



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 05 907 T2 2006.02.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 403 280 B1

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/415 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 05 907.0

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 021 837.6

(96) Europäischer Anmeldetag: 27.09.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 31.03.2004

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 31.08.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 16.02.2006

(73) Patentinhaber:

Biomay Produktions- und
Handels-Aktiengesellschaft, Wien, AT

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(72) Erfinder:

Westritschnig, Kerstin, 1180 Wien, AT; Focke,
Margarete, 1140 Wien, AT; Twardosz, Anna, 2500
Baden, AT; Valent, Peter, 1180 Wien, AT; Verdino,
Petra, 8010 Graz, AT; Keller, Walter, 8111
Judendorf, AT; Kraft, Dietrich, 1170 Wien, AT;
Valenta, Rudolf, 2604 Theresienfeld, AT

(54) Bezeichnung: Hypoallergene Impfstoffe gegen Allergie basierend auf Lieschgraspollenallergen Phl p 7

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 eingelebt, 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 Polypeptide, die von dem Lieschgraspollenallergen Phl p 7 abgeleitet sind. Die Polypeptide zeigen eine verminderte allergene Aktivität und sind nützlich als Allergieimpfstoffe zur Behandlung von sensibilisierten allergischen Patienten und zur prophylaktischen Impfung.

[0002] Mehr als 25% der Bevölkerung leiden unter durch IgE vermittelten Allergien. Die Symptome der Allergie (allergische Rhinokonjunktivitis, Asthma, Dermatitis, anaphylaktischer Schock) beruhen auf der IgE-Erkennung von Allergenen. Um eine starke Effektorzellaktivierung und dadurch entzündliche Reaktionen zu induzieren, muss ein Allergen zellgebundene Effektor-IgE-Antikörper wirksam vernetzen können. Dieser Prozess erfordert die Gegenwart von mindestens zwei IgE-Epitopen auf der Allergenoberfläche. IgE-Antikörper allergischer Patienten können entweder "kontinuierliche Epitope", die aus einer Reihe aufeinander folgender Aminosäuren bestehen, oder "diskontinuierliche Epitope" erkennen, die aus Aminosäuren von verschiedenen Teilen des Allergens zusammengesetzt sind, die einander angenähert werden, wenn das Molekül gefaltet ist. Eine allergeninduzierte Vernetzung von mastzellgebundenen IgE-Antikörpern induziert die sofortige Freisetzung biologisch aktiver Mediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene), wohingegen die durch IgE vermittelte Präsentation von Allergenen für T-Zellen eine T-Zellaktivierung und die Freisetzung pro-entzündlicher Cytokine verursacht.

[0003] Etwa 5 bis 20% von auf Pollen allergischen Personen sind sensibilisiert für eine kürzlich aufgefundene Gruppe von Calcium bindenden Proteinen, die zwei Bindungsstellen für Calcium enthalten. Diese Pollenallergene werden daher als Zwei-EF-Hand-Pollenallergene bezeichnet. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten enthalten diese Proteine kreuzreaktive IgE-Epitope und sensibilisierte Patienten zeigen daher allergische Symptome bei Kontakt mit einer großen Vielzahl verschiedener Pollen von Bäumen, Gräsern und Unkräutern.

[0004] Eine allergenspezifische Immuntherapie ist derzeit eine der wenigen heilenden Formen der Therapie für durch IgE vermittelte Allergien. Sie wird derzeit durchgeführt durch Verabreichung von allergenhaltigen Extrakten an sensibilisierte Personen, hauptsächlich durch Injektion oder über andere Wege (z.B. Sublingualimmuntherapie). Während Pollenextrakte aus Bäumen, Gräsern und Unkräutern standardisiert sind bezüglich bestimmter Hauptallergene, wird keine Standardisierung durchgeführt im Hinblick auf weniger häufig erkannte aber höchst kreuzreaktive Allergene, z.B. die oben erwähnten Calcium bindenden Allergene.

[0005] Die Allergie auf die Zwei-EF-Handpollenallergene kann daher nicht ausreichend mit rohen Allergenextrakten behandelt werden. Weiterhin sind die Zwei-EF-Handallergene höchst allergen und bei Injektion können sie schwere allergische Nebenwirkungen verursachen.

[0006] Die Erfindung hat das Ziel, Mittel für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung der Allergie gegen Zwei-EF-Hand-Pollenallergene bereitzustellen. Es wurde gefunden, dass Mutanten des Lieschgraspollenallergens Phl p 7 eine stark verminderte IgE-Bindung zeigen und daher als hypoallergene Mittel nützlich sind. Die Aminosäuresequenz von Phl p 7 wird in SEQ ID Nr. 1 gezeigt. Die Erfindung betrifft ein mutiertes Polypeptid, das von dem Pollenallergen Phl p 7 abgeleitet ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) Polypeptiden, die eine Aminosäuresequenz enthalten, in der im Hinblick auf die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, 1 bis 15 Aminosäurereste deletiert, substituiert und/oder zugefügt sind;
- (b) Polypeptiden, die ein Fragment von (a) enthalten, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 15 Aminosäuren hat und mindestens 90% der Aminosäurereste des Fragments identisch sind mit den entsprechenden Resten der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz;
- (c) Polypeptiden, die ein Fragment der Aminosäuresequenz enthalten, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 15 Aminosäuren hat;
- (d) Polypeptiden, die aus einem Fragment von (a) bestehen, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren hat und mindestens 80% der Aminosäurereste des Fragments identisch mit den entsprechenden Resten der Aminosäuresequenz sind, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist und
- (e) Polypeptiden, die aus einem Fragment der Aminosäuresequenz bestehen, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren hat;

wobei das mutierte Polypeptid im Vergleich zu dem Wildtyp Phl p 7 eine verminderte IgE-Bindungsaktivität hat.

[0007] Der Ausdruck "Polypeptid", wie er hier verwendet wird, bezeichnet eine Verbindung, die mindestens 7 Aminosäuren aufweist, die durch Peptidbindungen verbunden sind. Das Polypeptid ist bevorzugt nur aus Aminosäuren aufgebaut, kann aber auch nicht-proteinartige Komponenten enthalten. Die Länge des Polypeptids ist bevorzugt mindestens 10 Aminosäuren, bevorzugter mindestens 15 Aminosäuren. Das Polypeptid kann auch ein Fusionsprotein sein, das einen Teil, der aus Phl p 7 stammt und einen Fusionspartner aufweist. Der

aus PhI p 7 stammende Teil kann weiterhin an ein Trägermolekül gebunden sein, z.B. Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH).

[0008] Der Ausdruck "Zwei-EF-Handpollenallergen", wie er hier verwendet wird, bezeichnet ein Calcium bindendes Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz zu mindestens 60% identisch ist mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist. Diese Polypeptide haben Aminosäuresequenzen, die identisch sind mit den entsprechenden natürlich vorkommenden Pollenallergenen.

[0009] Ein "mutiertes" Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz sich von der des Wildtyps oder der von natürlich vorkommenden Zwei-EF-Handpollenallergenen unterscheidet.

[0010] Eine Aminosäuresubstitution bezeichnet den Ersatz einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure. Bevorzugt werden saure Reste substituiert. Die substituierende oder ersetzende Aminosäure kann jeglicher Art sein, bevorzugt ist sie eine nicht saure Aminosäure, bevorzugter eine hydrophobe Aminosäure, wie Alanin, Valin, Leucin etc.

[0011] In einer Ausführungsform enthält das Polypeptid der vorliegenden Erfindung eine Aminosäuresequenz, die 1 bis 15 Aminosäuredeletionen, -substitutionen und/oder -additionen im Hinblick auf die Aminosäuresequenz, wie sie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, hat. Bevorzugt ist die Anzahl der Aminosäuredeletionen, -substitutionen und/oder -additionen 1 bis 10, bevorzugter 1 bis 6, am meisten bevorzugt 1 bis 4. Die Polypeptide dieser Ausführungsform sind mindestens 63 Aminosäuren lang, die bevorzugte Länge ist etwa 78 Aminosäuren. Die bevorzugten Polypeptide haben 1, 2, 3 oder 4 Aminosäuresubstitutionen im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Aminosäuresequenz. Bevorzugter enthält das Polypeptid eine Aminosäuresequenz, in der im Hinblick auf die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, die Aminosäuren an den Positionen 24 und 59, bevorzugter an den Positionen 17, 24 und 59, noch bevorzugter an den Positionen 17, 24, 52 und 59 substituiert sind. Die am meisten bevorzugten Polypeptide enthalten eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 6 gezeigt. Das in SEQ ID Nr. 4 gezeigte Polypeptid trägt zwei Mutationen im Vergleich zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, nämlich E24A und D59A. Das in SEQ ID Nr. 5 gezeigte Polypeptid hat die Mutationen D17A, E24A, D59A im Vergleich zu SEQ ID Nr. 1. Das in SEQ ID Nr. 6 gezeigte Polypeptid trägt die Mutationen D17A, E24A, D52A und E59A im Vergleich zu SEQ ID Nr. 1.

[0012] Die Erfindung betrifft weiterhin Polypeptide, die ein Fragment der oben in (a) beschriebenen Polypeptide aufweisen. Das Fragment hat eine Länge von mindestens 15 Aminosäuren, d.h. es besteht aus mindestens 15 aufeinander folgenden Aminosäuren des oben in (a) beschriebenen Polypeptids. Bevorzugt ist die Länge des Fragments mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugter mindestens 25 Aminosäuren, noch bevorzugter mindestens 30 Aminosäuren. Mindestens 90% der Aminosäurereste des Fragments sind identisch mit den entsprechenden Resten der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz, bevorzugt mindestens 92%, bevorzugter mindestens 95%. Der Prozentanteil der Sequenzidentität wird mit üblichen Methoden bestimmt. Der Identitätsgrad der Aminosäuresequenz des Fragments mit der von SEQ ID Nr. 1 kann bestimmt werden, indem die Aminosäuresequenz des Fragments mit SEQ ID Nr. 1 verglichen wird unter Verwendung des Programms "Blast 2 sequences version Blast p2.1.2" (Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174, 247–250). Die Parameter, die in diesem Zusammenhang verwendet werden, sind: Matrix: BLOSUM 62; Gap open: 11; Gap extension: 1; X drop off: 50; Expect: 10; Wortgröße: 3; Filter: keiner.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform enthält das Polypeptid der Erfindung ein Fragment der Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt, mit einer Länge von mindestens 15 Aminosäuren. Das Fragment besteht aus mindestens 15 aufeinander folgenden Aminosäuren der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz, bevorzugt mindestens 20 aufeinander folgenden Aminosäuren, bevorzugter mindestens 25 aufeinander folgenden Aminosäuren, am meisten bevorzugt mindestens 30 aufeinander folgenden Aminosäuren.

[0014] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können aus einem Fragment der oben unter (a) beschriebenen Polypeptide bestehen. Dieses Fragment besteht aus mindestens 10 aufeinander folgenden Aminosäuren des oben unter (a) beschriebenen Polypeptids, bevorzugt mindestens 15 aufeinander folgenden Aminosäuren, bevorzugter mindestens 20 aufeinander folgenden Aminosäuren, noch bevorzugter mindestens 25 aufeinander folgenden Aminosäuren, am meisten bevorzugt mindestens 30 aufeinander folgenden Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des Fragments ist zu mindestens 80% identisch mit den entsprechenden Resten der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz. Der Grad der Aminosäuresequenzidentität wird bestimmt, wie oben beschrieben. Die Sequenzidentität der Fragmente mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 1 ist bevorzugt mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95%.

