



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 689 29 545 T2** 2006.12.14

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 846 700 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 29 545.6**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 202 850.0**

(96) Europäischer Anmeldetag: **23.03.1989**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.06.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.02.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/415** (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

PI739188

23.03.1988

AU

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:

**The University of Melbourne, Parkville, Victoria,
AU**

(72) Erfinder:

**Singh, Mohan Bir, Templestowe, VIC 3106, AU;
Hough, Terryn, Mordialloc, VIC 3195, AU;
Theerakulpisut, Piyada, Carlton, VIC 3053, AU;
Knox, Robert Bruce, North Balwyn, VIC 3104, AU**

(74) Vertreter:

L. Meyer und Kollegen, 20354 Hamburg

(54) Bezeichnung: **Pollen Allergene**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Hauptallergenprotein Lol pI aus dem Pollen von Weidelgras, *Lolium perenne* L. und Derivate und Homologe davon und allergene Proteine, die immunologisch damit verwandt sind; solche Materialien werden rekombinant hergestellt.

[0002] Allergene machen die am häufigsten vorhandenen Proteine von Graspollen aus, was die Hauptursache für allergische Erkrankungen in gemäßigten Klimata ist (MARSH, 1975, HILL et al. 1979). Die ersten Beschreibungen ihrer allergenen Proteine zeigten, dass sie sich immunchemisch unterscheiden, und sie sind bekannt als Gruppen I, II, III und IV (JOHNSON AND MARCH 1965, 1966). Unter Verwendung der kürzlich vorgeschlagenen Nomenklatur der International Union of Immunological Societies (IUIS) werden diese Allergene als Lol p I, Lol p II, Lol p III und Lol p IV bezeichnet. Das Hauptallergen Lol pI ist ein saures Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kD und umfasst vier isoallergene Varianten. Die anderen untergeordneten Allergene, die von Weidelgraspollen isoliert wurden, liegen in dem Molekulargewichtsbereich von 10 bis 76 kD (siehe die Übersicht von FORD UND BALDO, 1986). Das Allergen Lol pI macht ca. 5% der gesamten extrahierten Pollenproteine aus und ist ein Glycoprotein (HOWLETT & CLARKE, 1981), das einen 5% Kohlenhydratanteil enthält. Studien mit Kohlenhydratsplitting haben gezeigt, dass das Kohlenhydrat nicht zu der allergischen Reaktion beiträgt. Nach proteolytischem Verdau geht die allergene Aktivität verloren (siehe Überblick von BALDO, SUTTON & WRIGLEY, 1982), aber sie ist gegenüber Hitzebehandlung resistent, zum Beispiel 100°C für 30 Minuten bei neutralem pH (MARSH et al., 1966).

[0003] Lol pI wird wegen seiner Fähigkeit, an spezifisches IgE in Seren von Weidelgrasssensiblen Patienten zu binden, als ein Antigen bei IgG-Reaktionen zu agieren und T-Zell-Reaktionen auszulösen, als ein Allergen definiert. Die allergenen Eigenschaften wurden durch direkte Hauttestung bei Graspollen-sensiblen Patienten bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass 84% eine Hautsensibilisierung gegen Lol pI aufwiesen (FREIDHOFF et al., (1986), was die vorrangige Bedeutung dieses Proteins als das Hauptallergen zeigt. Darüber hinaus besaßen 95% der Patienten, die sich als Graspollen-sensibel zeigten, spezifische IgE-Antikörper, die an Lol pI banden, wie durch Immunoblot gezeigt wurde (FORD & BALDO, 1986).

[0004] Wesentliche allergene Kreuzreaktivität zwischen Graspollen wurde unter Verwendung eines IgE-Bindungsassays, z.B. dem Radioallergosorbent-Test (RAST) gezeigt, wie durch MARSH (1970) und LOWENSTEIN (1978) beschrieben wird.

[0005] Die immunchemischen Beziehungen von Lol pI zu anderen Graspollenantigenen wurden unter Verwendung sowohl polyklonaler wie auch monoklonaler Antikörper gezeigt (z.B. SMART & KNOX (1979); SINGH & KNOX (1985)). Antikörper wurden sowohl für gereinigte Proteine wie auch IgE-bindende Bestandteile hergestellt. Diese Daten zeigen, dass das Hauptantigen, das im Pollen nahe verwandter Gräser vorliegt, immunchemisch dem Lol pI ähnlich ist (SINGH & KNOX, 1985).

[0006] Weitere Hintergrundinformationen, die Graspollenallergene betreffen, können in den folgenden Überblicken gefunden werden: MARSH (1975), HOWLETT & KNOX (1984), BALDO, SUTTON & WRIGLEY (1982) und FORD & BALDO (1986).

[0007] Jüngste Fortschritte in der Biochemie und der rekombinanten DNA-Technologie haben es möglich gemacht, spezifische Proteine, z.B. Enzyme, unter kontrollierten Bedingungen, unabhängig von dem Organismus, aus dem sie normalerweise isoliert werden, zu synthetisieren. Diese biochemischen synthetischen Verfahren verwenden Enzyme und subzelluläre Komponenten der Protein-synthetisierenden Systeme von lebenden Zellen, entweder in vitro in zellfreien Systemen oder in vivo in Mikroorganismen. In jedem Fall ist das wichtigste Element die Bereitstellung einer Desoxyribonukleinsäure (DNA) von spezifischer Sequenz, die die Information, die erforderlich ist, um die gewünschte Aminosäuresequenz zu spezifizieren, enthält. Solch eine spezifische DNA-Sequenz wird als Gen bezeichnet. Die Kodierungsbeziehungen, mit deren Hilfe eine Desoxyribonukleotidsequenz verwendet wird, um die Aminosäuresequenz eines Proteins zu spezifizieren, sind gut bekannt und arbeiten gemäß einem fundamentalen Satz von Prinzipien (siehe z.B. WATSON, 1976).

[0008] Ein geklontes Gen kann verwendet werden, um die Aminosäuresequenz von Proteinen, die in vitro-Systemen synthetisiert werden, zu spezifizieren. DNA-gesteuerte Proteinsynthesierungssysteme sind auf dem Fachgebiet gut eingeführt. Einsträngige DNA kann induziert werden, um als Messenger-RNA (mRNA) in vitro zu wirken, was zu einer Translation der DNA-Sequenz mit großer Genauigkeit führt.

[0009] Es ist nun möglich, spezifische Gene oder Teile davon aus höheren Organismen, z.B. Pflanzen, zu isolieren und die Gene oder DNA-Fragmente in einem geeigneten Vektor, wie einen lambda-gt 11-Phagen, auf Mikroorganismen wie Bakterien, z.B. *Escherichia coli*, zu übertragen. Das übertragene Gen wird repliziert und vermehrt sich, wenn sich der transformierte Mikroorganismus vermehrt. Daraus folgt, dass der transformierte Mikroorganismus mit der Fähigkeit versehen ist, das erwünschte Protein oder Gen, das

es kodiert, z.B. ein Enzym, herzustellen und dann diese Fähigkeit an seine Nachkommen weiterzugeben. Siehe z.B. Cohen und Boyer, U.S. Patent Nr. 4,237,224 und 4,468,464. Die bakteriellen Klone, die den rekombinanten Phagen enthalten, werden auf das bestimmte Genprodukt (Protein) mit Hilfe spezifischer Antikörper gescreent.

[0010] Es wird die Klonierung des Gens, das Lol pl kodiert, beschrieben, wodurch die Produktion des rekombinanten Allergens in großem Maßstab ermöglicht wird.

[0011] Es wird auch ein rekombinanter Vektor beschrieben, der eine DNA-Sequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das eine allergene Aktivität aus Pollen einer Grasart aufweist. Genauer gehört die Grasart zu der Familie Poaceae (Gramineae) und noch genauer zu der Gattung Lolium. Sogar noch genauer wird das allergene Protein dadurch charakterisiert, dass es mit Antikörper gegen Lol pl Protein von Lolium perenne Pollen immunologisch kreuzreagiert, namentlich:

Pooideae ("Festucoide") Gräser. GRUPPE 1: Triticeae: Bromus inermis, Unbegrante Tresse; Agropyron repens, Gemeine Quecke; A.cristatum; Secale cereale Roggen; Triticum aestivum, Weizen. GRUPPE 2: Poanae: Dactylis glomerata, Wiesen-Knäuelgras oder-Knaulgras; Festuca elatior, Wiesenschwingel; Lolium perenne, Weidelgras; L.multiflorum, Italienisches Raigras; Poa pratensis, Wiesenrispengras; P.compressa, Zusammengedrücktes Rispengras; Avena sativa, Hafer; Holcus lanatus, Wolliges Honiggras; Anthoxanthum odoratum, Gewöhnliches Ruchgras; Arrhenatherum elatius, Glatthafer; Agrostis alba, Rotes Straußgras; Phleum pratense, Timotheusgras; Phalaris arundinacea, Rohrglanzgras. Panicoideae-Gras, Paspalum notatum, Bahiagrass, Andropogongräser: Sorghum halepensis, Mohrenhirse.

[0012] Es wird auch ein rekombinanter Vektor beschrieben, der eine DNA-Sequenz umfasst, die das allergene Protein Lol pl von Weidelgras, Lolium perenne, L.-Pollen, oder ein Derivat oder Homolog davon kodiert. Genauer betrifft die vorliegende Erfindung ein rekombinantes DNA-Molekül, das einen eukaryoten oder prokaryoten Ursprung der Replikation, einen nachweisbaren Marker, eine DNA-Sequenz, die das Lol pl-allergene Protein oder ein Derivat oder ein Homolog davon oder ein allergenes Protein, das mit dem Lol pl-Protein oder seinen Derivaten oder Homologen kreuzreaktiv ist, kodiert, und wahlweise eine Promotersequenz, die in der Lage ist, die Transkription des Allergenproteins zu lenken, umfasst.

[0013] Rekombinantes Lol pl oder ein Derivat oder Homolog davon oder ein allergenes Protein, das immunologisch reaktiv auf Antikörper gegen Lol pl oder ein Derivat oder Homolog davon ist, können durch die Kultivierung eines Organismus, der ein replizier-

bares rekombinantes DNA-Molekül enthält, hergestellt werden, wobei das Molekül einen Promotor, der zur Expression in dem Organismus fähig ist, das Gen, das Lol pl oder sein Derivat oder Homolog oder ein immunologisch verwandtes Protein von Lol pl, stromabwärts von dem Promotor lokalisiert und von ihm transkribiert, kodiert, und einen selektierbaren Marker und einen DNA-Träger, der einen prokaryoten oder eukaryoten Ursprung der Replikation enthält, umfasst, unter Bedingungen und für eine Zeit, die für das rekombinante DNA-Molekül ausreicht, um stabil erhalten zu werden und die Synthese von Lol pl oder seinem Derivat oder Homolog zu lenken.

[0014] Es wird auch ein nicht-natives (sprich rekombinantes oder chemisch synthetisiertes) Lol pl oder sein Derivat oder Homolog oder ein nicht-natives allergenes Protein, das immunologisch zu Antikörpern gegen Lol pl oder seinem Derivat oder Homolog kreuzreaktiv ist, beschrieben.

[0015] Es werden auch Antikörper gegen nicht-natives Lol pl oder ein Derivat oder Homolog davon beschrieben.

[0016] Es wird auch ein Verfahren für den Nachweis eines Antikörpers gegen ein allergenes Protein von Pollen der Familie Poaceae (Gramineae) in Serum oder einer anderen biologischen Flüssigkeit beschrieben, umfassend das in Kontakt bringen des Serums oder der Flüssigkeit mit rekombinantem Lol pl oder seinem antigenen Derivat für eine Zeit und unter Bedingungen, die für einen Antikörper-Lol pl-Komplex ausreichen, um sich zu bilden, und das Aussetzen dieses Komplexes gegenüber Nachweismitteln.

[0017] Es wird auch ein rekombinantes DNA-Molekül beschrieben, das eine Weidelgraspollenpromotorsequenz oder ein Homolog oder eine degenerierte Form davon umfasst, lokalisiert auf dem Molekül, und das weiter ein oder mehrere Restriktionsorte stromabwärts des Promotors aufweist, so dass eine Nukleotidsequenz, die in einen Ort oder mehrere dieser Orte inseriert wird, in den korrekten Leserahmen transkribierbar ist.

[0018] Vorzugsweise umfasst das rekombinante DNA-Molekül den Promotor, der die Synthese von Lol pl aus Pollen von Weidelgras, Lolium perenne L., lenkt und ist dadurch ein entwicklungsregulierter, polenspezifischer Expressionsvektor.

[0019] Es wird hier biochemische Standardnomenklatur verwendet, in der die Nukleotidbasen als Adenin (A); Thymin (T); Guanin (G) und Cytosin (C) bezeichnet werden. Andere Abkürzungen beinhalten:

BSA	Rinderserum-Albumin.
DEPC	Diethylpyrocarbonat.
DNA	Desoxyribonukleinsäure.
DTT	Dithiothreitol.
EDTA	Dinatriummethylenediamintetraacetat.
IPTG	Isopropylthio-beta-D-Galactopyranosid.
LB MEDIUM	Luria-Bertani Medium (1% (Gewicht pro Volumen) Bactotrypton, 1% (Gewicht pro Volumen) NaCl & 0,5% (Gewicht pro Volumen) Bacto-Heffextrakt in Wasser auf pH 7,5).
LIGATIONSPUFFER (10 × Lösung)	0,66 Mol Tris Cl (pH 7,5) 50 Millimol MgCl ₂ , 50 Millimol DTT, 10 Millimol ATP.
LiCl	Lithiumchlorid.
PEG	Polyethylenglykol.
pfu	Plaque-bildende Einheiten.
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid.
PROBENPUFFER	50 Millimol Tris-Cl, pH 6,8, 1,5% (Gewicht pro Volumen) SDS, 50 Millimol DTT, 4 Mol Harnstoff, 1 m MPMSF.
SDS	Natriumdodecylsulfat.
SM Puffer	Phagenaufbewahrungspuffer (0,1 Mol NaCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, 50 Millimol Tris HCl pH 7,5, 2% (Gewicht pro Volumen) Gelatine).
SSC	20 × Lösung von 3 Mol NaCl, 0,3 Mol Na ₃ Citrat, pH 7,0.
SSPE	(0,15 Mol NaCl, 10 Millimol Natriumphosphat pH 7,7, 1 Millimol)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (50 Millimol Tris pH 7,5, 150 Millimol NaCl).
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-Galaktopyranosid.

In den begleitenden Figuren:

[0020] [Fig. 1](#) zeigt die Identifizierung von Lol pl als das Hauptallergen von Weidelgraspollen durch SDS-PAGE und Western Blotting.

[0021] Bahnen 1-3. SDS-PAGE-Analyse der ge-

samten Weidelgraspollen-Proteine und isoliertem Lol pl-Allergen, gefärbt mit Coomassie-Blau für Proteine. Bahn 1, gesamte Pollenproteine; Bahn 2, Isoallergen von Lol pl; Bahn 3, Lol pl.

[0022] Bahnen 4-6. Western Blot der Proteine, die in den Bahnen 1-3 gezeigt werden, die spezifische Bindung von monoklonalem Antikörper FMC-A1 an das Lol pl-Allergen zeigend. Dieser Antikörper wurde verwendet, um die cDNA-Bibliothek zu screenen, um die Lol pl-Allergenklone zu selektieren. Bahn 4, molekulare Marker; Bahn 5, Isoallergen; Bahn 6, Lol pl, 32kD.

[0023] [Fig. 2](#) zeigt das Screening der cDNA-Bibliothek von Weidelgraspollen, um die spezifischen Klone, die Lol pl-Protein im lambda-gt 11-Vektor exprimieren, zu selektieren. (a,b): Plaque-Lifts von 10²-10³ rekombinanten Phagen, behandelt mit spezifischen Antikörper FMC-A1, mit (a) cDNA-Klon 6; (b) cDNA-Klon 12; (c,d) Re-Screening von cDNA-Klon 12 mit (c) monoklonalem Antikörper FMC-A1, (d) spezifischem IgE von Weidelgraspollen-sensiblen Patienten. Rekombinante Phagen, die das spezifische Allergen-DNA-Insert enthalten, werden durch diese Verfahren nachgewiesen. Die Antikörper weisen alle Klone, die die antigenen Determinanten von Lol pl enthalten, nach, während IgE an die Klone bindet, die die allergenen Determinanten von Lol pl enthalten. Alle Klone waren monoklonale Antikörper FMC-A1 positiv, da das die Grundlage des Screenings ist, während ein Anteil an IgE bindet, so wie bei Klon 12 hier.

[0024] [Fig. 3](#) zeigt die Analyse von E. coli-Fusionsprotein auf seine Identität mit Lol pl.

[0025] Bahnen 1-4: SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie-Blau für Proteine; Bahn 1, lambda-gt 11 nicht-rekombinanter Lysogenextrakt; Bahn 2, lambda-12RL8 rekombinanter Lysogenextrakt; Bahn 3, E. coli Beta-Galaktosidase-reines Protein; Bahn 4, Molekulargewicht-Marker, der 96KD-Marker wird durch einen Stern angezeigt.

