

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 503 296 A4 2007-09-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 755/2006**

(22) Anmeldetag: **03.05.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.09.2007**

(51) Int. Cl.⁸: **C07K 14/415** (2006.01),
C12N 15/10 (2006.01),
C12N 15/29 (2006.01),
A61K 39/36 (2006.01)

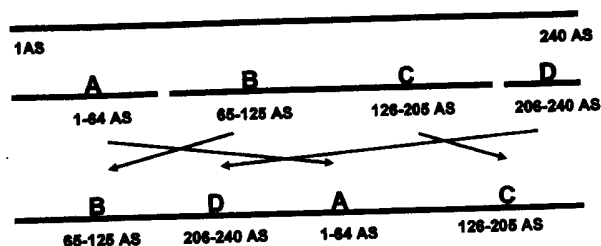
(73) Patentanmelder:

"BIOMAY" AG
A-1090 WIEN (AT)
ALLERGOPHARMA JOACHIM GANZER
KG
D-21465 REINBEK (DE)

(54) PROTEIN-ALLERGEN-DERIVAT

(57) Verfahren zur Herstellung von Derivaten des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1 mit im Vergleich zum Wildtyp-Allergen verringerter allergener Aktivität, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Vorsehen des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1,
- Spleißen des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente, wobei mindestens ein Fragment dieser mindestens drei Fragmente mindestens ein T-Zell-Epitop umfasst und die mindestens drei Fragmente eine reduzierte allergene Aktivität haben oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und
- Wiederverbinden der mindestens drei Fragmente in einer Reihenfolge, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet.



AT 503 296 A4 2007-09-15

Zusammenfassung:

Verfahren zur Herstellung von Derivaten des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1 mit im Vergleich zum Wildtyp-Allergen verringerter allergener Aktivität, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Vorsehen des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1,
- Spleißen des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente, wobei mindestens ein Fragment dieser mindestens drei Fragmente mindestens ein T-Zell-Epitop umfasst und die mindestens drei Fragmente eine reduzierte allergene Aktivität haben oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und
- Wiederverbinden der mindestens drei Fragmente in einer Reihenfolge, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet.

Fig 1A

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung betrifft Derivate des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1 und Verfahren zu ihrer Herstellung.

Allergie ist die ererbte oder erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit gegen fremde (d.h. nicht eigene) Substanzen, die normalerweise harmlos sind („Allergene“). Die Allergie ist mit entzündlichen Reaktionen in den betroffenen Organsystemen (Haut, Bindehaut, Nase, Rachenraum, Bronchien-Schleimhaut, Magen-Darm-Trakt), unmittelbaren Krankheitssymptomen, wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis, Dermatitis, anaphylaktischer Schock und Asthma, und chronischen Krankheitsmanifestationen, wie Spätreaktionen bei Asthma und atopische Dermatitis, verbunden.

Die Typ I-Allergie stellt eine genetisch bestimmte Überempfindlichkeits-Krankheit dar, die etwa 20% der Bevölkerung der industrialisierten Welt befällt. Das pathophysiologische Merkmal der Typ I-Allergie ist die Produktion von Immunglobulin E-(IgE)-Antikörpern gegen ansonsten harmlose Antigene (Allergene).

Derzeit ist die einzige ursächliche Form der Allergie-Behandlung eine Allergen-spezifische Immuntherapie, bei welcher dem Patienten zunehmende Allergen-Dosen verabreicht werden, um ein allergenspezifisches Nichtansprechen zu induzieren. Obgleich mehrere Studien die klinische Wirksamkeit der allergenspezifischen Immuntherapie zeigten, versteht man die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig.

Der Hauptnachteil der allergenspezifischen Immuntherapie ist die Abhängigkeit von der Verwendung natürlicher Allergen-Extrakte, die schwierig, wenn nicht unmöglich, zu standardisieren sind, zumindest in großtechnischem Maßstab. Solche natürlichen Allergen-Extrakte bestehen aus verschiedenen allergenen und nicht-allergenen Verbindungen, und auf Grund dieser Tatsache ist es möglich, dass bestimmte Allergene im verabreichten Extrakt nicht vorhanden sind oder - was noch schlimmer ist - dass Patienten im Laufe der Behandlung neue IgE-Spezifitäten gegen Komponenten ausbilden können. Ein weiterer Nachteil einer Therapie auf Extrakt-Basis ergibt sich daraus, dass die Verabreichung von biologisch aktiven Allergen-Präparaten anaphylaktische Nebenwirkungen induzieren kann.

Die Anwendung molekular-biologischer Techniken auf dem Gebiet der Allergen-Charakterisierung ermöglichte die Isolierung der cDNAs, die für alle relevanten Umwelt-Allergene codieren und

ermöglichte die Herstellung rekombinanter Allergene. Die Verwendung solcher rekombinanter Allergene ermöglichte es, das Reaktivitätsprofil des einzelnen Patienten entweder durch Verfahren der in vitro-Diagnose (d.h. Detektion allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum) oder durch Testen in vivo zu bestimmen. Auf der Basis dieser Technologie erschien die Möglichkeit der Entwicklung neuer Impfstrategien auf Komponenten-Basis gegen eine Allergie, insbesondere gegen die Typ I-Allergie, die an das Sensibilisierungs-Profil des Patienten zugeschnitten sind, erreichbar. Auf Grund der Ähnlichkeit der rekombinanten Allergene mit ihren natürlichen Gegenstücken weisen jedoch auch rekombinante Allergene eine signifikante allergene Aktivität auf. Da die rekombinanten Allergene die allergene Aktivität der Wildtyp-Allergene sehr genau nachahmen, sind alle mit dieser allergenen Aktivität bei der Immuntherapie unter Anwendung natürlicher Allergene verbundenen Nachteile auch bei rekombinanten Allergenen vorhanden. Um die Immuntherapie zu verbessern, muss die allergene Aktivität der rekombinanten Allergene verringert werden, so dass die Dosis der verabreichten Allergene mit nur einem geringen Risiko anaphylaktischer Nebenwirkungen erhöht werden kann.

Es wurde vorgeschlagen, ausschließlich die Aktivität von allergenspezifischen T-Zellen durch das Verabreichen von Peptiden, die nur T-Zell-Epitope enthalten, zu beeinflussen. T-Zell-Epitope stellen kleine Peptide dar, die sich aus dem proteolytischen Verdau von intakten Allergenen durch Antigen-repräsentierende Zellen ergeben. Solche T-Zell-Epitope können als synthetische Peptide erzeugt werden. Bisher mit T-Zell-Epitopen durchgeführte Tests lieferten jedoch nur schlechte Ergebnisse und wiesen eine geringe Wirksamkeit auf. Es wurden mehrere Erklärungen für die geringe Wirksamkeit einer Immuntherapie auf Basis von T-Zell-Peptid in Erwägung gezogen: erstens kann es schwierig sein, die optimale Dosis zu verabreichen, um eine T-Zellen-Toleranz anstelle einer Aktivierung zu erzielen. Zweitens haben kleine T-Zell-Epitop-Peptide eine kurze Halbwertszeit im Körper. Drittens gibt es beträchtliche Beweise dafür, dass die IgE-Produktion in atopischen Individuen eine Gedächtnis-Immunantwort darstellt, die keinen de novo-Klassenwechsel („class switching“) erfordert und somit nicht durch von T-Zellen abstammende Cytokine gesteuert werden kann. Therapie-Formen, die ausschließlich auf der Verabreichung von T-Zell-Epitopen beruhen,

könnten daher die aktivität von allergenspezifischen T-Zellen modulieren, aber nur einen geringen Einfluss auf die Erzeugung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern durch die bereits gewechselten Gedächtnis-B-Zellen haben.

Es wurde weiters vorgeschlagen, hypoallergene Allergen-Derivate oder -Fragmente durch rekombinante DNA-Technologie oder Peptid-Synthese zu erzeugen. Solche Derivate oder Fragmente tragen T-Zell-Epitope und können IgG-Antikörper induzieren, die mit der IgE-Erkennung des nativen Allergens konkurrieren. Es zeigte sich vor mehr als 20 Jahren, dass der proteolytische Verdau von Allergenen kleine Allergen-Fragmente ergab, die teilweise ihre IgE-Bindungs-Kapazität beibehielten, jedoch keine Soforttyp-Reaktionen („immediate type reactions“) hervorriefen. Während die Proteolyse von Allergenen schwer steuer- und standardisierbar ist, eröffnete die Molekularbiologie neue Wege zur Herstellung von IgE-bindenden Haptenen. Solche IgE-bindenden Haptene wurden als nützlich für eine aktive Immunisierung mit verringerten Risiken anaphylaktischer Wirkungen und für die passive Therapie vorgeschlagen, um Effektor-Zell-gebundenes IgE vor einem Allergen-Kontakt zu sättigen und somit eine Allergen-induzierte Mediator-Freisetzung zu blockieren.

