



(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 740/94

(51) Int.Cl.⁶ : GO1N 33/68
C07K 3/18, C12N 15/29, 15/70

(22) Anmeldetag: 13. 8.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1995

(45) Ausgabetag: 25.10.1995

(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.: 1685/90

(56) Entgegenhaltungen:

BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, BD. 967, 1988; 391-400

(73) Patentinhaber:

BIO-MAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND
HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.
A-4020 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) VERWENDUNG VON POLY(L-PROLIN) ZUR IN VITRO DIAGNOSE

(57) Die Erfindung stellt ein rekombinantes DNA Moleköl zur Verfügung, das für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Allergens P14 der Birke (*Betula verrucosa*) und anderer Gewächse der Ordnung Fagales besitzt oder ein Peptid, das mindestens ein Epitop davon aufweist sowie eine Nukleinsäuresequenz, die mit einer solchen Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Es wird ein Verfahren geliefert, das die Reinigung des P14 Allergens oder kreuzreaktiver Allergene mit Hilfe der Bindung an poly(L-Prolin) ermöglicht. Weiters werden Verfahren beschrieben, das P14 Allergen oder rekombinante oder synthetische Polypeptide gleicher Antigenität in der Diagnose oder Therapie allergischer Erkrankungen zu verwenden.

B

198
400

AT

Während des Frühlings leidet ein großer Teil der Bevölkerung von Mittel-, Ost- und Nordeuropa, Amerika und Australien unter allergischen Symptomen (Rhinitis, Konjunktivitis, Dermatitis und Pollenasthma). Proteine, die aus Pollen von Bäumen der Ordnung Fagales isoliert werden können, insbesondere aus Pollen von Birke, Erle, Hasel, Hainbuche und Eiche, sind für die meisten dieser allergischen Symptome verantwortlich (1).

Diagnosemethoden für allergische Erkrankungen wie RAST (Radioallergosorbent Test), PRIST (Papier Radioimmunosorbent Test) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), und IgE Immunoblots hängen stark von der Verfügbarkeit von reinen Allergenen ab. Proteinextrakte aus Pollen sind schwierig zu standardisieren, sie können unerwünschte Bestandteile enthalten und es können bestimmte Proteine fehlen, die bei der Extraktionsprozedur verlorengehen (2). Deshalb sind diagnostische Tests, die gut definierte Allergene enthalten, solchen Tests überlegen, die lediglich rohe Pollenextrakte mit einer unzureichend definierten Mischung aus Allergenen und anderen Komponenten enthalten. Allergene können aus Pollen mit proteinchemischen Methoden zur Homogenität gereinigt werden, zum Beispiel mit Hilfe der Affinitätschromatographie (3). Diese Methoden sind relativ aufwendig und benötigen Pollen als eine teure Quelle für die Allergene. Deshalb kann es effizienter sein, wenn man die cDNA, die ein allergenes Protein kodiert, isoliert und sequenziert. Dadurch wird es möglich, rekombinante Allergene oder synthetische Peptide herzustellen.

Die Hyposensibilisierung erwies sich als eine effektive Therapie bei allergischen Erkrankungen. Diese Therapie besteht aus einer parenteralen oder oralen Applikation von Allergenen in steigenden Dosen über einen langen Zeitraum. Wie die Diagnosemethoden benötigt sie ebenfalls reine und wohldefinierte Allergene. Mit der Verwendung von rekombinanten Allergenen oder synthetischen Peptiden könnte das Risiko, den Patienten gegen unerwünschte Komponenten zu sensibilisieren, stark gesenkt werden.

Diese Erfindung befasst sich mit einem Pollenallergen insbesondere der Birke (*Betula verrucosa*), in dieser Arbeit P14 genannt. Dieses Allergen ist nicht nur Bestandteil des Birkenpollens, sondern immunologisch eng verwandte Proteine kommen auch in Pollen von nahe verwandten Bäumen der Ordnung Fagales vor, insbesondere bei Erle, Hasel, Hainbuche und Eiche. Die Kreuzreaktivität der IgE Antikörper der Patienten ist in Abb. 1 dargestellt.

Mit vorliegender Erfindung wird ein rekombinantes DNA Molekül zur Verfügung gestellt, das eine Nukleotidsequenz besitzt, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Allergens P14 insbesondere der Gewächse der Ordnung Fagales besitzt. Die Erfindung liefert die vollständige cDNA Sequenz von P14 und damit die vollständige Aminosäuresequenz. Weiters wurde die P14 cDNA in zwei prokaryontische Expressionssysteme, vorliegend *Escherichia coli* inseriert und die IgE Bindungsfähigkeit der exprimierten Polypeptide, eines Fusionsproteins und eines Nichtfusionsproteins, wurde nachgewiesen. Die IgE Bindungsfähigkeit wurde auch für eine Teilsequenz nachgewiesen, die in Lambda gt11 als β -Galactosidase-Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß diese Teilsequenz ein IgE-bindendes Epitop darstellt. Weiters kann aus den Ergebnissen von IgE Immunoblots, Kreuzinhibitionstests, klinischen Tests und Northern (RNA) Blots (4-9) (Abb. 1 und 3) gefolgt werden, daß homologe IgE-bindende Polypeptide im Pollen der nahe verwandten Bäume der Ordnung Fagales existieren. Deshalb wird durch diese Erfindung ein Polypeptid zur Verfügung gestellt, das die gleiche Antigenität wie die verwandten Pollenallergene von Erle, Hasel und Hainbuche aufweist.

Eine Computersuche in den verfügbaren Sequenzdatenbanken (EMBL, MIPSX, Swissprot) nach Proteinen, deren Sequenz zu P14 homolog ist, zeigte eine signifikante Homologie zwischen P14 und einem Cytoskelettprotein (Profilin), das in verschiedenen Eukaryonten vorhanden ist (10-14) (Abb. 5). Diese Homologie wirft die Frage nach einer Kreuzreaktivität der IgE Antikörper der Patienten mit humanem Profilin auf. Diese Autoreaktivität wurde demonstriert (Abb. 12).

In dieser Weise wird ein molekulares System zur Verfügung gestellt, das es erlaubt, die Hypothese zu testen, ob Autoimmunmechanismen bei allergischen und atopischen Erkrankungen eine Rolle spielen. Erste Daten zeigen, daß Patienten, deren IgE Antikörper mit P14 reagieren, eine Gruppe darstellen, die während eines großen Teils des Jahres an allergischen Symptomen leidet, ohne auf konventionelle Therapie befriedigend anzusprechen. Daraus wird gefolgt, daß P14, oder rekombinante oder chemisch synthetisierte IgE bindende Polypeptide mit Sequenzen, die der Sequenz der P14 cDNA entsprechen, als prognostische Marker für die Hyposensibilisierungstherapie eingesetzt werden können.

Diese Erfindung eröffnet weiters einen effizienten Weg zur Reinigung des Pollenproteins sowie des rekombinanten oder synthetischen Polypeptids. Die Reinigungsmethode beruht auf der Affinität von P14 und homologen Polypeptiden zu poly(L-Prolin)(15,16). Da die Bindung des Pollenproteins sowie des rekombinanten P14 an poly(L-Prolin) gezeigt werden konnte (Abb. 8, 9, 10), wird damit eine Methode zur Verfügung gestellt, dieses Allergen zu immobilisieren. So können bestimmte diagnostische Tests aufgebaut werden (zum Beispiel kann poly(L-Prolin) statt eines Antikörpers zum Binden von Profilin bei ELISAS verwendet werden). Ebenso sind Therapieformen möglich, die mit Hilfe von poly(L-Prolin) P14 und analoge

Polypeptide als Allergen binden. Da es Hinweise gibt, daß Patienten, die an Autoimmunerkrankungen leiden, Antikörper gegen P14 bilden, könnten dieses Polypeptid oder homologe Polypeptide für Diagnostik oder Therapie dieser Erkrankungen eingesetzt werden.