[0026] Bahnen 5-7: Transblots auf Nitrozellulosemembran; Bahn 5 und 8, Molekulargewicht-Marker; Bahn 6, lambda-12RL8 rekombinanter Lysogenextrakt, a zeigt ein Fusionsprotein, das durch Bindung mit FMC-A1 identifiziert wird, an, Molekulargewicht a > c. Bahn 7, lambda-6RL2 rekombinanter Lysogenextrakt, B zeigt ein Fusionsprotein, wie es durch Bindung von FMC-A1 identifiziert wird, an, Molekulargewicht b > c. Die höheren Molekulargewichte von a und b über c zeigen die Insertion von cDNA in das gt 11-Genom an dem lacZ-Ort an.

[0027] [Fig. 4](#) zeigt die Analyse von Gewebe- und Organspezifität von Lol pl Gen in Weidelgras. (a) Slot Blot. Jeweils 2 Mikrogramm von Gesamt-RNA isoliert

aus Pollen (p), Blatt (l), Wurzeln (r) und hydrierten Samen (s) wurden auf Nitrozellulosemembran gebロットet. Es tritt Hybridisierung mit radioaktiven Sonden für die Klon 6 und 12 (p6, p12) mit Pollen auf, aber es besteht eine totale Abwesenheit von Hybridisierung mit der anderen Gewebe-RNA. (b) Northern Blot. Gesamt-RNA, isoliert aus diesen Weidelgras-Geweben, wurde elektrophoretisch auf einem denaturierenden Agarosegel getrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit p6 sondiert. Hybridisierung tritt nur mit der Pollenprobe auf, andere Gewebe-RNA zeigt die Abwesenheit von Hybridisierung. Dieses Beweismaterial zeigt, dass Lol pl-Gen nur in Pollen exprimiert wird.

[0028] Fig. 5 zeigt eine 1240 Basenpaar-DNA-Sequenz, die das cDNA-Klon 12R darstellt.

[0029] Fig. 6 zeigt die Reaktion von rekombinantem Allergen pGEX-12R (Lol pl) mit IgE aus gepoolten allergischen Seren. Die Kulturen von pGEX und pGEX-12R wurden über Nacht gezüchtet und dann 1:10 in Brühe verdünnt und für 2 Stunden bei 37°C gezüchtet. Sie wurden mit IPTG induziert und für 1 Stunde bei 37°C gezüchtet. Die Bakterien wurden pelletiert und in PBS auf 1/20 des Volumens der Kulturmedien erneut suspendiert. Die Bakterien wurden durch Gefrier-Auftau und Beschallung lysiert. Danach wurde ein gleiches Volumen von SDS-Gel-Probenpuffer zugegeben und die Proben wurden für 3 Minuten gekocht, bevor sie auf eine 10-15% Gradient-SDS-PAGE geladen wurden. Die getrennten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembran übertragen und diese Blots wurden zur Identifizierung von IgE-Bindungsproteinen unter Verwendung gepoolter Seren von allergischen Patienten weiterbearbeitet. ¹²⁵I-markierte anti-menschliche IgE-Antikörper (Kallestad Labs USA) wurden als Sonde verwendet. Fig. 6 zeigt einen typischen Autoradiograph, bei dem Bahn 1 eine Vektorkontrolle zeigt, bei der keine IgE-Bindung vorliegt, während die Bahnen 2, 3 und 4 die Expression von rekombinantem Lol pl in Bakterienkulturen, die mit pGEX-12R infiziert wurden, zeigen.

[0030] Fig. 7A, B und C zeigt antigene und allergene Ähnlichkeit von Proteinen, die zu Lol pl homolog sind, in einer Tafel von 17 verschiedenen Gräsern. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE von reifen Pollen wie folgt getrennt: Bahn a: Molekulargewicht-Marker; 1, *Bromus inermis*; 2, *Agropyron cristatum*; 3, *Secale cereale*; 4, *Dactylis glomerata*; 5, *Festuca elatior*; 6, *Lolium perenne*; 7, *L. multiflorum*; 8, *Poa compressa*; 9, *Avena sativa*; 10, *Holcus lanatus*; 11, *Anthoxanthum odoratum*; 12, *Agrostis alba*; 13, *Phleum pratense*; 14, *Phalaris arundinacea*; 15, *Cynodon dactylon*; 16, *Sorghum halepensis*; 17, *Zea mays*. 7A zeigt Coomassie-blau gefärbte Proteine in SDS-PAGE-Gel. 7B zeigt Western Blot, mit monoklonalem Antikörper FMC-A1, spezifisch für Lol pl, sondiert, antigene Ähnlichkeit von Lol pl und homologen

Genen in verwandten Gräsern, mit Ausnahme von Bahn 15, *Cynodon dactylon*, zeigend. 7C zeigt Western Blot, sondiert mit gepoolten allergischen menschlichen Seren und Anti-IgE-Antikörpern, was bestätigt, dass Lol pl und seine homologen Allergene in anderen Gräsern das immundominante Allergen von Graspollen sind.

[0031] Fig. 8A zeigt einen Vergleich von allergener Aktivität von nativen und rekombinanten Lol pl-Protein. Seren von 28 verschiedenen Patienten, von denen einige allergisch gegen Graspollen sind, wurden verwendet, um die IgE-Bindung von nativen und rekombinanten Lol pl-Protein zu vergleichen. Für natives Lol pl wurde eine Referenz-Standardprobe von den National Institutes of Health (NIAID), Bethesda, USA, erworben. Diese Probe wurde in 1% (Gewicht pro Volumen) BSA-Lösung verdünnt, und 0,5 Mikrogramm wurden auf Nitrozellulosemembran im Dot-Blot-Verfahren aufgebracht, und die Blots wurden für ein IgE-Bindungs-Assay verwendet. Um auf IgE-Bindung an rekombinantes Lol pl-Protein zu testen, wurde das Klon lambda-gt 11 -12R in *E. coli*-Wirtszellen exprimiert. Die Plaque-Lifts wurden auf eine ähnliche Weise für Dot-Blots für Testung der IgE-Bindung verwendet. Sowohl die Plaque-Lifts wie auch die Dot-Blots wurden über Nacht in 1:10 Verdünnung allergener Seren inkubiert und die Bindung von IgE wurde unter Verwendung von Kaninchen-Anti-Mensch-IgE (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) bildlich dargestellt. Diese Inkubation wurde von Peroxidase-konjugiertem Ziegen-Anti-Kaninchen IgG und dann dem Enzymsubstrat gefolgt, um eine Farbreaktion zu ergeben. Fig. 8B ist eine Korrelation allergener Reaktivität auf natives und rekombinantes Lol pl.

[0032] Fig. 9 zeigt eine Restriktionskarte des cDNA-Inserts auf lambda-gt 11 -12R und die Strategie der Nukleotidsequenzierung.

[0033] Es wird das Gen, das das Weidelgraspollen-allergen Lol pl kodiert, ein Verfahren zur Expression desselben in einer Wirtszelle und genauer organspezifisch (sprich Pollen), mit dessen Hilfe eine Quelle für rekombinantes Lol pl bereitgestellt wird, und der Promotor des Lol pl-Gens, der die Entwicklungsregulierung von Lol pl oder irgendeiner genetischen Sequenz, die stromabwärts davon platziert ist, lenkt, beschrieben.

[0034] Die ursprüngliche Quelle des genetischen Materials ist frischer Weidelgraspollen von *Lolium perenne* L., gesammelt von Feldquellen nahe Melbourne, Australien, und in großem Ausmaß gesammelter Pollen von einem Lieferanten (Greer Laboratories, Lenoir, NC). Diese Quellen für Pollen sollen nicht den Umfang der Erfindung begrenzen, da sie nur eine bequeme Versorgung mit dem Pollen darstellen. Die vorliegende Erfindung kann unter Verwendung von

Pollen von jedem Ort ausgeübt werden. [Fig. 1](#) zeigt die Identifizierung von Lol pl als das wesentliche Allergen von Weidelgraspollen.

[0035] „Gen“ wird in Hinblick auf die vorliegende Erfindung in seinem weitesten Sinne verwendet und bezieht sich auf jede aufeinander folgende Sequenz von Nukleotiden, deren Transkription zu einem mRNA-Molekül führt, ob das mRNA-Molekül in ein Polypeptid oder Protein translatierbar ist oder nicht. Das Gen, das Lol pl kodiert, bedeutet die Nukleotidsequenz, die das gesamte Polypeptid oder Derivate oder Homologe des Polypeptids kodiert, das Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -additionen enthalten kann. Ähnlich beinhalten in Bezug auf den Kohlenhydratanteil des Polypeptids Derivate Substitutionen, Deletionen oder Additionen des Kohlenhydratanteils. Das Lol pl-Gen bezieht sich auch auf eine cDNA, die zu der mRNA komplementär ist, die zu der vollständigen oder partiellen Länge des Lol pl-Polypeptids korrespondiert. Demgemäß liegt es innerhalb des Umfanges der vorliegenden Erfindung, Lol pl und seine Aminosäure- und/oder Kohlenhydratderivate und Nukleotidsequenzen, einschließlich DNA, cDNA und mRNA und die Homologe oder degenerierten Formen davon, die Lol pl oder die Derivate kodieren, zu umfassen. Es ist weiterhin in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, Moleküle wie Polypeptide, die an Lol pl oder seine Derivate oder an Nukleotidsequenzen, die an Lol pl- und/oder derivat-kodierende Nukleotidsequenzen angrenzen, fusioniert sind, mit einzuschließen. z.B. ist es für einige Aspekte der vorliegenden Erfindung erwünscht, ein Fusionsprotein herzustellen, das Lol pl oder sein Derivat und eine Aminosäuresequenz von einem anderen Polypeptid oder Protein umfasst, wobei Beispiele für das Letztere Enzyme wie Beta-Galaktosidase, Phosphatase, Urease und dergleichen sind. Die meisten Fusionsproteine werden durch die Expression eines rekombinanten Gens gebildet, in dem die zwei Kodierungssequenzen so zusammengefügt sind, dass ihre Leserahmen in Phase sind. Alternativ können Polypeptide in vitro durch chemische Mittel verbunden werden. All solche Fusionsproteine oder genetischen Hybriddervate von Lol pl oder seiner kodierenden Nukleotidsequenz werden durch die vorliegende Erfindung mit eingeschlossen. Darüber hinaus sollen Homologe und Derivate von Lol pl synthetische Derivate davon mit einschließen. Wie hier erläutert wird, kann die Nukleotidsequenz verwendet werden, um jede Anzahl von Peptiden oder Polypeptiden durch chemische Synthese, wie Festphasen-Synthese, durch gut bekannte Verfahren zu erzeugen. All solch chemisch synthetisierte Peptide werden durch die vorliegende Erfindung umfasst. Demgemäß erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf nicht-natives Lol pl und seine Derivate, Homologe und immunologischen Verwandten, die durch rekombinante Mittel oder durch chemische Synthese hergestellt werden. Darüber hinaus erstreckt sich die vorliegende Erfindung

auf Proteine, Polypeptide oder Peptide, die im Ganzen oder teilweise zu der Nukleotid-kodierenden Sequenz, die in [Fig. 5](#) angegeben wird, oder zu degenerierten oder homologen Formen davon korrespondiert.

[0036] Es liegt auch innerhalb des Umfanges der vorliegenden Erfindung allergene Proteine, die immunologisch kreuzreaktiv mit Antikörpern gegen Lol pl oder seine Derivate oder Homologe sind, mit einzuschließen. „Immunologisch-kreuzreaktiv“ wird in seinem breitesten Sinne verwendet und bezieht sich allgemein auf ein Protein, das zur nachweisbaren Bindung an einen Antikörper fähig ist, wobei der Letztere spezifisch für Lol pl oder für Derivate oder Homologe von Lol pl ist. Solch ein immunologisch verwandtes Allergen wird hier als ein immunologischer Verwandter von Lol pl bezeichnet.

[0037] Die Klonierung der cDNA, die Lol pl kodiert, basiert auf der Wiedererkennung des Proteins, das durch *Escherichia coli*, transformiert mit lambda-gt 11 Phagen, exprimiert wird, wobei sowohl spezifische monoklonale Antikörper wie auch spezifisches Serum-IgE von Graspollen-sensiblen Patienten verwendet wird. Zwei solche Klone werden als 6R und 12R bezeichnet. cDNA-Klone wurden auch auf der Grundlage differenzieller Antikörperbindung isoliert. z.B. wurde cDNA-Klon 6R auf der Grundlage isoliert, dass er ein Polypeptid kodierte, das zur Bindung an monoklonale Antikörper, aber nicht an IgE in der Lage war. Den Polypeptiden dieses Typs mangelt es offensichtlich an der Aminosäuresequenz, die Allergenität spezifiziert, und demnach muss es diesen cDNA-Klonen an der DNA-Sequenz mangeln, die diese kodiert. Monoklonale Antikörper, die hier verwendet werden, sind FMC A1, A5 und A7, wie durch KNOX & SINGH (1985) beschrieben wird.

[0038] Um das Lol pl-Gen oder Derivate davon zu klonen, wurde mRNA zuerst aus dem reifen Weidelgraspollen isoliert. Diese mRNA wurde als eine Matrize verwendet, um doppelsträngige komplementäre DNA zu synthetisieren.

[0039] Aus dieser cDNA-Bibliothek von Weidelgraspollen wurden rekombinante Phagen, die den Lol pl-Insert enthielten, durch Screening der Bibliothek mit (1) spezifischem monoklonalen Antikörper FMC-A1; (2) spezifischen IgE aus Seren von Weidelgras-sensiblen Patienten nachgewiesen ([Fig. 2](#)).

[0040] Eco RI, Linker wurden dann an beide Seiten der selektierten Klone der ds cDNA angefügt und dann in EcoRI, lambda-gt 11-Vektorarme (geschnitten und dephosphoryliert wie von Promega erworben) ligiert. Die rekombinante lambda-gt 11-DNA, die die cDNA-Inserts enthielt, wurde in reife Phagen gepackt und dem rekombinanten Phagen wurde es erlaubt, den *E. coli*-Wirt zu infizieren.

[0041] Die Synthese von Beta-Galaktosidase-rekombinantem Genfusionsprotein wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das Lol pl-Beta-Galaktosidase-Fusionsprotein wurde dann unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch die Epitope auf Lol pl-Protein erkennen, nachgewiesen.

[0042] Dieses Fusionsprotein wurde in präparativen Mengen aus bakteriellen Lysogenen isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese fraktioniert und die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen zur Sondierung mit monoklonalen Antikörpern transferiert ([Fig. 3](#)). Diese Antikörper erkannten ein Protein, das ein größeres Molekulargewicht als das von E. coli-Beta-Galaktosidase zeigte, wie es von einem allergenen Beta-Galaktosidase-Fusionsprotein erwartet wird.

[0043] Die allergene Natur der untersuchten Proteine wird zum Teil durch ihre Bindung an die reaginen IgE-Antikörper, die in hohen Spiegeln in Seren von allergischen Patienten vorliegen, charakterisiert. Die IgE-Bindung an die Epitope auf allergenen Proteinen kann in einem chromogenen Assay getestet werden, bei denen Allergene, die auf einem festen Träger immobilisiert sind, durch sequentielle Inkubation in (1) allergenem Patienten-Serum; (2) Enzym-markierten Anti-IgE-Antikörpern bildlich dargestellt werden.

[0044] Selektierte cDNA-Klone werden verwendet, um Gesamt-RNA zu sondieren, die aus anderen Weidelgraspflanzenorganen isoliert wurde, um zu testen, ob Lol pl-Allergen pollenspezifisch ist oder nicht. Es wurden Slot-Blotting und Northern-Analysen verwendet ([Fig. 4](#)). Für Gesamt-RNA aus Blatt, Samen und Wurzelproben war keine Hybridisierung nachweisbar. Diese Daten zeigen an, dass Lol pl in diesen anderen Organen der Weidelgraspflanze nicht exprimiert wird.

[0045] Selektierte cDNA-Klone wurden in sowohl M13- wie auch Gemini-Vektoren für die Sequenzierung ligiert. DNA-Restriktionsfragmente, die sequenziert werden sollten, wurden in M13 mp14 inseriert (MESSING UND VIEIRA 1982). M13-Klonung und Dideoxy-Kettenabbruch-DNA-Sequenzierung wurde, wie durch Bio-rad Laboratories (1980) und MESSING (1983) beschrieben, durchgeführt. Ein ähnlicher Ansatz wird für die Klonierung allergener Proteine aus Pollen von anderen Mitgliedern der Familie Poaceae (Gramineae), die immunologisch kreuzreaktiv mit Antikörpern gegen Lol pl oder seine Derivate oder Homologe sind, verwendet. Die Sequenz des cDNA-Klons 12R mit 1240 Basenpaaren wird in [Fig. 5](#) gezeigt. Es ist in Übereinstimmung mit dieser Erfindung, degenerierte Formen der Sequenz und/oder Nukleotidsequenzen, die eine substantielle, sprich mindestens 60%ige Homologie dazu aufweisen, mit einzuschließen.