Ein weiterer Vorschlag war, hypoallergene Allergen-Versionen mittels Gentechnik zu erzeugen, ausgehend von der Beobachtung, dass Allergene in der Natur als Isoformen, die sich lediglich in einigen wenigen Aminosäureresten voneinander unterscheiden, und/oder in Konformationen mit geringer IgE-Bindungs-Kapazität vorkommen können. Beispielsweise ergab die Oligomerisation des Birkenpollen-Hauptallergens, Bet v 1, mittels Gentechnik ein rekombinantes Trimer mit stark reduzierter allergener Aktivität. Alternativ wurde die Einführung von Punkt-Mutationen vorgeschlagen, um entweder zu Konformations-Änderungen in der Allergen-Struktur zu führen und somit diskontinuierliche IgE-Epitope aufzubrechen oder die IgE-Bindungskapazität direkt zu beeinflussen (Valenta et al., Biol. Chem. 380 (1999), 815-824).

Es zeigte sich auch, dass die Fragmentierung des Allergens in einige Teile (z.B. in zwei Teile) zu einem beinahe vollständigen Verlust der IgE-Bindungskapazität und allergenen Aktivität des Allergens auf Grund eines Verlusts ihrer nativ-artigen Faltungen führt (Vrtala et al., J. Clin. Invest. 99 (1997), 1673-1681) für Bet v 1, Twardosz et al. (BBRC 239 (1997), 197-204)

für Bet v 4, Hayek et al. (J. Immunol. 161 (1998), 7031-7039) für Aln g 4, Zeiler et al. (J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1997), 721-727) für bovines Hautschuppen-Allergen, Elfman (Int. Arch. Allergy Immunol. 117 (1998), 167-173) für Lep d2, Westritschnig (J. Immunol. 172 (2004), 5684-5692) für Phlp 7)). Die Fragmentierung von Proteinen, die hauptsächlich diskontinuierliche/konformationelle IgE-Epitope enthalten, führt zu einer wesentlichen Verringerung der IgE-Bindungskapazität des Allergens. Auf Basis dieses Kenntnis wurde im Stand der Technik untersucht, ob solche hypoallergenischen Allergen-Fragmente schützende Immunantworten in vivo induzieren können (Westritschnig et al., (Curr. Opinion in Allergy and Clin. Immunol. 3 (2003), 495-500).

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Mittel und Verfahren für eine verbesserte Allergie-Immunotherapie auf Basis der oben erwähnten Kenntnisse vorzusehen. Solche Verfahren und Mittel sollten wirkungsvoll sein, mit einem geringen Risiko für einen anaphylaktischen Schock verbunden sein, leicht anwendbar und an die Bedürfnisse eines einzelnen Patienten anpassbar und leicht auf industrielle Maßstäbe übertragbar sein.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Derivaten des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1 (ein Haupt-Pollen-Allergen des Wiesen-Lieschgrases) mit im Vergleich zum Wildtyp-Allergen verringerter allergener Aktivität, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Vorsehen des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1,
- Spleißen des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente, wobei mindestens ein Fragment dieser mindestens drei Fragmente mindestens ein T-Zell-Epitop umfasst und die mindestens drei Fragmente eine reduzierte allergene Aktivität haben oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und
- Wiederverbinden der mindestens drei Fragmente in einer Reihenfolge, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet.

Allergische Reaktionen werden ausgelöst, wenn Allergene vorgeformtes IgE, das an den Hochaffinitäts-Rezeptor FcεRI an Mastzellen gebunden ist, vernetzen. Mastzellen belegen die Körperoberflächen und dienen dazu, das Immunsystem auf eine lokale Infektion aufmerksam zu machen. Sobald sie aktiviert sind, induzieren sie entzündliche Reaktionen durch Sezernieren chemischer Mediatoren, die in vorgeformten Granula gelagert sind, und

durch Synthetisieren von Leukotrienen und Cytokinen, nachdem die Aktivierung stattgefunden hat. Daher ist wegen der verursachten Nebenwirkungen die Verabreichung von Wildtyp-Allergenen zur Verhinderung, Behandlung oder Sensibilisierung von Individuen, die eine Allergie haben oder bei welchen das Risiko einer Allergie besteht, nicht vorteilhaft. Ein Weg zur Vermeidung allergischer Reaktionen bei der Immuntherapie ist es, das Wildtyp-Allergen soweit zu modifizieren, dass diese modifizierten „Allergene“ in verringerter Menge oder gar nicht mehr an IgE binden. Folglich können solche Moleküle keine starke allergische Reaktion hervorrufen. Es sei jedoch bemerkt, dass Fragmente bestimmter Allergene möglicherweise nicht immunogen genug sind, um eine schützende Antikörper-Antwort zu induzieren (Westritschnig et al., (2004)).

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Herstellung von Allergen-Derivaten mit verringerter oder fehlender Fähigkeit, an IgE zu binden, wobei jedoch gleichzeitig jene Merkmale des Allergens konserviert werden, welche notwendig sind, um eine T-Zellen-vermittelte Immun-Antwort zu induzieren. Dies kann mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung erreicht werden, weil jene Strukturelemente, die für die Induktion einer T-Zellen-vermittelten Immunantwort verantwortlich sind, z.B. T-Zell-Epitope des Wildtyp-Allergens, im Allergen-Derivat gemäß der vorliegenden Erfindung im Wesentlichen konserviert bleiben. Eine Umordnung („shuffling“) (Spleißen und Wiederverbinden) der Fragmente des Allergens führt jedoch zu einer wesentlichen Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität oder sogar zum vollständigen Verlust dieser Bindungs-Kapazität. Natürlich sind, wenn im Laufe der Erzeugung der Allergen-Derivate nur ein paar Aminosäurereste verloren gehen (deletiert sind) oder hinzugefügt (insertiert sind), oder wenn die Teile durch einen Linker anstatt durch eine direkte Vereinigung verbunden werden, die Vorteile gemäß der vorliegenden Erfindung noch immer vorhanden. Diese Verringerung oder Ausschaltung der allergenen Aktivität wird durch das bekannte und allgemeine Prinzip der Teilung des Allergens in definierte Fragmente erreicht.

Das Allergen-Derivat gemäß der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise rekombinant erzeugt. Natürlich ist es auch möglich, die einzelnen Allergen-Fragmente chemisch zu synthetisieren und danach miteinander zu verbinden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Er-

findung wird die Verringerung der allergenen Aktivität durch eine Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität von mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, mehr bevorzugt mindestens 30%, insbesondere mindestens 50%, im Vergleich zum Wildtyp-Allergen, gemessen.

Die Verringerung der allergenen Aktivität wird vorzugsweise durch das Fehlen der Bindung von IgE-Antikörpern der Allergensensibilisierten Seren des Patienten an einen Dot-Blot des Derivats oder durch einen Basophilen-Freisetzungstest gemessen.

Herkömmliche in vitro-Tests zur Beurteilung der allergenen Aktivität inkludieren RAST (Sampson and Albergo, J. Allergy Clin. Immunol. 74:26, 1984), ELISAs (Burks et al., N. Engl. J. Med. 314:560, 1986), Immunoblotten (Burks et al., J. Allergy Clin. Immunol. 81:1135, 1988), Basophilen-Histamin-Freisetzungstests (Nielsen, Dan. Med. Bull. 42:455, 1995 und du Buske, Allergy Proc. 14:243, 1993) und andere (Hoffmann et al., Allergy 54:446, 1999).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die mindestens drei Fragmente die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurereste 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183 und/oder die Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1.

Die beim Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendenden mindestens drei Fragmente können mindestens eines der oben identifizierten T-Zell-Epitope aufweisen (vgl. z.B. Schenk S., et al., J. Allergy Clin. Immunol. (1995) 96:986-996).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die mindestens drei Fragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126-205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von Phl p1.

Die Fragmente der vorliegenden Erfindung werden ausgewählt, um IgE-bindende/B-Zell-Epitope und konservierende T-Zell-Epitope, die die Erzeugung einer angemessenen Immunantwort auf diese Epitope induzieren können, zu zerstören. Die Zerstörung/Reduktion von im Wildtyp-Allergen Phl p1 natürlicherweise vorhandenen B-Zell-Epitopen könnte es ermöglichen, dass diese Derivate bei

Verabreichung an ein Individuum vor allem eine T-Zell-vermittelte Antwort anstatt einer allergischen Reaktion hervorrufen (vollständiges Fehlen oder verringerte Bindung an IgE, das an Mediator-freisetzende Zellen gebunden ist).