5 **MATERIALIEN UND METHODEN :**

1. Konstruktion der cDNA Genbank

Pollen (Allergon AB Engelholm, Schweden), der mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie auf 10 Reinheit untersucht worden war, wurde zur Isolierung von polyadenylierter RNA verwendet (17, 18).

cDNA Synthese wurde mit oligo-dT und random Primern durchgeführt (19, 20), die Enden der cDNA wurden mit T4-Polymerase glattverdaut und mit EcoRI-Linkern versehen. Die cDNA mit Linkern wurde in dephosphorylierte Lambda gt11 Arme (21) ligiert und verpackt. Es ergab sich eine cDNA Genbank von 800.000 unabhängigen Klonen.

15 2. Screening der cDNA Genbank

IgE Screening der Birkenpollen cDNA Genbank wurde durchgeführt wie beschrieben (22). IgE bindende 20 Klonen wurden angereichert und Phagen-DNA wurde daraus präpariert (23). Die Inserts wurden mit EcoRI herausgeschnitten und die Fragmente wurden in das Plasmid pUC18 (24) subkloniert. Von einem Klon wurde die DNA Sequenz erhalten (25). Obwohl sie am 3'-Ende (poly-A Schwanz) vollständig war, fehlten ihr ein großer Teil des 5'-Endes und damit auch das Startcodon. Deshalb wurde die originale Genbank nochmals mit Oligodesoxinukleotiden gescreent, die komplementär zum kodierenden Bereich waren (26) und zwei unabhängige Klonen konnten erhalten werden.

25 3. RNA (Northern) Blots

Zehn µg von Gesamt-RNA aus Pollen von Erle, Birke und Hasel wurden mit Hilfe einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet (27,28). Eine P14 cDNA Probe wurde mittels 30 random Priming ³²P-markiert (29).

Prähybridisierung und Hybridisierung wurden mit Standardmethoden durchgeführt (23). Die Blots wurden mit 0.75xSSC (20xSSC = 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0), 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat), bei 50 °C gewaschen und autoradiographiert (Hyperfilm MP, Amersham, London, GB).

35 4. Expression der P14 cDNA

4.1. Expression des 3'-Teils der cDNA in Lambda gt11 Phagen (Abb. 2)

Mit Hilfe von IgE Screening (22) wurde ein unvollständiger cDNA Klon erhalten, der für einen Teil von 40 P14 codiert. Mit rekombinanten Lambda gt11 Phagen wurde der lysogene *E. coli* Stamm Y1089 infiziert und aus dem Ansatz wurde das β-Galactosidase-Fusionsprotein gewonnen (19). Der Ansatz wurde auf einem 7,5% Polyacrylamidgel elektrophoretisiert und auf Nitrocellulose geblottet. Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe von IgE Antikörpern in Patientenserum und einem jodmarkierten Kaninchen-anti-human IgE Antikörper (Pharmacia, Uppsala, Schweden) detektiert (Abb. 2).

45 4.2. Expression der vollständigen P14 cDNA als Fusions- und Nichtfusionsprotein

Die vollständige cDNA die für P14 kodiert, enthält eine prokaryontische Ribosomenbindungsstelle (Shine Dalgarno Sequenz (30)) und wurde in die EcoRI Stellen der Plasmide pKK223-3 (31) bzw. pEXB (32) 50 inseriert, um P14 als ein Nichtfusionsprotein bzw. ein Fusionsprotein von P14 mit dem Lambda cII Protein zu erhalten. Mit Hilfe von Serum IgE und einer Koloniescreeningmethode (33), wurden IgE bindende Klonen erhalten und mit Hilfe von DNA-Restriktionsanalyse überprüft.

Rekombinante Proteine wurden auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber Patienten IgE Antikörpern getestet wie beschrieben (22).

5. Reinigung des Birkenpollen-P14 und des rekombinanten P14

P14 aus Birkenpollen und rekombinantes P14 wurden mit Hilfe einer Affinitätsmethode nach einem Batchverfahren gereinigt (vergl. 15,16), das für die Profiline von *Acanthamoeba* (10), Hefe (11) und Mensch (13) geeignet ist. Birkenpollen und *E. coli* Zellen, die das Plasmid enthalten, das für P14 kodiert, wurden in 5 PHEM-TX Puffer lysiert (2x PHEM-TX: 120 mM PIPES (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)), 50 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure), 20 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 4mM MgCl₂, 10mM Glucose, 20 mg/ml Leupeptin, 156 mg/ml Benzamidin, 80 mg/ml Aprotinin, 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 1,5% Triton-X100, pH 7,2) und das Lysat 10 wurde eine Stunde bei 65000 x g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht bei 4°C mit poly(L-Prolin) an BrCN-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Die Affinitätsmatrix wurde dann dreimal mit je einem doppelten Volumen von TBS-ATP (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 mM 15 ATP (Adenosintriphosphat), pH 7,6) gewaschen und danach fünf Minuten bei Raumtemperatur mit einem doppelten Volumen von Elutionspuffer I (TBS-ATP mit 2M Harnstoff) eluiert.

Der Überstand wurde gesammelt. Die Prozedur wurde zweimal mit Elutionspuffer II (TBS-ATP mit 6M Harnstoff) wiederholt und die Überstände wurden gegen destilliertes Wasser bei 4°C dialysiert. Die Dialysate, die die Proteine enthielten, wurden lyophilisiert und mit Hilfe von Polyacrylamidelektrophorese und IgE-Immunoblot analysiert (Abb. 8, 9, 10, 11).

20 **ERGEBNISSE:**

BEISPIEL 1:

IgE Bindungsfähigkeit eines Teilstücks der P14 cDNA, das ein IgE bindendes Epitop enthält

25 Die 3'-Region der P14 cDNA (bp 419-478) wurde in die EcoRI Stelle von Lambda gt11 kloniert und als ein IgE-bindendes Polypeptid exprimiert (21) wie in Abb. 2 gezeigt. Das β-Galactosidase-Fusionsprotein (Spur 4) band stark an IgE des Patienten, während die Kontrollspuren 1 und 2 mit den Proteinen von *E. coli* Y1089 und den Proteinen von *E. coli* Y1089, die mit Lambda gt11 Phagen ohne Insert infiziert waren, keine 30 IgE-Bindung zeigten. Dieses Beispiel zeigt, daß auch ein Teil-cDNA Klon, der zumindest ein Epitop des P14 Moleküls enthält, zur Verfügung gestellt wird. Daraus folgt, daß Teil-cDNA Klonen, die rekombinante Polypeptide kodieren, oder synthetische Polypeptide IgE-bindende Epitope repräsentieren können, die in ähnlicher Weise wie das vollständige P14 Molekül oder homologe Proteine nützlich für Therapie oder Diagnose sein können.

35 **BEISPIEL 2:**

Demonstration von zu P14 homologen Polynukleotiden und Polypeptiden innerhalb der Ordnung Fagales

40 Der Northern (RNA) Blot (Abb. 3) zeigt, daß die P14 Sequenz in der Lage ist, mit Pollen-mRNA aus Erle und Hasel unter stringenten Bedingungen zu kreuzhybridisieren. Die Sequenzhomologie der korrespondierenden Allergene der Bäume der Ordnung Fagales kann deshalb schon auf der Nukleinsäureebene demonstriert werden. Abb. 1 hatte bereits eine ähnliche IgE-Bindungskapazität der zu P14 homologen Proteine von Erle, Hasel und Hainbuche gezeigt. Daraus wird gefolgt, daß die P14 cDNA Polypeptide von 45 ähnlicher IgE Bindungsfähigkeit und Antigenität wie die nahe verwandten Baumpollenallergene kodiert.

BEISPIEL 3:

Sequenzanalyse

50 Abb. 4 zeigt die Sequenz der cDNA, die P14 kodiert. Enthalten ist der vollständige Protein kodierende Bereich. In der Abbildung ist die Sequenz des Peptids unterstrichen, das an β-Galactosidase gekoppelt ein IgE-bindendes Epitop darstellt (siehe **BEISPIEL 4**).

