



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 401 180 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1685/90

(51) Int.Cl.⁶ : C12N 15/12
C12N 15/62, A61K 38/00

(22) Anmeldetag: 13. 8.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1995

(45) Ausgabetag: 25. 7.1996

(56) Entgegenhaltungen:

WO 89/09260A1
CHEMICAL ABSTRACTS 107-234414
CHEMICAL ABSTRACTS 104-184481
CHEMICAL ABSTRACTS 104-18392
CHEMICAL ABSTRACTS 97-53816

(73) Patentinhaber:

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

(54) FÜR DAS BAUMPOLLENALLERGEN P14 CODIERENDE REKOMBINANTE DNA-MOLEKÜLE, DARAUS HERGESTELLTE
UND ABGELEITETE POLYPEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG

(57) Die Erfindung stellt ein rekombinantes DNA Molekül 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 strengen 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

AT 401 180

AT 401 180 B

Während des Frühlings leidet ein großer Teil der Bevölkerung von Mittel-, Ost- und Nordeuropa, Amerika und Australien unter allergischen Symptomen (Rhinitis, Konjunktivitis, Dermatitis und Pollennasthma). 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 Hypo sensibilisierung 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 Kreuzreakтивität der IgE Antikörper der Patienten ist in Fig. 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) (Fig 1 und 3) gefolgert 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) (Fig. 5). Diese Homologie wirft die Frage nach einer Kreuzreakтивität der IgE Antikörper der Patienten mit humanem Profilin auf. Diese Autoreaktivität wurde demonstriert (Fig. 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 Hypo sensibilisierungstherapie 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 (Fig. 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

AT 401 180 B

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 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 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 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 (Fig. 2)

Mit Hilfe von IgE Screening (22) wurde ein unvollständiger cDNA Klon erhalten, der für einen Teil von 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 (Fig. 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) 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).

55 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

AT 401 180 B

(13) geeignet ist. Birkenpollen und *E. coli* Zellen, die das Plasmid enthalten, das für P14 kodiert, wurden in 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 (Ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 4mM MgCl₂, 10mM Glucose, 20 mg/ml Leupeptin, 156 mg/ml Benzamidin, 5 80 mg/ml Aprotinin, 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 1,5% Triton-X100, pH 7,2) und das Lysat 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 ATP (Adeosintriphosphat), pH 7,6) gewaschen und danach fünf Minuten bei Raumtemperatur mit einem 10 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 Polyacrylamidgelektrophorese und IgE-Immunoblot analysiert (Fig. 8, 9, 10, 11).

15

BEISPIEL 1 :

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

20 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 Fig. 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 IgE-Bindung zeigten. Dieses Beispiel zeigt, daß auch ein Teil-cDNA Klon, der zumindest ein Epitop des P14 25 Moleküls enthält, zur Verfügung gestellt wird. Daraus folgt, daß Teil-cDNA Klone, die rekombinante Polypeptide kodieren, oder synthetische Polypeptide IgE-bindende Epitope repräsentieren können, die in ähnlicher Weise wie das vollständige P14 Moleköl oder homologe Proteine nützlich für Therapie oder Diagnose sein können.

30 BEISPIEL 2:

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

Der Northern (RNA) Blot (Abb. 3) zeigt, daß die P14 Sequenz in der Lage ist, mit Pollen-mRNA aus Erle 35 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. Fig. 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 ähnlicher IgE Bindungsfähigkeit und Antigenität wie die nahe verwandten Baumpollenallergene kodiert.

40

BEISPIEL 3 :

Sequenzanalyse

45 Fig. 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).

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

50 Die Kreuzreaktivität von Patienten-IgE mit P14 und menschlichem Profilin ist in Fig. 12 gezeigt. Ähnliche chemische Eigenschaften dieser verwandten Proteine wurden auch durch ihre gemeinsame Affinität zu poly(L-Prolin) aufgezeigt (Fig. 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 Autoimmunreaktivität in Patienten führen können.