[0046] Mit diesem Wissen an der Hand kann eine Vielzahl von Expressionsvektoren für die Herstellung von Lol pl oder seinen Derivaten konstruiert werden. Demgemäß überlegt ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung rekombinanten Lol pl oder seines Derivates oder Homologs oder seines immunologischen Verwandten (wie hier zuvor definiert wurde), umfassend die Kultivierung eines Organismus, der ein replizierbares rekombinantes DNA-Molekül enthält, wobei das Molekül einen Promotor, der zur Expression in dem Organismus in der Lage ist, das Lol pl-Gen oder ein Gen, das sein Derivat, Homolog oder immunologischen Verwandten davon kodiert, lokalisiert stromabwärts und transkribiert von dem Promotor, einen selektierbaren Marker und einen DNA-Träger, der einen prokaryoten oder eukaryoten Ursprung der Replikation enthält, umfasst, unter Bedingungen und für eine Zeit, die für das rekombinante DNA-Molekül ausreicht, um stabil erhalten zu werden und die Synthese von Lol pl oder seinem Derivat, Homolog oder immunologischen Verwandten zu dirigieren, und dann Isolierung davon.

[0047] „Promotor“ wird in seinem weitesten Sinne verwendet und bezeichnet allgemein eine Nukleotidsequenz, die an RNA-Polymerase bindet und diese zu dem korrekten transkriptionellen Startort dirigiert, worauf ein Gen oder eine andere Nukleotidsequenz davon transkribiert wird. Wie hier verwendet, wird ein Gen oder eine Nukleotidsequenz als relativ zu dem Promotor bezeichnet, was bedeutet, dass der Promotor die Transkription des Gens oder der Nukleotidsequenz dirigiert. Der Promotor wird also auch auf der Basis seiner Fähigkeit, in einem bestimmten Wirt zu funktionieren, ausgewählt. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die Entwicklung prokaryoter Expressionsvektoren, die in der Lage sind, das Lol pl-Gen oder ein Gen, das sein Derivat, Homolog oder immunologischen Verwandten davon kodiert, zu exprimieren. Ähnliche Prinzipien gelten auch für die Konstruktion der eukaryoten Vektoren. In dieser Beschreibung beinhaltet auch die Bezugnahme auf das Lol pl-Gen die Bezugnahme auf Gene, die Derivate, Homologe oder immunologische Verwandten von Lol pl kodieren.

[0048] Bei der Konstruktion geeigneter prokaryoter Expressionsvektoren sind Transkriptionsterminationssequenzen erwünscht, um mögliches Überlesen durch die RNA-Polymerase zu verhindern. Um eine mögliche Beeinflussung der Transkriptionsterminatoren zu vermeiden, kann ein Fachmann auf dem Gebiet die 3'-nichtkodierende Region des Lol pl-Gens eliminieren. Gleichzeitig kann man andere bekannte Transkriptionsterminatoren, z.B. den Bakteriophagen-lambda-Terminator, substituieren. So ist die vorliegende Erfindung in keiner Weise auf die Verwendung von irgendeinem prokaryoten Transkriptionsterminator begrenzt. Andere Transkriptionsterminatoren

beinhalten z.B. den lpp-Terminator und den Phagen-SP01-Terminator. Alle der zuvor genannten Terminatoren wurden zuvor charakterisiert, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und können entweder synthetisch oder aus bekannten Plasmiden konstruiert werden.

[0049] Die Expression der Lol pl-Aktivität in *E. coli* ist in keiner Weise auf die Verwendung eines bestimmten Promotors begrenzt, da die Auswahl eines spezifischen Promotors für die Durchführbarkeit dieses Aspektes der vorliegenden Erfindung nicht entscheidend ist. Promotoren, die für den zuvor beispielhaft erwähnten λ PL-Promotor substituiert werden können, beinhalten, sind aber nicht begrenzt auf die *E. coli*-Lactose- (*lac*), die *E. coli*-Tryptophan- (*trp*), die *E. coli*-Lipoprotein- (*lpp*), und die Bakteriophagen-lambda-P-Promotoren. Zusätzlich können ein oder mehrere Promotoren in Tandem verwendet werden, wie z.B. die *trp*-und *lac*-Promotoren, oder Hybridpromotoren wie der *tac*-Promotor können verwendet werden, um die Lol pl-Genexpression anzutreiben. Alle der zuvor erwähnten Promotoren wurden zuvor charakterisiert, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und können entweder synthetisch oder aus bekannten Plasmiden konstruiert werden.

[0050] Viele Replikons, wie diejenigen aus den Plasmiden pBR322, pACYC184, den pUC-Plasmiden und dergleichen, sind auf dem Fachgebiet bekannt und sind für die Konstruktion von rekombinanten DNA-Klonierungs- und Expressionsvektoren, die entwickelt wurden, um die Expression der Lol pl-kodierenden DNA-Verbindungen der vorliegenden Erfindung anzutreiben, geeignet.

[0051] Es existiert eine große Anzahl selektierbarer Marker, sowohl für eukaryote wie auch prokaryote Wirtszellen, die für die Verwendung an einem rekombinanten DNA-Klonierungs- oder Expressionsvektor, umfassend eine DNA-Verbindung (oder Sequenz) der vorliegenden Erfindung, geeignet sind.

[0052] Es sind viele Modifizierungen und Variationen der vorliegenden veranschaulichenden DNA-Sequenzen und Plasmide möglich. z.B. ermöglicht die Degeneration des genetischen Codes die Substitution von Nukleotiden durch die gesamten Polypeptidkodierungsregionen, wie auch die Substitution der TAA oder TGA ATT ACT Translationsstoppsignale für das TAG Translationsstoppsignal.

[0053] ATC

[0054] Solche Sequenzen können von der Aminosäure oder DNA-Sequenz von Lol pl abgeleitet und durch die folgenden konventionellen synthetischen Verfahren konstruiert werden. Daher ist die vorliegende Erfindung auf keine Weise auf die DNA-Sequenzen und Plasmide, die eigens beispielhaft ange-

führt werden, beschränkt.

[0055] Die Verwendung prokaryoter Expressionsvektoren wie auch die Verfahren, die in dieser Erfindung offenbart werden, können auf einen weiten Bereich von Wirtsorganismen angewendet werden, insbesondere gramnegative prokaryote Organismen wie *Escherichia coli*, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 HB101, *E. coli* K12 C600, *E. coli* K12 SF8, *E. coli* K12 RR1, *E. coli* K12 RR1 M15, *E. coli* K12 MM294, *E. coli* SG936 und dergleichen. *Escherichia coli* SG936 wird in BUELL et al. (1985) offenbart. Zwei der genetischen Mutationen, die in diesen Stamm eingeführt werden, die *lon*- und *htpR*-Mutationen, sind dafür bekannt, dass sie die Expression der erwünschten Proteine fördern (siehe z.B. GOFF und GOLDBERG (1985)). Diese Mutationen können in andere Stämme von *E. coli* durch P1-Transduktion gemäß der Lehre von MILLER (1972) überführt werden.

[0056] Alternativ können andere Prokaryonten wie *Bacillus*, *Pseudomonas* und dergleichen einfach verwendet werden. Es wird notwendig sein, dass geringfügige Modifikationen an dem Expressionsvektor durchgeführt werden, abhängig von der verwendeten Wirtszelle, so dass der Vektor repliziert, der Promotor arbeitet und der selektierbare Marker exprimiert wird. Solche Modifikationen werden für einen Fachmann auf dem Gebiet Routine sein.

[0057] Ähnliche Überlegungen gelten bei der Entwicklung eukaryoter Expressionsvektoren und viele sind für die Verwendung in Säugerzellen, Hefe- und Pilzzellen und Insektenzellen erhältlich. Ein praktisches Nachschlagewerk für die Entwicklung eukaryoter oder prokaryoter Expressionsvektoren kann in MANIATIS et al. (1982) gefunden werden.

[0058] Es wird der Promotor von Weidelgraspollenproteinen und insbesondere der Promotor des Lol pl-Gens beschrieben. Dieser Promotor entwicklungsreguliert Lol pl-Genexpression und ist organ-, sprich pollenspezifisch. Entwicklungsregulierung, wie sie hier verwendet wird, bezeichnet die Expression eines bestimmten Merkmales, in diesem Fall allergener Proteine in Pollen, während eines bestimmten Stadiums in einem Pflanzenlebenszyklus und Non-Expression während eines anderen Stadiums.

[0059] Daher ist der Lol pl-Promotor besonders nützlich bei der Zulassung der Expression von Lol pl oder irgendeines anderen Gens oder einer Nukleotidsequenz, die damit verwandt ist, nur während der Entwicklung von Pollen. Der erfahrene Fachmann wird sofort die Wichtigkeit eines solchen Promotors bei der selektiven Expression eines bestimmten Merkmales während der Pollenbildung erkennen.

[0060] Die monoklonalen Antikörper, die bei der vor-

liegenden Arbeit verwendet wurden, um die cDNA-Bibliothek für Lol pl-Klone zu screenen, zeigten Kreuzreaktivität mit allergenen Proteinen von Pollen verschiedener verwandter Grasarten. Dies zeigt, dass eine Homologie zwischen allergenen Proteinen, die durch diese Pollen produziert werden, und Lol pl-Allergen besteht, was die Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung auf alle verwandten Gräser unterstützt. Diese Homologie kann z.B. ausgenutzt werden, um DNA zu isolieren, die andere allergene Proteine kodiert, ohne dass ein Bedarf an Proteinmikrosequenzierung und Oligonucleotidprimern besteht. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Antikörper gegen rekombinantes Lol pl und seine Derivate, Homologe und immunologische Verwandte, einschließlich seiner chemischen synthetischen Derivate. Bei der folgenden Diskussion beinhaltet der Hinweis auf Lol pl seine Derivate, Homologe und immunologischen Verwandten und chemisch-synthetischen Derivate davon. Für solche Antikörper wird in Betracht gezogen, dass sie bei der Entwicklung von Nachweisassays (Immunoassays) für das Lol pl nützlich sein können, insbesondere während der Überwachung eines therapeutischen oder diagnostischen Regimes und bei der Reinigung von Lol pl. Die Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein. Zusätzlich ist es möglich, irgendwelche sekundären Antikörper (monoklonal oder polyklonal), die gegen die ersten, oben diskutierten Antikörper gerichtet sind, mit einzuschließen.

[0061] Diese ersten oder zweiten Antikörper können bei Nachweisassays und z.B. bei der Überwachung des Effektes eines diagnostischen oder eines verabreichten pharmazeutischen Präparates verwendet werden. Darüber hinaus stellt man sich Antikörper gegen die glycosylierten Regionen von Lol pl (wo sie vorliegen) und gegen jedes Molekül, das mit dem Lol pl komplexiert ist, vor. Demgemäß umfasst ein Antikörper gegen Lol pl Antikörper gegen Lol pl oder antigene Teile davon und gegen jedes beliebige assoziierte Molekül (z.B. glykosylierte Regionen, Lipidregionen, Trägermoleküle, fusionierte Proteine und dergleichen).

[0062] Das Lol pl oder Teile davon, die hier berücksichtigt werden, werden gereinigt, dann bei der Antikörperproduktion verwendet. Sowohl polyklonale wie auch monoklonale Antikörper sind durch Immunisierung mit Lol pl erhältlich und jeder Typ ist für Immunoassays verwendbar. Die Verfahren, um beide Arten von Seren zu erhalten, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Polyklonale Seren sind weniger bevorzugt, aber werden relativ einfach durch Injektion eines geeigneten Labortieres mit einer effektiven Menge des gereinigten Lol pl oder antigener Teile davon, Abnahme des Serums von dem Tier und Isolierung spezifischer Seren durch irgendeine der bekannten Immunoabsorptionsstechniken hergestellt. Obwohl die Antikörper, die durch dieses Verfahren hergestellt

werden, in praktisch jeder Art von Immunoassay verwendbar sind, werden sie allgemein aufgrund der potentiellen Heterogenität des Produktes weniger bevorzugt.

[0063] Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern in einem Immunoassay wird aufgrund der Möglichkeit, sie in großen Mengen herzustellen, und der Homogenität des Produktes besonders bevorzugt. Die Zubereitung von Hybridomzelllinien für die monoklonale Antikörperproduktion, gewonnen durch die Fusionierung einer unsterblichen Zelllinie und Lymphozyten, die gegen die immunogene Zubereitung sensibilisiert wurden, kann mit Hilfe von Techniken, die denjenigen, die auf dem Fachgebiet bewandert sind, gut bekannt sind, durchgeführt werden (siehe z.B. DOUILLARD und HOFFMAN (1981) und KOHLER und MILSTEIN (1975; 1976)).

[0064] Anders als bei der Zubereitung von polyklonalen Seren ist die Wahl des Tieres abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter unsterblicher Linien, die in der Lage sind, mit Lymphozyten zu fusionieren. Maus und Ratte waren die Tiere der Wahl bei der Hybridomtechnologie und werden bevorzugt verwendet. Menschen können auch als Quellen für sensibilisierte Lymphozyten verwendet werden, wenn geeignete, unsterblich gemachte menschliche (oder nicht-menschliche) Zelllinien erhältlich sind. Für den Zweck der vorliegenden Erfindung kann das Tier der Wahl mit von ungefähr 0,1 mg bis ungefähr 20 mg des gereinigten Lol pl oder Teilen davon injiziert werden. Gewöhnlich wird das Injektionsmaterial in Freund's komplettem Adjuvans emulgiert. Boosterinjektionen können auch erforderlich sein. Der Nachweis der Antikörperproduktion kann durch Testung der Antiseren mit geeigneten markierten Antigenen durchgeführt werden. Lymphozyten kann man durch Entfernung der Milz oder von Lymphknoten von sensibilisierten Tieren auf eine sterile Weise und Durchführung von Fusion erhalten. Alternativ können Lymphozyten in vitro stimuliert oder immunisiert werden, wie z.B. in READING (1982) beschrieben wird.

[0065] Es wurde eine Anzahl von Zelllinien, die für die Fusion geeignet sind, entwickelt, und die Wahl irgendeiner speziellen Linie für die Hybridisierungsprotokolle wird durch jedes einer Anzahl von Kriterien wie Geschwindigkeit, Einheitlichkeit von Wachstumscharakteristiken, Defizienz ihres Metabolismus für einen Bestandteil des Wachstumsmediums und Potential für gute Fusionsfrequenz bestimmt.

[0066] Intraspezifische Hybride, insbesondere zwischen gleichen Stämmen, funktionieren besser als interspezifische Fusionen. Es sind verschiedene Zelllinien erhältlich, einschließlich Mutanten, die wegen ihres Verlustes der Fähigkeit, Myelomimmunglobulin zu sezernieren, ausgewählt wurden.

[0067] Die Zellfusion kann entweder durch Virus, wie Epstein-Barr- oder Sendai-Virus, oder Polyethylenglycol induziert werden. Polyethylenglycol (PEG) ist der effektivste Wirkstoff für die Fusion von somatischen Säugerzellen. PEG selbst kann für die Zellen toxisch sein, und es sollten verschiedene Konzentrationen auf ihre Effekte auf die Lebensfähigkeit getestet werden, bevor Fusion versucht wird. Der Molekulargewichtsbereich von PEG kann von 1000 bis 6000 variiert werden. Es ergibt die besten Resultate, wenn es von ungefähr 20% bis ungefähr 70% (Gew./Gew.) in Kochsalz oder serumfreiem Medium verdünnt wird. Die Exposition gegenüber PEG bei 37°C für ungefähr 30 Sekunden wird in dem vorliegenden Fall bevorzugt, wobei Mauszellen verwendet werden. Temperaturextreme (sprich über 45°C) werden vermieden und die Vorinkubation von jedem Bestandteil des Fusionssystems bei 37°C vor der Fusion kann nützlich sein. Das Verhältnis zwischen Lymphozyten und malignen Zellen wird optimiert, um Zellfusion unter Milzzellen zu vermeiden und es wird gewöhnlich ein Bereich von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:10 verwendet.

[0068] Die erfolgreich fusionierten Zellen können von der Myelomlinie durch jede Technik, die auf dem Fachgebiet bekannt ist, getrennt werden. Das gebräuchlichste und am meisten bevorzugte Verfahren ist, eine maligne Linie auszuwählen, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) defizient ist, die nicht auf einem Aminopterin enthaltenen Medium wachsen wird, das verwendet wird, um nur das Wachstum von Hybriden zuzulassen, und ein Aminopterin enthaltenes Medium, das verwendet wird, um nur das Wachstum von Hybriden zuzulassen und das im Allgemeinen aus Hypoxanthin $1 \cdot 10^{-4}$ mol, Aminopterin 1×10^{-5} mol und Thymidin 3×10^{-5} mol besteht, allgemein bekannt als das HAT-Medium. Die Fusionmischung kann in dem HAT-enhaltenden Kulturmedium direkt nach der Fusion 24 Stunden später gezüchtet werden. Die Fütterungspläne bringen normalerweise Erhaltung im HAT-Medium für 2 Wochen und dann Fütterung mit entweder regulärem Kulturmedium oder Hypoxanthin, Thymidin enthaltenem Medium mit sich.