Abb. 5 illustriert die Sequenzhomologie zwischen dem P14 Protein der Birke und menschlichem, Maus-, 55 Kalb-, Hefe- und *Acanthamoeba* Profilin (13, 12, 14, 11, 10).

Die Kreuzreaktivität von Patienten-IgE mit P14 und menschlichem Profilin ist in Abb.12 gezeigt. Ähnliche chemische Eigenschaften dieser verwandten Proteine wurden auch durch ihre gemeinsame Affinität zu poly(L-Prolin) aufgezeigt (Abb. 8, 10). Diese Daten geben einen Hinweis darauf, daß die Profiline

von Arten, die evolutionär so weit voneinander entfernt sind wie Mensch und Birke, als kreuzreaktive Panallergene wirken können, die zu einer IgE Autoimmunreakтивität in Patienten führen können.

BEISPIEL 4 :

5

Expression der P14 kodierenden cDNA in *E. coli* als Fusions- bzw. Nichtfusionsprotein und Nachweis der IgE-Bindungsfähigkeit dieser Polypeptide.

10

Das Polynukleotid, das für P14 kodiert, wurde in das Plasmid pKK223-3 inseriert, so daß ein rekombinantes Nichtfusionsprotein (31) hergestellt werden konnte, während im Plasmid pEXB ein rekombinantes Fusionsprotein produziert wurde (32). Die Reaktivität dieser Polypeptide mit Patienten-IgE wird in Abb. 6 gezeigt. Kontrollproteinextrakte von *E. coli* in den Spuren 1, 2, 5, und 6 binden kein IgE während rekombinantes P14 exprimiert als ein Nichtfusionsprotein (Spur 3, 4) und als ein Fusionsprotein (Spur 7, 8) IgE bindet.

15

In Abb. 7 wurden Sera von Birkenpollenallergikern (A-K), Graspollenallergikern (L-N), Beifußallergikern (O-Q) und ein Pool von nicht allergischen Individuen (R), die alle gemäß ihrer Krankengeschichte, RAST und Hauttest ausgewählt worden waren, auf ihr IgE-Bindungsvermögen mit rekombinanten P14 getestet.

IgEs der Sera D, E, F, I, J und P banden an P14 exprimiert in pKK223-3.

20

Daraus folgt, daß diese Erfindung ein Polynukleotid zur Verfügung stellt, das für Polypeptide kodiert, welche ähnliche Antigenität und ähnliches IgE-Bindungsvermögen besitzen wie das P14 Protein der Birke, wenn das Polynukleotid im korrekten Leserrahmen von verschiedenen Expressionssystemen inseriert ist. Die IgE Bindungseigenschaften dieser Polypeptide konnten für Sera von Patienten, die mit verschiedenen Pollen allergische Reaktionen zeigen, demonstriert werden und weisen damit auf die große klinische Relevanz dieser Polypeptide hin (Abb. 7).

25

BEISPIEL 5 :

Reinigung von P14 aus Pollen und des rekombinanten P14 aus *E. coli*.

30

Wie in Materialien und Methoden beschrieben stellt diese Erfindung eine einfache Methode zur Verfügung, um natürliches wie rekombinantes P14 zu reinigen. Das Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel in Abb. 8 zeigt daß reines P14 (Spur 3, 4 und 5) von Gesamtpollenprotein (Spur 1) getrennt werden kann. Die Proteine, die nicht an poly(L-Prolin)-Sepharose binden, werden auch gezeigt (Spur 2). Die Effizienz dieser Reinigungsmethode wurde mittels IgE Immunoblotting (Abb. 9) überwacht, wobei hierzu Serum eines Patienten verwendet wurde, der die meisten Birkenpollenallergene mit IgE Antikörpern erkennt (Spur 1). Nach der Anwendung der Affinitätsmethode kann nahezu kein P14 gefunden werden (Spur 2) während in Spur 3, 4 und 5 das gereinigte P14 erhalten wurde.

35

Abb. 10 zeigt ein Polyacrylamidgel, das die Reinigung von rekombinantem P14 aus *E. coli* JM105 demonstriert, der mit dem Plasmid pKK223-3 transformiert ist, das die P14-kodierende Sequenz trägt. Aus den Gesamtproteinen (Spur 1) wurde rekombinantes P14 (Spur 3, 4) abgetrennt, die verbleibenden Proteine zeigt Spur 2. Abb. 11 zeigt, daß aus *E. coli* JM105 transformiert mit pKK223-3 ohne Insert kein homologes Protein mittels der angewendeten Methode erhalten wird.

40

Wie Abb. 9, 6 und 7 zeigen, behält das gereinigte Protein (aus Birke und *E. coli*) seine IgE-Bindungsfähigkeit. So zeigt dieses Beispiel, daß die vorliegende Erfindung auch ein einfaches und rasches Reinigungsverfahren für P14 als nicht rekombinantes wie als rekombinantes Polypeptid zur Verfügung stellt. Bei diesem Verfahren behält es seine Antigenität und sein IgE-Bindungsvermögen. Die Methode bietet darüber hinaus eine Möglichkeit, das immunologisch aktive Polypeptid zu immobilisieren.

BEISPIEL 6 :

50

IgE Reaktivität von allergischen und atopischen Patienten mit humanem Profilin

55

Verschiedene Patientenserien wurden wie folgt ausgewählt (Abb. 12):

Patient 1 zeigt IgE Antikörper, die gegen die meisten Birkenpollenallergene einschließlich *Betv1* und P14 gerichtet sind, Patient 2 zeigt IgE Bindung ausschließlich mit P14 und Patient 3 ausschließlich mit *Betv1*. Patient 4 ist ein Hausstaubmilbenallergiker und der Serumpool 5 wurde von nicht allergischen Individuen zusammengestellt. Spur 6 ist die Pufferkontrolle. All diese Sera wurden auf ihr IgE-Bindungsvermögen mit nichtrekombinantem und rekombinantem P14 und humanem Profilin getestet. Jeder Patient, der das

nichtrekombinante P14 aus Birke sowie das rekombinante P14 aus *E. coli* erkannte, hatte auch IgE Antikörper gegen das humane Profilin. Deshalb gibt diese Erfindung zum ersten Mal Hinweise auf molekularem Niveau, daß Autoimmunmechanismen eine Rolle bei atopischen und allergischen Erkrankungen spielen könnten. Da Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen Antikörper gegen P14 bilden, könnte diese Erfindung einen diagnostischen Marker für diese Erkrankungen liefern.

5 **BEISPIEL 7 :**

Korrelation der Krankengeschichten von atopischen und allergischen Patienten mit der Bindung von IgE-Antikörpern an P14

10 Die Fallgeschichten von Patienten, die IgE-Antikörper gegen P14 bilden, zeigen, daß alle von ihnen unter schweren allergischen Symptomen leiden, die durch ganz verschiedene Allergene verursacht werden (Baum- und Graspolen, Milben-, Katzen- und Hundeallergene), daß sie einen erhöhten Gesamt-IgE Spiegel haben und eine unbefriedigenden Verlauf bei der Hypersensibilisierungstherapie zeigen. Daraus folgt, daß 15 eine positive Reaktion des Serum-IgE der Patienten mit P14 als ein guter Marker zur Differenzierung von bestimmten Gruppen von Atopie- und Allergiepatienten verwendbar ist.