55

BEISPIEL 4 :

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

5 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 Fig. 6 gezeigt. Kontrollproteinextrakte von *E.coli* in den Spuren 1, 2, 5, und 6 binden kein IgE während 10 rekombinantes P14 exprimiert als ein Nichtfusionsprotein (Spur 3, 4) und als ein Fusionsprotein (Spur 7, 8) IgE bindet.

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.

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

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 20 Pollen allergische Reaktionen zeigen, demonstriert werden und weisen damit auf die große klinische Relevanz dieser Polypeptide hin (Fig. 7).

BEISPIEL 5 :

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

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 Fig. 8 zeigt daß reines P14 (Spur 3, 4 und 5) von Gesamtpollenprotein (Spur 1) getrennt werden kann.

30 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 (Spur1) 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 Fig. 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.

45

BEISPIEL 6 :

IgE Reaktivität von allergischen und atopischen Patienten mit humanem Profilin

50 Verschiedene Patientenserum wurden wie folgt ausgewählt (Fig. 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 55

AT 401 180 B

Autoimmunerkrankungen Antikörper gegen P14 bilden, könnte diese Erfindung einen diagnostischen Marker für diese Erkrankungen liefern.

BEISPIEL 7 :

5

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

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 Hypo sensibilisierungstherapie zeigen. Daraus folgt, daß 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.

10 Fig. 1: IgE Immunoblot: Pollenproteine aus Birke (B), Hainbuche (CA) 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 Sternchen zeigen die Molgewichte an. Das gebundene Serum-IgE wurde mit Hilfe einer Autoradiographie von den gebundenen ¹²⁵I 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.

15 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 zwischen 120 und 130 kD betragen (Spur 3 und 4) wurden mit ¹²⁵I-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.

20 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.

25 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 30 der DNA 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.

35 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.

40 Fig. 6: Western (Protein) Blot eines Polyacrylamid Gels geprägt 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 45 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).

45 Fig. 7: Sera von verschiedenen allergischen Patienten wurden auf ihre IgE-Reaktivität gegenüber rekombinantern 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.

50 Fig. 8: Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels: Spur M Molekulargewichtsmarker, Spur 1: Ge- samtpollenproteine der Birke, Spur 2: Birkenpollenproteine, aus denen nach der Affinitätsmethode P14

entfernt worden ist, Spur 3, 4, und 5: eluiertes P14.

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.

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 exprimierte, Spur 2: Proteinfraktion nach der Entfernung des rekombinanten P14, Spuren 3 und 4 : gereinigtes rekombinantes P14 - eluierte Fraktionen.

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 kein zu P14 homologes Protein isoliert werden kann.

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 *Betv1* 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 ¹²⁵I markierten Anti-Human IgE Antiserum vom Kaninchen nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA Molekül, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleotidsequenz besitzt, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Allergens P14, insbesondere der Gewächse der Ordnung Fagales, besitzt oder ein Peptid, das mindestens ein Epitop davon aufweist, wobei die Nukleinsäuresequenz mit der in Fig. 4 dargestellten Sequenz ganz oder teilweise in homologer Weise übereinstimmt bzw. durch Degeneration aus der in Fig. 4 dargestellten Sequenz ableitbar ist, sowie eine Nukleinsäuresequenz, die mit einer solchen Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
2. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das als Antigen kreuzreakтив mit dem P14 Allergen, insbesondere der Gewächse der Ordnung Fagales, ist und zu diesem eine hohe Homologie aufweist.
3. Rekombinanter DNA Expressionsvektor oder Klonierungssystem, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Expressionskontrollsequenz funktionell mit einer Nukleotidsequenz nach Anspruch 1 verbunden ist, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des P14 Allergens, insbesondere der Gewächse der Ordnung Fagales, besitzt oder eines Teilpeptids davon, das mindestens ein Epitop aufweist.
4. Rekombinanter Expressionsvektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Expressionskontrollsequenz funktionell mit einer Nukleotidsequenz nach Anspruch 1 verbunden ist, die unter stringenten Bedingungen mit der P14 cDNA Probe hybridisiert oder aus ihr durch Degeneration ableitbar ist.
5. Wirtssystem, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen rekombinanten Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem nach Patentanspruch 3 oder 4 enthält.
6. Aus dem DNA-Molekül nach Anspruch 1 abgeleitetes rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Antigenität von P14 oder zumindest eines Epitops davon aufweist, wobei die Aminosäuresequenz der in Fig. 4 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht.
7. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, welches ein Polypeptid darstellt, das die Antigenität des P14 Allergens der Birke oder zumindest eines Epitops davon aufweist und dabei einen zusätzlichen Polypeptidanteil aufweist, der von der DNA eines Expressionsvektors oder Klonierungssystems kodiert wird.