Die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat ist vorzugsweise B-D-A-C.

Natürlich ist es auch möglich, diese Fragmente auf eine alternative Weise zu reihen (D-B-A-C, B-A-D-C usw.), vorausgesetzt, dass das erhaltene Allergen-Derivat im Vergleich zum Wildtyp-Allergen eine verringerte allergene Aktivität aufweist.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung erhaltenen Derivate können mit einem pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten leicht vereinigt und zu einem pharmazeutischen Präparat fertig gestellt werden.

Vorzugsweise werden die Derivate mit einem geeigneten Vakzin-Adjuvans vereinigt und zu einem pharmazeutisch akzeptablen Vakzin-Präparat fertig gestellt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die Derivate gemäß der vorliegenden Erfindung mit weiteren Allergenen zu einem Kombinations-Vakzin vereinigt. Solche Allergene sind vorzugsweise Wildtyp-Allergene, insbesondere eine Mischung von Wildtyp-Allergenen, rekombinanten Wildtyp-Allergenen, Derivaten von Wildtyp-Protein-Allergenen oder Mischungen davon. Solche Mischungen können spezifisch für die Bedürfnisse (Allergen-Profil) eines bestimmten Patienten hergestellt werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein solches pharmazeutisches Präparat weiters einen Allergen-Extrakt.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist dieses weitere Allergen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilinen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2.

Die pharmazeutischen und Vakzin-Präparate gemäß der vorliegenden Erfindung können neben einem Derivat von Phl p 1 andere Allergene oder Derivate und Fragmente davon, Allergen-Extrakte

NACHGEREICHT

usw., umfassen.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein mit einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung erhältliches Allergen-Derivat.

Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Allergen-Derivat von Wildtyp-Protein-Allergen Phl p 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat mindestens drei Fragmente des Wildtyp-Protein-Allergens aufweist, die miteinander in einer Reihenfolge fusioniert sind, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet, wobei die mindestens drei Wildtyp-Allergen-Fragmente eine verringerte allergene Aktivität aufweisen oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und wobei mindestens eines der mindestens drei Fragmente ein oder mehrere T-Zell-Epitope umfasst.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die mindestens drei allergenen Fragmente mindestens 6 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 10 Aminosäurereste, insbesondere mindestens 15 Aminosäurereste.

Die mindestens drei Fragmente umfassen vorzugsweise die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurereste 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183 und die Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die mindestens drei Fragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126 bis 205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von Phl p 1.

Die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat ist vorzugsweise B-D-A-C.

Die Allergen-Derivate der vorliegenden Erfindung können auch zum Nachweis und zur Diagnose einer Empfindlichkeit gegenüber Phl p 1 verwendet werden. Beispielsweise kann dies in vitro erfolgen durch Vereinigen von Blut oder Blutprodukten, die von einem im Hinblick auf Empfindlichkeit zu beurteilenden Subjekt erhalten wurden, mit einem eine Phl p 1-Aktivität aufweisenden Peptid, unter Bedingungen, die für die Bindung von Komponenten

im Blut (z.B. Antikörpern, T-Zellen, B-Zellen) mit den Derivaten geeignet sind, und bestimmen des Ausmaßes, in welchem eine solche Bindung auftritt. Andere Diagnosemethoden für allergische Erkrankungen, bei welchen die Derivate der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, umfassen den Radioallergosorbens-Test (RAST), den Papier-Radioimmunosorbens-Test (PRIST), den Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISSA), Radioimmuno-Assays (RIA), immun-radiometrische Assays (IRMA), Lumineszenz-Immuno-Assays (LIA), Histamin-Freisetzungs-Assays und IgE-Immunoblots.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Allergen-Zusammensetzung, umfassend ein Allergen-Derivat gemäß der vorliegenden Erfindung (siehe oben) und weitere Allergene, vorzugsweise Wildtyp-Allergene, insbesondere eine Mischung aus Wildtyp-Allergenen, rekombinanten Wildtyp-Allergenen, Derivaten von Wildtyp-Protein-Allergenen, oder Mischungen davon.

Diese Zusammensetzung enthält vorzugsweise weiters einen Allergen-Extrakt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die Allergen-Zusammensetzung einen pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Zusammensetzung weiters ein oder mehrere Allergene ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilinen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Allergen-spezifischen Immuntherapie-Medikaments.

Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Medikaments zur aktiven Immunisierung.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammen-

NACHGEREDET

setzung gemäß der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Medikaments zur prophylaktischen Immunisierung.

Dieses Medikament enthält vorzugsweise weiters Adjuvantien, Verdünnungsmittel, Konservierungsmittel oder Mischungen davon.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Medikament 10 ng bis 1 g, vorzugsweise 100 ng bis 10 mg, insbesondere 0,5 µg bis 200 µg des rekombinanten Allergen-Derivats. Bevorzugte Verabreichungswege inkludieren alle Standard-Verabreichungs-Schemas, die für die Impfung im Allgemeinen und für die Allergie-Immuntherapie im Besonderen beschrieben und vorgeschlagen wurden (oral, transdermal, intravenös, intranasal, über die Schleimhaut usw.). Die vorliegende Erfindung inkludiert ein Verfahren zur Behandlung und Verhinderung einer Allergie durch Verabreichen einer wirksamen Menge der pharmazeutischen Präparate gemäß der vorliegenden Erfindung.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Allergen-Derivats gemäß der vorliegenden Erfindung, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Vorsehen eines DNA-Moleküls, das für ein Allergen-Derivat gemäß der vorliegenden Erfindung codiert,
- Transformieren einer Wirtszelle mit dem DNA-Molekül, und
- Exprimieren des Derivats in der Wirtszelle und Isolieren des Derivats.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Wirtszelle eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine Hefe- oder eine Pflanzenzelle, oder eine prokaryontische Zelle, vorzugsweise *Escherichia coli*.

Vorzugsweise ist der Wirt ein Wirt mit einer hohen Expressions-Kapazität. Wie hierin verwendet ist „ein Wirt mit einer hohen Expressions-Kapazität“ ein Wirt, der ein Protein, an dem ein Interesse besteht, in einer Menge von mindestens 1 mg/l Kultur, vorzugsweise mindestens 5 mg/l, mehr bevorzugt mindestens 10 mg/l, am meisten bevorzugt mindestens 20 mg/l exprimiert. Natürlich hängt die Expressions-Kapazität auch vom ausgewählten Wirt und Expressionssystem (z.B. Vektor) ab. Bevorzugte Wirte gemäß der vorliegenden Erfindung sind *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, Pflanzenzellen (z.B. aus Tabak stammend) usw..

Natürlich können die Allergen-Derivate gemäß der vorliegen-

den Erfindung auch mit irgendeinem anderen geeigneten Verfahren, insbesondere chemischer Synthese oder halbchemischer Synthese, hergestellt werden.

Die vorliegende Erfindung ist weiters durch die folgenden Figuren und Beispiele veranschaulicht, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

Fig. 1A zeigt die Konstruktion eines hypoallergen Phl p1-Derivats gemäß der vorliegenden Erfindung.

Fig. 1B zeigt die Aminosäure-Sequenz des phl p1-Mosaik-Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO: 2).

Fig. 2A zeigt eine Coomassie-gefärbte SDS-PAGE von Plm, welches auf >90% Reinheit gereinigt worden ist.

Fig. 2B zeigt eine massenspektroskopische Analyse von Plm. Die Laser-Desorptions-Massenspektren wurden auf lineare Weise mit einem TOF compact MALDI II-Instrument (Kratos, UK) (piCHEM, Österreich) erhalten.

Fig. 2C zeigt eine Cirkulardichroismus(CD)-Analyse von Plm. Weite UV-CD-Spektren wurden auf einem Jasco J-810-Spektropolarimeter (Jasco, Easton, MD) bei Raumtemperatur bei Protein-Endkonzentrationen von 46 μ M für Plm und 12 μ M für rekombinantes Phl p 1 in 0,001 cm bzw. 0,05 cm Bahn-Längen-Quarz-Kuvetten aufgenommen. Drei unabhängige Messungen wurden aufgezeichnet und für jeden Spektral-Punkt gemittelt. Die endgültigen Spektren wurden durch Subtrahieren der unter identischen Bedingungen erhaltenen korrespondierenden Puffer-Spektren Basislinien-korrigiert. Die Ergebnisse wurden als mittlere Rest-Elliptizität $[\theta]$ bei einer gegebenen Wellenlänge ausgedrückt.