[0015] In einer weiteren Ausführungsform besteht das Polypeptid der Erfindung aus einem Fragment der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz. Dieses Fragment besteht aus mindestens 10 aufeinander folgenden Aminosäuren der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz, bevorzugt mindestens 15 aufeinander folgenden Aminosäuren, bevorzugter mindestens 20 aufeinander folgenden Aminosäuren, noch bevorzugter 25 aufeinander folgenden Aminosäuren, am meisten bevorzugt mindestens 30 aufeinander folgenden Aminosäuren. Bevorzugte Polypeptide enthalten mindestens die Aminosäuren, die eines der EF-Handmotive bilden (Aminosäuren D13 bis L25 oder D48 bis F60 der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz). Beispiele sind Polypeptide, die im Wesentlichen aus der in SEQ ID Nr. 2 (erstes EF-Hand-Motiv) oder in SEQ ID Nr. 3 (zweites EF-Hand-Motiv) gezeigten Aminosäuresequenz bestehen, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0016] Gemäß der vorliegenden Erfindung können an der Oberfläche exponierte Aminosäuren, die möglicherweise an der Epitopbildung beteiligt sind, substituiert oder deletiert werden. Es wurde gefunden, dass die hoch konservierten Reste Lysin 19 und Phenylalanin 54 von SEQ ID Nr. 1 dem Lösungsmittelausgesetzt sind. Daher kann die Substitution oder Deletion dieser Reste durchgeführt werden, um ein Polypeptid mit verminderter allergener Aktivität zu erhalten. Vorgeschlagene Mutationen sind die Reste Asparagin 15, Glycin 16 und Asparaginsäure 17 von SEQ ID Nr. 1. Diese Reste bilden eine Art ungeladener Kappe auf der N-terminalen Calcium bindenden Schleife. Die Substitution dieser Reste (z.B. durch geladene Aminosäuren) führt zu einem vollständig anderen Oberflächenmuster dieser immunologisch interessanten Proteinregion. Ein weiteres Ziel ist die Mutation der Reste Asparaginsäure 50, Asparaginsäure 52 und Asparaginsäure 56 von SEQ ID Nr. 1. Diese Aminosäuren sind für eine deutlich negative Ladungsverteilung auf der Oberfläche der C-terminalen Calciumbindungsschleife verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass ein Peptid, das aus den 12 Aminosäuren besteht, die die C-terminale Calciumbindungsschleife bilden, immunologisch aktiv ist. Daher wird die Mutation der oben erwähnten Asparaginsäurereste dieses Epitop stark beeinflussen. Weiterhin kann mindestens eine der Aminosäuren in der ungeladenen Falte substituiert oder deletiert sein. Dies sind Phenylalanin 57, Asparagin 58, Isoleucin 61, Serin 62, Asparagin 65, Alanin 66, Prolin 68 und Methionin 5 (was von der gegenüberliegenden Monomerkette bereitgestellt wird) von SEQ ID Nr. 1.

[0017] Es wurde weiterhin gefunden, dass rekombinant erzeugtes Phl p 7, das natürlich vorkommendem Phl p 7 entspricht, als neue Dimeranordnung auftritt, die eine verlängerte Konformation annimmt. Zwei Proteinmonomere fügen sich in einer Kopf-Schwanz-Anordnung mit einer aufgrund von Domainswapping erfolgten EF-Hand-Paarung zusammen. Die ineinander verwundenen Dimere nehmen eine fassartige Struktur an mit einer vergrößerten hydrophoben Höhle, die eine Ligandenbindungsstelle bereitstellt. Die Calciumbindung wirkt als Konformationsschalter zwischen einer offenen und einer geschlossenen dimeren Form von Phl p 7. Daher kann die Zerstörung der Dimeranordnung erfindungsgemäß in Betracht gezogen werden. Diese Strategie zielt auf die hohe Vernetzungsaktivität von Phl p 7 auf die Effektorzell-gebundenen IgE-Antikörper. Aufgrund von Domain-Swapping setzt sich das Protein zu einem hoch symmetrischen Dimer zusammen. Dies führt zur Verdopplung der (identischen) IgE-Epitope. Es wird erwartet, dass eine Umwandlung des Domain-geswappeten Dimers in das entsprechende Monomer die IgE-Epitope erhält, aber die Allergie hervorrufende vernetzende Aktivität stark vermindert. Erfindungsgemäß werden daher Mutationen an der Scharnierschleife bzw. Gelenkschleife, die die verlängerte Linkerregion zwischen den N- und C-terminalen Calcium bindenden Domänen destabilisieren, vorgeschlagen. Als erstes wird eine Mutation mindestens einer der Aminosäuren, die die diskreten Wasserstoffbindungen bereitstellen und dadurch die starre Konformation der Linkerregion stabilisieren, vorgeschlagen; dies sind die hoch konservierten Reste Arginin 30, Glycin 33, Serin 34, Threonin 35, Serin 36 und Glutaminsäure 39 (von SEQ ID Nr. 1). Der Austausch dieser Reste gegen Aminosäurereste, die keine Wasserstoffbindungen bilden können (z.B. sperrige nicht polare Aminosäuren) würde die Stabilität der Scharnierschleifenkonformation stark beeinflussen. Weiterhin wird die Substitution der Scharnierschleifen bildenden Reste (insbesondere Glycin 33, Serin 34, Threonin 35, Serin 36) durch eine Reihe kleiner flexibler Aminosäuren (wie Glycin oder Alanin) vorgeschlagen, entweder 1:1 oder durch Einführung einer längeren Reihe, wodurch die Scharnierschleife verlängert wird und gleichzeitig ihre Flexibilität erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit ist der Austausch der kurzen starren Phl p 7 Scharnierschleife (Glycin 33, Serin 34, Threonin 35, Serin 36) durch entsprechende Schleifen bildende Sequenzen, die aus Intradomain-gepaarten EF-Hand-Proteinen bekannt sind. All diese Mutationen ermöglichen die Bildung von monomerem Phl p 7 mit intramolekularer EF-Handpaarbildung.

[0018] Weiterhin kann die dimere Struktur durch Mutation mindestens eines der hydrophoben Reste, die für die Wechselwirkung zwischen den E-Helizes und der Z-Helix des gegenüberliegenden Monomers in dem durch Domain-Swapping entstandenen Dimer sorgen, zerstört werden. Diese Aminosäuren sind Isoleucin 8, Phenylalanin 12 (Teil der N-terminalen E-Helix), Threonin 35, Valin 40, Methionin 43 und Isoleucin 47 (Teil der C-terminalen E-Helix), ebenso wie die Reste Methionin 71, Valin 74, Alanin 75, Lysin 76, Valin 77 und Phenyl-

Ialanin 78 (Teil der Z-Helix) von SEQ ID Nr. 1. Die Mutation dieser Aminosäuren (z.B. durch geladene oder sperrige Reste) destabilisiert die symmetrische Dimeranordnung stark.

[0019] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung haben eine verminderte allergene Aktivität im Vergleich zu Wildtyp Phl p 7. Erfindungsgemäß wird die allergene Aktivität einer Probe bestimmt, indem die IgE-Antikörper bestimmt werden, die bei einem Testtier nach Verabreichung der Probe induziert werden. Die allergene Aktivität wird bevorzugt geeigneterweise mit in-vitro- oder in-vivo-Tests bestimmt. Die allergene Aktivität kann mit einem Hauttest bestimmt werden, wie von van Hage-Hamsten et al. in J. Allergy Clin. Immunol. 1999, 104, Seiten 969–977 oder von Pauli et al. in Clin. Exp. Allergy 2000, 30, Seiten 1076–1084 beschrieben. Die allergene Aktivität von Wildtyp Phl p 7 kann unter Verwendung von rekombinant erzeugtem Phl p 7 bestimmt werden, das aus der Aminosäuresequenz besteht, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist.

[0020] Bevorzugt ist die allergene Aktivität des Polypeptids geringer als 50% der allergenen Aktivität von Wildtyp Phl p 7. Bevorzugter ist die allergene Aktivität des Polypeptids geringer als 25% des Wildtypproteins. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform hat das Polypeptid im Wesentlichen keine allergene Aktivität. Allgemein ist die durch das Polypeptid der Erfindung induzierte Histaminfreisetzung signifikant vermindert im Vergleich zu der durch Phl p 7 induzierten Histaminfreisetzung. Ein bevorzugter in-vitro-Test zur Bestimmung der Histaminfreisetzung ist der Basophil-Histaminfreisetzungstest, wie von Vrtala et al. in J. Clin. Invest. 1997, 99, Seiten 1673–1681 beschrieben. Bevorzugt wird die Histaminfreisetzung um mindestens 25%, bevorzugter um mindestens 50%, am meisten bevorzugt um mindestens 75% reduziert, bestimmt bei der Konzentration an Allergen, bei der Phl p 7 eine maximale Histaminfreisetzung zeigt.

[0021] Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeigen eine verminderte Bindung an IgE-Antikörper von Lieschgraspollenallergie-Patienten im Vergleich zu Wildtyp Phl p 7 (SEQ ID Nr. 1). Die IgE bindende Aktivität ist bevorzugt um mindestens 25%, bevorzugter um mindestens 50%, am meisten bevorzugt um mindestens 75% reduziert. Rekombinantes Phl p 7, das im Wesentlichen aus der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz besteht, kann verwendet werden, um die IgE-Bindungsaktivität von Wildtyp Phl p 7 zu bestimmen. Die IgE-Bindung von Polypeptiden kann mit Western-Blot-Analyse oder Dot-Blot-Versuchen bestimmt werden unter Verwendung von Serum von Lieschgraspollenallergie-Patienten. Die Lieschgraspollenallergie wird diagnostiziert mit einer Krankheitsgeschichte, die auf Lieschgraspollenallergie hindeutet (z.B. jahreszeitliche Symptome der Allergie während der Blühperiode der Gräser), positive Hauttestreaktion auf Lieschgraspollenallergene und/oder Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen Lieschgraspollenallergene in Serum. Dot-Blots können quantitativ ausgewertet werden, indem die Menge an ¹²⁵I-markierten Antihuman-IgE-Antikörpern durch Gammazählung gemessen wird, wie beschrieben (Niederberger et al., J. Allergy Clin. Immunol. 1998, 102, 579–591).

[0022] Es wurde auch gefunden, dass die erfindungsgemäßen von Phl p 7 abgeleiteten Polypeptide in vivo eine IgG-Antikörperantwort induzieren. Daher enthalten die oben beschriebenen Polypeptide mindestens ein IgG-Epitop. Ein Polypeptid enthält mindestens ein IgG-Epitop, wenn es bei einem Menschen oder einem Testtier eine IgG-Antikörperantwort hervorrufen kann. Ein entsprechender Test zur Bestimmung einer IgG-Antwort wird in Beispiel 3 beschrieben. Bevorzugter sind diese IgG-Antikörper "blockierende Antikörper" oder "schützende Antikörper", die IgE-Antikörper an einer Bindung an Phl p 7 hindern. Eine signifikante Reduktion allergischer Symptome kann auf diese Weise erreicht werden.