[0069] Die wachsenden Kolonien werden dann auf die Gegenwart von Antikörpern, die das antigene Präparat erkennen, getestet. Der Nachweis von Hybridomantikörpern kann unter Verwendung eines Assays, bei dem das Antigen an einen festen Träger gebunden wird und man ihm erlaubt, mit Hybridomüberständen, die mögliche Antikörper enthalten, zu reagieren, durchgeführt werden. Die Gegenwart von Antikörpern kann durch „Sandwich“-Techniken unter Verwendung einer Vielzahl von Indikatoren nachgewiesen werden. Die meisten der gebräuchlichen Verfahren sind ausreichend sensibel für die Verwendung in dem Bereich von Antikörperkonzentrationen, die während Hybridwachstum sezerniert werden.

[0070] Die Klonierung von Hybriden kann nach 21 bis 23 Tagen des Zellwachstums in ausgewähltem Medium durchgeführt werden. Die Klonierung kann durch Zellgrenzwertverdünnung in flüssiger Phase oder durch direkte Auswahl einzelner Zellen, die auf halbfester Agarose wachsen, durchgeführt werden. Für die Grenzwertverdünnung werden Zellsuspensionen seriell verdünnt, um eine statistische Wahrscheinlichkeit des Erhaltes von nur einer Zelle pro Vertiefung zu ergeben. Für die Agarosetechnik werden Hybride in eine halbfeste obere Schicht über eine untere Schicht, die Feederzellen enthält, geimpft. Die Kolonien von der unteren Schicht können aufgenommen werden und schließlich auf Vertiefungen übertragen werden.

[0071] Antikörpersezernierende Hybride kann man in verschiedenen Gewebekulturkolben züchten, was Überstände mit variablen Konzentrationen von Antikörpern ergibt. Um höhere Konzentrationen zu erhalten, können Hybride in Tiere transferiert werden, um entzündlichen Ascites zu erhalten. Antikörperenthaltender Ascites kann 8 bis 12 Tage nach intraperitonealer Injektion geerntet werden. Der Ascites enthält eine höhere Konzentration von Antikörpern, aber beinhaltet sowohl Monoklonale wie auch Immunglobuline von dem entzündlichen Ascites. Antikörperreinigung kann dann z.B. durch Affinitätschromatographie erreicht werden.

[0072] Die hier überlegte Gegenwart von Lol pl oder Antikörpern, die dafür spezifisch sind, in einem Patientenserum, Pflanzen- oder Säugergewebe oder Gewebeextrakt kann unter Verwendung von Antikörpern, die wie oben hergestellt wurden, entweder monoklonal oder polyklonal, in praktisch jeder Art von Immunoassay nachgewiesen werden. Es steht ein großer Bereich an Immunoassaytechniken bereit, wie durch Bezugnahme auf U.S. Patent Nr. 4,016,043, 4,424,279 und 4,018,653 gesehen werden kann. Dies beinhaltet natürlich sowohl „single-site“ wie auch „two-site“ oder „Sandwich“-Assays der nichtkompetitiven Typen wie auch die traditionellen kompetitiven Bindungsassays. Sandwich-Assays sind unter den nützlichsten und am häufigsten verwendeten Assays und werden für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Es existiert eine Anzahl von Variationen der Sandwich-Assaytechnik, und alle sollen durch die vorliegende Erfindung umfasst werden. Kurzgefasst wird in einem typischen Forward-Assay ein unmarkierter Antikörper auf einem festen Substrat immobilisiert, und die Probe, die untersucht werden soll, wird in Kontakt mit dem gebundenen Molekül gebracht. Nach einer geeigneten Inkubationsperiode, für einen Zeitraum, der ausreicht, um die Bildung eines sekundären Antikörperantigenkomplexes zu ermöglichen, wird dann ein zweiter Antikörper, markiert mit einem Reportermolekül, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal hervorzurufen, zugegeben und inkubiert, wobei aus-

reichend Zeit für die Bildung eines tertiären Komplexes aus Antikörper-Antigen-markiertem Antikörper (z.B. Antikörper-Lol pl-Antikörper) zu gelassen wird. Irgendwelches nicht umgesetzte Material wird gewaschen, und die Gegenwart des Antigens wird durch Beobachtung eines Signals, das durch das Reportermolekül hervorgerufen wird, bestimmt. Die Ergebnisse können entweder qualitativ, durch einfache Beobachtung des sichtbaren Signals, sein, oder sie können durch Vergleich mit einer Kontrollprobe, die bekannte Mengen an Hapten enthält, quantifiziert werden. Variationen des Forward-Assays beinhalten einen simultanen Assay, bei dem sowohl Probe wie auch markierter Antikörper zu dem gebundenen Antikörper simultan zugegeben werden oder einen Reverse-Assay, bei dem der markierte Antikörper und die Probe, die untersucht werden soll, zuerst verbunden, inkubiert und dann simultan zu dem gebundenen Antikörper zugegeben werden. Diese Techniken sind denjenigen, die auf dem Fachgebiet bewandert sind, einschließlich irgendwelcher geringer Variationen, wie leicht offensichtlich wird, gut bekannt.

[0073] Obwohl die folgende Diskussion den Nachweis von Lol pl betrifft, ist sie ebenso auf den Nachweis von Antikörpern gegen Lol pl anwendbar und sie soll eine ausreichende Beschreibung davon sein. Bei einem typischen Forward-Sandwich-Assay wird ein erster Antikörper mit Spezifität für Lol pl oder antigenen Teilen davon, überlegt in dieser Erfindung, entweder kovalent oder passiv an eine feste Oberfläche gebunden. Die feste Oberfläche ist typischerweise Glas oder ein Polymer, wobei die am häufigsten verwendeten Polymere Zellulose, Polyacrylamid, Nylon, Polystyrol, Polyvinylchlorid oder Polypropylen sind. Die festen Träger können in der Form von Röhren, Perlen, Scheiben von Mikroplatten oder irgendwelchen anderen Oberflächen, die für die Durchführung eines Immunoassays geeignet sind, vorliegen. Die Bindungsprozesse sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und bestehen im Allgemeinen aus quervernetzender kovalenter Bindung oder physikalischer Adsorption, der Polymerantikörperkomplex wird in Vorbereitung für die Testprobe gewaschen. Ein Aliquot der Probe, die untersucht werden soll, wird dann zu dem Festphasenkomplex zugegeben und bei 25°C für einen Zeitraum, der ausreicht, um die Bindung von jeder Untereinheit, die in dem Antikörper vorliegt, zu erlauben, inkubiert. Der Inkubationszeitraum wird variieren, aber wird gewöhnlich in dem Bereich von etwa 2 bis 40 Minuten liegen. Nach dem Inkubationszeitraum wird die Antikörperuntereinheit-Festphase gewaschen und getrocknet und mit einem zweiten Antikörper, der für einen Teil des Haptens spezifisch ist, inkubiert. Der zweite Antikörper wird an ein Reportermolekül gebunden, das verwendet wird, um die Bindung des zweiten Antikörpers an das Hapten anzuzeigen.

[0074] Mit „Reportermolekül“, wie es in der vorlie-

genden Beschreibung verwendet wird, ist ein Molekül gemeint, das durch seine chemische Natur ein analytisch nachweisbares Signal bereitstellt, das den Nachweis von Antigen-gebundenem Antikörper erlaubt. Der Nachweis kann entweder qualitativ oder quantitativ sein. Die am häufigsten verwendeten Reportermoleküle in dieser Art von Assay sind entweder Enzyme, Fluorophore oder Radionuklid-enthaltende Moleküle (sprich Radioisotope). In dem Fall eines Enzymimmunoassays wird ein Enzym an den zweiten Antikörper konjugiert, im Allgemeinen mit Hilfe von Glutaraldehyd oder Perjodat. Wie einfach erkannt werden wird, gibt es jedoch eine große Bandbreite von verschiedenen Konjugationstechniken, die für den bewanderten Fachmann einfach erhältlich sind. Allgemein verwendete Enzyme beinhalten u.a. Meerrettichperoxidase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase und alkalische Phosphatase. Die Substrate, die mit den spezifischen Enzymen verwendet werden, werden im Allgemeinen wegen der Produktion, bei Hydrolyse des korrespondierenden Enzyms, einer nachweisbaren Farbänderung ausgewählt. z.B. ist p-Nitrophenylphosphat für die Verwendung mit alkalischen Phosphatasekonjugaten geeignet; für Peroxidasekonjugate werden häufig 1,2-Phenylendiamin, 5-Aminosalicylsäure oder Toluidin verwendet. Es ist auch möglich, fluorogene Substrate zu verwenden, die eher ein fluoreszierendes Produkt ergeben als die chromogenen Substrate, die oben bezeichnet werden. In allen Fällen wird der enzymmarkierte Antikörper zu dem ersten Antikörper-Haptenkomplex zugegeben, man lässt ihn binden, und dann wird das überschüssige Reagenz gewaschen. Eine Lösung, die das geeignete Substrat enthält, wird dann zu dem tertiären Komplex von Antikörper-Antigen-Antikörper zugegeben. Das Substrat wird mit dem Enzym, das an den zweiten Antikörper gebunden ist, reagieren, was ein qualitativ sichtbares Signal ergibt, was weiter, gewöhnlich spektrophotometrisch, quantifiziert werden kann, um einen Hinweis auf die Menge an Hapten, die in der Probe vorliegt, zu geben. „Reportermolekül“ erstreckt sich auch auf die Verwendung von Zellagglutination oder Inhibition von Agglutination, wie z.B. rote Blutzellen oder Latexperlen und dergleichen.

[0075] Alternativ können fluoreszierende Verbindungen, wie Fluorescein und Rhodamin, chemisch an Antikörper gekoppelt werden, ohne dass ihre Bindungskapazität verändert wird. Wenn er durch Beleuchtung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert wird, adsorbiert der fluorochrom-markierte Antikörper die Lichtenergie, was einen angeregten Zustand in den Molekülen induziert, gefolgt von Emission des Lichtes mit einer charakteristischen Farbe, die visuell mit einem Lichtmikroskop nachweisbar ist. Bei dem EIA lässt man z.B. den fluoreszenzmarkierten Antikörper an den ersten Antikörper-Haptenkomplex binden. Nach Abwaschen des ungebundenen Reagenz wird dann der verbleibende

tertiäre Komplex Licht der passenden Wellenlänge ausgesetzt, wobei die beobachtete Fluoreszenz die Gegenwart des Haptens von Interesse anzeigt. Immunfluoreszenz- und EIA-Techniken sind auf dem Fachgebiet sehr gut eingeführt und werden für das vorliegende Verfahren besonders bevorzugt. Es können jedoch auch andere Reportermoleküle, wie Radioisotop, chemilumineszente oder biolumineszente Moleküle, verwendet werden. Es wird dem bewanderten Techniker leicht offensichtlich sein, wie das Verfahren zu variieren ist, um den erforderlichen Zweck zu erfüllen. Es wird auch offensichtlich sein, dass das Vorangehende verwendet werden kann, um direkt oder indirekt (sprich via Antikörper) das Lol pl dieser Erfindung nachzuweisen.

[0076] Demgemäß betrachtet ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Lol pl oder einem Derivat oder Homolog davon oder einem allergenen Protein, das immunologisch reaktiv mit Lol pl oder seinem Derivat oder Homolog in Serum, Gewebeextrakt, Pflanzenextrakt oder einer anderen biologischen Flüssigkeit ist, umfassend die Schritte des in Kontakt bringens des Serums, Extraktes oder der Flüssigkeit, die getestet werden soll, mit einem Antikörper gegen Lol pl für eine Zeit und unter Bedingungen, die für einen allergenen Protein-Antikörper-Komplex ausreichen, um sich zu bilden, und die Aussetzung des Komplexes gegenüber einem Nachweismittel. Die vorliegende Erfindung betrachtet auch ein Verfahren des Nachweises eines Antikörpers gegen ein allergenes Protein aus Pollen der Familie Poaceae (Gramineae) in Serum oder einer anderen biologischen Flüssigkeit, umfassend das in Kontakt bringen des Serums oder der Flüssigkeit mit rekombinantem Lol pl oder seinem antigenen Derivat für eine Zeit und unter Bedingungen, die für einen Antikörper-Lol pl-Komplex ausreichen, um sich zu bilden, und das Aussetzen des Komplexes gegenüber einem Nachweismittel. Der letztere Komplex kann durch das Lol pl, dem ein Reportermolekül angehängt wurde, oder durch Zugabe eines zweiten Antikörpers, der mit einem Reportermolekül markiert wurde, nachgewiesen werden.

[0077] Demgemäß ist die vorliegende Erfindung auch auf ein Kit für den schnellen und bequemen Test auf Antikörper gegen Lol pl oder seine Derivate, Homologe oder immunologischen Verwandten in Säugerkörperflüssigkeiten (z.B. Serum, Gewebeextrakten, Gewebeflüssigkeiten), in vitro Zellkulturüberständen und Zelllysaten gerichtet. Der Kit ist eingeteilt, um einen ersten Container, der angepasst wurde, um rekombinantes Lol pl oder einen antigenen Bestandteil davon zu enthalten, und einen zweiten Container, der angepasst wurde, um einen Antikörper gegen Lol pl zu enthalten, wobei der Antikörper mit einem Reportermolekül markiert ist, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal, wie hier zuvor beschrieben, abzugeben, zu erhalten. Wenn das Re-

portermolekül ein Enzym ist, dann wird ein dritter Container, der angepasst wurde, um ein Substrat für das Enzym zu enthalten, bereitgestellt. Bei einer beispielhaften Verwendung des Testkits wird eine Probe, die getestet werden soll, mit dem Inhalt des ersten Containers für eine Zeit und unter Bedingungen in Kontakt gebracht, dass ein Antikörper, wenn er vorliegt, an Lol pl in dem ersten Container binden kann. Wenn Lol pl aus dem ersten Container an Antikörper in der Testflüssigkeit gebunden hat, werden die Antikörper des zweiten Containers an den sekundären Komplex binden, um einen tertiären Komplex zu bilden und, da diese Antikörper mit einem Reportermolekül markiert sind, wird der tertiäre Komplex, wenn er einem Nachweismittel ausgesetzt wird, nachgewiesen. Daher ist ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Kit für den Nachweis von Antikörpern gegen ein Protein mit allergenen Eigenschaften, wobei das Protein aus Pollen der Familie Poaceae (Gramineae) stammt, wobei das Kit eingeteilt ist, um einen ersten Container, der adaptiert wurde, um rekombinantes Lol pl oder sein antigenes Derivat oder Homolog davon zu enthalten, und einen zweiten Container, der angepasst wurde, um einen Antikörper gegen Lol pl oder sein Derivat oder Homolog zu enthalten, wobei der Antikörper mit einem Reportermolekül markiert wurde, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu geben, zu erhalten. Das „Reportermolekül“ kann auch Agglutination von roten Blutzellen (RBC) auf Latexperlen mit einbeziehen. In diesem Kit ist das Reportermolekül ein Radioisotop, ein Enzym, ein fluoreszierendes Molekül, ein chemilumineszierendes Molekül, ein biolumineszierendes Molekül oder RBC. Der Kit umfasst alternativ einen Container, der angepasst wurde, um rekombinantes Lol pl oder sein antigenes Derivat oder Homolog zu enthalten, das mit einem Reportermolekül markiert wurde, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu geben.

[0078] Wegen der Gegenwart von Allergenen in der Umgebung weisen Heuschnupfen und saisonales Asthma weiterhin eine signifikante Morbidität und sozioökonomische Auswirkung auf westliche Gemeinschaften, trotz der Fortschritte, die in ihrer Pharmakologie und Immunologie gemacht wurden, auf. Während das erhältliche Spektrum an Medikamenten, einschließlich Antihistaminika und Steroiden, zu einer spektakulären Verbesserung bei der Behandlung der allergischen Erkrankung geführt haben, weisen sie dennoch ungünstige Nebenwirkungen auf, die mit langfristiger Verwendung assoziiert werden. Wegen dieser Probleme wurde neuerliches Interesse an der Immuntherapie der allergischen Erkrankung gezeigt. Die Immuntherapie beinhaltet die Injektion von stark wirksamen Allergenextrakten, um die Patienten gegen allergische Reaktionen zu desensibilisieren (BOUSQUET und MICHEL, 1989). Unglücklicherweise sind die Pollenpräparate, die als Allergene verwendet werden, polyvalent und von schlechter Qualität. Daraus folgend sind die verwendeten Konzentra-

tionen häufig höher, um IgG-Reaktionen zu induzieren, aber sie können durch Auslösen systemischer Reaktionen, einschließlich Anaphylaxie, tödlich sein. Das geklonte Genprodukt oder synthetische Peptide, die auf der Sequenz von Allergenen basieren, stellen ein sichereres Medium für die Therapie bereit, da sie qualitätskontrolliert, charakterisiert und standardisiert werden können.

[0079] Der genaue Mechanismus für symptomatische Erleichterung bleibt hypothetisch. Es wurde nachgewiesen, dass die Desensibilisierungstherapie die Bildung von allergenspezifischen nicht-Mastzell-bindendem IgG induziert, das die Kombination von Mastzell-gebundenem IgE und Allergen blockiert. Dies verhindert die Mediatorfreisetzung und die Auslösung der allergischen Reaktion. Kürzliche Studien zur Ambrosienkraut-Pollensensibilität zeigten, dass eine Korrelation zwischen allergenspezifischen IgG-Spiegeln und der Erleichterung allergischer Symptome besteht (Lichtenstein et al., 1983). Anwendung von Reagentien, die die allergenspezifische IgG-Produktion während Immuntherapie auslösen können, könnte die Erfolgsrate dieser Behandlung signifikant steigern.