AT 401 180 B

8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das besagte zusätzliche Polypeptid β -Galactosidase oder das Lambda cII Protein ist.
- 5 9. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 6 bis 8 enthält.
- 10 10. Verfahren, in vitro die Allergie eines Patienten gegen das P14 Allergen nachzuweisen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 6 bis 8 gemessen wird.
11. Verfahren, in vitro die zelluläre Reaktion auf das P14 Allergen nachzuweisen, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 6 bis 8 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

15

Hiezu 12 Blatt Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

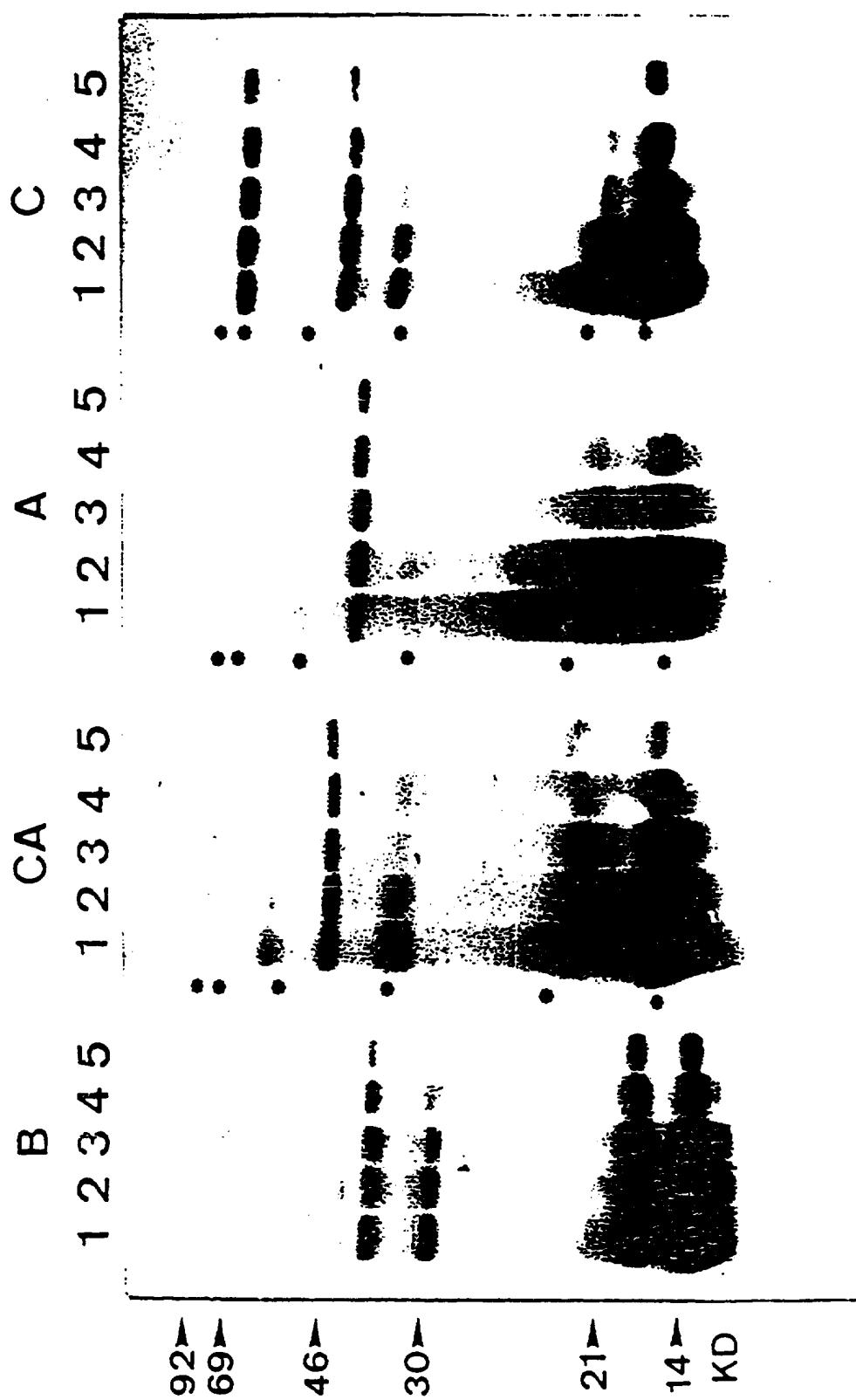


FIG. 1

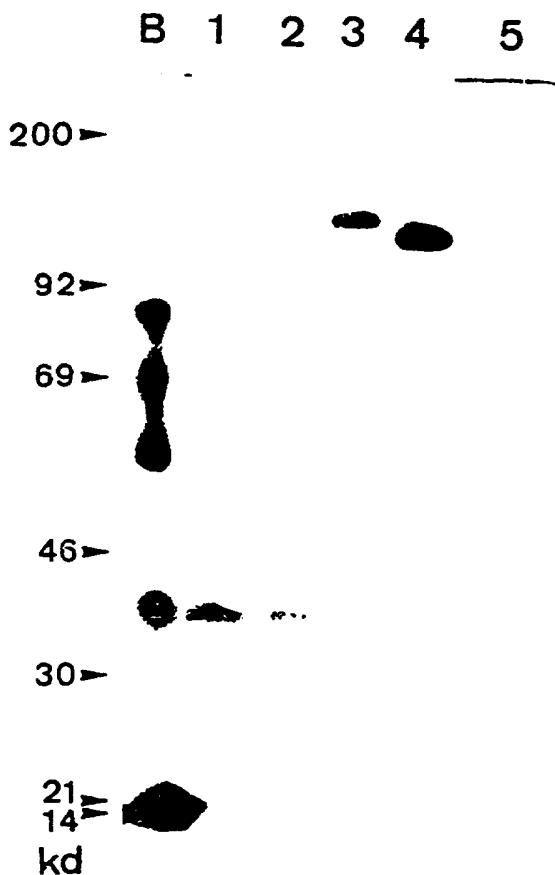


FIG. 2

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben 25. 7.1996
Blatt 3

Patentschrift Nr. AT 401 180 B
Int. Cl.": C12N 15/12
C12N 15/62, A61K 38/00

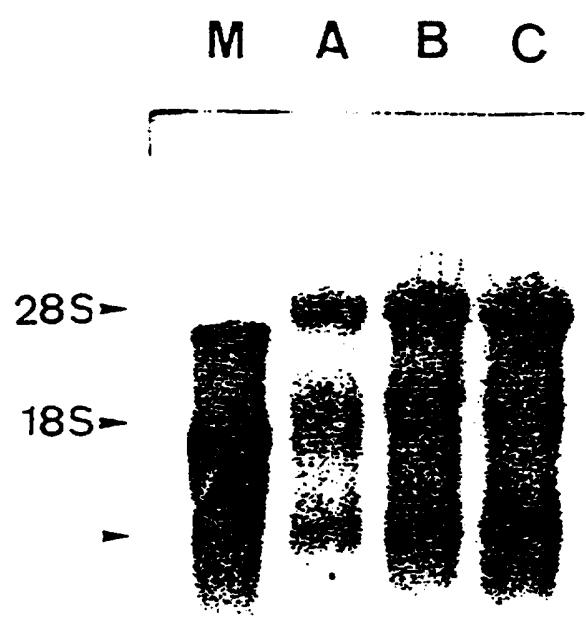


FIG. 3