[0023] Es wurde gefunden, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide, die Mutationen tragen entsprechend den durch die Aminosäuresequenzen SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 6 dargestellten Mutationen, unerwartete vorteilhafte Eigenschaften haben. Die in diesen Aminosäuresequenzen als Ziel ausgewählten Aminosäurepositionen können auch in anderen Zwei-EF-Handpollenallergenen substituiert oder deletiert werden. Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein mutiertes Polypeptid, das von einem Zwei-EF-Handpollenallergen abgeleitet ist, bei dem im Hinblick auf die Wildtypsequenz des Zwei-EF-Handpollenallergens Aminosäurepositionen substituiert oder deletiert wurden, die den Aminosäureresten entsprechen, die im Vergleich zu SEQ ID Nr. 1 in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 6 substituiert oder deletiert sind. Die Identifikation der Aminosäurepositionen in anderen Zwei-EF-Handpollenallergenen, die den Aminosäurepositionen entsprechen, die in irgendeiner der SEQ ID Nr. 2 bis 6 mutiert sind, liegt im Wissen des Fachmanns auf diesem Gebiet. Der Fachmann kann z.B. irgendeine der in SEQ ID Nr. 1 bis 6 gezeigten Sequenzen mit der Aminosäuresequenz eines gegebenen Zwei-EF-Handpollenallergens ausrichten bzw. abgleichen unter Verwendung des Programms Blast 2 sequences, wie oben beschrieben. Durch die Ausrichtung können die entsprechenden zu mutierenden Aminosäurepositionen leicht abgeleitet werden. Als Beispiel zeigt [Fig. 9](#) eine Ausrichtung von Phl p 7 und Aln g 4. Die zu substituierenden oder deletierenden Aminosäurepositionen entsprechen D17, E24, D52 und/oder E59 von SEQ ID Nr. 1. Diese

Positionen entsprechen D24, E31, D59 und E66 der Aminosäuresequenz von Aln g 4 (SEQ ID Nr. 7). Die von Zwei-EF-Handpollenallergenen abgeleiteten Polypeptide können in ein größeres Polypeptid aufgenommen werden oder an ein geeignetes Trägerprotein, wie KLH, gekuppelt werden. Sie können auch eine verminderte allergene Aktivität und IgE-Bindungskapazität im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypformen haben und eine IgG-Antwort induzieren, wie oben beschrieben. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Zwei-EF-Handpollenallergene sind bekannt:

Aln g 4 (Erle) (Hayek et al., J. Immunol. 1998, 161, 7031–7039)

Cyn d 7 (Bermudagrass) (Suphioglu et al., FEBS Lett. 1997, 402, 167–172)

Bra r 1 (Raps-Brassica) (Toriyama et al., FEBS Lett. 1998, 424, 234–238)

Bet v 4 (Birke) (Twardosz et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, 239, 197–204)

Ole e 3 (Olive) (Ledesma et al., Eur. J. Biochem. 1998, 258, 454–459).

[0024] Die Aminosäuresequenzen von Aln g 4, Cyn d 7, Ole e 3, Bet v 4 und Bra r 1 sind in SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10 bzw. SEQ ID Nr. 11 gezeigt. Die Aminosäure an Position 71 von SEQ ID Nr. 10 kann auch Alanin sein.

[0025] Es ist anzumerken, dass Polypeptide, die von anderen Zwei-EF-Handpollenallergenen als Phl p 7 abgeleitet sind, nur beansprucht werden, soweit sie Substitutionen oder Deletionen an den gleichen Aminosäurepositionen, wie in SEQ ID Nr. 2 bis 6 aufweisen.

[0026] Die Erfindung betrifft ein mutiertes Polypeptid, das von Aln g 4 abgeleitet ist, wobei im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 7 gezeigte Aminosäuresequenz die Aminosäuren an Position 31 und 66, bevorzugt an Position 24, 31 und 66, bevorzugter an Position 24, 31, 59 und 66 substituiert sind. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus den Aminosäuren 2 bis 44 oder 43 bis 85 von SEQ ID Nr. 7 besteht, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0027] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein mutiertes Polypeptid, das von Cyn d 7 abgeleitet ist, wobei im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 8 gezeigte Aminosäuresequenz die Aminosäuren an Position 26 und 61, bevorzugt an Position 19, 26 und 61, bevorzugter an Position 19, 26, 54 und 61 substituiert sind. Ein weiterer Aspekt ist ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus den Aminosäuren 2 bis 39 oder 38 bis 80 der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Aminosäuresequenz besteht, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0028] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein mutiertes Polypeptid, das von Ole e 3 abgeleitet ist, wobei im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 9 gezeigte Aminosäuresequenz die Aminosäuren an Position 30 und 65, bevorzugt an Position 23, 30 und 65, bevorzugter an Position 23, 30, 58 und 65 substituiert sind. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus den Aminosäuren 2 bis 43 oder 42 bis 84 der in SEQ ID Nr. 9 gezeigten Aminosäuresequenz besteht, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0029] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein mutiertes Polypeptid, das von Bet v 4 abgeleitet ist, wobei im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 10 gezeigte Aminosäuresequenz die Aminosäuren an Position 31 und 66, bevorzugt an Position 24, 31 und 66, bevorzugter an Position 24, 31, 59 und 66 substituiert sind. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus den Aminosäuren 2 bis 44 oder 43 bis 85 der in SEQ ID Nr. 10 gezeigten Aminosäuresequenz besteht, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0030] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein mutiertes Polypeptid, das von Bra r 1 abgeleitet ist, wobei im Hinblick auf die in SEQ ID Nr. 11 gezeigte Aminosäuresequenz die Aminosäuren an Position 25 und 60, bevorzugt an Position 18, 25 und 60, bevorzugter an Position 18, 25, 53 und 60 substituiert sind. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus den Aminosäuren 2 bis 38 oder 37 bis 79 der in SEQ ID Nr. 11 gezeigten Aminosäuresequenz besteht, gegebenenfalls an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0031] Wildtyp Phl p 7, der durch die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Aminosäuresequenz dargestellt wird und Proteine, die Wildtyp Phl p 7 enthalten, liegen nicht im Schutzbereich der Erfindung. Natürlich vorkommende Zwei-EF-Handpollenallergene oder rekombinante Proteine, die aus den gleichen Aminosäuren bestehen, werden in dieser Anmeldung nicht beansprucht (z.B. Bet v 4, Bra r 1, Aln g 4, Cyn d 7 etc.).

[0032] Die vorliegende Erfindung liefert auch Polynukleotidmoleküle, einschließlich DNA- und RNA-Molekülen, die die hier offenbarten Polypeptide codieren. Der Fachmann auf diesem Gebiet erkennt leicht, dass im

Hinblick auf die Degeneriertheit des genetischen Codes erhebliche Sequenzvariationen bei diesen Polynucleotidmolekülen möglich sind. Das Polynucleotid kann einzel- oder doppelsträngig sein. Es ist festzustellen, dass erfundungsgemäß wenn ein Polynucleotid, wie hier beschrieben, beansprucht wird, das, was beansprucht wird, sowohl der codierende Strang, der Antisense-Strang als auch die DNA als Doppelstrang ist, wobei codierender und Antisense-Strang miteinander über die jeweiligen Wasserstoffbindungen reassoziiert sind. Beansprucht wird auch die Messenger-RNA (mRNA), die die erfundungsgemäßen Polypeptide codiert. Messenger-RNA codiert ein Polypeptid unter Verwendung der gleichen Codons, wie die, die von DNA verwendet werden, mit der Ausnahme, dass jedes Thyminnucleotid (T) durch ein Uracilnucleotid (U) ersetzt ist.

[0033] Methoden zur Herstellung von DNA und RNA sind im Stand der Technik wohl bekannt. Ein Klon mit vollständiger Länge, der Phl p 7 codiert, kann mit üblichen Klonierungsverfahren erhalten werden. DNA, die Phl p 7 codiert, kann mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden unter Anwendung geeigneter spezifischer Primer. Die erfundungsgemäßen Polynucleotide können auch chemisch synthetisiert werden, z.B. unter Verwendung der Phosphoramiditmethode.

[0034] Die Erfindung betrifft weiterhin einen Vektor oder ein Plasmid, der/das ein Polynucleotid, wie oben beschrieben, enthält. Im Allgemeinen ist die ein Polypeptid der Erfindung codierende Polynucleotidsequenz operativ mit anderen genetischen Elementen, die für seine Expression erforderlich sind, was im Allgemeinen einen Transkriptionspromotor und Terminator einschließt, innerhalb eines Expressionsvektors verknüpft. Der Vektor enthält üblicherweise auch einen oder mehrere selektierbare Marker oder einen oder mehrere Replikationsur sprung, obwohl der Fachmann auf diesem Gebiet erkennt, dass in bestimmten Systemen selektierbare Marker auf getrennten Vektoren bereitgestellt werden können und die Replikation exogener DNA durch Integration in das Wirtszellgenom erfolgen kann. Die Selektion von Promotoren, Terminatoren, selektierbaren Markern, Vektoren und anderen Elementen ist eine Sache von Routineversuchen im Bereich des Wissens eines Fachmanns auf diesem Gebiet. Viele solcher Elemente werden in der Literatur beschrieben und sind von kommerziellen Anbietern erhältlich.

[0035] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem Vektor oder einem Plasmid der Erfindung transformiert oder transfiziert ist. Die Wirtszellen können prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein. Prokaryotische Wirtszellen, einschließlich von Stämmen der Bakterien *Escherichia coli*, *Bacillus* und anderen Gattungen sind nützliche Wirtszellen im Bereich der vorliegenden Erfindung. Techniken, um diese Werte zu transformieren und Fremd-DNA-Sequenzen, die darin kloniert sind, zu exprimieren, sind im Stand der Technik wohl bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

[0036] Die Wirtszellen der Erfindung können verwendet werden, um die erfundungsgemäßen Polypeptide herzustellen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß der Erfindung, das beinhaltet, dass Wirtszellen, wie oben beschrieben, unter solchen Bedingungen gezüchtet werden, dass das Polypeptid exprimiert wird, und gegebenenfalls das Polypeptid aus den Wirtszellen gewonnen wird. Wenn ein Polypeptid der Erfindung in Bakterien, wie *E. coli*, exprimiert wird, kann das Polypeptid im Cytoplasma enthalten sein, möglicherweise in Form unlöslicher Einschlussskörper. In diesem Fall werden die Zellen lysiert und die Einschlussskörper gewonnen und denaturiert, z.B. unter Verwendung von Guanidinithiocyanat oder Harnstoff. Das denaturierte Polypeptid kann dann wieder gefaltet werden, indem das Denaturierungsmittel verdünnt wird, z.B. durch Dialyse gegen eine Lösung von Harnstoff und eine Kombination von reduziertem und oxidiertem Glutathion und anschließende Dialyse gegen eine gepufferte Kochsalzlösung.

[0037] Transformierte oder transfizierte Wirtszellen werden gemäß üblichen Verfahren im Kulturmedium gezüchtet, das Nährstoffe und andere Komponenten enthält, die für das Wachstum der ausgewählten Wirtszellen erforderlich sind. Eine Vielzahl geeigneter Medien, einschließlich definierter Medien und komplexer Medien sind im Stand der Technik bekannt und enthalten im Allgemeinen eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle und Mineralien. Es ist bevorzugt, die erfundungsgemäßen Peptide auf $\geq 80\%$ Reinheit zu reinigen, bevorzugter $\geq 95\%$ Reinheit und besonders bevorzugt ist ein pharmazeutisch reiner Zustand, d.h. mehr als 99,9% rein im Hinblick auf kontaminierende Makromoleküle, insbesondere andere Proteine und Nucleinsäuren, und frei von infektiösen und pyrogenen Mitteln. Bevorzugt ist ein gereinigtes Polypeptid der Erfindung im Wesentlichen frei von anderen Polypeptiden. Das exprimierte rekombinante Polypeptid der Erfindung kann gereinigt werden unter Verwendung von Fraktionierungs- und/oder üblichen Reinigungsmethoden und -medien. Ammoniumsulfatfällung und saure oder chaotropie Extraktion können zur Fraktionierung von Proben verwendet werden. Die erfundungsgemäßen Polypeptide können auch durch Affinitätschromatographie isoliert werden unter Verwendung von Antikörpern, die gegen das Polypeptid gerichtet sind. Kürzere Polypeptide werden bevorzugt unter Verwendung von HPLC gereinigt. Methoden zur Reinigung von Proteinen werden z.B. in Methods in Enzymo-

logy, Bd. 182, Guide to Protein Purification, Academic Press New York 1990 und Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, Heidelberg 1994, beschrieben.