[0080] Zurzeit ist die Immuntherapie eine der am häufigsten verabreichten Behandlungen in der Allergologie und in den USA wird sie als die erste Wahl betrachtet. Vorteile dieser Behandlung für Pollenrhinitis sind, dass die Behandlung bis zu drei Jahre dauert, während Pharmakotherapie während der gesamten Lebenszeit des Patienten durchgeführt werden muss. Patienten, denen Pollenextrakt für Immuntherapie gegeben wurde, zeigten einen klinischen Benefit, der bis zu vier Jahre nach Beendigung der Behandlung anhielt (GRAMMER et al., 1984).

[0081] Demgemäß sind Lol pl, seine Derivate, Homologe oder immunologischen Verwandten nützlich bei der Entwicklung eines Impfstoffes, um Menschen gegen Allergien aufgrund von Graspollen zu desensibilisieren.

[0082] Demgemäß betrachtet die vorliegende Erfindung ein Verfahren der Desensibilisierung eines Menschen, der gegen Graspollen allergisch ist, das die Verabreichung einer desensibilisierend wirkenden Menge von Lol pl oder einem Derivat, Homolog oder immunologischen Verwandten davon, sei es mit rekombinanten oder synthetischen Mitteln hergestellt worden, für eine Zeit und unter Bedingungen, die ausreichen, um die Desensibilisierung des Menschen gegenüber dem Graspollen zu bewirken, an einen Menschen, umfasst.

[0083] Die vorliegende Erfindung betrachtet daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine desensibilisierend wirkende Menge von Lol pl oder seinen Derivaten, Homologen oder immunologischen

Verwandten und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst. Es werden die aktiven Bestandteile einer pharmazeutischen Zusammensetzung betrachtet, die Lol pl oder dergleichen umfasst, um ausgezeichnete therapeutische Aktivität, z.B. bei der Desensibilisierung von Menschen, die allergisch gegen Graspollen sind, aufzuweisen, wenn sie in einer Menge verabreicht werden, die von dem speziellen Fall abhängen. z.B. kann von ungefähr 0,5 µg bis ungefähr 20 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht werden. Dosierungspläne können eingestellt werden, um das optimale therapeutische Ansprechen bereitzustellen. z.B. können verschiedene aufgeteilte Dosen täglich verabreicht werden oder die Dosis kann proportional reduziert werden, wie es durch die Bedürfnisse der therapeutischen Situation angezeigt ist. Die aktive Verbindung kann auf eine bequeme Weise verabreicht werden, wie z.B. auf oralen, intravenösen (wo wasserlöslich), intramuskulären, subkutanen, intranasalen, intradermalen oder Suppositoriumswege oder Implantation (z.B. unter Verwendung von Molekülen mit langsamer Freisetzung). Abhängig von dem Verabreichungsweg kann es erforderlich sein, die aktiven Bestandteile, die Lol pl oder dergleichen umfassen, mit einem Material zu beschichten, um die Bestandteile vor der Wirkung von Enzymen, Säuren und anderen natürlichen Bedingungen, die die Bestandteile inaktivieren könnten, zu schützen. z.B. wird es die geringe Lipophilie von Lol pl oder dergleichen zulassen, dass sie in dem Gastrointestinaltrakt durch Enzyme, die in der Lage sind, Peptidbindungen zu spalten, und in dem Magen durch Säurehydrolyse zerstört werden. Um Lol pl oder dergleichen durch andere als parenterale Verabreichung zu verabreichen, werden sie mit einem Material beschichtet oder verabreicht, um ihre Inaktivierung zu verhindern. z.B. kann Lol pl oder dergleichen in einem Adjuvans verabreicht werden, zusammen mit Enzyminhibitoren oder in Liposomen verabreicht werden. Adjuvans wird in seinem weitesten Sinne verwendet und beinhaltet jede immunstimulierende Verbindung wie Interferon. Adjuvantien, über die hier nachgedacht wird, beinhalten Resorcinole, nicht-ionische Tenside wie Polyoxyethylenoleylether und n-Hexadecylpolyethylenether. Enzyminhibitoren beinhalten pankreatischen Trypsininhibitor, Diisopropylfluorophosphat (DEP) und Trasylol. Liposome beinhalten Wasser-in-Öl-in-Wasser CGF-Emulsionen wie auch konventionelle Liposome.

[0084] Die aktiven Verbindungen können auch parenteral oder intraperitoneal verabreicht werden. Dispersionen können auch in Glycerol, flüssigen Polyethylenglycolen und Mischungen davon und in Ölen zubereitet werden. Unter gewöhnlichen Bedingungen der Lagerung und Verwendung enthalten diese Präparate einen Konservierungsstoff, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

[0085] Die pharmazeutischen Formen, die für die in-

jizierbare Verwendung geeignet sind, beinhalten sterile wässrige Lösungen (wo wasserlöslich) oder Dispersionen und sterile Pulver für die unvorbereitete Herstellung steriler injizierbarer Lösungen oder Dispersion. In allen Fällen muss die Form steril und in einem Ausmaß flüssig sein, dass eine leichte Aufziehbarkeit besteht. Sie muss unter den Bedingungen der Herstellung und Lagerung stabil sein und muss gegen die kontaminierende Wirkung von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen konserviert sein. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder Dispersionsmedium sein, das z.B. Wasser, Ethanol, Polyol (z.B. Glycerol, Propylenglycol und flüssiges Polyethylenglycol und dergleichen), geeignete Mischungen davon und Pflanzenöle enthält. Die richtige Fluidität kann z.B. durch die Verwendung einer Beschichtung wie Lecithin, durch die Erhaltung der erforderlichen Teilchengröße im Falle der Dispersion und durch die Verwendung von Tensiden erhalten werden. Die Verhinderung der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und Antipilzwirkstoffe herbeigeführt werden, z.B. Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure, Thiomersal und dergleichen. In vielen Fällen wird es vorgezogen werden, isotone Wirkstoffe, z.B. Zucker oder Natriumchlorid, mit einzuschließen. Verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch die Verwendung von Wirkstoffen, die die Absorption verzögern, z.B. Aluminium, Monostearat und Gelatine, in den Verbindungen herbeigeführt werden.

[0086] Sterile injizierbare Lösungen werden durch den Einschluss der aktiven Verbindungen in der erforderlichen Menge in dem geeigneten Lösungsmittel mit verschiedenen der anderen Bestandteile, die oben aufgezählt wurden, wie erforderlich, gefolgt von gefilterter Sterilisation hergestellt. Im Allgemeinen werden Dispersionen durch Einschluss der unterschiedlichen sterilisierten aktiven Bestandteile in einen sterilen Träger, der das Basisdispersionsmedium und die erforderlichen anderen Bestandteile von den oben aufgezählten enthält, hergestellt. In dem Fall steriler Pulver für die Zubereitung steriler injizierbarer Lösungen sind die bevorzugten Verfahren der Herstellung Vakuumtrocknung und die Gefriertrocknungstechnik, die ein Pulver des aktiven Bestandteiles plus alle zusätzlichen erwünschten Bestandteile aus der zuvor steril gefilterten Lösung davon ergeben.

[0087] Wenn Lol pl oder dergleichen, wie oben beschrieben, geeignet geschützt ist, kann die aktive Verbindung oral verabreicht werden, z.B. mit einem inerten Verdünnungsmittel oder mit einem assimilierbaren essbaren Träger, oder sie kann in eine Gelatinekapsel mit einer harten oder weichen Hülle eingeschlossen werden oder sie kann in Tabletten komprimiert werden oder sie kann direkt mit den Nahrungsmitteln der Diät aufgenommen werden. Für die orale therapeutische Verabreichung kann die aktive Ver-

bindung mit Arzneiträgern aufgenommen werden und in der Form von ingestierbaren Tabletten, Buccaltabletten, Pastillen, Kapseln, Elixieren, Suspensionen, Sirups, Oblaten und dergleichen verwendet werden. Solche Zusammensetzungen und Präparate sollten mindestens ein Gewichtsprozent der aktiven Verbindung enthalten. Die Prozentverteilung der Zusammensetzungen und Präparate kann natürlich variiert werden und kann praktischerweise zwischen ungefähr 5 bis ungefähr 80 Gewichtsprozenten der Einheit liegen. Die Menge der aktiven Verbindung in solchen therapeutisch nützlichen Zusammensetzungen ist so, dass eine geeignete Dosierung erhalten werden wird. Bevorzugte Zusammensetzungen oder Präparate gemäß der vorliegenden Erfindung werden so hergestellt, dass eine orale Dosierungseinheitsform zwischen ungefähr 10 µg und 2000 mg der aktiven Verbindung enthält.

[0088] Die Tabletten, Pastillen, Pillen, Kapseln und dergleichen können auch das Folgende enthalten: ein Bindemittel wie Tragantgummi, Akaziengummi, Maisstärke oder Gelatine; Arzneimittelträger wie Dicalciumphosphate; ein Zerfallsmittel wie Maisstärke, Kartoffelstärke, Alginsäure und dergleichen; ein Gleitmittel wie Magnesiumstearat; und ein Süßungsmittel wie Saccharose, Lactose oder Saccharin können zugegeben werden oder ein Aromastoff wie Pfefferminz, Wintergrünöl oder Kirscharoma. Wenn die Dosierungseinheitsform eine Kapsel ist, kann sie zusätzlich zu den Materialien vom obigen Typ einen flüssigen Träger enthalten. Verschiedene andere Materialien können als Beschichtungen vorliegen oder auf andere Weise die physikalische Form der Dosierungseinheit modifizieren. z.B. können Tabletten, Pillen oder Kapseln mit Schellack, Zucker oder beidem überzogen sein. Ein Sirup oder Elixier kann die aktive Verbindung, Saccharose als ein Süßstoff, Methyl und Propylparabene als Konservierungsstoffe, einen Farbstoff und Aroma wie Kirsch- oder Orangenaroma enthalten. Natürlich sollte jedes Material, das bei der Herstellung jeder Dosierungseinheitsform verwendet wird, pharmazeutisch rein und im Wesentlichen nicht toxisch in den verwendeten Mengen sein. Zusätzlich kann die aktive Verbindung in Präparate und Formulierungen mit verzögerter Freisetzung eingeschlossen werden.

[0089] Wie hier verwendet, beinhaltet „pharmazeutisch akzeptabler Träger“ jedes und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, antibakterielle und Antipilzwirkstoffe, isotonische und absorptionsverzögernde Wirkstoffe und dergleichen. Die Verwendung solcher Medien und Wirkstoffe für pharmazeutisch aktive Substanzen ist auf dem Fachgebiet gut bekannt. Ausgenommen insoweit, dass irgendein konventionelles Medium oder Wirkstoff mit dem aktiven Bestandteil inkompatibel ist, wird die Verwendung davon in den therapeutischen Zusammensetzungen überlegt. Ergänzende aktive Bestandteile

können auch in die Zusammensetzungen eingeschlossen werden.

[0090] Es ist besonders vorteilhaft, parenterale Zusammensetzungen in Dosierungseinheitsform für die Einfachheit der Verabreichung und Einheitlichkeit der Dosierung zu formulieren. Dosierungseinheitsform, wie hier verwendet, bezeichnet physikalisch diskrete Einheiten, die als einheitliche Dosierungen für die Säugersubjekte, die behandelt werden sollen, geeignet sind; dabei enthält jede Einheit eine vorbestimmte Menge an aktivem Material, berechnet, um den gewünschten therapeutischen Effekt zusammen mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger hervorzurufen. Die Spezifizierung für die neuen Dosierungseinheitsformen der Erfindung wird durch (a) die einzigartigen Charakteristiken des aktiven Materials und den besonderen therapeutischen Effekt, der erzielt werden soll, und (b) die Limitierungen, die der Kunst der Zusammenstellung eines solchen aktiven Materials für die Behandlung von Erkrankung bei lebenden Individuen mit einem erkrankten Zustand, bei denen die körperliche Gesundheit beeinträchtigt ist, innewohnen, diktiert und sind direkt davon abhängig, wie hier detailliert offenbart wird.

[0091] Der wichtigste aktive Bestandteil wird für bequeme und effektive Verabreichung in effektiven Mengen mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Träger in Dosierungseinheitsform gemischt, wie hier zuvor offenbart wurde. Eine Einheitsdosierungsform kann z.B. die wichtigste aktive Verbindung in Mengen, die von 0,5 µg bis ungefähr 2000 mg reichen, enthalten. Ausgedrückt in Verhältnissen liegt die aktive Verbindung im Allgemeinen in ungefähr 0,5 µg bis ungefähr 2000 mg/ml des Trägers vor. In dem Fall von Zusammensetzungen, die ergänzende aktive Bestandteile enthalten, werden die Dosierungen durch Bezugnahme auf die gewöhnliche Dosis und Verabreichungsweise der Bestandteile bestimmt.

[0092] Die folgenden, nicht begrenzenden Beispiele, sind für die vorliegende Erfindung relevant.

BEISPIEL 1

Extraktion von RNA.

[0093] 4 g frischer Weidelgraspollen (gesammelt von Feldquellen nahe Melbourne und unter flüssigem N₂ gelagert) wurde in 10 ml Extraktionspuffer (50 mmol Trispuffer, pH 9, 0,2 mol NaCl, 10 mmol Mg-Acetat), enthaltend Vanadylribonucleosidkomplexe zu 10 mmol (BERGER und BIRKENMEIER, 1979) und DEPC zu 0,1%, suspendiert. Die Pollenklumpen wurden in einem Mörser und Pistill unter flüssigem N₂ für 10-20 Min. zerrieben, um ein Homogenat bereitzustellen, in dem alle Pollenkörner aufgebrochen sind. Die Aufschlammung wurde auf Nalgen-Zentrifu-

genröhrchen mit 1% (Gew./V) SDS, 10 mmol EDTA und 0,5% (Gew./V) N-Lauroylsarcosin übertragen. Ein gleiches Volumen von warmem, hochgradig gepuffertem Phenol (von IBI), behandelt mit 0,1% (Gew./V) Hydroxychinolin (MANIATIS et al., 1982) wurde zugegeben und die Mischung wurde für 10 Min. geschüttelt. Ein äquivalentes Volumen von 24:1 Teilen Chloroform:Isoamylalkohol wurde zugegeben und das Schütteln wurde fortgesetzt. Die Röhrchen wurden bei 15.000 U/Min. für 20 Min. bei 10°C zentrifugiert, um die Phasen zu trennen und das unlösliche Material und Zellbruchstücke zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit P:C:I vier Mal teextrahiert, bis die Phenolphase klar blieb, (mit Phasentrennung bei 2.500 U/Min. für 15 Min. bei Raumtemperatur), und die wässrige Phase wurde auf Corex-Zentrifugenröhrchen übertragen. 2,5 Volumen 100% (V/V) Ethanol wurden zugegeben und die Lösung wurde durch Pipette gemischt und man ließ sie über Nacht bei -20°C präzipitieren und sie wurde bei 15.000 U/Min. für 20 Min. bei 0°C gedreht. Das Pellet wurde in 10 ml EDTA erneut suspendiert, um die Vanadylribonucleosidkomplexe zu entfernen, und LiCl wurde zugegeben, um eine endgültige Konzentration von 2 M zu ergeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 0°C gehalten und mit 15.000 U/Min. für 30 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem 2 M LiCl und 5 mmol EDTA (pH 7,3) gewaschen, die Flüssigkeit wurde abgegossen und das Pellet wurde in 1 ml Wasser erneut suspendiert. Die Lösung wurde auf 65°C erhitzt und es wurden 0,1 ml 3 M Na-Acetat und 2,2 ml Ethanol für die Präzipitation über Nacht der Gesamt-RNA bei -20°C zugegeben. Das Pellet wurde sanft mit 70-%igem (V/V) Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 0,5 ml Wasser erneut suspendiert. Die Suspension wurde bei -70°C aufbewahrt, bis sie für Poly(A⁺)-RNA-Selektion benötigt wurde.

[0094] Ein Gramm Weidelgraspollen enthielt 1 mg Gesamt-RNA. Poly(A⁺)-mRNA wurde durch Affinitätschromatographie auf Poly(U)Sephrose (Pharmacia) gemäß Standardverfahren selektiert. Die Unversehrtheit der Poly(A⁺)-mRNA wurde in Bezug auf ihre Fähigkeit, als eine Matrice für die Synthese von einsträngiger cDNA zu wirken, wie auch auf ihre Translationsaktivität in dem Kaninchenretikulozytensystem untersucht.