15 **LITERATUR:**

- 20 1. L. Yman. Botanical relations and immunological cross-reactions in pollen allergy, 2nd ed. Uppsala, Sweden: Pharmacia AB, 1982.
2. W. R. Thomas, K.-Y. Chua, W. K. Greene und G. A. Stewart. Recombinant mite allergens. In: *Epitopes of atopic allergens*. A. H. Sehon, D. Kraft, und G. Kunkel (Hrsg.) UCB Institute of Allergy, Brussels 1990.
- 25 3. E. Jarolim, M. Tejkl, M. Rohac, G. Schlerka, M. Breitenbach, O. Scheiner, D. Kraft, H. Rumpold. Monoclonal antibodies against birch pollen allergens; characterization by immunoblotting and use for single-step affinity purification of the major allergen *Betv1*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90, 54-60 (1989).
4. H. Ipsen, H. Bowadt, H. Janniche, B. Nüchel Petersen, E. P. Munch, J. A. Wihl und H. Loewenstein. 30 Immunoochemical characterization of reference alder (*Alnus glutinosa*) und hazel (*Corylus avellana*) pollen extracts and the partial immunoochemical identity between the major allergens of alder, birch, und hazel pollen. *Allergy* 40, 510-518 (1985).
5. H. Rumpold, M. Rohac, B. Bohle, M. Breitenbach, O. Scheiner und D. Kraft. The relationship of *Betv1* epitopes recognized by patients' IgE und monoclonal anti-*Betv1* antibodies. In: *Epitopes of atopic allergens*. A. Sehon, D. Kraft und G. Kunkel (Hrsg.). The UCB Institute of Allergy, Brussels 1990.
- 35 6. R. Valenta, H. Breiteneder, K. Pettenburger, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft und O. Scheiner. Homology of the major pollen allergens of alder, hazel, und hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, zur Veröffentlichung eingereicht.
7. B. Nüchel Petersen, H. Janniche, E. P. Munch, J. A. Wihl, H. Böwadt, H. Ipsen und H. Loewenstein. 40 Immunotherapy with partially purified und standardized tree pollen extracts. *Allergy* 43, 353-362 (1988).
8. J. A. Wihl, H. Ipsen, B. Nüchel Petersen, E. P. Munch, H. Janniche und H. Loewenstein. Immunotherapy with partially purified tree pollen extracts. *Allergy* 43, 363-369 (1988).
9. H. Ipsen, B. Schwartz, J. A. Wihl, B. Nüchel Petersen, E. P. Munch, H. Janniche und H. Loewenstein. 45 Immunotherapy with partially purified und standardized tree pollen extracts. *Allergy* 43, 370-377 (1988).
10. C. Ampe, J. Vandekerckhove, S. L. Brenner, L. Tobacman und E. D. Korn. The amino acid sequence of *Acanthamoeba* profilin. *J. Biol. Chem.* 260, 834-840 (1985).
11. V. Magdolen, U. Oechsner, G. Müller und W. Bandlow. The intron-containing gene for yeast profilin (*PFY*) encodes a vital function. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5108-5115 (1988).
12. J. S. Widada, C. Ferraz und J.-P. Liautard. Total coding sequence of profilin cDNA from *Mus musculus* macrophage. *Nucl. Acids Res.* 17, 2855 (1989).
13. D. J. Kwiatkowski und G. A. P. Bruns. Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, und chromosomal analysis. *J. Biol. Chem.* 263, 5910-5915 (1988).
14. C. Ampe, F. Markey, U. Lindberg und J. Vandekerckhove. The primary structure of human platelet profilin: reinvestigation of the calf spleen profilin sequence. *FEBS Lett.* 228, 17-21 (1988).
15. U. Lindberg, C. E. Schutt, E. Hellsten, A.-C. Tjäder und T. Hult. The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin und profilactin complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 391-400 (1988).
- 55 16. M. Tanaka und H. Shibata. Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin und a profilactin. *Eur. J. Biochem.* 151, 291-297 (1985).

17. H. Breiteneder, W. Hassfeld, K. Pettenburger, E. Jarolim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft und O. Scheiner. Isolation und characterization of messenger RNA from male inflorescences und pollen of white birch (*Betula verrucosa*). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 87, 19-24 (1988).
- 5 18. H. Aviv und P. Leder. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412 (1972).
19. T. V. Huynh, R. A. Young, R. W. Davis, in *DNA cloning - a practical approach*, Band 1, D. M. Glover (Hrsg.), IRL Press, Oxford 1985.
- 10 20. H. Haymerle. *Nucl. Acids Res.* 14, 8615 (1986).
21. R. A. Young und R. W. Davis. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1184-1198 (1983).
- 15 22. H. Breiteneder, K. Pettenburger, A. Bito, R. Valenta, D. Kraft, H. Rumpold, O. Scheiner und M. Breitenbach. The gene coding for the major birch pollen allergen *Betv1* is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8, 1935-1938 (1989).
23. F. M. Ausubel. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishing Associates und Willy-Interscience, New York, 1987.
- 20 24. C. Yanisch-Perron, J. Vieira und J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors und host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 und pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119 (1985).
- 25 25. F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977).
- 26 26. R. B. Wallace, J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose und K. Itakura. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ϕ X 174 DNA: the effect of a single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543-3557 (1979).
27. P. S. Thomas. Hybridization of denatured RNA und small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205 (1980).
28. H. Lehrach. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751 (1977).
29. A. P. Feinberg und B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13 (1983).
30. J. Shine und L. Dalgarno. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets und ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346 (1974).
31. E. Armann, J. Brosius und M. Ptashne. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25, 167-178 (1983).
32. N. Kiyoshi, H. C. Thøgersen. Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309, 810-812 (1984).
33. D. M. Helfman, J. R. Feramisco, J. C. Fiddes, G. P. Thomas und S. H. Hughes. Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 31-35 (1983).

40 **Figuren:**

Fig. 1: IgE Immunoblot: Pollenproteine aus Birke (B), Hainbuche (CA), Erle (A) und Hasel (C) wurden mit Hilfe von einer 12.5% Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Nitrocellulose wurde in Streifen geschnitten (1-5), die mit Serumverdünnungen (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80) von einem ausgewählten Patienten inkubiert wurden, der mit seinen IgE Antikörpern die wichtigsten Birkenpollenallergene erkannte. Pfeile und Stemchen zeigen die Molgewichte an. Das gebundene Serum-IgE wurde mit Hilfe einer Autoradiographie von daran gebundenen 125 I markierten Anti-Human IgE Antikörpern von Kaninchen detektiert. Die IgE-bindenden Proteine von Birke, Erle, Hasel und Hainbuche entsprachen sich, was die Ähnlichkeit der Antigene demonstriert.

Fig. 2: IgE Immunoblot:
Proteine wurden mit Hilfe einer 7.5% Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Spur B: Birkenpollenproteine, Spur 1: Proteine aus *E. coli* Y1089 (lysogener Wirt), Spur 2: Proteine von *E. coli* Y1089 infiziert mit dem Lambda gt11 Phagen ohne Insert, Spur 3: Proteine aus *E. coli* Y1089 infiziert mit einem rekombinanten Phagen, der ein Kontrollinsert trägt (Positivkontrolle), Spur 4: Proteine aus *E. coli* Y1089 infiziert mit den rekombinanten Phagen, die den 3'-Anteil der P14 cDNA enthielten, der für ein IgE bindendes Epitop kodiert, Spur 5: Proteine aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*).
Rekombinante β -Galaktosidase-Fusionsproteine mit IgE-Bindungsfähigkeit, deren Molekulargewichte zwi-

schen 120 und 130 kD betrugen (Spur 3 und 4) wurden mit ^{125}I -markiertem Anti-Human IgE Antiserum aus Kaninchen detektiert. Keine vergleichbare IgE-Bindung findet in Spur 1, 2 und 5 statt, während Spur B das IgE-Bindungsprofil des Patienten zeigt.

5 **Fig. 3:** Northern (RNA) Blot: Zehn μg Pollen RNA von Erle (Spur A), Birke (Spur B) und Hasel (Spur C) und als Marker RNA von *E. coli* (Spur M) wurden auf Nitrocellulose geblottet. Die P14 cDNA hybridisiert mit Pollen-mRNA von Erle, Birke und Hasel und ergibt unter stringenten Bedingungen (0.75 x SSC, 0.1% SDS, 50 °C) ein Signal bei 800 Basen.