[0038] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch mit chemischer Synthese hergestellt werden, wie z.B. von Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963 und Etherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford 1989, beschrieben.

[0039] Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Verhütung einer allergischen Störung. Die Störung oder das Leid ist gewöhnlich eine Allergie gegen ein oder mehrere 2-EF-Handpollenallergene, z.B. gegen Phl p 7. Es wurde gefunden, dass Phl p 7 die meisten der relevanten IgE-Epitope der Familie der 2-EF-Handpollenallergene enthält. Daher können die Polypeptide verwendet werden zur Behandlung von Allergien gegen praktisch jedes 2-EF-Handpollenallergen. Bevorzugt ist das allergische Leiden, das behandelt werden soll, eine Allergie gegen mindestens eines der Proteine Bet v 4, Bra r 1, Aln g 4, Bra n 1, Cyn d 7, Ole e 3, Syr v 3 und/oder Phl p 7. Das Medikament kann für die therapeutische Behandlung eines allergischen Leidens oder für die prophylaktische Impfung verwendet werden, um die Entwicklung des Leidens zu verhindern.

[0040] Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung mit mindestens einem erfindungsgemäßen Polypeptid. Die Zusammensetzung kann weiterhin einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein Verdünnungsmittel enthalten. Bevorzugt wurde das Polypeptid der Erfindung an ein Trägermolekül, wie KLH, gekuppelt.

[0041] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein pharmazeutischer Kit, der mindestens ein Polypeptid der Erfindung enthält. Der Kit kann zwei oder mehrere verschiedene Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. In einer Ausführungsform enthält der Kit mindestens ein mutiertes Polypeptid, das von Phl p 7 abgeleitet ist und mindestens ein mutiertes Polypeptid, das von einem weiteren 2-EF-Handpollenallergen abgeleitet ist.

[0042] Andere Allergene von Lieschgraspollen oder von anderen Pollen und deren Epitopen können enthalten sein. Gemäß einem weiteren Aspekt kann das mutierte Polypeptid, das von Phl p 7 abgeleitet ist, eine Komponente in einer prophylaktischen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Impfung sein, die die wichtigsten Allergene von verschiedenen Allergenquellen enthält (Milben, Katze, Pollen, Pilze etc.).

[0043] Für die pharmazeutische Verwendung werden die erfindungsgemäßen Polypeptide für die orale oder parenterale, insbesondere subcutane Abgabe gemäß üblichen Methoden formuliert. Im Allgemeinen enthalten pharmazeutische Präparate ein Polypeptid der Erfindung in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, wie Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, 5% Dextrose in Wasser oder dgl. Formulierungen können weiterhin einen oder mehrere Hilfsstoffe, Konservierungsmittel, Löslichkeitsvermittler, Puffermittel, Albumin, um Proteinverlust an Glasoberflächen zu verhindern, etc. enthalten. Methoden zur Formulierung sind im Stand der Technik wohl bekannt und werden z.B. in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, Herausgeber, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19. Ausgabe 1995, offenbart. Therapeutische oder prophylaktische Dosen liegen im Allgemeinen in einem Bereich von 0,1 bis 100 µg pro Injektion in einem Volumen von 100 bis 200 µl, wobei die exakte Dosis von dem Arzt bestimmt wird gemäß akzeptierten Standards, wobei die Art und Schwere des zu behandelnden Zustands, die Merkmale des Patienten etc. in Betracht gezogen werden. Die Bestimmung der Dosen liegt im Bereich des Fachwissens auf diesem Gebiet. Die Menge kann variieren abhängig von der Behandlungsart. Während der Immuntherapiebehandlung können einzelne Dosen von etwa 25 µg bis 75 µg in einem Volumen von etwa 100 µl/Injektion verabreicht werden. Im Fall der oralen Verabreichung kann eine Dosis von 0,1 µg bis 50 mg in Betracht gezogen werden. Im Fall von Impfungen werden Patienten gewöhnlich nicht mehrere Male am Tag behandelt, außer bei einer "Rush-Immunotherapie". Übliche Immuntherapien schließen ungefähr 8 vorsaisonale Impfungen ein, die in Intervallen von 1 bis 2 Wochen verabreicht werden und die über einen Zeitraum von 2 bis 3 Jahren fortgesetzt werden. Bevorzugt werden 4 Injektionen pro Jahr mit einem Intervall von 3 Monaten über 3 bis 5 Jahre angewendet. In einer besonderen Ausführungsform ist mehr als ein Polypeptid in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten.

Beschreibung der Tabellen und Figuren:

Fig. 1

[0044] CD-Spektren von Phl p 7, von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden und Phl p 7 abgeleiteten Mutanten (M1.6, M2A, M4).

Fig. 2A, B

[0045] Reduktion der IgE-Bindungskapazität von von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten und von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden.

[0046] Auf Nitrocellulose geblottete rPhl p 7 (Bahn Phl p 7) und von rPhl p 7 abgeleitete Mutanten (Bahnen M1.6, M2A, M4) wurden mit Serum aus einem mit Phl p 7 sensibilisierten auf Graspollen allergischen Patienten sondiert. Gebundene IgE-Antikörper wurden mit ^{125}I -markierten Antihuman-IgE-Antikörpern nachgewiesen (**Fig. 2A**).

[0047] Auf Nitrocellulose gepunktete Phl p 7 und von Phl p 7 abgeleitete Mutanten (M1.6, M2A, M4) ebenso wie von Phl p 7 abgeleitete Peptide wurden mit Seren von 10 mit Phl p 7 sensibilisierten auf Graspollen allergischen Patienten sondiert. Gebundene IgE-Antikörper wurden mit ^{125}I -markierten Antihuman-IgE-Antikörpern nachgewiesen (**Fig. 2B**).

Fig. 3A, B

[0048] Induktion der Histaminfreisetzung aus Basophilen bei einem auf Lieschgraspollen allergischen Patienten. Granulozyten eines auf Lieschgraspollen allergischen Patienten wurden mit verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) von rPhl p 7 Wildtyp (P7), von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden (P1, P2), von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten (M4) oder anderen Antigenen (Hom s 4) inkubiert (**Fig. 3A**). Granulozyten des gleichen Patienten wurden auch mit verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) von KLH-gekuppeltem rPhl p 7 Wildtyp (P7-K), von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden (P1-K, P2-K) oder einer von Phl p 7 abgeleiteten Mutante (M4-K) inkubiert (**Fig. 3B**). Der Prozentanteil an in den zellfreien Kulturüberstand freigesetztem Histamin ist auf der y-Achse aufgetragen.

Fig. 4

[0049] Kaninchen-Antiseren gegen KLH-gekoppelte Peptide oder gegen eine gekuppelte und eine ungekoppelte Phl p 7-Mutante reagieren mit vollständigem Phl p 7 Wildtyp. Auf Nitrocellulose gepunktete Phl p 7 und von Phl p 7 abgeleitete Peptide oder Mutanten wurden mit dem entsprechenden Kaninchen-Antiserum in verschiedenen Konzentrationen (1:500, 1:1000, 1:2000) sondiert. Gebundene Kaninchen-Antikörper wurden mit ^{125}I -Esel-Antikaninchen-Antikörpern nachgewiesen.

Fig. 5

[0050] Kaninchen-Antiseren gegen KLH-gekoppelte Peptide oder gegen eine gekuppelte und eine ungekoppelte Phl p 7-Mutante reagieren mit einem mit Phl p 7 kreuzreaktiven Calciumbindungsprotein aus Erlenpollen, Aln g 4.

[0051] Auf Nitrocellulose gepunktetes Aln g 4 wurde mit Kaninchen-Antiserum (anti-M4, anti-M4-KLH, anti-P1-KLH, anti-P2-KLH) sondiert. Gebundene Kaninchen-Antikörper wurden mit ^{125}I -Esel-Antikaninchen-Antikörpern nachgewiesen.

Fig. 6 (Tabelle 1)

[0052] Eigenschaften von zwei nicht allergenen von Phl p 7 abgeleiteten synthetischen Peptiden und drei von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten mit verminderter Allergenizität. Position, Sequenz, Länge, Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Faltung sind angegeben. Mutierte Aminosäuren sind in fetten Buchstaben gedruckt.

Fig. 7 (Tabelle 2)

[0053] Hautreaktionen vom Soforttyp gegen komplettes rPhl p 7, von Phl p 7 abgeleitete Peptide und eine von Phl p 7 abgeleitete Mutante (M4). Drei auf Lieschgraspollen allergische Patienten (#1–3) und eine nicht allergische Person (#4) wurden getestet. Die mittleren Quaddeldurchmesser (mm) sind für zwei verschiedene Konzentrationen von rPhl p 7, für Lieschgraspollenextrakt, Histamin und zwei verschiedene Konzentrationen der zwei Peptide und der Mutante aufgetragen.

Fig. 8 (Tabelle 3)

[0054] Hemmung von Kaninchen-anti-Phl-p-7-Peptid und Kaninchen-anti-Phl-p-7-Mutantenantiseren der Serum-IgE-Bindung bei auf Graspollen allergischen Patienten gegen rPhl p 7.

Fig. 9

[0055] Ausrichtung der Aminosäuresequenzen von Phl p 7 und Aln g 4. Die Aminosäurereste, die bevorzugt in 2-EF-Handpollenallergenen substituiert oder deletiert sind, sind fett gedruckt.

[0056] Die Erfindung wird weiter durch die folgenden nicht beschränkenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

[0057] Charakterisierung der zwei Peptide, die die vollständige N-terminale oder C-terminale Calciumbindungsdomäne von Phl p 7 und der von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten aufweisen mit Aminosäureaustauschen in der ersten und der zweiten EF-Hand.

Peptidsynthese

[0058] Peptide wurden synthetisiert unter Verwendung der Fmoc-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-Strategie mit HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat)-Aktivierung (0,1 mmol Zyklen in kleinem Maßstab) auf dem Peptidsyntheseautomaten von Applied Biosystems Modell 433A (Foster City, CA). Vorbeladene PEG-PS-(Polyethylenglycol-Polystyrol)-Harze (0,15–0,2 mmol/g Beladung) (von Septive Biosystems, Warrington, GB) wurden als Festphase verwendet, um die Peptide aufzubauen. Chemikalien wurden von Applied Biosystems erworben. Die Kupplung der Aminosäuren wurde bestätigt durch Überwachung der Leitfähigkeit in einem Feedback-Kontrollsysteem. Ein Cysteinrest wurde jedem Peptid zugefügt, um die Kupplung der Peptide an die Träger zu erleichtern. Die Peptide wurden von den Harzen mit einer Mischung aus 250 µl dest. Wasser, 250 µl Triisopropylsilan (Fluka, Buchs, Schweiz), 9,5 ml TFA 2 Stunden lang abgespalten und in tert.-Butylmethylether (Fluka, Buchs, Schweiz) ausgefällt. Die Identität der Peptide wurde mit Massenspektrometrie untersucht und sie wurden auf eine Reinheit von mehr als 90% mit präparativer HPLC (PiChem, Graz, Österreich) gereinigt.