BEISPIEL 2

Zubereitung von cDNA-Klonen

[0095] Die Synthese von Erststrang-cDNA entstand aus 5 µg (PolyA⁺)-RNA in 50 µl Reaktionspuffer (50 mmol Trispuffer, pH 8,3, enthaltend 40 mmol KCl, 10 mmol MgCl₂, 5 mmol DTT, jeweils 1 mmol von dATP, dGTP, dTTP und dCTP, 50 Einheiten menschlichen Placenta-Ribonucleaseinhibitor (HPRI), 5 µg Oligodesoxythymidinsäureprimer, 80 µCi [Alpha-³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham) und 100 Einheiten re-

verser Transcriptase. Die Mischung wurde für 60 Min. bei 42°C inkubiert. Zweitstrang-cDNA wurde unter Verwendung der mRNA/cDNA-Hybride als Substrat, 4 Einheiten E. coli-DNA-Ribonuclease H, um Nicks in der mRNA-Matrize hervorzurufen, und 115 Einheiten E. coli-DNA-Polymerase 1, um den Ersatz des mRNA-Stranges durch DNA zu katalysieren, synthetisiert. Die Reaktionsmischung wurde sequentiell bei 12°C für jeweils 60 Min. inkubiert und die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 70°C für 10 Min. gestoppt. 10 Einheiten T4 DNA-Polymerase wurden zugegeben, um kleine 3'-Überhänge von der Erststrang-cDNA zu entfernen (GUBLER AND HOFFMAN, 1983). Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 20 mmol EDTA und 1% (Gew./V) SDS gestoppt. Die Doppelstrang(ds)-cDNA wurde durch Phenol/Chloroformextraktion gereinigt, gefolgt durch Präzipitation mit Ethanol.

[0096] Um eine lambda-gt 11 cDNA-Expressionsbibliothek zu konstruieren, wurden 500 ng doppelsträngige cDNA mit 20 Einheiten EcoR1-Methylase bei 37°C für 60 Min. inkubiert.

[0097] Schlaufen („lug“) von phosphorylierten EcoR1-Linkern (5'd[pGGAATTCC]) wurden mit der doppelsträngigen cDNA in Ligationspuffer mit 5 Einheiten T4 DNA-Ligase bei 15°C über Nacht ligiert. Die EcoR1-verbundene cDNA wurde mit 100 Einheiten EcoR1-Linkern durch eine Sephacrylsäule veredaut.

[0098] 50 ng verbundene cDNA wurde an Schlaufen von dephosphorylierter EcoR1-geschnittener lambda-gt 11-DNA (Promega) mit 2,5 Einheiten T4 DNA-Ligase für 20 h bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 10 µl ligiert. Die ligierte lambda-gt 11-DNA wurde mit 30 mmol Na-Acetat und 2,7 Volumen Ethanol bei -70°C für 2 h präzipitiert. Die lambda-gt 11-DNA, ligiert an cDNA, wurde in vitro bei 20°C für 2 h unter Verwendung von 25 µl der lambda packaging mixture (Promega) gepackt. Die cDNA-Bibliothek wurde auf E. coli-Stamm Y1090r auf Platten, die 1 mg/ml X-gal und 0,4 mg/ml IPTG enthielten, titriert. Die cDNA wurde als Plattenlysat auf E. coli-Stamm Y1090r mit einer Dichte von 15.000 Plaques pro 150 mm Platte amplifiziert.

BEISPIEL 3

Screening der lambda-gt 11-cDNA-Bibliothek unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper-sonden.

[0099] Es wurden Weidelgraspollenallergen-spezifische monoklonale Antikörper entwickelt und durch SMART et al. (1983) charakterisiert. Seren von Patienten, die gegen Weidelgraspollen allergisch sind, wurden freundlicherweise durch Dr. David Hill vom Royal Children's Hospital, Melbourne, zur Verfügung

gestellt.

[0100] Die folgende Vorgehensweise für das Screening der lambda-gt 11-Expressionsbibliothek ist eine Modifizierung eines zuvor beschriebenen Verfahrens (HUYNH, YOUNG AND DAVIS, 1985). Man züchtete eine einzelne Kolonie von E. coli Y1090r bei 37°C mit guter Belüftung auf eine OD600 von 0,7-0,9 in LB Medium, das 100 µl/ml Ampicillin und 0,4% (Gew./V) Maltose enthielt. Die Zellen wurden pelletiert und in 10 mmol MgSO₄ in 40% des Kulturvolumens erneut suspendiert. Die E. coli Y1090r -Zellen (0,3 ml) wurden dann mit ungefähr 18.000-20.000 rekombinanten Phagen bei 37°C für 15 Min. infiziert, auf 150 mB LB Platten in 0,7% (Gew./V) Agarose plattiert und bei 42°C für 3 h inkubiert. Die Platten wurden mit trockenen 132 mm-Nitrocellulosefiltern, die in 10 m IPTG voreingeweicht wurden, überschichtet, dann für 6 h bei 37°C inkubiert und die Filter entfernt. Ein zweiter IPTG-behandelter Filter wurde auf den Bakterienrasen platziert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Filter-Plaquelifts wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit TBS für 10 Min. gewaschen. Das TBS wurde entfernt und 10 ml TBS, enthaltend 10% (Gew./V) fettfreies Milchpulver, wurde zugegeben und die Filter wurden für 1 h sanft bewegt, abgetropft, für 30 Sek. mit TBS gespült und dann für 10 Min. mit TBS plus 0,1 (V/V) Tween-20 gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschungen mit TBS für jeweils 10 Min. Die Filter wurden für 3 h in TBS, das 2% (Gew./V) BSA und monoklonale Antikörper (Ascites) gegen Weidelgraspollenallergene in einer Verdünnung von 1:500 enthielt, mit sanfter Bewegung inkubiert. Nach Waschen in TBS/0,1% (V/V) Tween-20 wurden die Filter für 1,5 h in TBS, das 2% (Gew./V) BSA und Peroxidase-konjugiertes affinitäts-gereinigtes Antimäus-IgG in einer Verdünnung von 1:500 enthielt, inkubiert. Die Filter wurden gewaschen und unter Verwendung von frischem chromogenem Peroxidasesubstrat 4-Chlor-1-Naphthol, 60 mg aufgelöst in 20 ml eiskaltem Methanol, und 80 ml TBS, enthaltend 0,03% (V/V) H₂O₂, entwickelt. Für jeden Filter wurden 10 ml Entwicklerlösung verwendet. Nachdem purpurne Flecken auf den Filtern auftraten, wurde die Entwicklerlösung entfernt und die Filter wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, um die Reaktion zu stoppen.

[0101] Die entwickelten Filter wurden verwendet, um spezifische Plaquebereiche auf der Platte, korrespondierend zu einem positiven Signal, zu lokalisieren. Positive Phagenplaques wurden von den Platten als „Sagaroseplugs“ aufgenommen und die eluierten Phagen auf individuelle Antigen-positive lambda-gt 11-Klone durch erneutes Screening bei niedrigerer Dichte auf 85 mm-Petrischalen mit 82 mm-Nitrocellulosekreisen gereinigt. Nachdem die Plaquereinigung einmal erreicht wurde, wurde jeder der lambda-gt 11-Klone, der die Allergen-cDNA trug, mit geringer Dichte plattiert und es wurden doppelte Filter-Lifts

durchgeführt. Die Fähigkeit des rekombinanten Allergens, an Antiseren von allergischen Patienten zu binden, wurde unter Verwendung der gleichen Vorgehensweise wie oben beschrieben nachgewiesen, außer dass der Filter-Lift über Nacht in den allergischen Antiseren in einer Verdünnung von 1:10 inkubiert wurde, während der erste Lift mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurde.

BEISPIEL 4

Herstellung von rekombinanten allergenen Proteinen aus lambda-gt 11-rekombinanten Lysogenen und Westernblotanalyse.

[0102] Es wurden Bakterien (E. coli Stamm Y1089), die durch den rekombinanten Phagen lysogenisiert werden sollten, bis zur Sättigung in LB Medium (pH 7,5), das 0,2% (Gew./V) Maltose enthielt, bei 37°C gezüchtet. Ein ml der Zellen wurde durch Zentrifugation gesammelt und in 300 µl LB Medium, das 10 mmol MgCl₂ enthielt, erneut suspendiert. Die Zellen (ungefähr 1×10^8 Zellen) wurden mit ungefähr 1×10^9 pfu lambda-gt 11 rekombinanten Phagen, die cDNA-Inserts enthielten, die die allergenen Proteine kodierten (z.B. Klon 12R und Klon 6R), bei 32°C für 20 Min. infiziert. Die infizierten Zellen wurden seriell verdünnt und in einer Dichte von 100-200 Kolonien pro Platte plattiert und über Nacht bei 32°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden auf Replikat LB Platten gesprenkelt, von denen eine bei 42°C und die andere bei 32°C über Nacht inkubiert wurde. Rekombinante Lysogenklone wurden durch Wachstum bei 32°C, aber nicht bei 42°C, angezeigt und traten mit einer Frequenz von 20% für Klon 12R und 3 - 4% für Klon 6R auf.

[0103] Um eine präparative Menge der rekombinanten allergenen Proteine zu erhalten, wurde eine einzelne Lysogenkolonie von Y1089 in 10 ml LB Medium geimpft und bei 32°C mit guter Belüftung inkubiert, bis die OD₆₀₀ 0,5 erreichte. Die Kultur wurde schnell in ein 42°C Wasserbad verlagert und für 20 Min. mit Schütteln-inkubiert.

[0104] Der lac-Operonrepressor wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M IPTG inaktiviert. Die Kultur wurde dann bei 37°C für eine Stunde inkubiert, was es ermöglichte, dass das lac Z-Gen exprimiert und die allergenen Proteine als ein Fusionsprotein mit beta-Galactosidase synthetisiert wurden. Die Zellen wurden durch Rotation bei 3.000 U/Min. für 10 Min. bei Raumtemperatur geerntet, in 150 µl Probenpuffer erneut suspendiert und sofort in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Zellen wurden durch Auftauen bei Raumtemperatur lysiert. Für die elektrophoretische Analyse von Proteinen wurde 150 µl SDS Probenpuffer, der bromphenolblaue Farbmaterie enthielt, zu dem Gefrier-Auftausalysat zugegeben. Die Proben wurden für 3 Min. gekocht und das unlösliche Material durch

Mikrozentrifugation für 3 Min. entfernt.

[0105] Die Proteine wurden durch 7-10% (Gew./V) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Coomassieblaufärbung mit doppelten Proben, die auf Nitrocellulosefilter im Elektroblobverfahren aufgebracht wurden, unter Verwendung des Bio-Rad Transblotapparates (0,15 Amp. über Nacht) bildlich dargestellt. Fusionsproteine wurden mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen und unter Verwendung des Screeningvorgehens, das zuvor beschrieben wurde, bildlich dargestellt.

BEISPIEL 5

Northernanalyse.

[0106] Gesamt-RNA wurde aus Pollen-, Blatt-, hydrierten Samen- und Wurzelproben, wie zuvor für Pollen beschrieben, extrahiert und 20 µg RNA/Probe wurden in Formaldehyd/1,2% (Gew./V) Agarosegelen (MANIATIS et al., 1982), laufend bei 70 V für 4 h in Laufpuffer, der 20 mmol Morpholinopropansulfonsäure, 5 mmol Natriumacetat und 0,1 mmol EDTA enthielt, auf pH 7,0 elektrophoriert. Die RNAs wurden auf Nitrocellulose (Hybond C) Filter übertragen und 2 h bei 50°C in Nybridisierungspuffer, der 50% (V/V) entionisiertes Formamid, 2 × SSPE, 7% (Gew./V) SDS, 0,5% (Gew./V) fettfreies Milchpulver, 1% PEG 20.000 und 0,5 mg/ml nicht-homologe Heringssperma-Träger-DNA enthielt, vorequilibriert. Frischer Hybridisierungspuffer, der die zufällig mit Primer versehene Lol pl-DNA-Sonde enthielt, wurde zugegeben und bei 50°C für Übernacht-Hybridisierung inkubiert. Die Filter wurden heftig in 2 × SSC, 0,1% (Gew./V) SDS für 15 Min. bei Raumtemperatur, dann 0,5 × SSC, 1% (Gew./V) SDS bei 50°C für 15 Min. gewaschen, gefolgt durch ein kurzes Ausspülen in 0,5 × SSC, 0,1% (Gew./V) SDS, leicht geblottet und in Glad Wrap eingewickelt. Kodakfilm wurde für 18 h bei -70°C belichtet.

BEISPIEL 6

Expression von Lol pl-cDNA-Produkten, reagiert mit IgE von allergischen Seren.

[0107] Das cDNA-Insert von lambda-gt 11-12R, das Lol pl kodiert, wurde in den EcoR1-Ort des Plasmidexpressionsvektors pGEX subkloniert, wo es als ein Fusionsprotein mit Glutathiontransferase exprimiert werden kann. Es wurde E. coli, das mit diesem Plasmid pGEX-12R oder mit dem nicht-rekombinanten Vektor allein infiziert wurde, in einer log-Phasenkultur gezüchtet und die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Diese Bakterien wurden lysiert und die Gesamtproteine auf SDS-PAGE-Gel getrennt. Ein Westernblot zeigt, dass nur Bakterien, die rekombinante Plasmide enthalten, ein Proteinbestandteil besitzen, das mit spezifischen IgE in Seren, die von

Spendern abgenommen wurden, von denen bekannt ist, dass sie gegen Weidelgraspollen sind, reagiert. Diese Ergebnisse werden in [Fig. 6](#) gezeigt.

BEISPIEL 7

Kreuzreaktivität von Lol pl mit homologen Allergenen von anderen Graspollen.

[0108] Lol pl ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34 kD und SDS-PAGE zeigt, dass andere häufige Gräser ein homologes Protein von ähnlichem Molekulargewicht besitzen. Andere Ergebnisse zeigen, dass diese Proteine ein gemeinsames antigenes Epitop (nachgewiesen durch monoklonale Antikörper) teilen und vom Aspekt der spezifischen IgE-Bindung her Allergene sind. Die Ergebnisse werden in **Fig. 7** gezeigt. Wegen dieser allergenen Ähnlichkeit ist Lol pl das immundominante Allergen von Graspollen. Eine Konsequenz ist, dass das cDNA-Klon 12R als eine heterologe Sonde verwendet werden kann, um die homologen cDNA-Klone für Allergene von anderen Graspollen zu isolieren.

LITERATURVERZEICHNIS:

- BALDO, B.A., SUTTON, R., and WRIGLEY, C.W. (1982). Grass allergens with particular reference to cereals. *Prog. Allergy* 30, 1-66. (Karger, Basel).
- BERGER, S.L. and BIRKENMEIER (1919). Inhibition of tractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. *Biochemistry* 18; 5143-5149.
- BOUSQUET, J. & MICHEL, F.B. (1989) Specific Immunotherapy: A treatment of the Past? *Allergy and Clinical Immunology News* 1:7-10
- BUELL et al. (1985). *Nucleic Acids Research* 13: 1923-1958.
- DOUILLARD, J.Y. and HOFFMAN (1981). Basic facts about hybridomas in *Compendium of Immunology*, Vol II, ed. by Schwartz.
- FORD & BALDO B.A. (1986). A re-examination of Ryegrass (*Lolium perenne*) pollen allergens. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 81; 193-203.
- FREIDHOFF, L.R., EHRLICH-KANTZKY, E., GRANT, J.N., MEYERS, D.A., MARSH, D.G. (1986). A study of the human immune response to *Lolium perenne* (Rye) pollen and its components, Lol, pl and Lol pII (Rye I and Rye II). *Journal of Allergy and clinical immunology*.
- GOFF and GOLDBERG (1985). *Cell* 41: 587-595.
- GRMMER et al., 1984. Persistence of efficacy after a brief course of polymerized ragweed allergens: A controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73:484-489
- GUBLER, V. and HOFFMAN, B.J. (1983). *Gene* 25, 263.
- HILL, D.J., SMART, I.J. and KNOX, R.V. (1979). Childhood asthma and grass pollen aerobiology in Melbourne. *Medical Journal of Australia* I, 426-429.
- HOWLETT, B.J. and CLARKE, A.E. (1981). Isolation and partial characterization of two antigenic glycoproteins from ryegrass (*Lolium perenne*) pollen. *Biochemical Journal*, 197, 695-706.
- HOWLETT, B.J. & KNOX, R.B. (1984). Allergic interactions; in Heslop-Harrison J, Linskens, H.F. (eds) *Encyclopaedia of Plant Physiology* 17, 655-674. Springer, Heidelberg.
- HUYNH, T.V., YOUNG, R.A. and DAVIS, R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in lambda-gt 10 and lambda-gt 11. In Glover, D.M. (ed); *DNA cloning; A practical approach Vol. I.* pp49-78. IRL Press, Oxford.
- JOHNSON, P. & MARSH, D.G. (1965. 'Isoallergens' From ryegrass pollen. *Nature*, 206, 935-
- JOHNSON, P.& MARSH, D.G. (1966). Allergens from common ryegrass pollen (*Lolium perenne*). I. Chemical composition and structure. *Immunochemistry* 3, 91-100.
- KOHLER, G and MILSTEIN, C. (1975). *Nature* 495-49.
- KOHLER, G and MILSTEIN, C. (1976). *European Journal of Immunology* 6: 511-519.
- LICHTENSTEIN L.M. et. al. (193) *Int. Cong. of Allergology and Clin. Immunol.* J.W. Kerr and .A. Gander-ton (eds).
- LOWTTENSTEIN, H. (1978). Quantitive immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis ad isolation of allergens. *Prog. Allergy* 25. 1-62. (Karger, Basel).
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.G. and SAMBROOK, J. (1982). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- MARSH, D.G., HADDAD Z.H. and CAMPBELL D.H. (1970). A new method for determining the distribution of allergenic fractions in biological materials: Its application to grass pollen extracts. *J. Allergy*, 46, 107-121.
- MARSH, D.G. (1975). Allergens and the genetics of allergy; in M. Sela (ed), *The Antigens*, Vol. 3, pp 271-359. (Academic Press Inc., London, New York).
- MARSH. D.G., MILNER, F.M. and JOHNSON, P. (1966). The allergenic activity and stability of purified allergens from the pollen of common ryegrass. *International Archives of Allergy* 29, 52-
- MESSING, J. & (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods an Enzymology – Recombinant DNA techniques* 101, Part C. pp. 20-78.
- MESSING, J. & VIEIRA, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*; 19, 269-276.
- MILLER, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, New York.
- READING. J. (1993) *Journal of Immunological Methods* 53: 261-291
- SINGH, M.B. & KNOX, R.B. (1985). Grass pollen allergens: Antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay,

International Archives of Allergy and Applied Immunology 78, 300-304.

