile
 165 170 175

Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
 180 185 190

Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr
 195 200 205

Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr
 210 215 220

Ala Tyr Glu Ser Lys
 225

<210> 15

<211> 699

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(699)

<223>

<400> 15

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc	240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro	
65 70 75 80	
gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac	288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn	
85 90 95	
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gag ctc tcc ggc atc gcg ttc	336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe	
100 105 110	
ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc	384
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly	
115 120 125	
gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc	432
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly	
130 135 140	
acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg	480
Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu	
145 150 155 160	
gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg	528
Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val	
165 170 175	
gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg	576
Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser	
180 185 190	
tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc	624

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205
 ttc acc gtc cgc ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag 672
 Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys
 210 215 220
 gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 699
 Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230

<210> 16

<211> 232

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 16

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

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys
 210 215 220

Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230

<210> 17

<211> 666

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(666)

<223>

<400> 17

ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg aag 48
 Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
 1 5 10 15

agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc 96
 Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
 20 25 30

ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg 144
 Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
 35 40 45

acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc 192
 Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
 50 55 60

tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag 240
 Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
 65 70 75 80

ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac gag gag ccc atc gcc gcg 288
 Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
 85 90 95

tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc gac gag cag aag 336
 Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Asp Glu Gln Lys
 100 105 110

ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc 384
 Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser
 115 120 125

aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc 432
 Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser
 130 135 140

aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc 480
 Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly
 145 150 155 160

gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc 528
 Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile
 165 170 175

gcg ctc aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag 576
 Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
 180 185 190

gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc ggc gag gcc aag gac gtc atc 624
 Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile
 195 200 205

ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 666
 Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 210 215 220

<210> 18

<211> 221

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 18

Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
 20 25 30

Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
 35 40 45

Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
50 55 60

Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
65 70 75 80

Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
85 90 95

Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Asp Glu Gln Lys
100 105 110

Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser
115 120 125

Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser
130 135 140

Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly
145 150 155 160

Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile
165 170 175

Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
180 185 190

Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile
195 200 205

Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
210 215 220

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 19
atccccgaagg tccccgccg

18

<210> 20

<211> 63

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 20

atcccgaagg tcccgccggg cccgaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctggac 60

gcg 63

<210> 21

<211> 63

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 21

gttgtccttg ggaccggcgg ccgtcggctt gccgtaccag gtgctcttcg cgtccagcca 60

ctt 63

<210> 22

<211> 62

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 22

ggtcccaagg acaacggcgg cgcgagcggg tacaaggacg tggacaagcc cccgttcagc 60

gg 62

<210> 23

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 23

gagccgctgc cccggccgga cttgaagatg ggggtggtgc cggagccggt catgcccctg 60

aacgggggc 69

<210> 24

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 24

tccggccggg gcagcggctc ctccttcgag atcaagagca ccaagcccga ggcctcctcc 60

ggcgagccc 69

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 25

ggtaagcttt cacttggact cgtagggcgt 30

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 26

tccgggtact tggacttgac gcg 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 27

cgcgtcaagt ccaagtaccc gga 23

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 28

ccgaacatca cggcgaccta cggcgacaag tggctggacg cg 42

<210> 29

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 29

gtcgaagtgg tacgcggcga tgggctcctc gttgtcgtcg gtgatgtgga ccaccacggg 60

ctcgccgga 69

<210> 30

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 30

gccgcgtacc acttcgacct ctccggcatc gcggttcgggt ccgacgagca gaagctgcgc 60

agcgccggc 69

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 31

ggtaagcttt cacttgact cgtaggcggg gtcggccttc cagccctcgg ggatgacgtc 60

cttggcctcg ccgcgacgg tgaaggggcc cttgag 96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/007481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/415		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BHALLA P L: "GENETIC ENGINEERING OF POLLEN ALLERGENS FOR HAYFEVER IMMUNOTHERAPY" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 75-84, XP009052994 ISSN: 1476-0584 abstract page 77, right-hand column, last paragraph page 78, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 79, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 table 1 <div style="text-align: center;"> ----- -/-- </div>	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">28 October 2005</div>	Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10/11/2005</div>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Niebuhr-Ebel, K</div>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/007481