Erzeugung, Expression und Reinigung von von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten:

[0059] Punktmutationen wurden in die cDNA von Phl p 7 eingeführt, in dem Expressionsvektor pET17b kloniert unter Verwendung eines doppelsträngigen Punktmutagenese-Chamäleonkits (Stratagene, East Kew, Australien). Spezifische Primer wurden entwickelt, um Phl p 7 an spezifischen Stellen zu mutieren. Die folgenden Mutationen wurden gemacht: Mutante 1.6 (SEQ ID Nr. 4): 24E→24A (erste EF-Hand); 59E→59A (zweite EF-Hand). Mutante 2A (SEQ ID Nr. 5): 17D→A, 24E→24A (erste EF-Hand); 59E→59A (zweite EF-Hand). Mutante 4 (SEQ ID Nr. 6): 17D→A, 24E→24A (erste EF-Hand); 52D→52A, 59E→59A (zweite EF-Hand). Die rekombinanten von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten wurden in Escherichia coli BL21 (DE3) exprimiert. E. coli wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,4 in LB-Medium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, gezüchtet. Die Expression von rekombinanten Proteinen wurde induziert, indem Isopropyl-β-thiogalactopyranosid auf eine Endkonzentration von 1 mM zugegeben wurde und für weitere 4 Stunden bei 37°C gezüchtet wurde. E.-coli-Zellen aus einer 500-ml-Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet, wieder in 10 ml PBS suspendiert und unter Verwendung eines Ultraturrax (Ika, Heidelberg, Deutschland) homogenisiert. Eine Fraktion, die lösliche Proteine enthielt, wurde nach 30-minütiger Zentrifugation des Homogenisats bei 4°C mit 10.000 U/min erhalten (Sorval, RC5C, SS34-Rotor). Die Anreicherung des Proteins in der löslichen Fraktion und die Entfernung kontaminierender Proteine wurden durch Zugabe von 70% G/V Ammoniumsulfat zu der löslichen E.-coli-Fraktion und Zentrifugation (18.000 U/min, Sorval SS34, 4°C, 30 Minuten) erreicht. Die Fraktion mit der löslichen von Phl p 7 abgeleiteten Mutante wurde gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert, wieder in 50 ml Puffer A (25 mM Imidazol, 1 mM β-Mercaptoethanol, pH = 7,4) suspendiert und auf eine DEAE-Anionenaustauschsäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgebracht. Die Mutante wurde mit einem NaCl-Gradienten (Puffer A, der 500 mM NaCl enthält) bei 200 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen, die reine von Phl p 7 abgeleitete Mutante enthielten, wurden zusammengefasst, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Proteinproben wurden auf ihre Reinheit analysiert mit Gelelektrophorese auf Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel (SDS-PAGE) und Proteinfärbung.

Kupplung von Peptiden und der Mutante (M4) an KLH

[0060] Mit HPLC gereinigte Peptide oder die von Phl p 7 abgeleitete Mutante ebenso wie Phl p 7 Wildtyp wurden an KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin, MW $4,5 \times 10^3$ bis $1,3 \times 10^7$, Pierce, Rockford, IL) gemäß der Anweisung des Herstellers gekuppelt und gereinigt unter Verwendung eines Conjugation Kit (Sigma, St. Louis).

Analyse der Sekundärstruktur (CD)

[0061] CD-Messungen wurden ausgeführt an einem Jasco J-715-Spektropolarimeter unter Verwendung einer Zelle mit einer Weglänge von 0,1 cm, die bei 20°C equilibriert worden war. Die Spektren wurden mit 0,5 nm Auflösung bei einer Scan-Geschwindigkeit von 100 nm/min aufgezeichnet und resultierten aus dem Durchschnitt von 3 Scans. Die Endspektren wurden bezüglich der Grundlinie korrigiert, indem die entsprechenden MilliQ-Spektren, die unter identischen Bedingungen erhalten worden waren, abgezogen wurden. Die Ergebnisse wurden mit dem Secondary Structure Estimation Programm J-700 angepasst.

[0062] Die Spektren im tiefen UV zeigen, dass die Punktmutanten einen erheblichen Anteil einer α -Helixstruktur aufweisen. Die Spektren sind gekennzeichnet durch Minima bei 224 und 208 nm und ein starkes Maximum unter 200 nm. Der Anteil an α -Helix ist identisch für verschiedene Punktmutationen. Das native rekombinante Phl p 7 zeigte ein signifikant größeres α -Helixsignal. Eine zweite Analyse, bei der Phl p 7 und die Punktmutante-4 verglichen wurden, ergab, dass im Gegensatz zu dem normalisierten Spektrum von rPhl p 7 das Signal für Mutante 4 signifikant um ungefähr 20% verringert ist. Weiterhin ist das Minimum bei 208 nm leicht verschoben zu einer kleineren Wellenlänge und die Durchkreuzung der Kurve bei 0 ist unter 200 nm. Diese Erkenntnisse deuten auf einen steigenden Anteil einer Random-coil Sekundärstruktur innerhalb des Mutanten-4-Proteins.

[0063] Das N-terminale Peptid zeigte eine Random-coil Sekundärstruktur mit charakteristischen Minima bei 200 und 225 nm. Dies deutet auf die Tatsache, dass die Trunkierung des intakten rPhl-p-7-Proteins nicht nur zur Zerstörung des gesamten Aufbaus führt, sondern weiterhin die Faltung der einzelnen EF-Hand-Domäne beeinflusst. Dies könnte auch für das entsprechende C-terminale Peptid zutreffen, da dieses Protein nicht nur ungefaltet war, sondern weiterhin eine signifikant verringerte Löslichkeit und Ausfällung zeigte.

Beispiel 2

[0064] Die Fragmentierung von Phl p 7 an spezifischen Stellen führt zum Verlust der IgE-Bindungskapazität, die Mutation von Phl p 7 an spezifischen Stellen der Calciumbindungsdomänen führt zu einer verminderten IgE-Bindungskapazität.

- a) Die von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten und die von Phl p 7 abgeleiteten Peptide zeigen eine verminderte IgE-Bindung:

[0065] Die IgE-Bindungskapazität von gereinigten von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten (M1.6, M2A, M4) wurde durch Western-Blot-Analyse mit der von Phl p 7 Wildtyp verglichen unter Verwendung von Serum eines gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten (**Fig. 2A**) ebenso wie durch Dot-Blot-Versuche unter Verwendung von Seren von 10 gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten (**Fig. 2B**). Die Western-Blot-Analyse zeigte eine verminderte IgE-Bindungskapazität für alle Mutanten verglichen mit Phl p 7. Die stärkste Reduktion wurde für die Mutante M4 nachgewiesen (**Fig. 2A**). Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die Dot-Blot-Versuche: nur 4 von 10 Patienten zeigten eine schwache IgE-Bindung für M4, 5 von 10 reagierten mit M2A, 6 von 10 mit M1.6 (**Fig. 2B**). Die doppelte Mutante (M4) zeigte damit die stärkste Reduktion der IgE-Bindungskapazität.

[0066] Die IgE-Bindungskapazität der von Phl p 7 abgeleiteten Peptide wurde mit der von Phl p 7 Wildtyp mit Dot-Blot-Versuchen verglichen unter Verwendung von Seren von 10 gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten (**Fig. 2B**). Für beide Peptide war die IgE-Bindungskapazität vollständig erloschen, als sie mit Serum von 10 gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten getestet wurde.

- b) Verminderte Histaminfreisetzung aus Basophilen mit Phl p 7-Mutante und Peptiden

[0067] Als nächstes wurden die von Phl p 7 abgeleiteten Peptide und die von Phl p 7 abgeleitete Mutante mit Phl p 7 Wildtyp verglichen bezüglich der Kapazität, eine Histaminfreisetzung aus Basophilen bei einer gegen Lieschgraspollen allergischen Person zu induzieren.

[0068] Granulozyten wurden aus heparinisierten Blutproben einer gegen Lieschgraspollen allergischen Person isoliert mit Dextransedimentation. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (10^{-6} bis $10 \mu\text{g/ml}$) jedes Peptids oder der Mutante und, für Kontrollzwecke, mit rPhl p 7 Wildtyp inkubiert. Histamin, das in den zellfreien Kulturüberstand freigesetzt wurde, wurde mit Radioimmunoassay (Immunotech, Marseille, Frankreich) bestimmt. Das gesamte Histamin wurde nach Einfrieren und Auftauen der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

[0069] Wie in **Fig. 3** ausgeführt, wurde gefunden, dass keines der Peptide (gekuppelt oder ungekuppelt) eine Histaminfreisetzung bis zu einer Konzentration von $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ induzierte. Die von Phl p 7 abgeleitete Mutante M4 induzierte eine dosisabhängige Freisetzung von Histamin mit einer maximalen Freisetzung bei einer Konzentration von $10^{-3} \mu\text{g/ml}$, wohingegen Phl p 7 Wildtyp eine maximale Histaminfreisetzung schon bei einer Konzentration von $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ induzierte. Die Kupplung an KLH erhöhte die allergene Aktivität der Mutante und der Peptide nicht (**Fig. 3B**).

c) Reduzierte allergene in-vivo-Aktivität der Mutante und der Peptide

[0070] Ein in-vivo-Testen bei gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten bestätigte die verlorene allergene Aktivität der von Phl p 7 abgeleiteten Peptide und die verminderte Allergenizität der von Phl p 7 abgeleiteten Mutante M4.

[0071] Die allergene in-vivo-Aktivität der Peptide und der Mutante wurde mit einem Haut-Prick-Test (SPT) bei 3 gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten und einer nicht atopischen Person untersucht. SPTs wurden an den Vorderarmen der Personen durchgeführt. Aliquots mit jeweils $20 \mu\text{l}$, die zwei Konzentrationen von komplettem rPhl p 7 oder der von Phl p 7 abgeleiteten Mutante M4 ($2 \mu\text{g/ml}$, $8 \mu\text{g/ml}$) enthielten, ebenso wie zwei Konzentrationen der von Phl p 7 abgeleiteten Peptide ($1 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$) wurden angewendet. Zusätzlich wurden standardisierte Haut-Prick-Lösungen (Lieschgraspollenextrakt und Histamin) (Allergopharma, Reinbeck, Deutschland) getestet. Die Reaktionen wurden 20 Minuten nach dem SPT durch Fotografie aufgezeichnet und indem der mit einem Kugelschreiber umrundete Quaddelbereich mit einem Klebeband auf Papier übertragen wurde. Der mittlere Quaddeldurchmesser (Dm) wurde berechnet, indem der maximale Längs- und Querdurchmesser gemessen wurde und die Summe durch 2 geteilt wurde.

[0072] Haut-Prick-Tests wurden bei 3 gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten und einer nicht allergischen Person mit rPhl p 7, von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden und einer von Phl p 7 abgeleiteten Mutante M4 (Tabelle 3) durchgeführt. Keines der Peptide induzierte irgendwelche sofortigen Hautreaktionen, wenn es in einer Konzentration von $4 \mu\text{g/ml}$ aufgebracht wurde, wohingegen Phl p 7 Wildtyp schon bei einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ Hautreaktionen vom Soforttyp induzierte. M4 induzierte Hautreaktionen vom Soforttyp, die mäßig schwächer waren als die, die von Phl p 7 Wildtyp induziert wurden (mittlerer Quaddeldurchmesser, der von Phl p 7 bei einer Konzentration von $8 \mu\text{g/ml}$ induziert wurde: $9,3 \text{ mm}$; mittlerer Quaddeldurchmesser, der von M4 bei einer Konzentration von $8 \mu\text{g/ml}$ induziert wurde: 7 mm). Alle gegen Lieschgraspollen allergischen Patienten zeigten Hautreaktionen vom Soforttyp gegen Lieschgraspollenextrakt. Die nicht allergische Person zeigte keine Reaktionen gegen Lieschgraspollenextrakt, rPhl p 7, die von Phl p 7 abgeleiteten Peptide oder die von Phl p 7 abgeleitete Mutante (Tabelle 3: #4). Alle Personen reagierten nach dem Test mit Histamin, der als positive Kontrolle verwendet wurde (Tabelle 3).

Beispiel 3

[0073] Immunisierung mit von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden und der von Phl p 7 abgeleiteten Mutante induziert IgG-Antikörper, die rPhl p 7 Wildtyp ebenso wie ein kreuzreaktives Allergen aus Erle, Aln g 4, erkennen.