10 20 30 40 50 60
CAGAGAAAGOGAAAGCTCTCCGCCACAACAAAACGAAGTAGAAGAAGAAGAGTGAGCAAG
70 79
AGACAGAGGGAAGAGGAAA
90 100 110 120
ATG TCG TGG CAA ACG TAC GTG 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 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 GGC 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 GTG ACA CCA GGA CAG TCG AAC ATG GTT
gly ile tyr glu glu pro val thr pro gly gln ser asn met val
450 460 470 480
GTT GAG AGG TTG GGG GAT TAC CTT ATT GAC CAG GGC CTG TAG
val glu arg leu gly asp tyr leu ile asp gln gly leu *
490 500 510 520 530 540
GCAAAGGTCTATCATCATTGGGGCTTAATTGTTTTTTTTGCTCTTATTCC
550 560 580 590 600 610
TTTGATTTCGGTCCAAGTGTGCATCGATCTCATTGAAAGCCTAAATTGGCAGTGAA
620 630 640 650 660 670
GTTGTTGCAGACAATAACCATGTGAGAACAAAAACATTGTCITGTTGGTTGTTGA
680 690 700 710
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 4

	10	20	30	40	50	60	70	80
Maus	MACMAYIDS. I.MAD.. G...	TCQDAATIVGYKRDSPSVWAAVPGKTFVSIITPAEVGLVG.	KDRSSFFVNGLTLGGQKCS					