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PETERSEN A ET AL: "Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen." CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. MAR 1998, vol. 28, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 315-321, XP002351773 ISSN: 0954-7894 abstract page 316, left-hand column, paragraph 2 - last paragraph page 317, right-hand column, paragraph 3; figure 1 page 320, left-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-26
Y	<p>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" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol. 162, no. 4, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 2406-2414, XP002216586 ISSN: 0022-1767 cited in the application abstract page 2406, right-hand column, last paragraph -----</p>	1-26
Y	<p>TAKAI T ET AL: "ENGINEERING OF THE MAJOR HOUSE DUST MITE ALLERGEN DER F2 FOR ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 15, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 754-758, XP000783948 ISSN: 1087-0156 page 754, right-hand column, paragraph 2 page 757, right-hand column, paragraph 3 ----- -/--</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/007481

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SMITH A M ET AL: "REDUCTION IN IGE BINDING TO ALLERGEN VARIANTS GENERATED BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS: CONTRIBUTION OF DISULFIDE BONDS TO THE ANTIGENIC STRUCTURE OF THE MAJOR HOUSE DUST MITE ALLERGEN DER P 2"</p> <p>MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 33, no. 4/5, 1996, pages 399-405, XP001010204 ISSN: 0161-5890 abstract page 400, left-hand column, paragraph 1 page 404, right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26
Y	<p>WO 03/025009 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE; DEWEERD NICOLE; SINGH, MOHAN, BIR; BHALLA) 27 March 2003 (2003-03-27) "Recombinant allergen with reduced ige binding but undiminished t-cell antigenicity" page 18, line 22 - line 27</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/007481

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03025009	A	27-03-2003	
		CA 2460392 A1	27-03-2003
		CN 1589278 A	02-03-2005
		EP 1434793 A1	07-07-2004
		JP 2005511512 T	28-04-2005
		NO 20041146 A	19-05-2004
		US 2005074464 A1	07-04-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/007481

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/415

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BHALLA P L: "GENETIC ENGINEERING OF POLLEN ALLERGENS FOR HAYFEVER IMMUNOTHERAPY" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, Bd. 2, Nr. 1, Februar 2003 (2003-02), Seiten 75-84, XP009052994 ISSN: 1476-0584 Zusammenfassung Seite 77, rechte Spalte, letzter Absatz Seite 78, linke Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 1 Seite 79, linke Spalte, Absatz 2 - Absatz 3 Tabelle 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-26

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 2005

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

10/11/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Niebuhr-Ebel, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PETERSEN A ET AL: "Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen." CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. MAR 1998, Bd. 28, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 315-321, XP002351773 ISSN: 0954-7894 Zusammenfassung Seite 316, linke Spalte, Absatz 2 - letzter Absatz Seite 317, rechte Spalte, Absatz 3; Abbildung 1 Seite 320, linke Spalte, Absatz 2</p>	1-26
Y	<p>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" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, Bd. 162, Nr. 4, 15. Februar 1999 (1999-02-15), Seiten 2406-2414, XP002216586 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2406, rechte Spalte, letzter Absatz</p>	1-26
Y	<p>TAKAI T ET AL: "ENGINEERING OF THE MAJOR HOUSE DUST MITE ALLERGEN DER F2 FOR ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 15, 15. August 1997 (1997-08-15), Seiten 754-758, XP000783948 ISSN: 1087-0156 Seite 754, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 757, rechte Spalte, Absatz 3</p>	1-26
Y	<p>SMITH A M ET AL: "REDUCTION IN IGE BINDING TO ALLERGEN VARIANTS GENERATED BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS: CONTRIBUTION OF DISULFIDE BONDS TO THE ANTIGENIC STRUCTURE OF THE MAJOR HOUSE DUST MITE ALLERGEN DER P 2" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, Bd. 33, Nr. 4/5, 1996, Seiten 399-405, XP001010204 ISSN: 0161-5890 Zusammenfassung Seite 400, linke Spalte, Absatz 1 Seite 404, rechte Spalte, Absatz 2</p>	1-26

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/007481

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 03/025009 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE; DEWEERD NICOLE; SINGH, MOHAN, BIR; BHALLA) 27. März 2003 (2003-03-27) "Recombinant allergen with reduced ige binding but undiminished t-cell antigenicity" Seite 18, Zeile 22 - Zeile 27 -----	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/007481

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03025009	A	CA 2460392 A1	27-03-2003
		CN 1589278 A	02-03-2005
		EP 1434793 A1	07-07-2004
		JP 2005511512 T	28-04-2005
		NO 20041146 A	19-05-2004
		US 2005074464 A1	07-04-2005