[0074] Um zu testen, ob die Immunisierung mit von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden oder der von Phl p 7 abgeleiteten Mutante M4 IgG-Antikörper induziert, die mit dem vollständigen Phl p 7-Molekül und mit Phl p 7-kreuzreaktiven Allergenen reagieren, wurden Kaninchen mit Phl p 7 Wildtyp, den Peptiden oder der Phl p 7-Mutante ebenso wie mit KLH konjugierten Peptiden/Proteinen unter Verwendung von Freund's Adjuvans immunisiert. 8 Kaninchen wurden mit einem Peptid-KLH-Konjugat, dem Mutanten-KLH-Konjugat, Phl p 7-KLH-Konjugat, unkonjugierten Peptiden, der Mutante bzw. dem Phl p 7 Wildtyp immunisiert, ($200 \mu\text{g}/\text{Injektion}$) unter Verwendung von Freund's komplettem und inkomplettem Adjuvans (Charles River, Kißlegg, Deutschland). Serumproben wurden in Intervallen von 4 Wochen erhalten. Die Seren wurden bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

[0075] Die Reaktivität der durch Peptid induzierten IgG-Antikörper und der durch die Phl p 7-Mutante induzierten IgG-Antikörper auf rPhl p 7 Wildtyp und ein kreuzreaktives Allergen wurden mit Dot-Blot-Versuchen un-

tersucht. Phl p 7 Wildtyp ebenso wie das entsprechende Immunogen (Peptid 1, Peptid 2, Mut-4) wurden auf Nitrocellulosestreifen getupft (1 µg/Punkt). Die Streifen wurden verschiedenen Verdünnungen des Kaninchen-Antiserums ausgesetzt (1:500, 1:1000, 1:2000).

[0076] In gleicher Weise wurde rekombinantes Aln g 4, ein mit Phl p 7 kreuzreaktives Calcium bindendes Allergen aus Erle, auf Nitrocellulosestreifen getupft und die Streifen wurden einem 1:1000 verdünnten Kaninchen-Antiserum ausgesetzt. Gebundene Kaninchen-Antikörper wurden mit einem 1:1000 verdünnten ¹²⁵I-markierten Esel-Antikaninchen-Antiserum (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.

[0077] Die an KLH gekuppelten Peptide induzierten IgG-Anti-Phl-p-7-Antikörperantworten ([Fig. 4](#)) ebenso wie die von Phl p 7 abgeleitete Mutante (M4, gekuppelt und ungekuppelt). In gleicher Weise erkannten Kaninchen-Antiseren, die gegen M4, M4-KLH und die gekuppelten Peptide erzeugt worden waren, das mit Phl p 7 kreuzreaktive Allergen Aln g 4 ([Fig. 5](#)).

Beispiel 4

[0078] Antipeptid- und Antimutanten-Antiseren hemmen die Bindung von Serum-IgE von gegen Graspollen allergischen Patienten an komplettes rPhl p 7.

[0079] Die Fähigkeit von Anti-Phl-p-7-Peptid- und Anti-Phl-p-7-Mutantenantikörpern, die Bindung des Serum-IgE's von allergischen Patienten gegen vollständiges rPhl p 7 zu hemmen, wurde mit einem ELISA-Konkurrenztest untersucht unter Verwendung von Seren aus 4 gegen Graspollen allergischen Patienten (Tabelle 3).

[0080] Die Fähigkeit von durch Peptid oder Mutante induziertem Kaninchen-IgG die Bindung von IgE aus allergischen Patienten an vollständiges Phl p 7 zu hemmen, wurde mit einem ELISA-Konkurrenztest untersucht. ELISA-Platten (Nunc Maxisorp, Rokslide, Dänemark) wurden mit rPhl p 7 (1 µg/ml) beschichtet und entweder mit einer 1:250-Verdünnung von jedem der Antipeptid-Antiseren (anti-P1-KLH, anti-P2-KLH), dem Antimutanten-Antiserum (anti-M4-KLH) und, für Kontrollzwecke, mit dem entsprechenden Präimmunserum vorinkubiert. Nach dem Waschen wurden die Platten mit 1:3 verdünnten Seren aus 4 mit Phl p 7 sensibilisierten gegen Graspollen allergischen Patienten inkubiert und gebundene IgE-Antikörper wurden mit monoklonalen Ratten-Anti-human-IgE-Antikörpern (Pharmingen, San Diego, CA), die 1:1000 verdünnt waren, und anschließend 1:2000 verdünntem HRP-gekoppeltem Schaf-Antiratten-Ig-Antiserum (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nachgewiesen. Der Prozentanteil Hemmung der IgE-Bindung, der durch Vorinkubation mit den Antipeptid- oder Antimutanten-Antiseren erreicht wurde, wurde wie folgt berechnet: % Hemmung der IgE-Bindung = $100 - \frac{OD_i}{OD_p} \times 100$. OD_i und OD_p bedeuten die Extinktionen nach Vorinkubation mit Rattenimmun- bzw. Präimmunserum.

[0081] Die stärkste Hemmung der IgE-Bindung wurde nach Präinkubation mit Antipeptid 2 beobachtet (47% durchschnittliche Hemmung). Antimutanten-KLH-gekuppelte Antikörper zeigten eine geringere Kapazität, die Serum-IgE-Bindung an Phl p 7 zu hemmen (23,4% durchschnittliche Hemmung). Die Hemmung der Serum-IgE-Bindung nach Vorinkubation mit der Antimutante konnte in zwei von vier Seren nachgewiesen werden (durchschnittliche Hemmung 5,6%) und nur bei einem von vier Seren nach Präinkubation mit Antipeptid 1.

Sequenzprotokoll

<110> BIOMAY Produktions- und Handels-Aktiengesellschaft

<120> Hypoallergene Impfstoffe gegen Allergie basierend auf dem Lieschgraspollenallergen
Phl p 7

<130> Phl p 7

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 78

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 1

Met Ala Asp Asp Met Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr Asn Gly
1 5 10 15

Asp Gly Lys Ile Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Ala Leu Arg Thr Leu
20 25 30

Gly Ser Thr Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu Ile Asp
35 40 45

Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Asp Phe Asn Glu Phe Ile Ser Phe Cys
50 55 60

Asn Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
65 70 75

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Peptid 1

<400> 2

Ala Asp Asp Met Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr Asn Gly Asp
1 5 10 15

Gly Lys Ile Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Ala Leu Arg Thr Leu Gly
20 25 30

Ser Thr Ser Ala
35

<210> 3

<211> 43

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Peptid 2

<400> 3

Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu Ile Asp Thr Asp Gly
1 5 10 15

Asp Gly Phe Ile Asp Phe Asn Glu Phe Ile Ser Phe Cys Asn Ala Asn
20 25 30

Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
35 40

<210> 4

<211> 78

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mutante 1.6

<400> 4

Met Ala Asp Asp Met Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr Asn Gly
1 5 10 15

Asp Gly Lys Ile Ser Leu Ser Ala Leu Thr Asp Ala Leu Arg Thr Leu
20 25 30

Gly Ser Thr Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu Ile Asp

35

40

45

Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Asp Phe Asn Ala Phe Ile Ser Phe Cys
 50 55 60

Asn Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
 65 70 75

<210> 5

<211> 78

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mutante 2A

<400> 5

Met Ala Asp Asp Met Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr Asn Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ile Ser Leu Ser Ala Leu Thr Asp Ala Leu Arg Thr Leu
 20 25 30

Gly Ser Thr Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu Ile Asp
 35 40 45

Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Asp Phe Asn Ala Phe Ile Ser Phe Cys
 50 55 60

Asn Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
 65 70 75

<210> 6

<211> 78

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mutante 4

<400> 6

Met Ala Asp Asp Met Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr Asn Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ile Ser Leu Ser Ala Leu Thr Asp Ala Leu Arg Thr Leu
 20 25 30

Gly Ser Thr Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu Ile Asp
 35 40 45

Thr Asp Gly Ala Gly Phe Ile Asp Phe Asn Ala Phe Ile Ser Phe Cys
 50 55 60

Asn Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
 65 70 75

<210> 7

<211> 85

<212> PRT

<213> Alnus glutinosa

<400> 7

Met Ala Asp Asp His Pro Gln Asp Gln Ala Glu His Glu Arg Ile Phe
 1 5 10 15

Lys Cys Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Ala Ser Glu Leu
 20 25 30

Gly Asp Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ser Val Thr Pro Asp Glu Val Lys
 35 40 45

His Met Met Ala Glu Ile Asp Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Ser Phe
 50 55 60

Gln Glu Phe Thr Asn Phe Ala Arg Ala Asn Arg Gly Leu Val Lys Asp
 65 70 75 80

Val Ala Lys Ile Phe
 85

<210> 8

<211> 80

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 8

Met Ala Asp Thr Gly Asp Met Glu His Ile Phe Lys Arg Phe Asp Thr
 1 5 10 15

Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Leu Ala Glu Leu Thr Asp Ala Leu Arg
 20 25 30

Thr Leu Gly Ser Thr Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Met Met Ala Glu
 35 40 45

Ile Asp Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Asp Phe Asp Glu Phe Ile Ser
 50 55 60

Phe Cys Asn Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
 65 70 75 80

<210> 9

<211> 84

<212> PRT

<213> olea europaea

<400> 9

Met Ala Asp Asp Pro Gln Glu Val Ala Glu His Glu Arg Ile Phe Lys
 1 5 10 15

Arg Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Ser Ser Glu Leu Gly
 20 25 30

Glu Thr Leu Lys Thr Leu Gly Ser Val Thr Pro Glu Glu Ile Gln Arg
 35 40 45

Met Met Ala Glu Ile Asp Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Ser Phe Glu
 50 55 60

Glu Phe Thr Val Phe Ala Arg Ala Asn Arg Gly Leu Val Lys Asp Val
 65 70 75 80

Ala Lys Ile Phe

<210> 10

<211> 85

<212> PRT

<213> Betula pendula

<400> 10

Met Ala Asp Asp His Pro Gln Asp Lys Ala Glu Arg Glu Arg Ile Phe
 1 5 10 15

Lys Arg Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Ala Ala Glu Leu
 20 25 30

Gly Glu Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ser Ile Thr Pro Asp Glu Val Lys
 35 40 45

His Met Met Ala Glu Ile Asp Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Ser Phe
 50 55 60

Gln Glu Phe Thr Asp Phe Gly Arg Ala Asn Arg Gly Leu Leu Lys Asp
 65 70 75 80

Val Ala Lys Ile Phe
 85

<210> 11

<211> 79

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 11

Met Ala Asp Ala Glu His Glu Arg Ile Phe Lys Lys Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Gly Lys Ile Ser Ala Ala Glu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Lys
 20 25 30

Leu Gly Ser Val Thr Pro Asp Asp Val Thr Arg Met Met Ala Lys Ile
 35 40 45

Asp Thr Asp Gly Asp Gly Asn Ile Ser Phe Gln Glu Phe Thr Glu Phe
 50 55 60

Ala Ser Ala Asn Pro Gly Leu Met Lys Asp Val Ala Lys Val Phe
 65 70 75

Patentansprüche

1. Mutiertes Polypeptid abgeleitet von dem Pollenallergen Phl p 7 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Sequenzen, die in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6 gezeigt sind, wobei das Polypeptid eine verminderte allergene Aktivität hat im Vergleich zu Wildtyp Phl p 7.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, das eine IgG-Antwort bei einem Säugetier induzieren kann.
3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das eine Histaminfreisetzung induziert, die signifikant geringer ist als bei dem Wildtyp Phl p 7.
4. Polynucleotid, das ein Polypeptid nach Anspruch 1 codiert.
5. Vektor oder Plasmid, der/das ein Polynucleotid nach Anspruch 4 enthält.
6. Wirtszelle, die mit einem Vektor oder einem Plasmid gemäß Anspruch 5 transformiert oder transfiziert ist.
7. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das beinhaltet, dass Wirtszellen gemäß Anspruch 6 unter Bedingungen gezüchtet werden, unter denen das Polypeptid exprimiert

wird, und gegebenenfalls das Polypeptid aus den Wirtszellen gewonnen wird.