10 **Fig. 4:** cDNA Sequenz von P14. Der Leserahmen beginnt mit dem ATG (Basenpaare 80-82) und endet mit dem Stopcodon TAG (Basenpaare 479-481). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter der DNA 15 Sequenz abgebildet. Die Sequenz von P14, die innerhalb eines Fusionsproteins in der Lage ist, IgE von Patienten zu binden und deshalb ein Epitop darstellt, ist unterstrichen dargestellt.

15 **Fig. 5:** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von P14 mit der Aminosäuresequenz des humanen (13), Kalbs- (14), Maus- (12), Hefe- (11) und *Acanthamoeba* (10) Profilins. Identische Aminosäurereste sind markiert. Der Prozentsatz von identischen Aminosäureresten zwischen dem P14 Protein der Birke und den Homologen beträgt 30% zum humanen Protein, 28% zu den homologen Proteinen von Kalb und Maus, 26% zum Hefeprotein und 25% zum *Acanthamoeba* Protein.

20 **Fig. 6:** Western (Protein) Blot eines Polyacrylamid Gels geprobt mit IgE Antikörpern von Patienten Spur 1: Proteine von *E. coli* JM105 ohne Plasmid, Spur 2: Proteine von *E. coli* JM105 mit dem Plasmid pKK223-3 ohne Insert, Spur 3, 4: Proteine von *E. coli* JM105 mit jenem aus pKK223-3 abgeleiteten 25 Plasmid, das von der inserierten cDNA das P14 Protein als Nichtfusionsprotein exprimiert, Spur 5: *E. coli* AR58 Proteine, Spur 6: *E. coli* AR58 mit dem Plasmid pEXB ohne Insert, Spur 7, 8: Extrakte aus *E. coli* AR58 transformiert mit dem aus pEXB abgeleiteten Plasmid, das die p14 cDNA als Fusionsprotein exprimiert, Spur 9: Birkenpollen-Proteinextrakt (Positivkontrolle).

25 **Fig. 7:** Sera von verschiedenen allergischen Patienten wurden auf ihre IgE-Reaktivität gegenüber rekombinantem P14 getestet, das in pKK223-3 exprimiert war. Patienten D, E, F, I, J, und P zeigen IgE Bindung an das rekombinante P14. Spur R ist die Pufferkontrolle.

30 **Fig. 8:** Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels: Spur M Molekulargewichtsmarker, Spur 1: Gesamtproteine der Birke, Spur 2: Birkenpollenproteine, aus denen nach der Affinitätsmethode P14 entfernt worden ist, Spur 3, 4, und 5: eluiertes P14.

35 **Fig. 9:** IgE Immunoblot: Eine in gleicher Weise gewonnene Probe von Proteinen wie in Abb. 8 wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit Serum-IgE von einem Patienten inkubiert, der die meisten Birkenpollenallergene erkennt. Spuren 1 - 5 enthalten dasselbe Material wie in Abb. 8, Spur 6 enthält den Molekulargewichts-Marker.

40 **Fig. 10:** Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel. Spur M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: Gesamtproteine von *E. coli* JM105 mit dem aus pKK223-3 abgeleiteten Plasmid, das die P14 cDNA exprimiert, Spur 2: Proteinfraktion nach der Entfernung des rekombinanten P14, Spuren 3 und 4: gereinigtes rekombinantes P14 - eluierte Fraktionen.

45 **Fig. 11:** Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel. Spur M: Molekulargewichtsmarker, Spur 1: Gesamtprotein aus *E. coli* JM105 mit dem Plasmid pKK223-3 ohne Insert, Spur 2: Proteinfraktion nach poly(L-Prolin)-Reinigung, Spuren 3, 4 und 5: eluierte Fraktionen die zeigen, daß aus dem Expressionssystem ohne Insert 50 kein zu P14 homologes Protein isoliert werden kann.

50 **Fig. 12:** IgE Immunoblot: Gereinigtes humanes Profilin wurde auf ein 12% Polyacrylamidgel geladen und auf Nitrocellulose geblottet. Von der Nitrocellulose wurden Streifen geschnitten und in folgender Weise inkubiert: Streifen 1 wurde mit Serum-IgE von einem Patienten inkubiert, der die meisten Birkenpollenallergene, P14 eingeschlossen, erkannte, Streifen 2 wurde mit Serum IgE von einem Patienten inkubiert, der nur P14 in Birkenpollenextrakten erkannte, Streifen 3 wurde mit Serum von einem Patienten inkubiert, dessen Serum-IgE nur gegen *Betvl* gerichtet war, Streifen 4 wurde mit dem Serum eines Milbenallergikers inkubiert, Streifen 5 mit Serum von einer Gruppe von nichtallergischen Spendern und Streifen 6 zeigt die Pufferkontrolle. IgE-Bindung wurde mit einem ^{125}I markierten Anti-Human IgE Antiserum vom Kaninchen nachgewiesen.

Patentansprüche

- 55 1. Verwendung von poly(L-Prolin) zur *In vitro* Diagnose, die auf der Affinität zu einem Protein oder Polypeptid beruht, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Polypeptid die Antigenität des P14 Proteins oder eines Epitops davon besitzt, wobei die Aminosäuresequenz der in Abbildung 4 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht.

AT 400 198 B

2. Verfahren zur Reinigung eines Proteins oder eines Polypeptids, das der Antigenität des P14 Proteins entspricht, dessen Aminosäuresequenz der in Abbildung 4 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht, **dadurch gekennzeichnet**, daß Poly(L-Prolin) für eine affinitive Reinigung eingesetzt wird.

5

3. Verfahren zur Reinigung von natürlichem Pollenextrakt, **dadurch gekennzeichnet**, daß das P14 Allergen, dessen Aminosäuresequenz der in Abb. 4 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht, durch affinitive Bindung an poly(L-Prolin) entfernt wird.