Fig. 3 zeigt die IgE-Bindung an Membran-gebundene rekombinante Allergene rPhl p 1, Plm und HSA. Seren von 49 gegen Graspollen allergischen Patienten und ein Serum von einem nicht-atopischen Spender (n = 50) wurden mit den Membran-gebundenen rekombinanten Allergenen rPhl p 1, Plm und HSA inkubiert. Gebundenes IgE wurde mit mit 125 I-markierten anti-Human-IgE-Antikörpern detektiert.

Fig. 4 zeigt einen Vergleich der CD203c-Expression, wenn eine Probe von fünf gegen Phl p 1 allergischen Individuen rPhl p 1 und Plm ausgesetzt wird.

Fig. 5 zeigt die Induktion einer IgG1-Antwort bei einer rPhl p1 und Plm ausgesetzten Maus.

BEISPIELE: Charakterisierung eines hypoallergen Phl p 1-

Mosaik(Plm)-Proteins

Beispiel 1: Konstruktion eines hypoallergen Phl p 1-Mosaik(Plm)-Proteins

Für die Konstruktion eines rekombinanten hypoallergen Phl p 1-Mosaiks wurden für vier Phl p 1-Fragmente codierende cDNAs amplifiziert. Die Fragmente A (AS 1-64), B (AS 65-125), C (AS 126-205) und D (AS 206-240) sind in Fig. 1A gezeigt. Die beschriebenen cDNA-Fragmente wurden durch „gene SOEing“ in der Reihenfolge B-D-A-C zusammengefügt (Horton et al., 1999). In den ersten PCR-Reaktionen wurden cDNAs für die Fragmente A (Primer AF: 5'ATC CCC AAG GTT CCC 3' und AR: 5'CAG CTC GCC GGC GCT CTT GAA GAT GGG 3'), B (Primer BF: 5'C TCC TCC CAT ATG TCC GGA CGC GGC 3' und BR: 5'GGT GAA GGG GCC CGT GCG CAG CTT CTG 3'), C (Primer CF: 5'AGC GCC GGC GAG CTG 3' und CR: 5'C GGG ATC CTA ATG ATG ATG ATG ATG GGC GGC GAG CTT GTC GGG AGT GTC 3'), und D (Primer DF: 5'ACG GGC CCC TTC ACC 3' und DR: 5'GGG AAC CTT GGG GAT CTT GGA CTC GTA 3') erhalten. In der folgenden ersten SOEing-Reaktion wurden die Gel-gereinigten PCR-Produkte als Matrizen verwendet, um cDNAs zu erhalten, die für die Fragmente BD (unter Verwendung der Primer BF und DR) und AC (unter Verwendung der Primer AF und CR) codieren. In der nachfolgenden zweiten SOEing-Reaktion wurden die Gel-gereinigten Fragmente BD und AC als Matrizen verwendet, um das PCR-Produkt zu erhalten, das für BDAC codiert, wobei die Primer BF und CR (schematisch in Fig. 1A dargestellt) verwendet wurden.

Das resultierende cDNA-Konstrukt, das für BDAC codiert, wurde in die NdeI/BamHI-Restriktionsstelle von Plasmid pET17b (Novagen, Madison, WI) insertiert. Am C-Terminus des BDAC-Konstrukts folgen auf zwei Glycine ein Hexahistidin-Tag, was die Reinigung des Mosaik-Proteins mittels Ni^{2+} -Affinitäts-Chromatographie ermöglicht (Fig. 1B). Die korrekte Sequenz der cDNA, die für das phl p 1-Mosaik (Plm) codiert, wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Das resultierende Molekül behält die gesamte primäre Sequenz (Laffer et al., 1994) und T-Zell-Epitope (Schenk et al., 1995) bei.

Beispiel 2: Biochemische Charakterisierung von Plm

Expression und Reinigung von Plm

Das Plm-Konstrukt wurde in E.coli BL21 (DE3) (Stratagene, Australien) transformiert und in LB-Medium, ergänzt mit 100 mg/l

Ampicillin, exprimiert. Transformierte Zellen wurden bei 37°C zu einer OD₆₀₀=0,9 gezüchtet, und die Expression des rekombinanten Plm wurde durch Zugabe von 1mM Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Inkubation wurde 4 h unter denselben Bedingungen fortgesetzt, und danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet. Rekombinantes Plm wurde aus der unlöslichen Pellet-Fraktion unter Verwendung denaturierender Bedingungen gereinigt. Die Zellen wurden durch 60-minütiges Rühren in 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0, lysiert. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 14.000 x g wurde der Überstand auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Rekombinantes Plm eluierte in 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 4,5, und wurde durch schrittweise Dialyse für mindestens 4 h renaturiert, jeder Schritt gegen 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0, enthaltend 6, 4, 3, 2, 1 und 0,5 M Harnstoff. Das Protein wurde schließlich gegen 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0, dialysiert und unter Verwendung eines Amicon-Centricon YM.-3-Konzentrators konzentriert.

Die Proteinreinheit wurde mittels SDS-PAGE bestätigt. Die Protein-Konzentration der gereinigten Probe wurde durch UV-Absorption bei 280 nm bewertet. Der molare Extinktions-Koeffizient des Proteins wurde aus dem Tyrosin- und Tryptophan-Gehalt berechnet (Gill et al., 1989).

Plm zeigt ein Migrations-Muster, das rekombinatem Phl p 1 vergleichbar ist (siehe Fig. 2A), was mit dem gemäß der hergeleiteten Aminosäure-Sequenz des Proteins berechneten Molekulargewicht übereinstimmt.

Die Molekülmasse von Plm wurde mittels Massenspektrometrie als 27 082 Dalton bestimmt, was mit dem vorausgesagten Molekulargewicht des Proteins übereinstimmt (siehe. Fig. 2B).

Das gereinigte Plm wurde mittels Circular dichroismus-Analyse analysiert und mit rekombinatem Phl p 1 verglichen, um deren Sekundär-Strukturgehalt zu bestimmen (siehe Fig. 2C). Unerwarteterweise ist Plm ein gefaltetes Molekül mit einem Minimum bei 207 und 215 nm und einem Maximum bei 195 nm, was eine beträchtliche Menge an β -Sekundär-Struktur nahelegt. Plm, das ein künstliches Allergen-Protein darstellt, weist ein CD-Spektrum auf, das sich von der gefalteten Version von rekombinatem phl p 1-, in mit Baculovirus infizierten Insekten-Zellen exprimiert, unterscheidet (Ball et al.). Im Vergleich dazu zeigte in E.coli exprimiertes rekombinantes Phl p 1 das Spektrum eines ungefalteten

ten Proteins, eine Tatsache, die kürzlich beschrieben wurde (Ball et al., 2005).

Beispiel 3: Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität von Plm

Die IgE-Reaktivität von Plm wurde bestimmt und mit rPhl p 1 mittels Dot-Blot-Versuchen unter Bedingungen eines Antigen-Überschusses verglichen (Niederberger et al., 1998). Drei µg der gereinigten rekombinanten Proteine wurden auf Nitrozellulose-Streifen punktweise aufgetragen („dotted“) und mit Seren von 49 gegen Phl p 1 allergischen Patienten inkubiert. Gebundene IgE-Antikörper wurden mit mit ¹²⁵I-markierten anti-Human-IgE-Antikörpern detektiert und durch γ-Zählung (Wallac, Finnland) quantifiziert (Ball et al., 1999).

Die unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmte IgE-Reaktivität von Plm war im Vergleich zur IgE-Bindungs-Kapazität von rPhl p 1 stark reduziert (Fig. 3). Die Quantifizierung von plm-gebundenen IgE-Antikörpern zeigte eine mittlere Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität von 86.5% von Plm im Vergleich zu rPhl p 1 (Tabelle 1).

Fig. 3 zeigt die IgE-Bindung an die Membran-gebundenen rekombinanten Allergene rPhl p 1, Plm und HSA. Seren von 49 gegen Graspollen allergischen Patienten und ein Serum von einem nicht-atopischen Spender (n = 50) wurden mit Membran-gebundenen rekombinanten Allergenen rPhl p 1, Plm und HSA inkubiert. Gebundenes IgE wurde mit mit ¹²⁵I-markierten anti-Human-IgE-Antikörpern detektiert.

Tabelle 1. Serum-IgE-Reaktivität von rPhl p 1 und Plm. Punktweise aufgetragene Proteine wurden Seren von 29 gegen Graspollen allergischen Patienten ausgesetzt. Gebundene IgE-Antikörper wurden mit mit ¹²⁵I-markierten anti-Human-IgE-Antikörpern detektiert und durch γ-Zählung quantifiziert.