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das eine chemische Synthese des Polypeptids beinhaltet.

9. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Verhütung eines allergischen Leidens.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei das allergische Leiden eine Allergie gegen ein Zwei-EF-Hand-pollenallergen ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das allergische Leiden eine Allergie gegen Phl p 7 ist.

12. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das allergische Leiden eine Allergie gegen ein Allergen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bet v 4, Bra r 1, Aln g 4, Bra n 1, Cyn d 7, Ole e 3, Syr v 3 und/oder Phl p 7 ist.

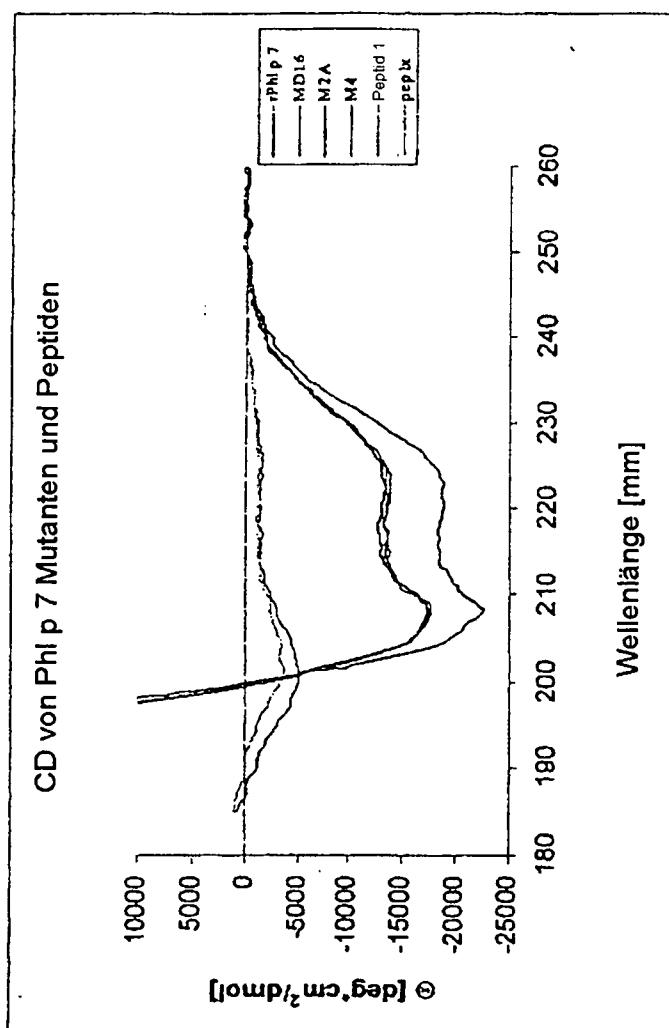
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei das Arzneimittel zur prophylaktischen Impfung verwendet wird.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein pharmazeutisch annehmbares Verdünnungsmittel.

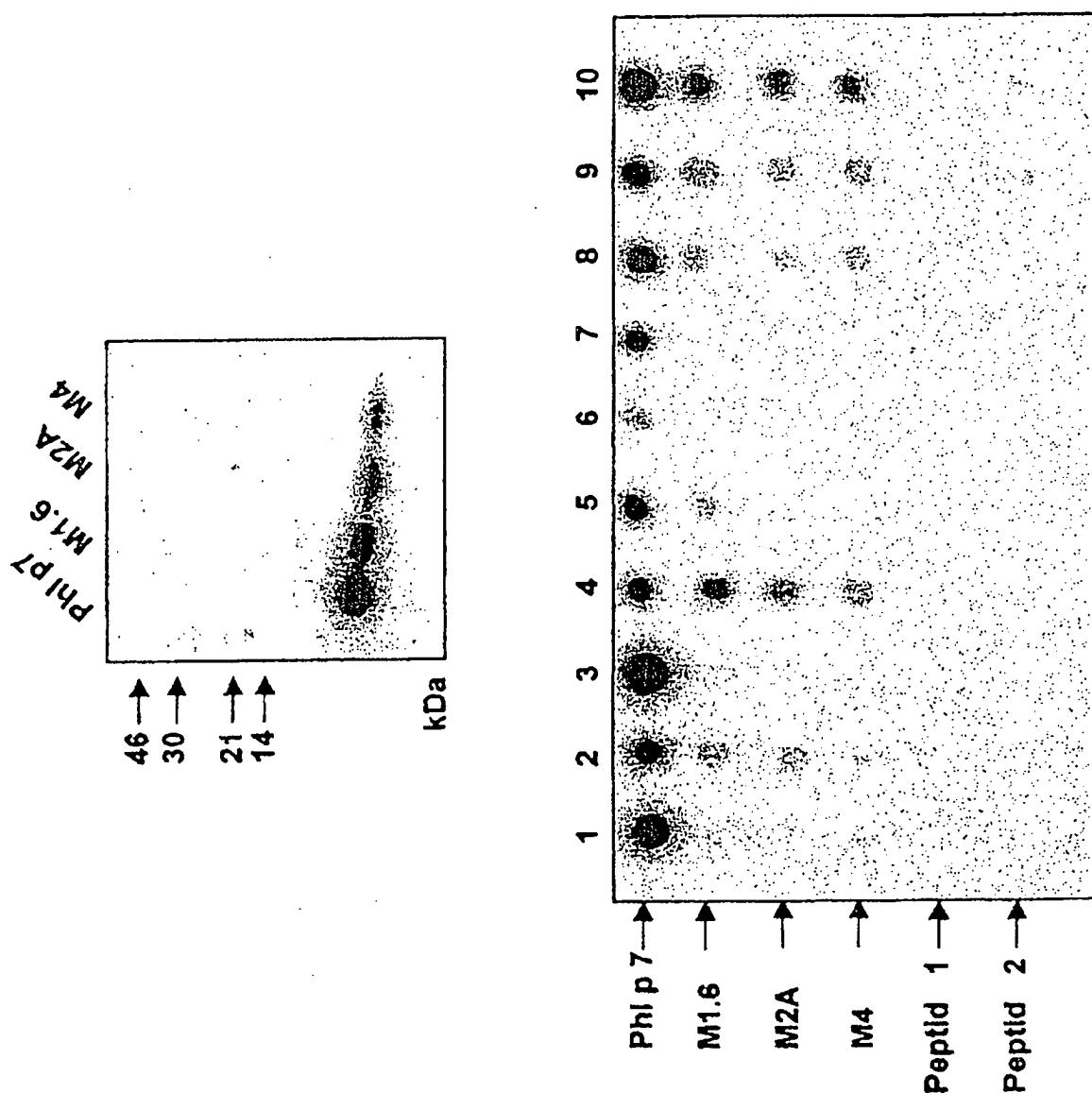
15. Pharmazeutischer Kit enthaltend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 14.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