SMART, I.J., HEDDLE, R.J. ZOLA, M., BRADLEY, J. (1983). Development of monoclonal antibodies specific for allergenic components in ryegzass (*Lolium perenne*) pollen. International Archives of Allergy and Applied Immunology 72 243-248.

SMART I.J. & KNOX, R.B. (1979). Rapid batch fractionation of ryegzass pollen allergens. Zernational Archives of Allergy and Applied Immunology 62. 173-187.

WATSON, J. (1976). Molecular Biology of the Gene, 3rd Ed. Benjamin-Cummings, Menlo Park, California.

Patentansprüche

1. Allergenes Protein von Pollen der Familie Poaceae, kodiert durch

a) eine DNA-Sequenz, die mindestens 60%ige Homologie mit der Sequenz, die in **Fig. 5** dargestellt wird, aufweist und ein allergenes Protein von Pollen der Familie Poaceae kodiert, wobei optional der Pollen Pollen von *Lolium perenne* ist, oder

b) eine DNA-Sequenz, die mindestens 60%ige Homologie mit der Sequenz, die in **Fig. 5** dargestellt wird, aufweist und ein allergenes Protein von einem Graspollen kodiert, das allergen kreuzreaktiv mit einem allergenen Pollenprotein von *Lolium perenne* ist, wie durch IgE-Bindungsstudien gezeigt wird; wobei das allergene Protein rekombinant in einer Wirtszelle, transformiert mit einer Nukleinsäure, die mindestens 60%ige Homologie mit der Sequenz, die in **Fig. 5** dargestellt wird, zeigt, hergestellt wurde.

2. Antigenes Polypeptidfragment, erhältlich von einem allergenen Protein, wie es in Anspruch 1 definiert wird, das allergen kreuzreaktiv mit einem allergenen Pollenprotein von *Lolium perenne* ist, wie durch IgE-Bindungsstudien gezeigt wird.

3. Ein Arzneimittel, das eine desensibilisierend wirkende Menge eines allergenen Proteins, wie es in Anspruch 1 definiert wird, oder eines Antigenen Polypeptids, wie es in Anspruch 2 definiert wird, umfasst.

4. Allergenes Protein, wie es in Anspruch 1 definiert wird, oder antigenes Polypeptid, wie es in Anspruch 2 definiert wird, für die Verwendung als ein Arzneimittel.

5. Die Verwendung eines Allergen Proteins, wie es in Anspruch 1 definiert wird, oder eines Antigenen Polypeptids, wie es in Anspruch 2 definiert wird, bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Graspollenallergie

6. Die Verwendung eines allergenen Proteins gemäß Anspruch 1 oder eines antigenen Polypeptidfragmentes gemäß Anspruch 2 bei einem in vitro-Assay für den Nachweis von Antikörpern, die gegen das

allergene Protein gemäß Anspruch 1 oder das antigenes Polypeptid gemäß Anspruch 2 reagieren.

7. Die Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein allergenes Protein, wie es in Anspruch 1 definiert wird, oder ein antigenes Polypeptid, wie es in Anspruch 2 definiert wird, reagiert, bei einem in vitro-Assay für den Nachweis eines allergenen Proteins gemäß Anspruch 1 oder eines antigenen Polypeptids gemäß Anspruch 2.

8. Einen Kit für einen Assay von Antikörpern, die gegen allergenes Protein gemäß Anspruch 1 oder antigenes Polypeptid gemäß Anspruch 2 reagieren, umfassend einen Container von allergenem Protein gemäß Anspruch 1 oder antigenem Polypeptid gemäß Anspruch 2.

9. Einen Kit, wie er in Anspruch 8 beansprucht wird, worin das Protein oder Polypeptid in dem Container mit einem Reportermolekül markiert wird, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu geben.

10. Einen Kit, wie er in Anspruch 9 beansprucht wird, der weiter einen zweiten Container von Antikörper umfasst, der gegen das Protein oder Polypeptid reagiert, wobei der Antikörper mit einem Reportermolekül markiert wird, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu geben.

11. Ein in vitro-Assayverfahren für den Nachweis von Antikörper, der gegen allergenes Protein gemäß Anspruch 1 oder antigenes Polypeptid gemäß Anspruch 2 reagiert, in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen einer Probe, die geprüft werden soll, mit einem allergenen Protein gemäß Anspruch 1 oder einem antigenen Polypeptid gemäß Anspruch 2 für einen Zeitraum und unter Bedingungen, die ausreichen, damit sich ein Antikörper-Protein- oder Antikörper-Polypeptid-Komplex bildet, und das Aussetzen des Komplexes gegenüber den Nachweismitteln.

12. Ein in vitro-Assayverfahren für den Nachweis von allergenem Protein gemäß Anspruch 1 oder antigenem Polypeptid gemäß Anspruch 2 in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen einer Probe, die geprüft werden soll, mit einem Antikörper, der gegen das Protein oder Polypeptid reagiert, für einen Zeitraum und unter Bedingungen, die ausreichen, damit sich ein Protein/Polypeptid-Komplex bildet, und das Aussetzen des Komplexes gegenüber den Nachweismitteln.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Fig. 1.

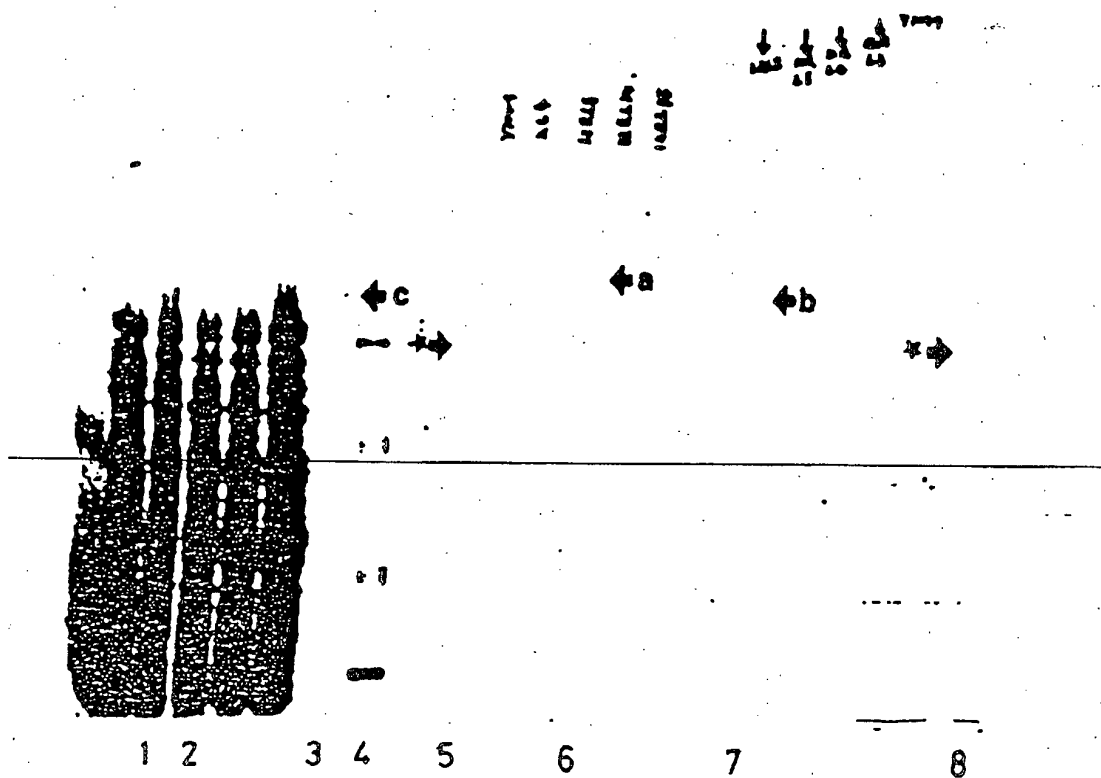


Fig. 3.

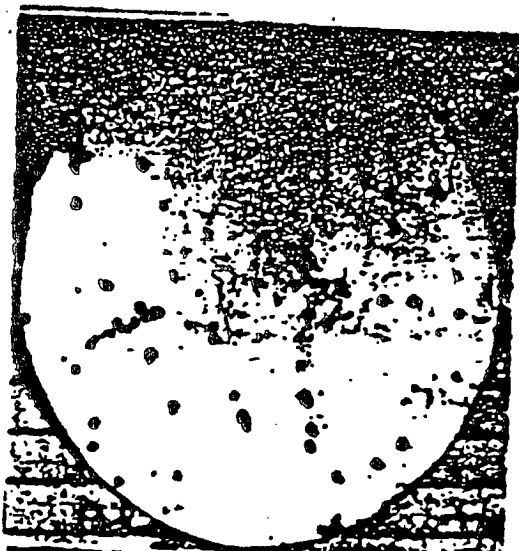


Fig. 2a.

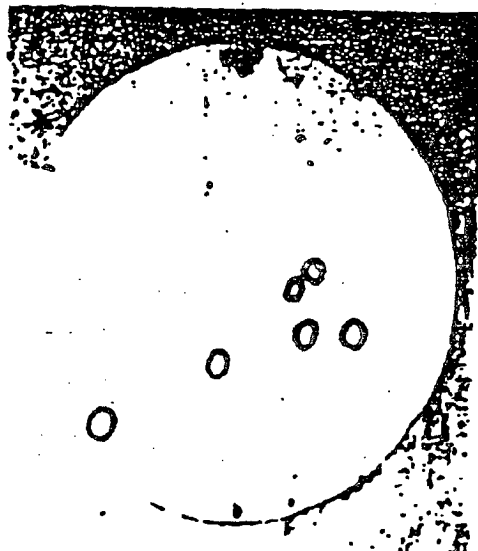


Fig. 2c.

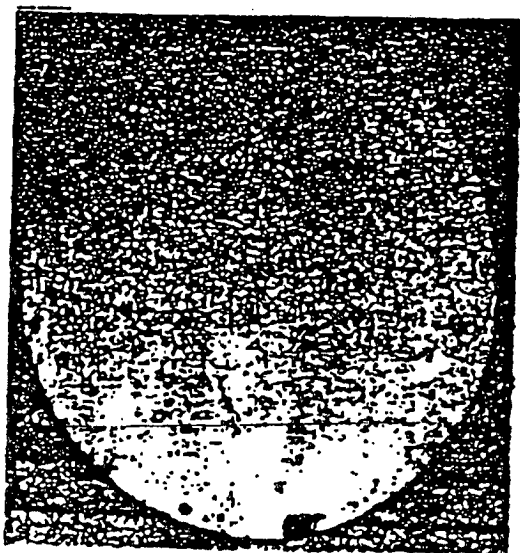


Fig. 2b.

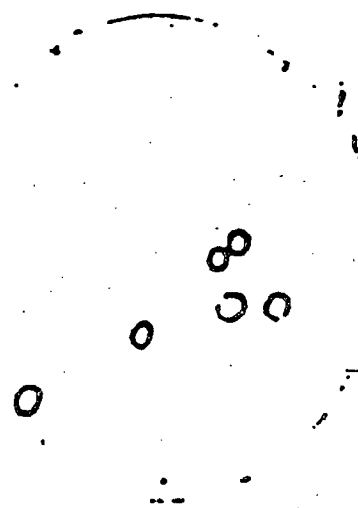


Fig. 2d

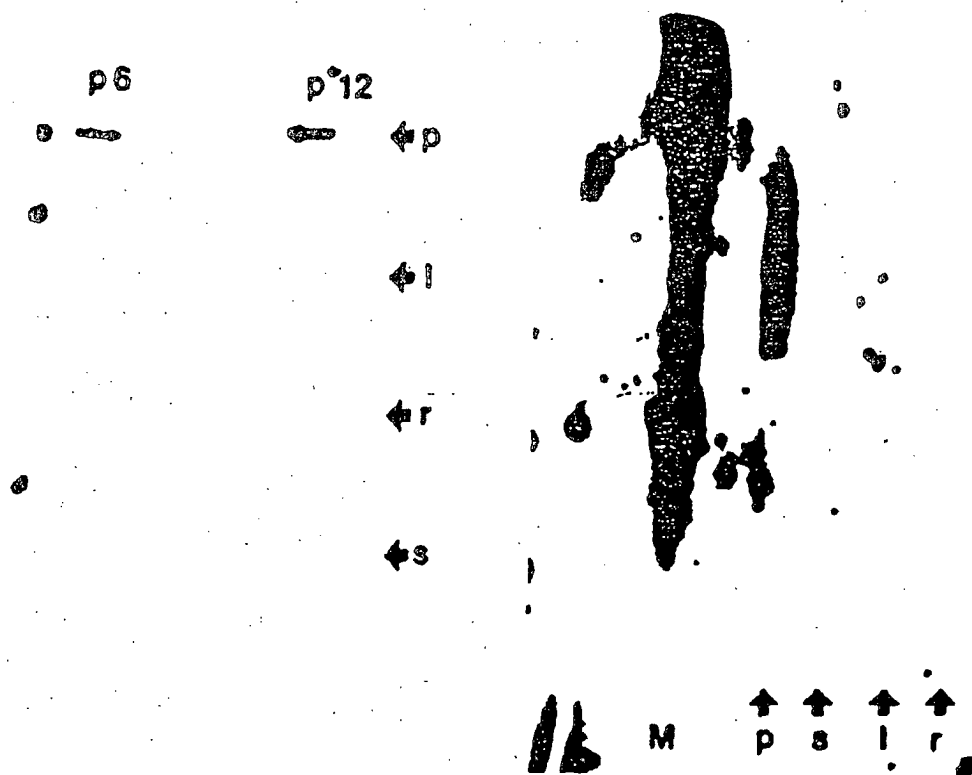


Fig.4a.

Fig.4b.

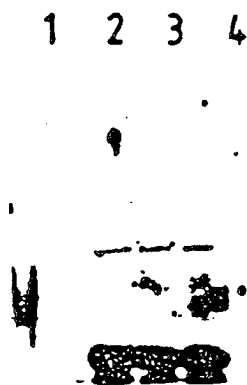


Fig.6.