Patient	IgE-Bindung (cpm)		% Reduktion der IgE-Bindung (cpm)
	rP1	P1m	
1	855	31	96,4
2	604	209	65,4
4	252	45	82,1
5	724	47	93,5
6	1508	171	88,7
7	1133	303	73,3
8	247	37	85
9	1448	356	75,4
10	1676	213	87,3
11	17971	847	95,3
12	342	90	73,7
13	1539	77	95
14	413	58	86
15	105	28	73,3
16	252	19	92,5
17	300	27	91
18	987	70	92,9
19	623	34	94,5
20	687	47	93,2
21	50	8	84
22	694	42	93,9
23	1825	173	90,5
24	9681	386	96
25	1696	299	82,4
26	3230	295	90,9
27	183	25	86,3
28	763	89	88,3
29	179	40	77,7
30	0	0	-
Mittelwert			86,5 %

Beispiel 4: plm zeigt verringerte allergene Aktivität

Basophilen-Aktivierung, gemessen mittels CD203c-Expression

Peripheres Blut wurde von 5 allergischen Spendern nach Einverständniserklärung erhalten. Das Blut wurde in heparinisierten Röhrchen gesammelt. Blut-Aliquots (100 µl) wurden mit seriellen Verdünnungen von Plm und rphl p 1 (10^{-3} bis 10 µg/ml), anti-IgE-Antikörper (1 µg/ml) (Immunotech, Marseille, Frankreich) oder Puffer (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, „phosphate-buffered saline“ = PBS) 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS, enthaltend 20 mM EDTA, gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 10 µl PE-konjugiertem

CD203c mAb 97A6 (Immunotech, Marseille, Frankreich) 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden die Proben einer Erythrozyten-Lyse mit 2 ml FACS™ Lysing solution (Becton Dickinson, San Jose, CA) unterzogen. Die Zellen wurden gewaschen, in PBS resuspendiert und mittels Zweifarben-Durchfluss-Cytometrie auf einem FACScan (Becton Dickinson) unter Verwendung von Paint-a-Gate Software analysiert. Allergen-induzierte Hinauf-Regulierung von CD203c wurde aus den mittleren Fluoreszenz-Intensitäten (MFIs), die mit stimulierten (MFI_{stim}) und unstimulierten ($MFI_{control}$) Zellen erhalten worden waren, berechnet und als Stimulations-Index ($MFI_{stim} : MFI_{control}$) ausgedrückt.

Die allergene Aktivität von Plm wurde durch Messung der CD203c-Expression auf Blut-Basophilen von fünf gegen Phl p 1 allergischen Patienten analysiert. Wie in Fig. 4 dargestellt ist die CD203c-Expression nach Inkubation mit rPhl p 1 bei einer Protein-Konzentration von 1 µg/ml signifikant ($p < 0,05$) hinauf reguliert, wogegen mit Plm keine Expression von CD203c induziert wird. Nur wenn die Konzentration von Plm auf 10 µg/ml erhöht wird, ist die Expression von CD203c hinauf reguliert. somit zeigt Phl p 1 eine zehnfache allergene Aktivität im Vergleich zu Plm.

Beispiel 5: IgG-Antikörper, induziert durch Immunisierung mit Plm inhibieren bei Patienten die IgE-Bindung an rPhl p 1

Immunisierung von Kaninchen

Kaninchen wurden zuerst mit 200 µg Plm und rPhl p 1 unter Verwendung von CFA, und 100 µg der Immunogene für die folgenden Booster-Injektionen unter Verwendung von IFA (erste Booster-Injektion nach 4 Wochen, eine zweite Booster-Injektion mit unvollständigem Adjuvans wurde nach 7 Wochen gegeben) immunisiert (Charles River Breeding Laboratories, Kisslegg, Deutschland). Den Kaninchen wurde 8 Wochen nach der ersten Immunisierung das Blut entnommen („bled“).

Inhibierung der Bindung von IgE allergischer Patienten an rPhl p 1 durch Plm-induziertes IgG

Die Fähigkeit von Plm- und rPhl p 1-induziertem Kaninchen-IgG, die Bindung von IgE allergischer Patienten an rPhl p 1 zu inhibieren, wurde mit einem ELISA-Kompetitions-Test getestet (Focke et al., 2001). ELISA-Platten (Nunc Maxisorp, Dänemark) wurden mit 1 µg/ml rPhl p 1 beschichtet und mit 1/100 Verdünnungen der rPhl p 1- und Plm-Antisera und - für Kontrollzwecke -

der entsprechenden Präimmun-Seren vorinkubiert. Nach dem Waschen wurden die Platten mit 1/10 verdünnten Seren von 43 mit Phl p 1-sensibilisierten, gegen Graspollen allergischen Patienten inkubiert. Gebundene IgE-Antikörper wurden mit HRP-gekoppelten Ziegen-anti-Human-IgE-Antikörpern (KPL, Gaithersburg, MD), 1/2500 verdünnt, detektiert. Der Prozentsatz der Inhibierung der IgE-Bindung, die durch Vorinkubation mit den anti-Phl p 1- und anti-Plm-antiseren erreicht wurde, wurde wie folgt berechnet: Prozentsatz der Inhibierung der IgE-Bindung = $100 - OD_I / OD_P \times 100$. OD_I und OD_P stellen die Extinktionen nach Vorinkubation mit den Kaninchen-Immunsereen bzw. den entsprechenden Vorimmun-Seren dar.

Die Fähigkeit von Plm, die IgE-Bindung von Patienten an rPhl p 1 zu inhibieren, ist als Prozent Reduktion in Tabelle 2 gezeigt. Die stärkste Inhibierung der Patienten-IgE-Bindung an rPhl p 1 im Bereich von 0 bis 89% (52% mittlere Reduktion) wurde mit anti-Plm Antikörpern erreicht, wogegen die Inhibierung mit anti-Phl p 1-Antikörpern im Bereich von 4 bis 75% (43% Mittelwert) lag.

Tabelle 2. Gegen rPhl p 1 und Plm gezogene Kaninchen-Antiseren inhibieren die Bindung des IgE von gegen Graspollen allergischen Patienten an rPhl p 1. ELISA-Platten-gebundenes rPhl p 1 und Plm wurde mit Kaninchen-anti-rPhl p1- und anti-Plm-Antiseren vorinkubiert. Die von 43 gegen Graspollen allergischen Patienten erhaltenen Prozent der Reduktion der IgE-Bindung sind gezeigt.

**% Reduktion der IgE-Bindung an rPhl p 1 durch
P1m-induziertes Kaninchen-IgG**

Patient	OD Werte:	
	rαP1	rαP1m
1	37	50
2	44	61
3	32	49
4	50	70
5	4	34
6	44	52
7	55	75
8	27	38
9	51	55
10	28	0
11	32	13
12	36	24
13	40	36
14	20	14
15	23	51
16	39	60
17	41	56
18	25	41
19	42	55
20	43	58
22	62	56
23	55	68
24	46	50
26	35	32
27	31	24
28	70	77
29	28	38
30	58	65
31	43	57
32	52	56
33	56	66
34	59	66
36	69	80
37	49	70
38	72	81
39	37	61
40	68	78
41	23	37
42	75	89
43	49	68
44	72	81
45	72	85
47	9	23
Mittelwert	43	52

Beispiel 6: Immunogenität von P1m

Um zu untersuchen, ob das Phl p 1-Mosaik-Protein eine Aller-

NACHGEREICHT

gen-spezifische IgG-Antwort in vivo induziert, wurden 6 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Breeding Laboratories) subkutan immunisiert. Gruppen von 5 Mäusen wurden mit 5 µg Plm, rPhl p 1 und - zu Kontrollzwecken - mit PBS alleine, adsorbiert an Al(OH)₃ (Alu-Gel-S, Serva, Deutschland) immunisiert (Vrtala et al., 1998). Die Mäuse wurden drei Mal immunisiert (Tag 1, 28 und 56) und aus den Schwanzvenen wurden in 4-Wochen-Intervallen Blut entnommen, und die Seren wurden bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Die IgG1-Antworten auf rPhl p 1 wurden mittels ELISA gemessen (Vrtala et al., 1998). Die ELISA-Platten (Nunc Maxisorp, Dänemark) wurden mit 5 µg von Plm beschichtet und mit 1:1000 verdünnten Maus-Seren inkubiert. Gebundene IgG1-Antikörper wurden mit einem 1:1000 verdünnten monoklonalen Ratten-anti-Maus-IgG1 (Pharmingen, CA) und einem 1:200 verdünnten, HRP markierten Schaf-anti-Ratten-Antiserum (Amsersham, UK) detektiert.