10

Hiezu 12 Blatt Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

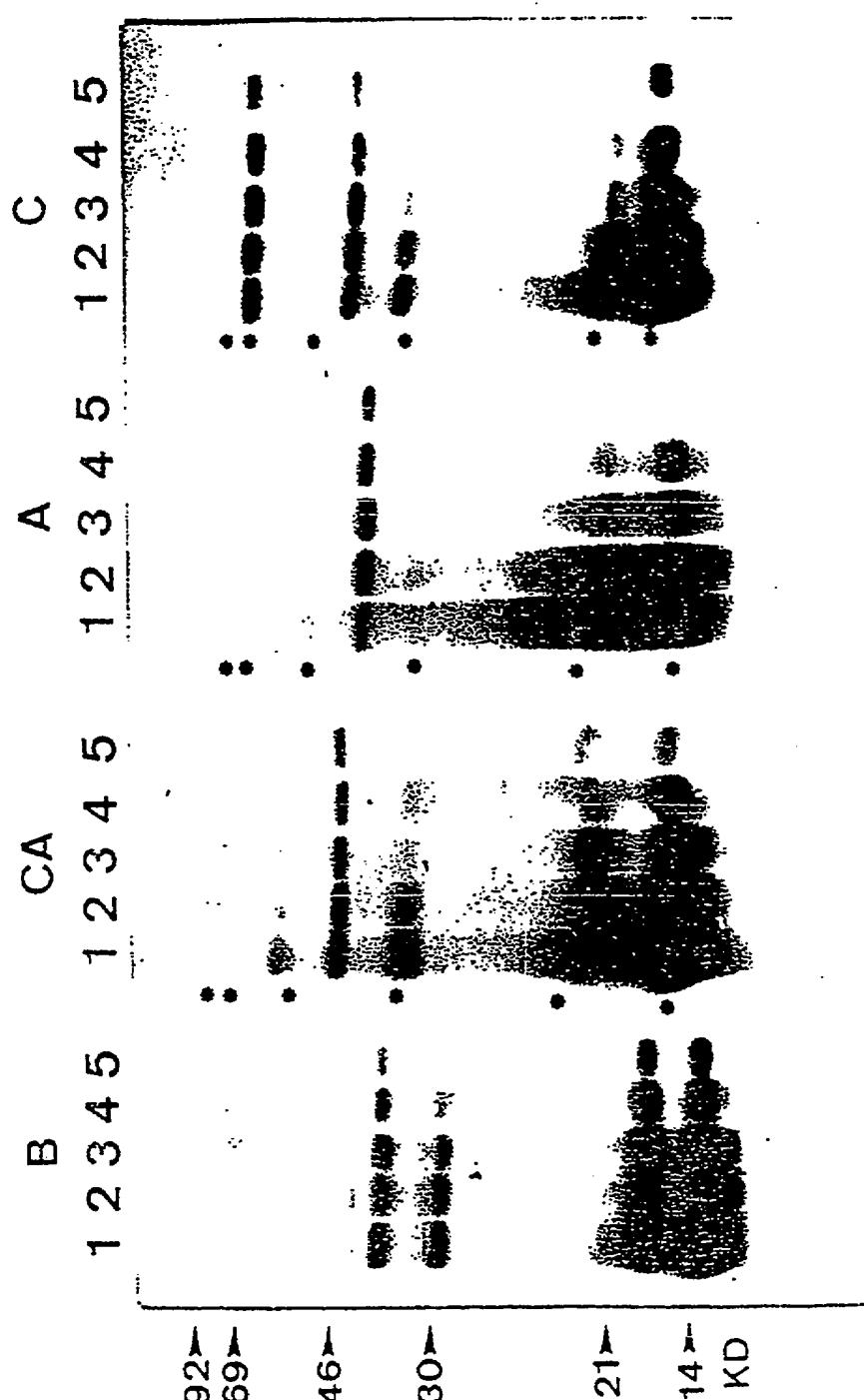


FIG. 1

B 1 2 3 4 5

200 -

92 -

69 -

46 -

30 -

21 -
14 - kd

FIG. 2

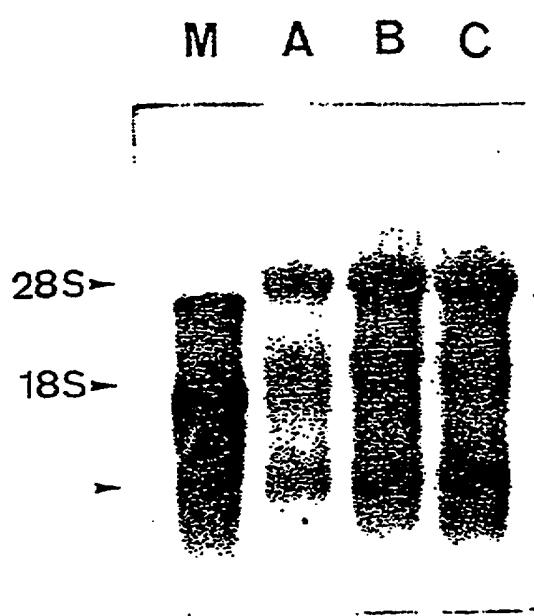


FIG. 3

10	20	30	40	50	60
CAGAGAAACCGAAACCTCTCCGCCACAAACAAAACGAAGTAGAAGAAGAAGAGTGAGCAAG					
70	79				
AGACAGAGGAAAGAGGAAA					
90	100	110	120		
ATG TCG TGG CAA ACG TAC GIG GAT GAA CAT TTG ATG TGC GAT ATC					
met ser trp gln thr tyr val asp glu his leu met cys asp ile					
130	140	150	160		
GAC GGG CAA GCC AGC AAC TCG CTG GCA TCT GCG ATC GTC GGT CAC					
asp gly gln ala ser asn ser leu ala ser ala ile val gly his					
180	190	200	210		
GAT GGC TCT GTG TGG GCC CAG AGC TCT TCC TTC CCA CAG TTT AAG					
asp gly ser val trp ala gln ser ser phe pro gln phe lys					
220	230	240	250		
CCT CAG GAA ATC ACT GGT ATC ATG AAG GAC TTT GAG GAG CCG GGT					
pro gln glu ile thr gly ile met lys asp phe glu glu pro gly					
270	280	290	300		
CAT CTT GCT CCG ACG GGC TTA CAC CTT GGG GCC ATA AAA TAC ATG					
his leu ala pro thr gly leu his leu gly gly ile lys tyr met					
310	320	330	340		
GTC ATC CAG GGA GAG GCT GGT GCT GTC ATC CGT GGA AAG AAG GGA					
val ile gln gly glu ala gly ala val ile arg gly lys lys gly					
360	370	380	390		
TCT GGA GGT ATT ACT ATA AAG AAG ACT GGT CAA GCT CTC GTT TTT					
ser gly gly ile thr ile lys lys thr gly gln ala leu val phe					
400	410	420	430		
GGC ATC TAT GAA GAG CCT GIG ACA CCA GGA CAG TCG AAC ATG GTT					
gly ile tyr glu glu pro val thr <u>pro gly gln ser asn met val</u>					
450	460	470	480		
GTT GAG AGG TTG GGG GAT TAC CTT ATT GAC CAG GGC CTG TAG					
<u>val glu arg leu gly asp tyr leu ile asp gln gly leu</u> *					
490	500	510	520	530	540
GCAAAGGTCTATCATCATTTGGGCTTAATTGTTTTTTTTGCTCTATTCCC					
550	560	580	590	600	610
TTTGATTTCGGTCAAGTGTGATCTCATTTGAAAGCCTTAAATTGCCAGIGAA					
620	630	640	650	660	670
GTGTTGCGAGACAATAACCATGTGAGAACTAAAACATTGTCTTGTTGGTTGTTGA					
680	690	700	710		
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					

FIG. 4

	10	20	30	40	50	60	70	80
Maus	MAGWNAVD. I.MAD.. G...	TCQDAATVGYKDS	SPSVWAAPGKTFVSVITPAEVGVLYG..	KDRSSEFVNGLIGGQKCS				
Kalb	AGWNAVDN. I.MAD.. G...	TCQDAATVGYKDS	SPSVWAAPGKTFVNVITPAEVGVLYG..	KDRSSFFVNGLIGGQKCS				
Human	MAGWNAVDN. I.MAD.. G...	TCQDAATVGYKDS	SPSVWAAPGKTFVNVITPAEVGVLYG..	KDRSSFVNGLIGGQKCS				
Birke	MS.WQTYVDEHTMCDIDGASNSLASATVGDGCS..	VWA..	QSSSFPOQKPOEITGIMKDFEPGHLAPTGHLGGIKM					
Hefe	MS.WQAYTDN.LIGT.. G...	KVDKAVIYSRAG.DAWWATSGG..	.LSLQPNEIGERYQEFDNPAIGLQNGLHQGQKF.					
Acanthamoeba	..TWQSYVDTINLVGT.. G...	AVTQAMALGIDGNT..	.WASEAG..	FAVTPAQGTITLAGAFNNADAIRAGGFIDLACGVHV				
					90	100	110	120
								130
								140
Maus	VIRDSSLQDGEFTMDIRTGSTGGAPTFNVTMATAKTLVLMGKEGVHGGLINKKCYTEMASHLRRSQX							
Kalb	VIRDSSLQDGEFTMDIRTGSTGGAPTFNVTMATAKTLVLMGKEGVHGGMINKKCYTEMASHLRRSQX							
Human	VIRDSSLQDGEFSMDIRTGSTGGAPTFNVTMATAKTLVLMGKEGVHGGLINKKCYTEMASHLRRSQX							
Birke	VI.....Q.GEAGAVIRGKGSGG..	..IHKRTGQALVCTIEEPVTPGOSNMVERLGYLJD.QGII						
Hefe	...MILRADDSTIXGRHDAEG..	...VVCVRTEKQTIVLIAHPPPTVQAGEATKIVTEQLADXLIGVQY						
AcanthamoebaLRAADDSTIYGRKGASG..VITVTKTSKSLIVGYTNEKIQEGTAANVVERKLADYLIG.QGF						