10	20	30	40	50	60
GAATTCGGCT	ATCCCTCCCT	CGTACAAACA	AACGCAAGAG	CAGCAATGGC	CGTCCAGAAC
70	80	90	100	110	120
TACACGGTGG	CTCTATTCTT	CGCCGTGGCC	CTCGTGGGGG	CCCGGCCGCT	CCTACGCCGC
130	140	150	160	170	180
TGACGCCGGC	TACACCCCCG	CAGCCGGGCC	ACCCCGGCTA	CTCCTGCTGC	CACCCCGGCT
190	200	210	220	230	240
GCGGCTGGAG	GGAAGGCGAC	GACCGACGAG	CAGAAGCTGC	TGGAGGACGT	CAACGCTGGC
250	260	270	280	290	300
TTCAAGGCAG	CCGTGGCCGC	CGTGCCCAACG	CCCCCTCCGC	GGACAAGTTC	AAGATCTTCG
310	320	330	340	350	360
AGGCCGCCCTT	CTCCGAGTCC	TCCAAGGGCC	TCCTCGCCAC	CTCCGCCGCA	AGGCACCCCG
370	380	390	400	410	420
CCTCATCCCC	AAGCTCGACA	CCGCCCTACGA	CGTCGCTACA	AGGGCGAGGG	CGCCGCCACC

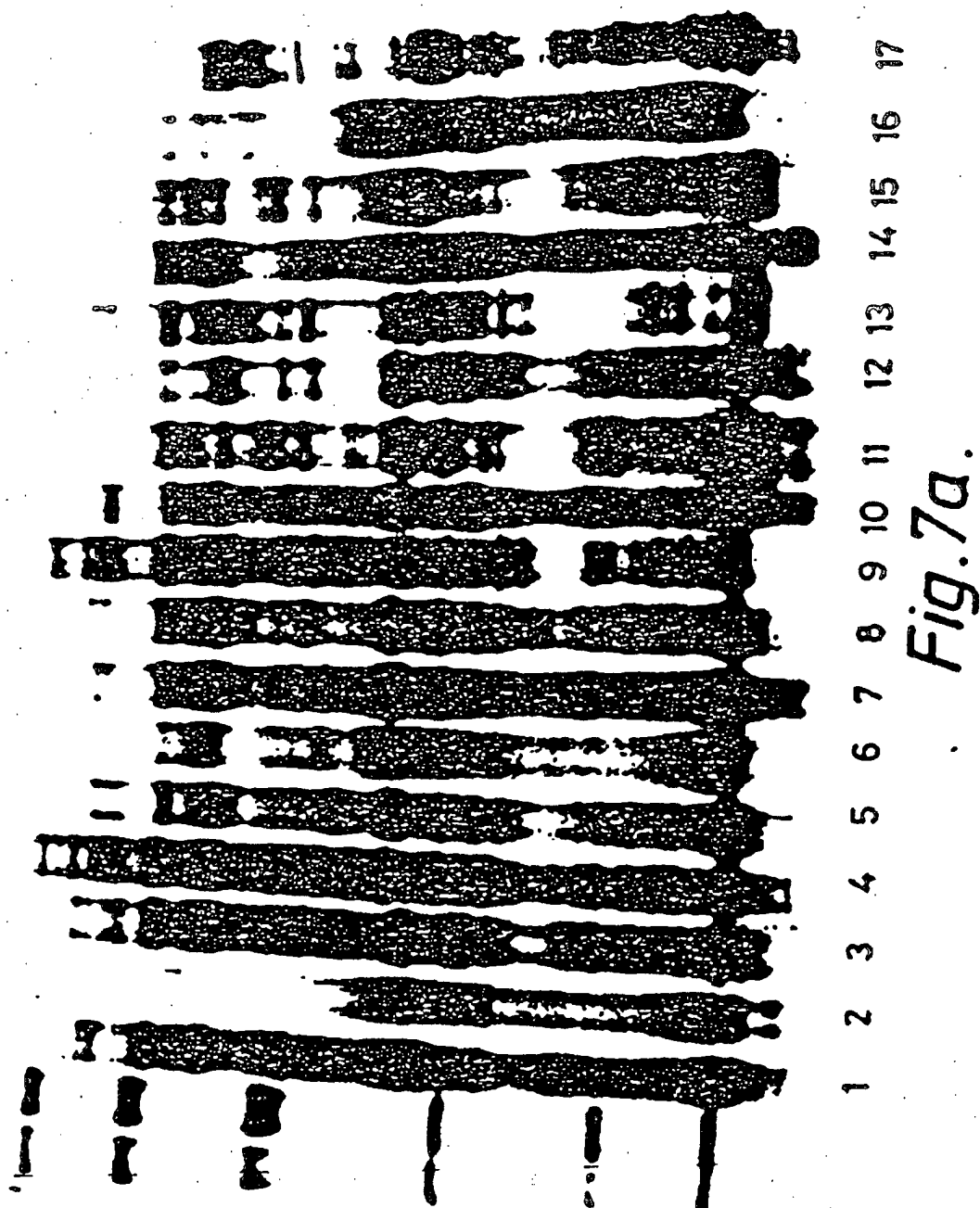
Fig. 5(1).

430	440	450	460	470	480
CCCGAGGCCA	AGTACGACGC	CTTCGTCACT	GCCCTCACCG	AAGCTCCGCG	TCATCGCCCG
490	500	510	520	530	540
CGCCCTCGAG	GTCCACGCCG	TCAAGCCCCG	CACCGAGGAG	GTCCCTGCTG	CTAAGATCCC
550	560	570	580	590	600
CACCGGTGAG	CTGCAGATCG	TTGACAAGAT	CGATGCTGCC	TTCAAGATCG	CAGCCACCCG
610	620	630	640	650	660
CGCCGCCAAC	GCCGCCCCCA	CCAACGATAA	GTTACCCGTC	ITCGAGAGTG	CCTTCAACAA
670	680	690	700	710	720
GGCCCTCAAT	GAGTGCACCG	GGCGGCGCTA	TGAGACCTAC	AAGTTCATCC	CCTCCCCTCGA
730	740	750	760	770	780
GGCCGCGGTC	AAGCAGCCCTA	CGCCGCCACC	GTCCGCCGCCG	GCCCGAGGTC	AAGTACCGCC

Fig.5(2).

790	800	810	820	830	840
GTC TTGAGG	CCGCGCTCGA	CCAAGGCCAT	CACCGCCATG	ACCAGGCAC	AGAAGGCCGG
850	860	870	880	890	900
CAAACCCGCT	GCCGCGCGCTG	CCACAGGCCG	CAACCGTTGC	CACCGCACCG	CAACCGCCGC
910	920	930	940	950	960
C--TG-C-CA	G-CCGCCGCT	GCTGGTGGCT	ACCAAAGCCT	GATCAGCTTG	CTAATATACT
970	980	990	1000	1010	1020
ACTGAACGTA	TGTATGTGCA	TGATCCGGGC	GGCGAGTGGT	TTTGTTGATA	ATTAATCTTC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTTTTTCGTTT	CATGCAGCCG	CGATCGAGAG	GTTCATCGT	TGTAATAATT	CAATATTTT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TATTTCTTTT	TGAATCTGTA	AATCCCCATT	GACAAGTAGT	GGGATCAAGT	CG-CATGTAT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CACCGTTGAT	GCTGAGTTTA	ACGATGGGA	GTTTATCAAA	GAATTTATTA	TTAAAAAAA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
AAAAA AAAA	AAAAA AAAA	AAAAA AAAA	AAAAA AAAA	AAAAA AAAA	

Fig.5(3).

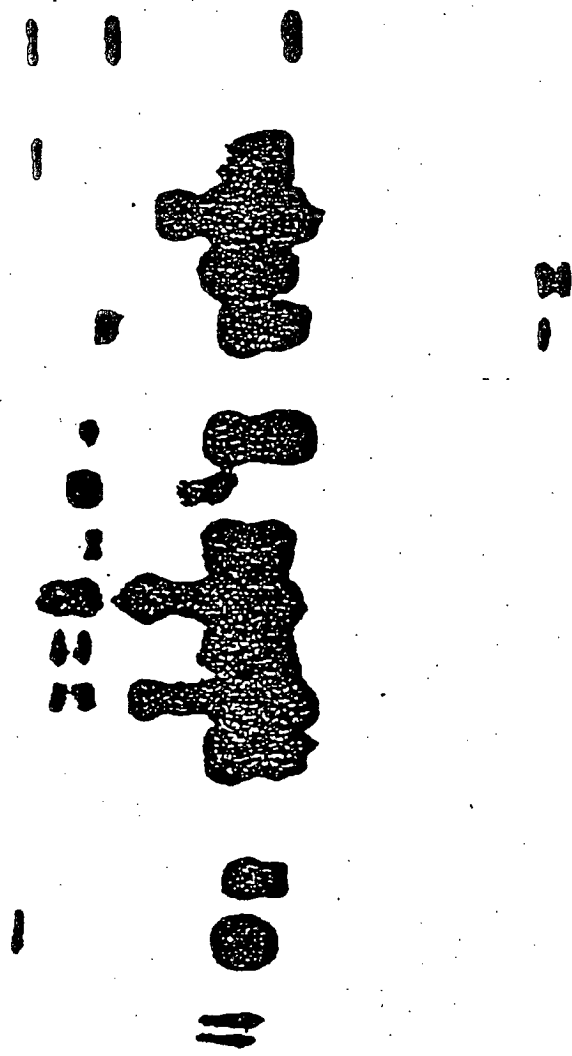


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Fig. 7b.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



Lol p1 ➤

Fig.7c.

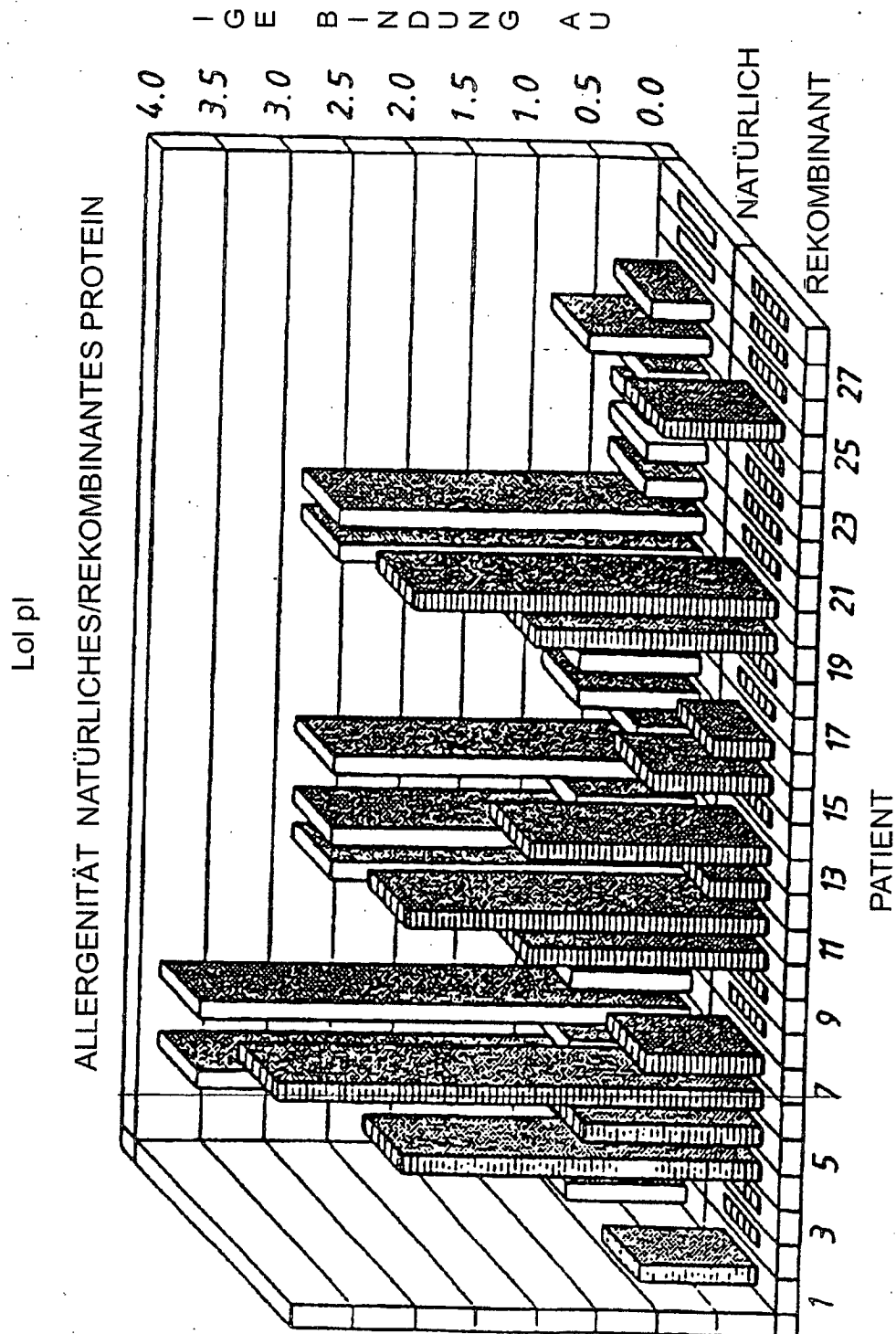


Fig. 8a.

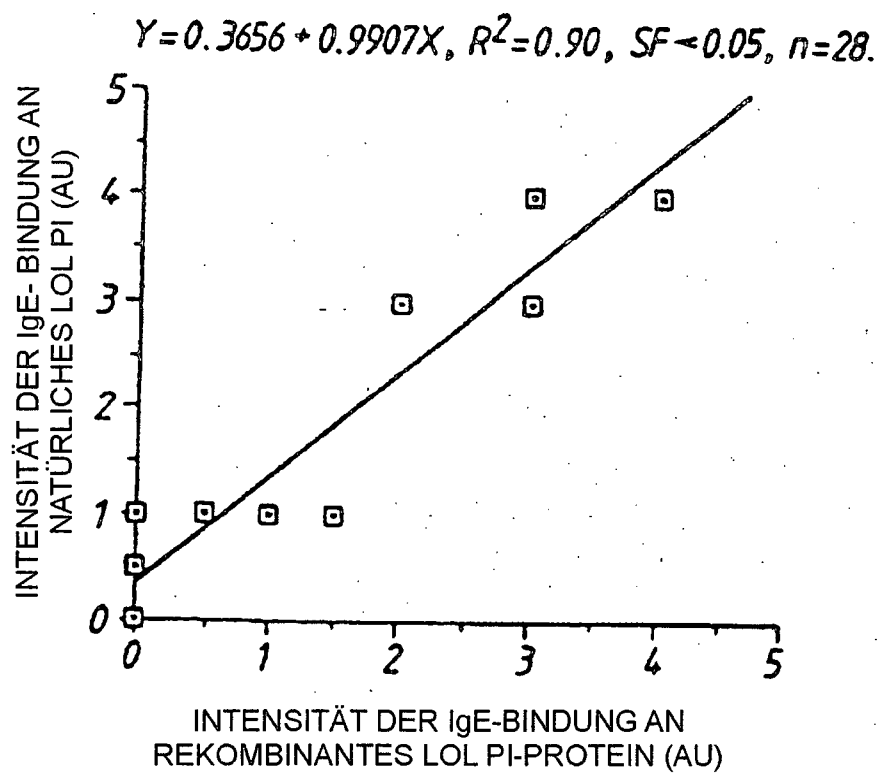


Fig.8b.

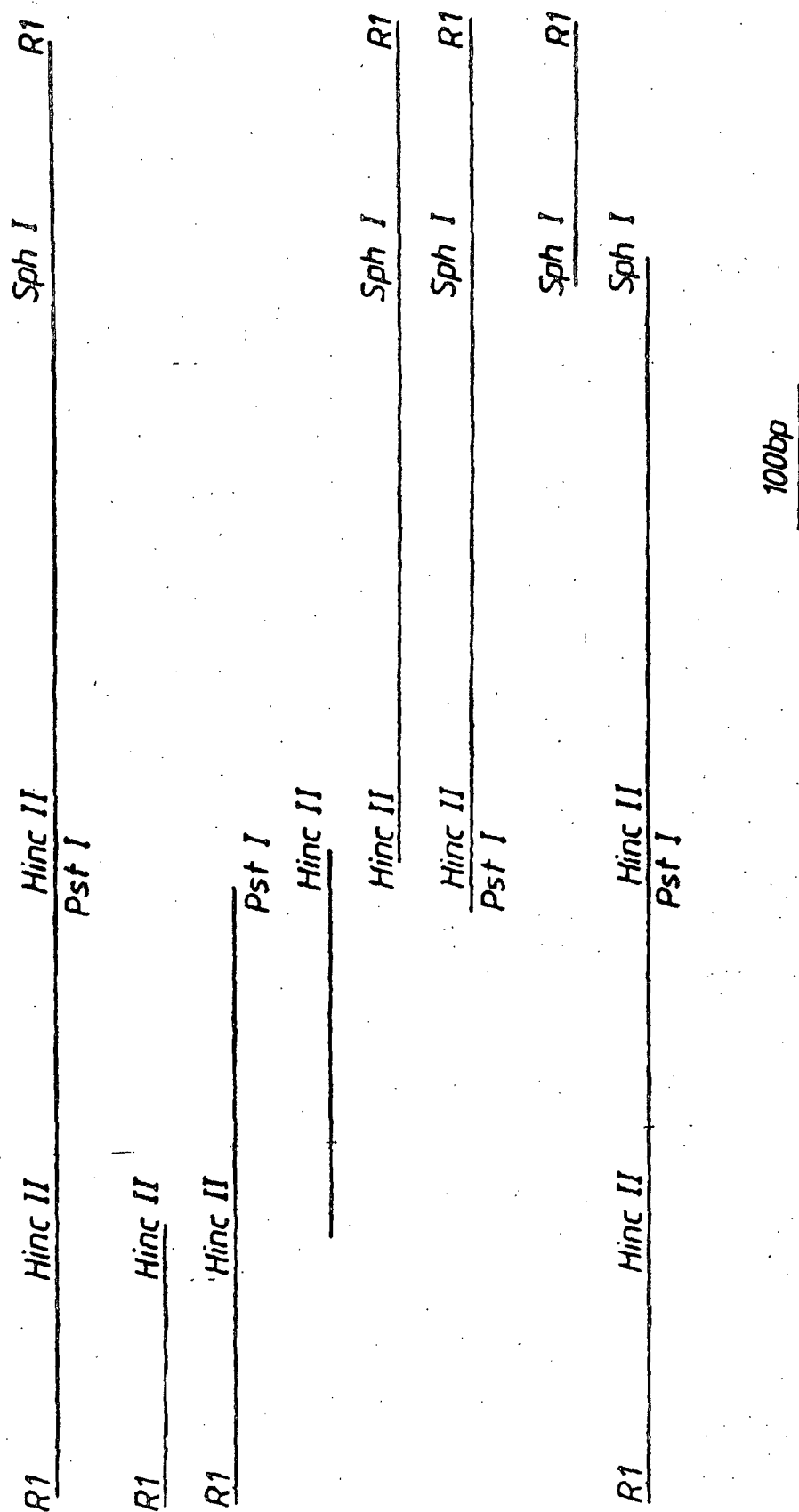


Fig.9.