Wie in Fig. 5 gezeigt ist, ist die Plm-induzierte IgG1-Antwort auf rPhl p 1 beinahe so groß wie jene, die durch Immunisierung mit rPhl p 1 induziert ist.

Fig. 5. Immunogenität von Plm. Mittlere IgG₁-Antwort von 5 Mäusen, immuisiert mit PBS, rPhl p1 oder Plm oder (x-Achse) als OD-Werte (y-Achse) gezeigt, 4, 8 oder 12 Wochen nach Immunisierung.

Literaturstellen:

- Ball, T., et al. (2005) FEBS J. 272:217-227.
Ball, T., et al. (1999) FASEB J. 13:1277.
Focke, M., et al. (2001) FASEB J. 15:2042
Gill, S. C., and P. H. Hippel. (1989) Anal. Biochem. 182: 319.
Hauswirth, AW., et al. (2002) J Allergy Clin Immunol 110:102.
Horton, R. M. (1999) Mol. Biotechnol. 2:93.
Laffer, S., et al. (1994) J. Allergy Clin. Immunol. 94:689.
Niederberger, V., et al. (1998) J. Allergy Clin. Immunol.
101:258.
Schenk, S., et al. (1995) J. Allergy Clin. Immunol. 96:986.
Vrtala, S., et al. (1998) J. Immunol. 160: 6137.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Derivaten des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1 mit im Vergleich zum Wildtyp-Allergen verringerter allergener Aktivität, welches die folgenden Schritte umfasst:
 - Vorsehen des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1,
 - Spleißen des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente, wobei mindestens ein Fragment dieser mindestens drei Fragmente mindestens ein T-Zell-Epitop umfasst und die mindestens drei Fragmente eine reduzierte allergene Aktivität haben oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und
 - Wiederverbinden der mindestens drei Fragmente in einer Reihenfolge, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verringerung der allergenen Aktivität durch eine Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität von mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, mehr bevorzugt mindestens 30%, insbesondere mindestens 50%, im Vergleich zum Wildtyp-Allergen, gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Verringerung der allergenen Aktivität durch das Fehlen der Bindung von IgE-Antikörpern der Allergen-sensibilisierten Seren des Patienten an einen Dot-Blot des Derivats oder durch einen Basophilen-Freisetzungstest gemessen wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Spleißen des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente T-Zell-Epitope des Allergens bestimmt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurereste 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183 oder die

NACHGEREICHT

Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1 umfassen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126-205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von Phl p 1.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat B-D-A-C ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit einem pharmazeutisch akzeptablen Expzipienten vereinigt und zu einem pharmazeutischen Präparat fertig gestellt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit einem geeigneten Vakzin-Adjuvans vereinigt und zu einem pharmazeutisch akzeptablen Vakzin-Präparat fertig gestellt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit mindestens einem weiteren Allergen zu einem Kombinations-Vakzin vereinigt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Allergen ein Wildtyp-Allergen ist, insbesondere eine Mischung von Wildtyp-Allergenen, rekombinante Wildtyp-Allergene, Derivate von Wildtyp-Protein-Allergenen oder Mischungen davon.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Präparat weiters einen Allergen-Extrakt enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Allergen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere

NACHGEREICHT

Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilinen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2.

14. Allergen-Derivat, erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

15. Allergen-Derivat des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat mindestens drei Fragmente des Wildtyp-Protein-Allergens enthält, die miteinander in einer Reihenfolge fusioniert sind, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet, wobei die mindestens drei Wildtyp-Allergen-Fragmente eine verringerte allergene Aktivität aufweisen oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und wobei mindestens eines der mindestens drei Fragmente ein oder mehrere T-Zell-Epitope umfasst.

16. Allergen-Derivat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Allergen-Fragmente mindestens 6 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 10 Aminosäurereste, insbesondere mindestens 15 Aminosäurereste umfassen.

17. Allergen-Derivat nach einem Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 1 bis 64, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 65 bis 125, die Aminosäurereste 126 bis 205, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurereste 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183, die Aminosäurereste 206 bis 240 oder die Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1 umfassen.

18. Allergen-Derivat nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126-205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von Phl p 1.

19. Allergen-Derivat nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat B-D-A-C ist.
20. Allergen-Zusammensetzung, umfassend ein Allergen-Derivat nach einem der Ansprüche 14 bis 19, und weiters Allergene, vorzugsweise Wildtyp-Allergene, insbesondere eine Mischung aus Wildtyp-Allergenen, rekombinante Wildtyp-Allergene, Derivate von Wildtyp-Protein-Allergenen, oder Mischungen davon.
21. Allergen-Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung weiters einen Allergen-Extrakt enthält.
22. Allergen-Zusammensetzung nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten enthält.
23. Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung weiters eines oder mehrere Allergene ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilinen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2, umfasst.
24. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Allergen-spezifischen Immuntherapie-Medikaments.
25. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Medikaments zur aktiven Immunisierung.
26. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zu-

NACHGEREICHT

sammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Medikaments zur prophylaktischen Immunisierung.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament weiters Adjuvantien, Verdünnungsmittel, Konservierungsmittel oder Mischungen davon enthält.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es 10 ng bis 1 g, vorzugsweise 100 ng bis 10 mg, insbesondere 0,5 µg bis 200 µg des rekombinanten Allergen-Derivats umfasst.

29. Verfahren zur Herstellung eines Allergen-Derivats nach einem der Ansprüche 15 bis 18, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Vorsehen eines DNA-Moleküls, das für ein Allergen-Derivat gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18 codiert,
- Transformieren einer Wirtszelle mit dem DNA-Molekül, und
- Exprimieren des Derivats in der Wirtszelle und Isolieren des Derivats.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirt eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine Hefe- oder eine Pflanzenzelle, oder eine prokaryontische Zelle, vorzugsweise Escherichia coli ist.

31. Verfahren zur Herstellung eines Allergen-Derivats nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Allergen-Derivat durch chemische Synthese hergestellt wird.