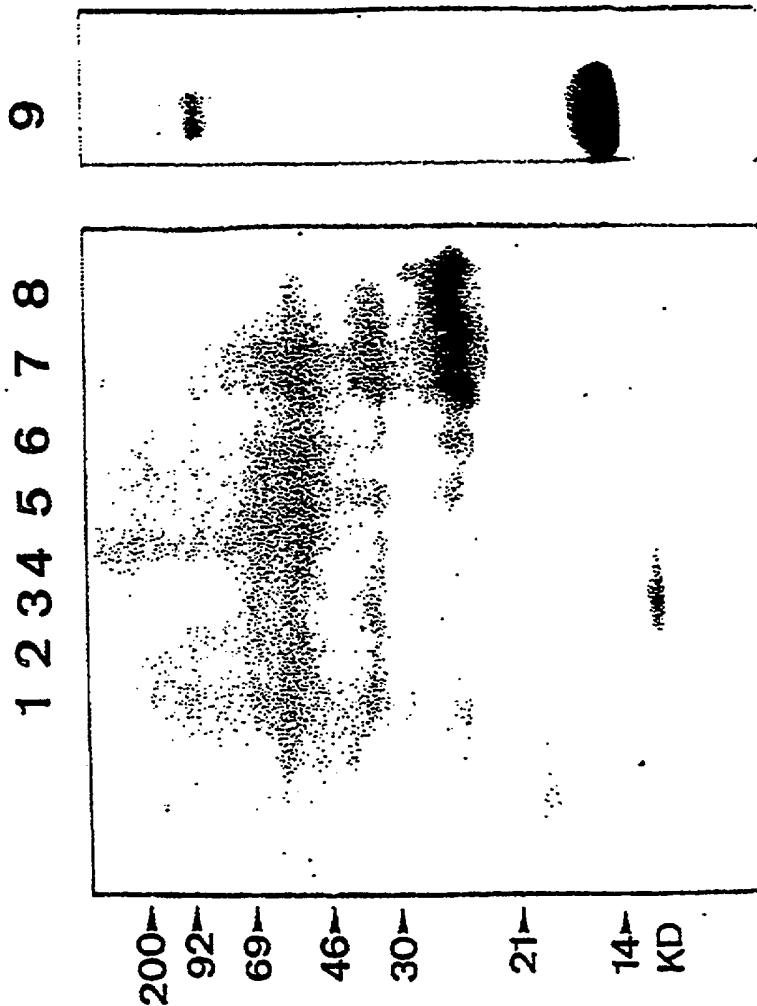


FIG.6

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R

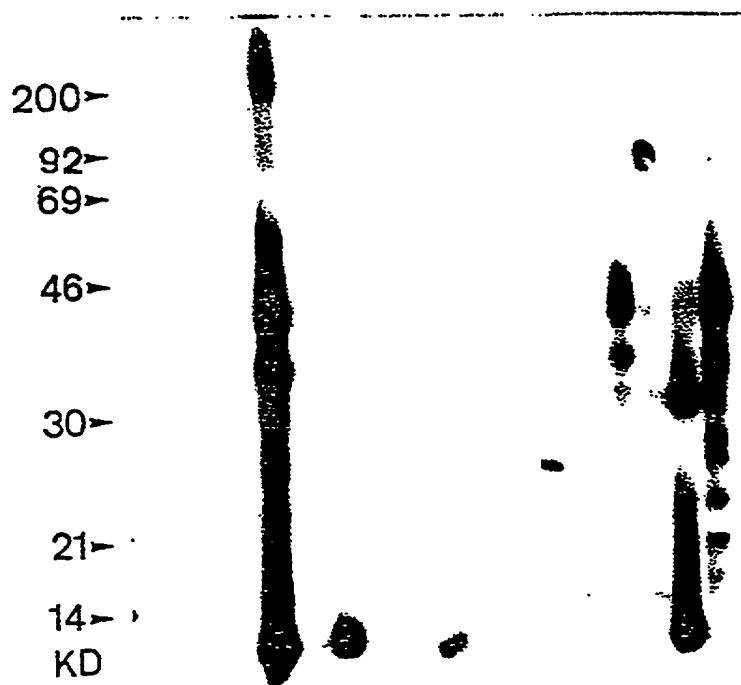


FIG. 7

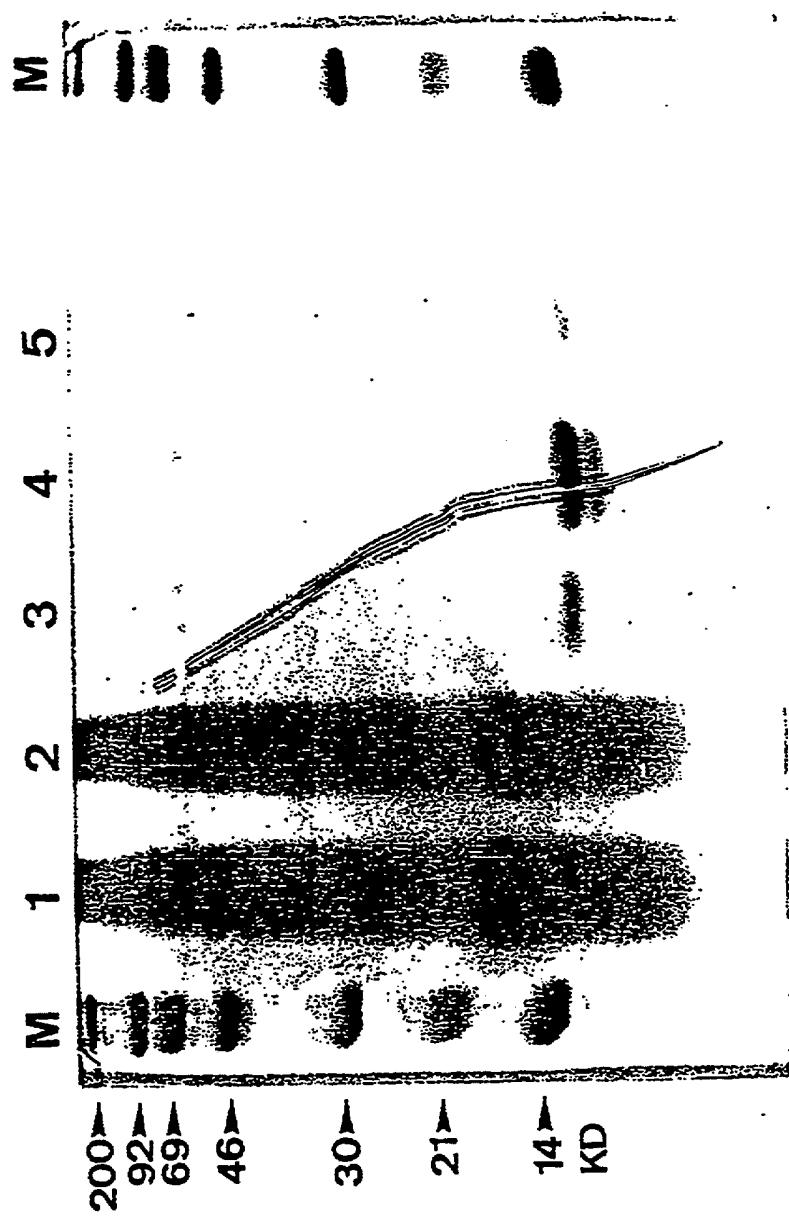


FIG. 8

1 2 3 4 5 6