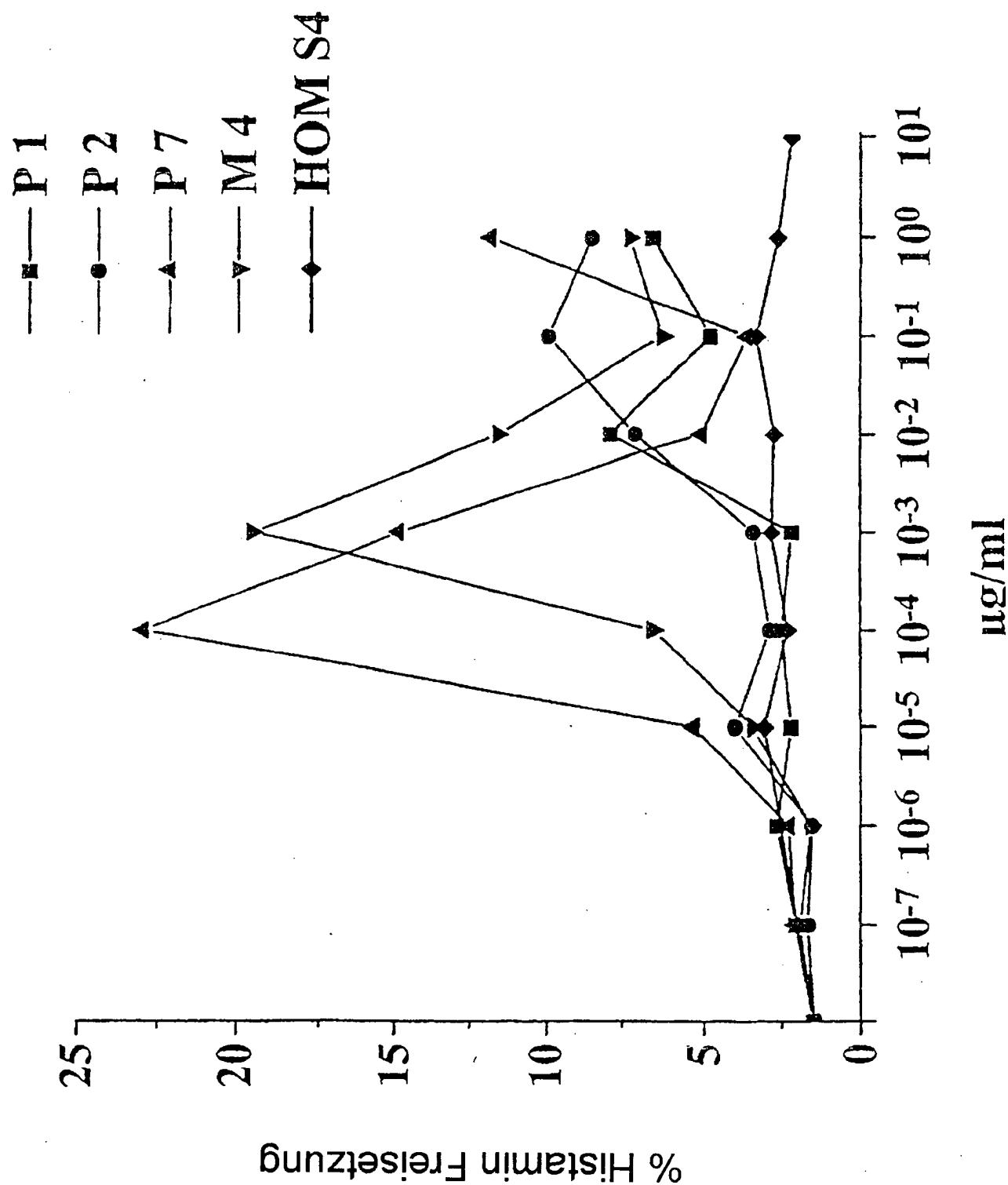
Figur 1



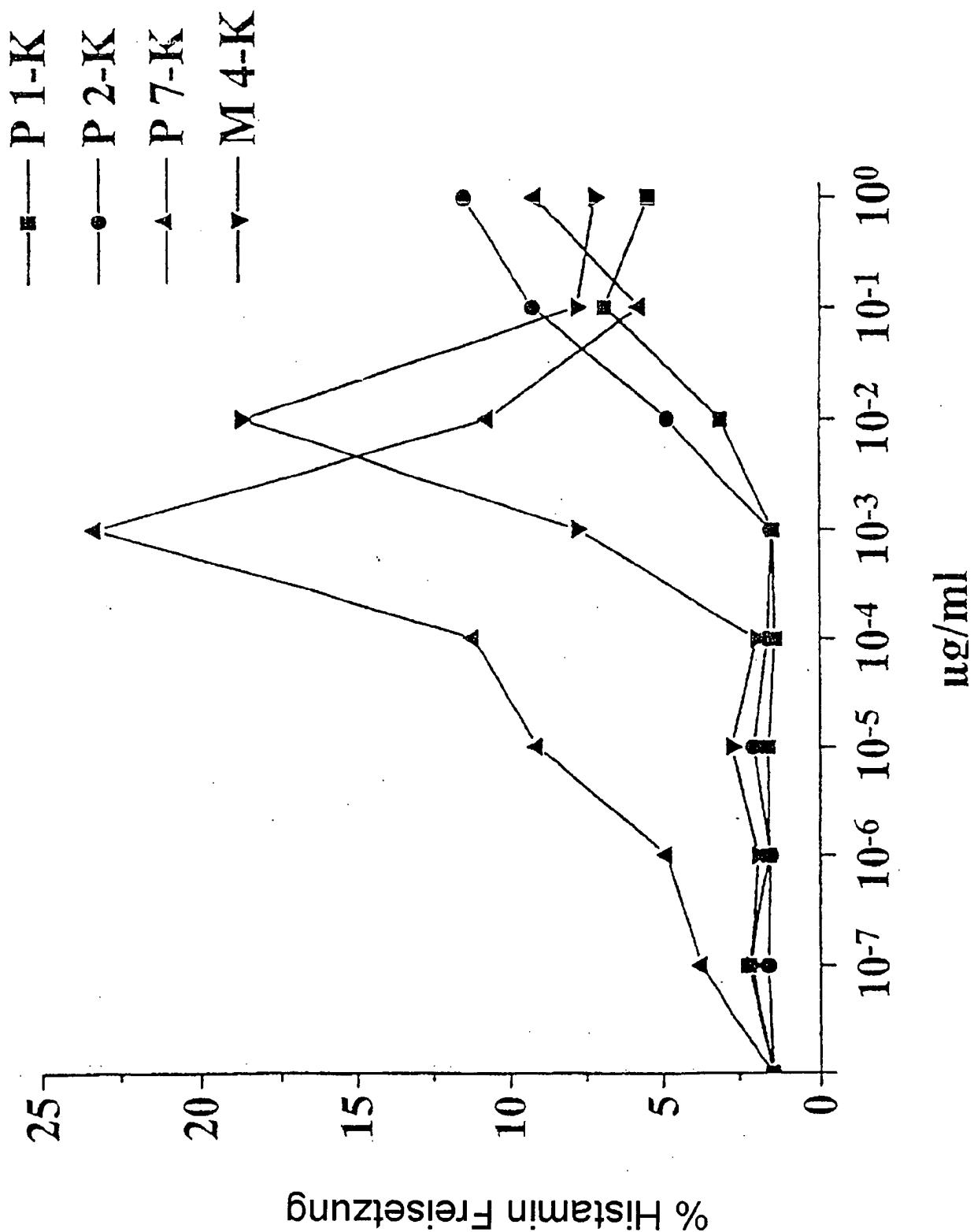
Figur 2



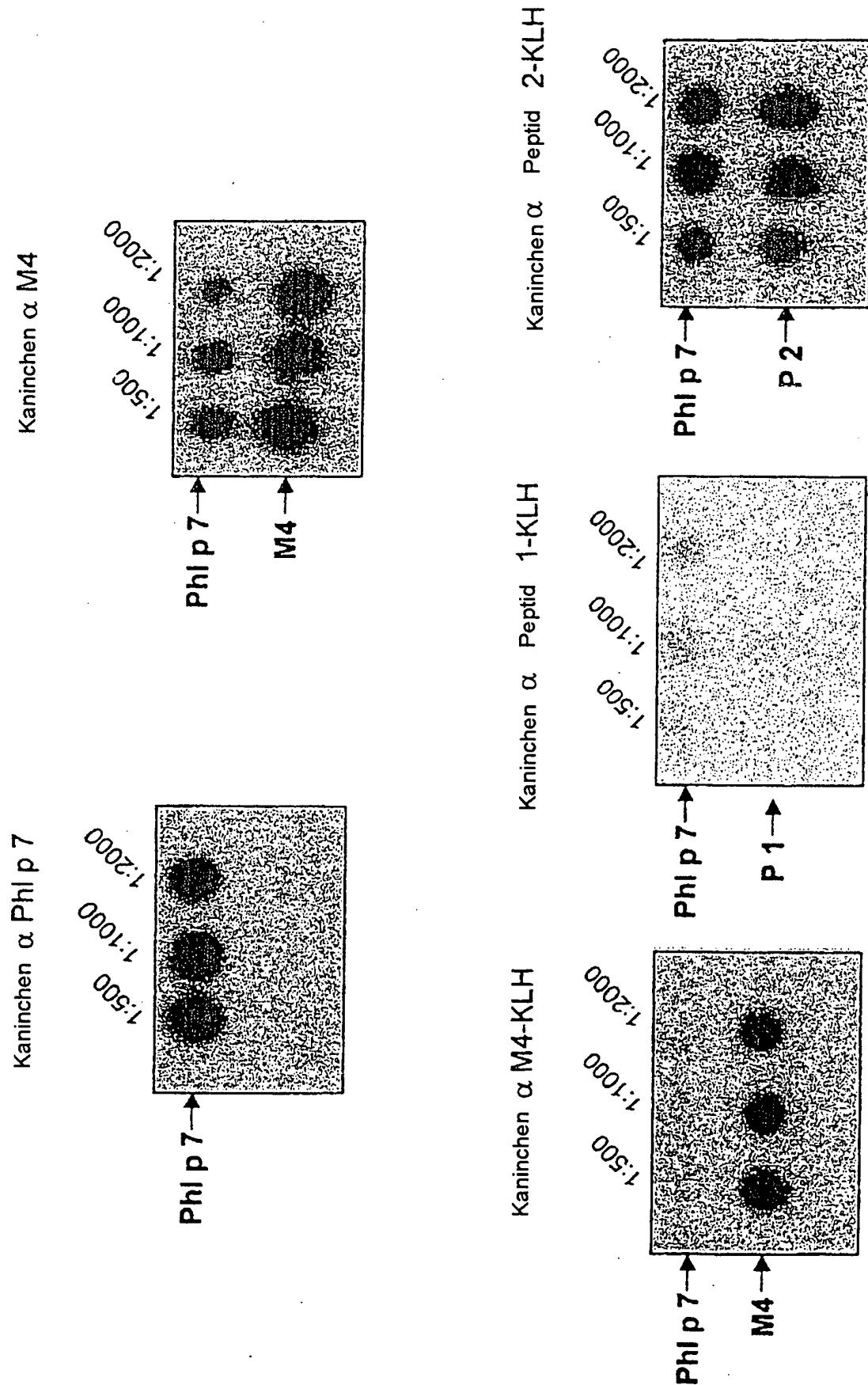
Figur 3A



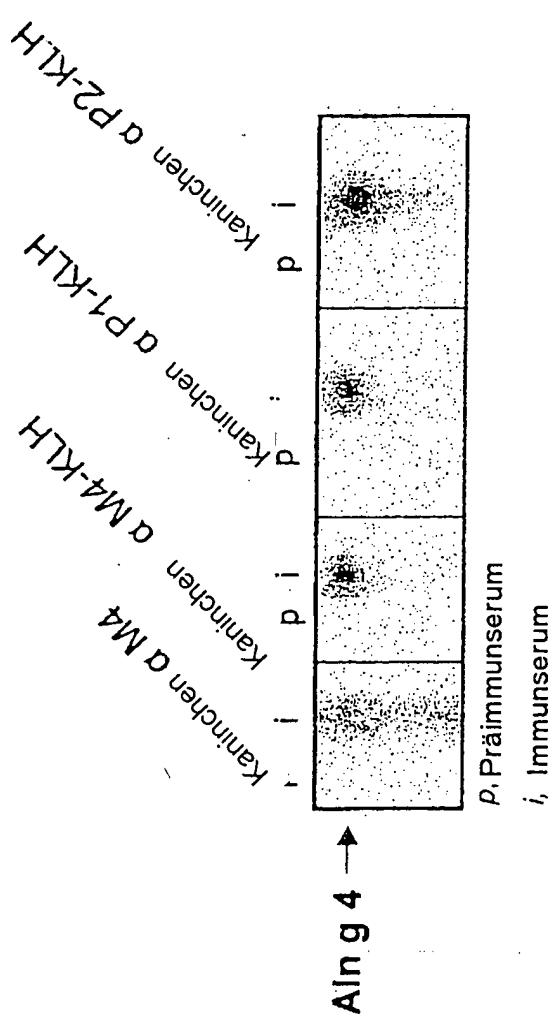
Figur 3B



Figur 4



Figur 5



Figur 6
(Tabelle 1)

Eigenschaften von nicht-allergenen von Phl p 7 abgeleiteten synthetischen Peptiden und von Phl p 7 abgeleiteten Mutanten

	Position aa	Sequenz	Anzahl aa	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt (pI)	gefaltet (CD)
Peptid 1	2-37	ADD MER IFK RFDTINGDGKISLSALTDALRTLGS T S A	36	3932	4.40	-
Peptid 2	36-78	S A D E V Q R M M A E I D T D G D G F I D F N E F I S F C N A N P G L M K D V A K V F	43	4701.9	3.71	-
Mutante 1.6	1-78	M ADD M E R I F K R F D T N G D G K I S L S A L T D A L R T L G S T S A D E V Q R M M A E I D T D G D G F I D F N A F I S F C N A N P G L M K D V A K V F	78	8559.9	4.08	+
Mutante 2A	1-78	M ADD M E R I F K R F D T N G A G K I S L S A L T D A L R T L G S T S A D E V Q R M M A E I D T D G D G F I D F N A F I S F C N A N P G L M K D V A K V F	78	8515.9	4.17	+
Mutante 4	1-78	M ADD M E R I F K R F D T N G A C K I S L S A L T D A L R T L G S T S A D E V Q R M M A E I D T D G A G F I D F N A F I S F C N A N P G L M K D V A K V F	78	8471.9	4.28	+

Figur 7
(Tabelle 2)

Induktion von Hautreaktionen vom Sofort-Typ mit rPhl p 7 und von Phl p 7 abgeleiteten Peptiden und einer Mutante

Person	mittlerer Quaddel-Durchmesser									
	rPhl p 7 2µg/ml	rPhl p 7 8µg/ml	Liesch- Gras	Histamin	P1 1µg/ml	P1 4µg/ml	P2 1µg/ml	P2 4µg/ml	M4 2µg/ml	M4 8µg/ml
1	8	11	10	4	0	0	0	0	7	9
2	5	8	10	3	0	0	0	0	4	5
3	6	9	5	4	0	0	0	0	9	7
4	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0

Figur 8 (Tabelle 3)

Kaninchen-Anti-Phl p 7-Peptidantiseren und ein Kaninchen-Anti-Phl p 7-Mutantenantiserum hemmen die Serum IgE Bindung von gegen Graspollen allergischen Patienten am rPhl p 7

Patient	% Hemmung				
	anti-P1	anti-P2	anti-M4	anti-M4-KLH	anti-rPhl p 7
1	0	64.8	0	35.8	82
2	0	42.26	2.7	18.95	83.7
3	0	42.2	19.9	4	79
4	9.4	39.1	0	35.2	64.1
Durchschnitt	2.35	47.9	5.6	23.4	77.2

Figur 9

Phl p 7: 1 MADD-----MERIFKRFDTNGDGKISLSELTDALRTLGS... 53
MADD ERIFK FD NGDGKIS SEL DAL TLGS DEV MMAEIDTDGDG
Aln g 4: 1 MADDHPQDQAEHERIFKCFDANGDGKISASELGALKLGSVTPDEVKHMMAEIDTDGDG 60

Phl p 7: 54 FIDFNEFISFCNANPGLMKDVAKVF 78
FI F EF F AN GL KDVAK F
Aln g 4: 61 FISFQEFTNFARANRGLVKDVAKIF 85