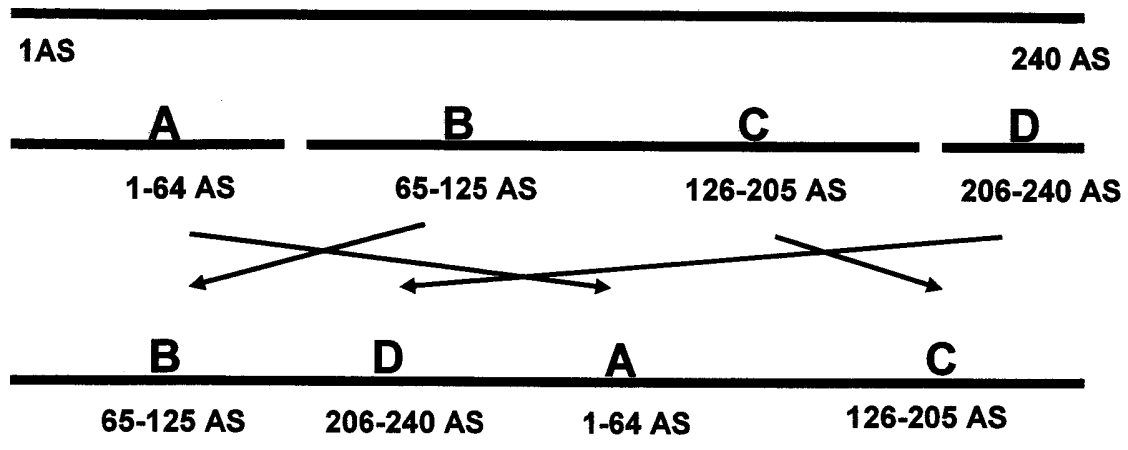


Fig. 1A

SGRGCGSCFE IKCTKPEACSGEPVVVHITDDNEEP IAPYHFDLSGHAFGAMAKKGDEQKLRT

GPFTVRYTTEGGTKTEAEDV IPEGWKADTSYESKIPKVPPGPNITATYGDKWLDKSTWYWK

PTGAGPKDNGGACGYKDVKPPFSGMTGCGNTIFKSAGELELQFRRVKCKYPEGTKVTFHV

EKGSNPNYLALLVKYVNGDGDVVAVDIKEKGKDKWIELKESWGAIWRIDTPDKLGGHHHHHH

- Fragment B
- Fragment D
- Fragment A
- Fragment C

Fig. 1B

NACHGEREICHT

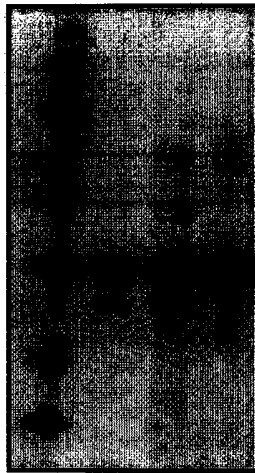


Fig. 2A

M P1m P1m P1

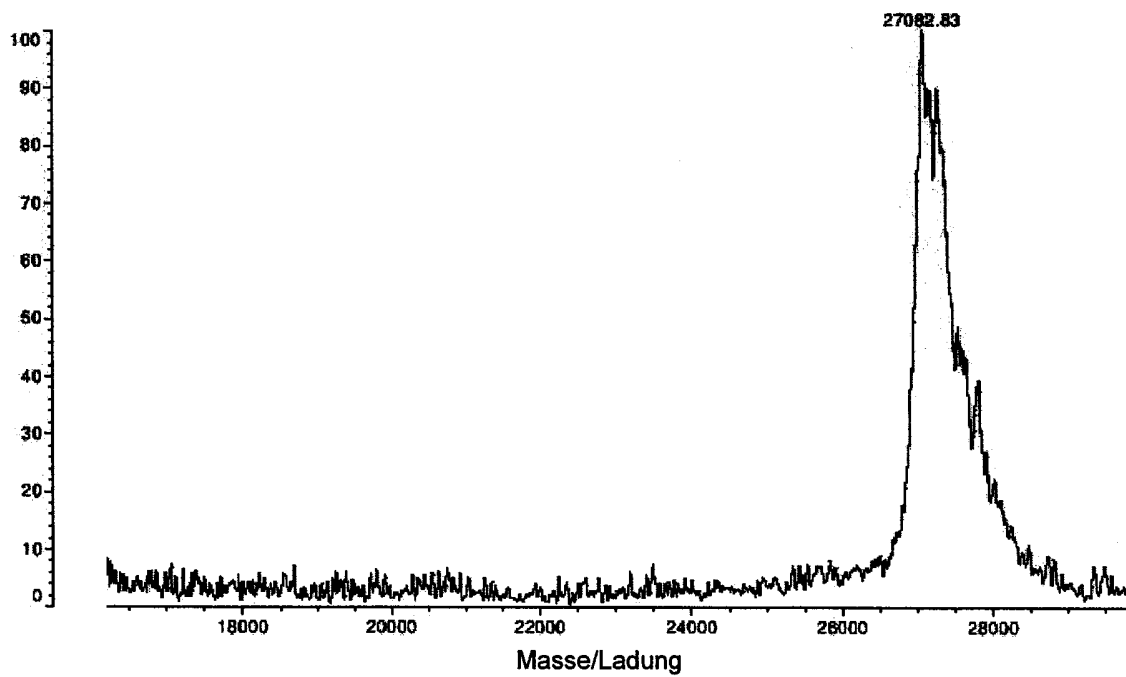


Fig. 2B

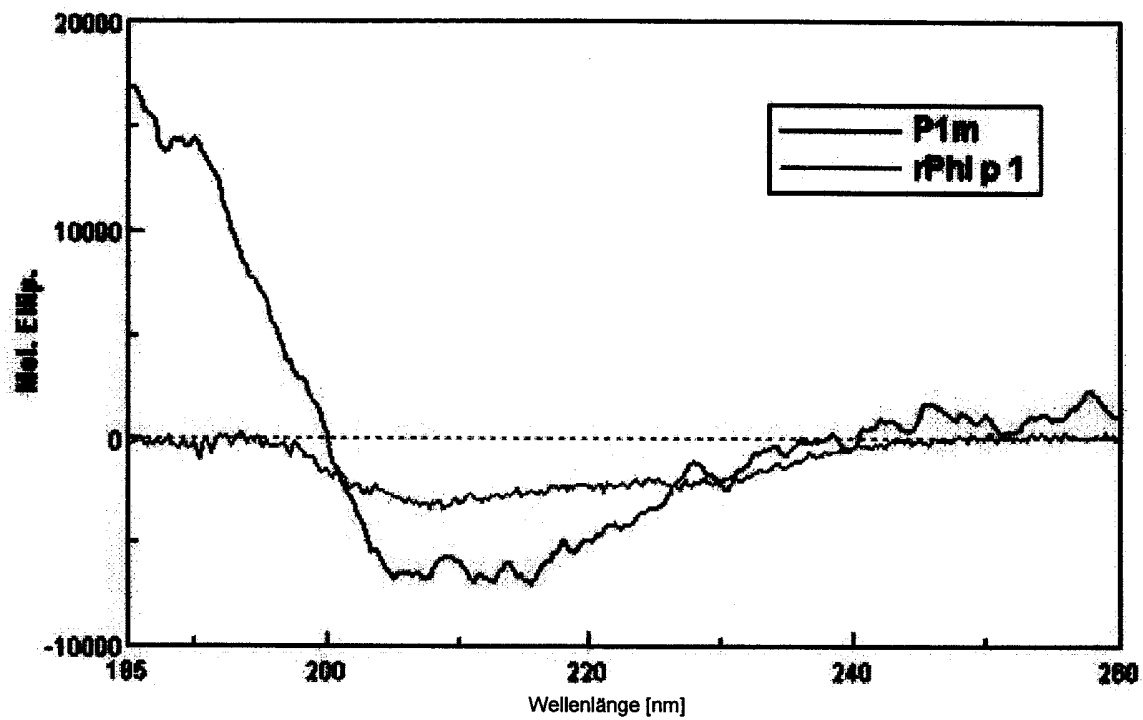


Fig. 2C

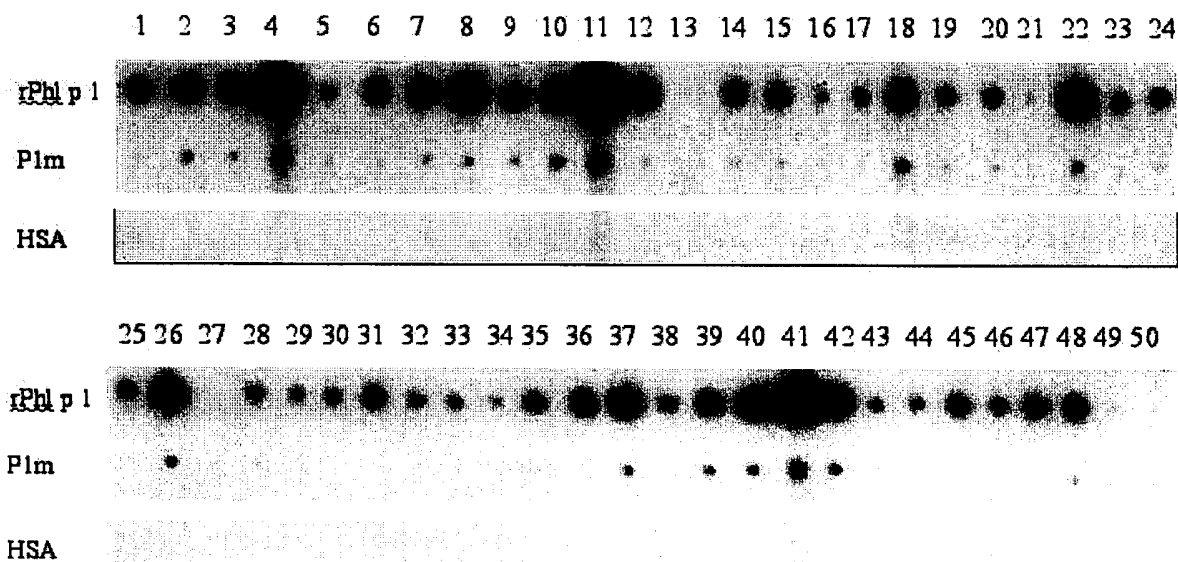


Fig. 3

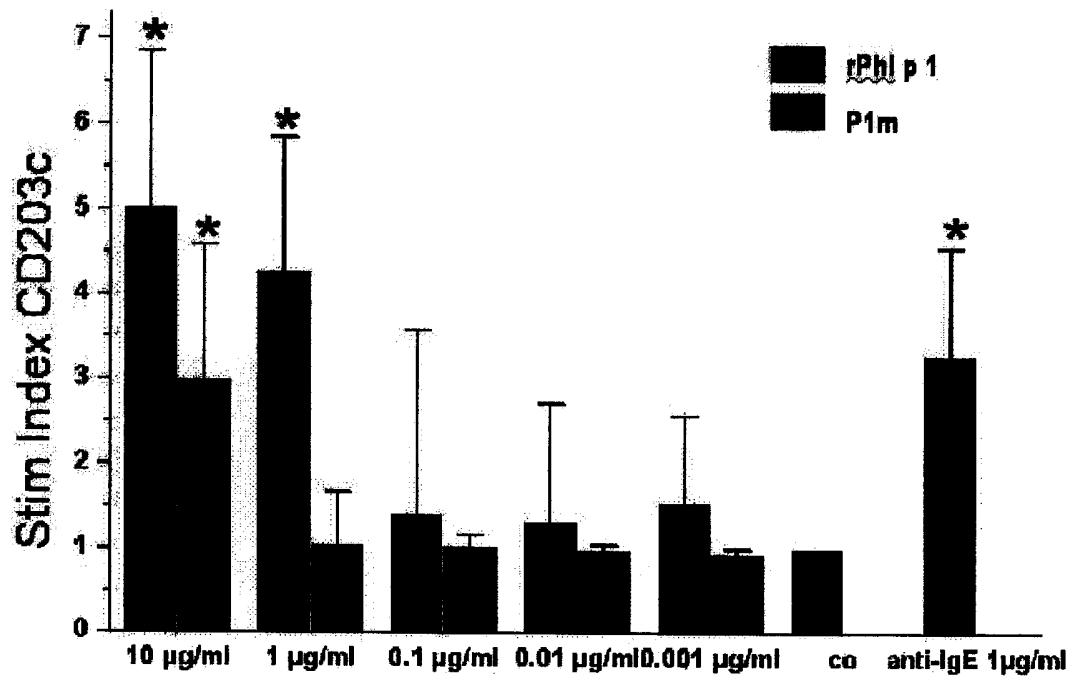


Fig. 4

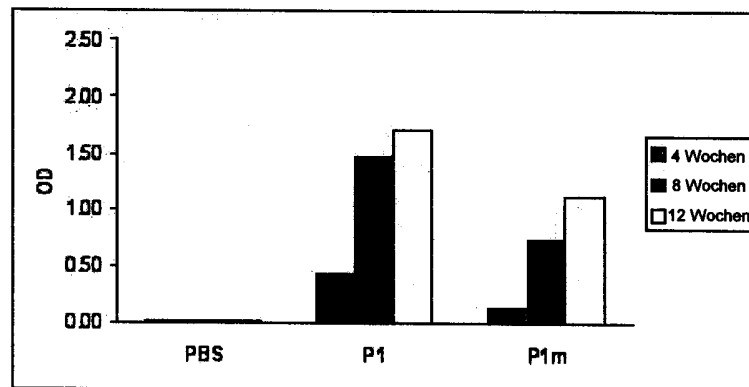


Fig. 5

NACHGEREICHT

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Derivaten des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1 mit im Vergleich zum Wildtyp-Allergen verringerter allergener Aktivität, welches die folgenden Schritte umfasst:
 - Vorsehen des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p1,
 - Fragmentieren des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente, wobei mindestens ein Fragment dieser mindestens drei Fragmente mindestens ein T-Zell-Epitop umfasst und die mindestens drei Fragmente eine reduzierte allergene Aktivität haben oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und
 - Wiederverbinden der mindestens drei Fragmente in einer Reihenfolge, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verringerung der allergenen Aktivität durch eine Verringerung der IgE-Bindungs-Kapazität von mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, mehr bevorzugt mindestens 30%, insbesondere mindestens 50%, im Vergleich zum Wildtyp-Allergen, gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Verringerung der allergenen Aktivität durch das Fehlen der Bindung von IgE-Antikörpern der Allergen-sensibilisierten Seren des Patienten an einen Dot-Blot des Derivats oder durch einen Basophilen-Freisetzungstest gemessen wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Fragmentieren des Wildtyp-Protein-Allergens in mindestens drei Fragmente T-Zell-Epitope des Allergens bestimmt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurer-

este 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183 oder die Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1 umfassen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126-205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von Phl p 1.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat B-D-A-C ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit einem pharmazeutisch akzeptablen Expizipienten vereinigt und zu einem pharmazeutischen Präparat fertig gestellt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit einem geeigneten Vakzin-Adjuvans vereinigt und zu einem pharmazeutisch akzeptablen Vakzin-Präparat fertig gestellt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Derivate mit mindestens einem weiteren Allergen zu einem Kombinations-Vakzin vereinigt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Allergen ein Wildtyp-Allergen ist, insbesondere eine Mischung von Wildtyp-Allergenen, rekombinante Wildtyp-Allergene, Derivate von Wildtyp-Protein-Allergenen oder Mischungen davon.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Präparat weiters einen Allergen-Extrakt enthält.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Allergen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und

NACHGEREICHT

Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2.

14. Allergen-Derivat, erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

15. Allergen-Derivat des Wildtyp-Protein-Allergens Phl p 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat mindestens drei Fragmente des Wildtyp-Protein-Allergens enthält, die miteinander in einer Reihenfolge fusioniert sind, die sich von der Reihenfolge der Fragmente im Wildtyp-Allergen unterscheidet, wobei die mindestens drei Wildtyp-Allergen-Fragmente eine verringerte allergene Aktivität aufweisen oder ihnen die allergene Aktivität fehlt, und wobei mindestens eines der mindestens drei Fragmente ein oder mehrere T-Zell-Epitope umfasst.