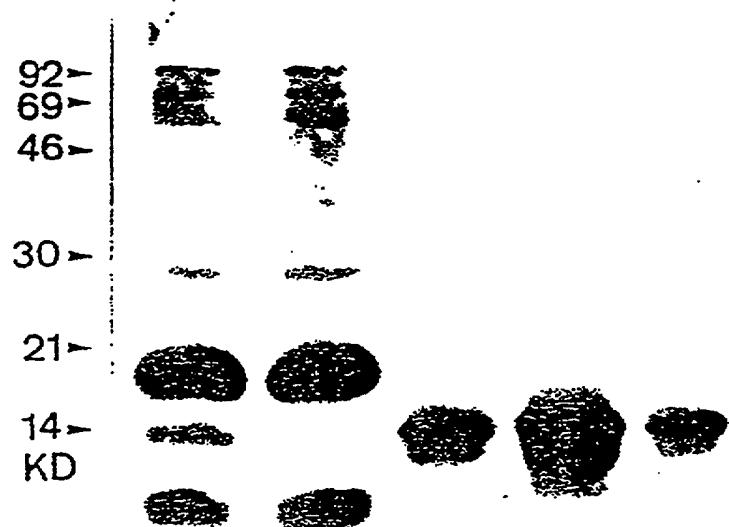


FIG. 9

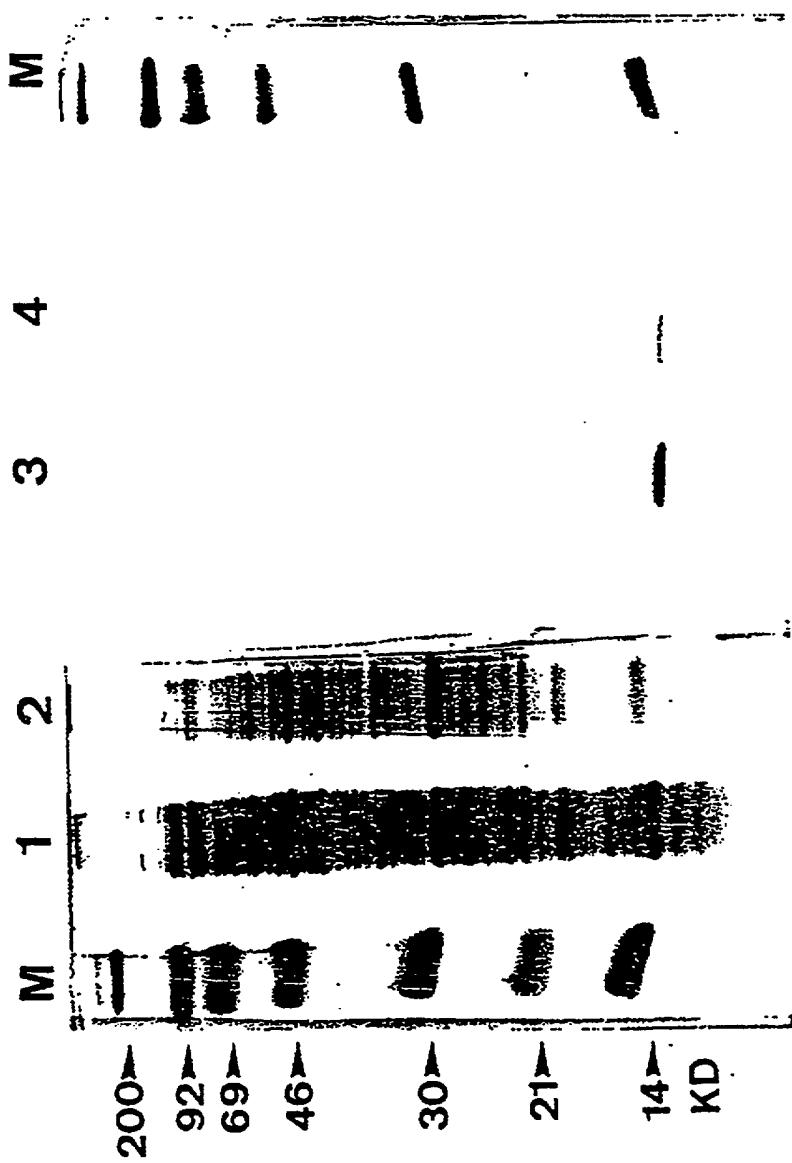


FIG. 10

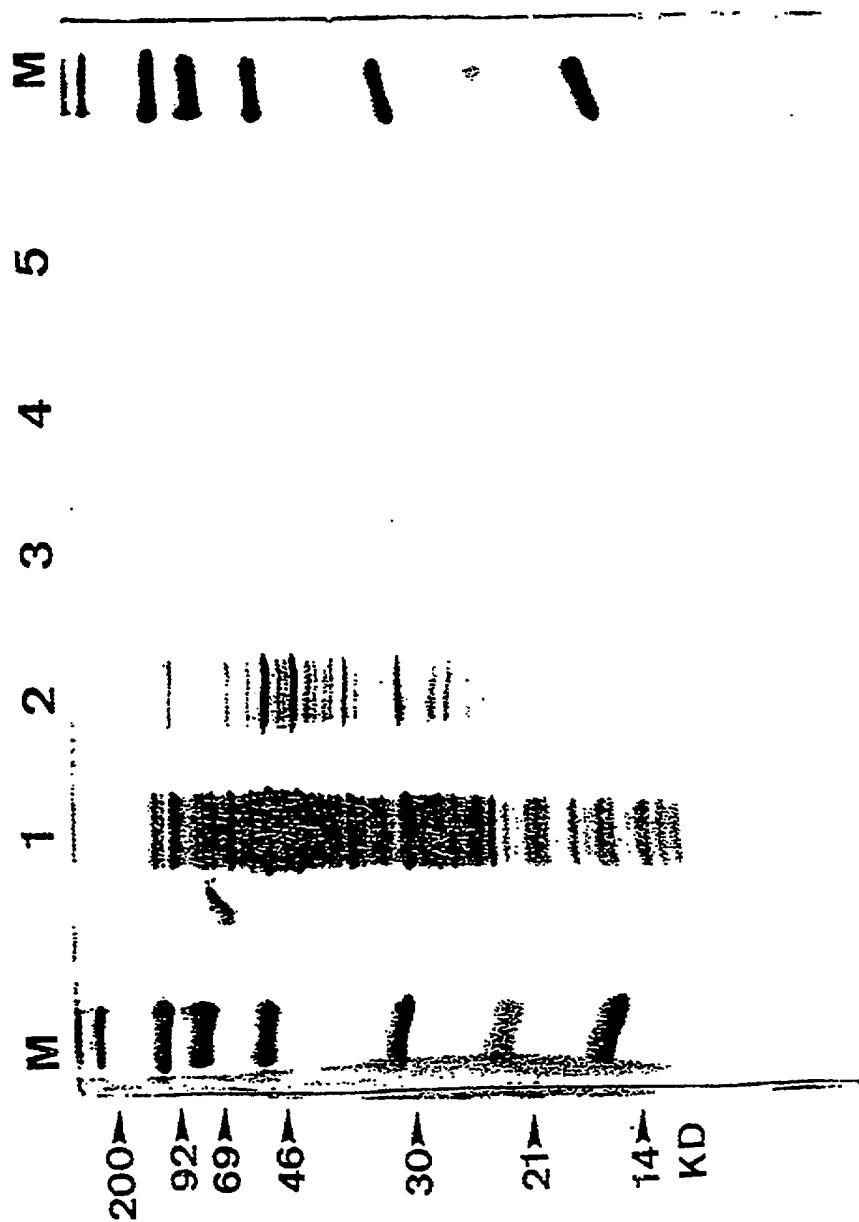


FIG. 11

1 2 3 4 5 6

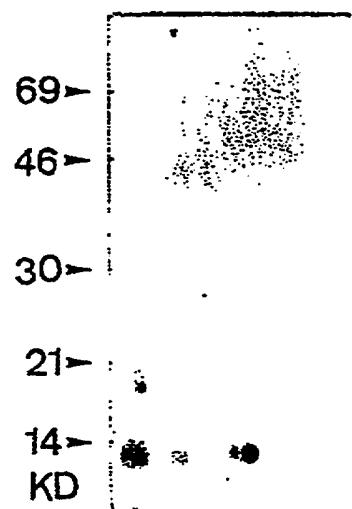


FIG. 12