16. Allergen-Derivat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Allergen-Fragmente mindestens 6 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 10 Aminosäurereste, insbesondere mindestens 15 Aminosäurereste umfassen.

17. Allergen-Derivat nach einem Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente die Aminosäurereste 25 bis 39, die Aminosäurereste 34 bis 45, die Aminosäurereste 1 bis 64, die Aminosäurereste 73 bis 84, die Aminosäurereste 91 bis 102, die Aminosäurereste 100 bis 111, die Aminosäurereste 109 bis 133, die Aminosäurereste 121 bis 135, die Aminosäurereste 65 bis 125, die Aminosäurereste 126 bis 205, die Aminosäurereste 127 bis 138, die Aminosäurereste 157 bis 168, die Aminosäurereste 169 bis 183, die Aminosäurereste 206 bis 240 oder die Aminosäurereste 226 bis 240 von Phl p 1 umfassen.

18. Allergen-Derivat nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens drei Fragmente ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 64 (A), den Aminosäureresten 65 bis 125 (B), den Aminosäureresten 126-205 (C) und den Aminosäureresten 206 bis 240 (D) von

NACHGEREICHT

Phl p 1.

19. Allergen-Derivat nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihenfolge der Fragmente im Allergen-Derivat B-D-A-C ist.

20. Allergen-Zusammensetzung, umfassend ein Allergen-Derivat nach einem der Ansprüche 14 bis 19, und weiters Allergene, vorzugsweise Wildtyp-Allergene, insbesondere eine Mischung aus Wildtyp-Allergenen, rekombinante Wildtyp-Allergene, Derivate von Wildtyp-Protein-Allergenen, oder Mischungen davon.

21. Allergen-Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung weiters einen Allergen-Extrakt enthält.

22. Allergen-Zusammensetzung nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten enthält.

23. Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung weiters eines oder mehrere Allergene ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Hauptallergenen von Birkenpollen, insbesondere Bet v 1 und Bet v 4, den Hauptallergenen von Wiesen-Lieschgras-Pollen, insbesondere Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 und Phl p 7, den Hauptallergenen der Hausstaubmilbe, insbesondere Der p 1 und Der p 2, dem Hauptallergen der Katze Fel d 1, den Hauptallergenen der Biene, den Hauptallergenen der Wespe, Profilinen, insbesondere Phl p 12, und Allergenen der Vorratsmilbe, insbesondere Lep D 2, umfasst.

24. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Allergen-spezifischen Immuntherapie-Medikaments.

25. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Medikaments zur aktiven Immunisierung.

NACHGEREICHT

26. Verwendung eines Allergen-Derivats oder einer Allergen-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Herstellung eines Medikaments zur prophylaktischen Immunisierung.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament weiters Adjuvantien, Verdünnungsmittel, Konservierungsmittel oder Mischungen davon enthält.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es 10 ng bis 1 g, vorzugsweise 100 ng bis 10 mg, insbesondere 0,5 µg bis 200 µg des rekombinanten Allergen-Derivats umfasst.

29. Verfahren zur Herstellung eines Allergen-Derivats nach einem der Ansprüche 15 bis 18, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Vorsehen eines DNA-Moleküls, das für ein Allergen-Derivat gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18 codiert,
- Transformieren einer Wirtszelle mit dem DNA-Molekül, und
- Exprimieren des Derivats in der Wirtszelle und Isolieren des Derivats.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirt eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine Hefe- oder eine Pflanzenzelle, oder eine prokaryontische Zelle, vorzugsweise Escherichia coli ist.

31. Verfahren zur Herstellung eines Allergen-Derivats nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Allergen-Derivat durch chemische Synthese hergestellt wird.