Kalb	.AGMAYIDN. I.MAD.. G...	TCQDAATIVGYKRDSPSVWAAVPGKTFVNITPAEVGLVG.	KDRSSFFVNGLTLGGQKCS					
Human	MAGMAYIDN. I.MAD.. G...	TCQDAATIVGYKRDSPSVWAAVPGKTFVNITPAEVGLVG.	KDRSSFFVNGLTLGGQKCS					
Birke	MS.WQTYVDEHLMCIDGQASNSLASSATVGDGS.. WWA.. QSSSFPOFKPQEITGIMDPEEPGLIAPTLGHLLGGIKTM							
Hefe	MS.WQAYTDN.LIGT.. G...	KVDKAVTYSRAG.DAVWATSGG... LSLOPNEICEIVQCFDNPAQLQSNGNLHIQGQKR.						
Acanthamoeba	..TWQSYVDTNLVGT.. G...	AVTOQAALLGIDGNT.. WASFAG... .FAVTPAQGTTLAGFNNADAIRAGGFDLAGVHYV						
	90	100	110	120	130	140		
Maus	VIRDSSLQDGFTMDLRKTSSTGGAPTTVMTAKTLLVLMKGKEGVHGGLINKKCYEMASHLRRSQY							
Kalb	VIRDSSLQDGFTMDLRKTSSTGGAPTTVMTAKTLLVLMKGKEGVHGGLINKKCYEMASHLRRSQY							
Human	VIRDSSLQDGFSMDLRKTSSTGGAPTTVNTDKTLVLMKGKEGVHGGLINKKCYEMASHLRRSQY							
Birke	VI....Q.GEAGAVTRGKKGSGG.. ITIKKTGQALVFGIYEERPVTPGQSNMMPVERLDYLD.QGL.							
HefeMLRADDRIYGRHDAGE..... VVCVRKTKQTVTIAHYPPTVQAGEATKTKVEQLADYLIGVQY							
Acanthamoeba	T....LRADDRIYGRKGASG..... VITVKTSKSILVGYNEKTOPGTAANVKEKLADYLIG.QGF							

1 2 3 4 5 6 7 8 9

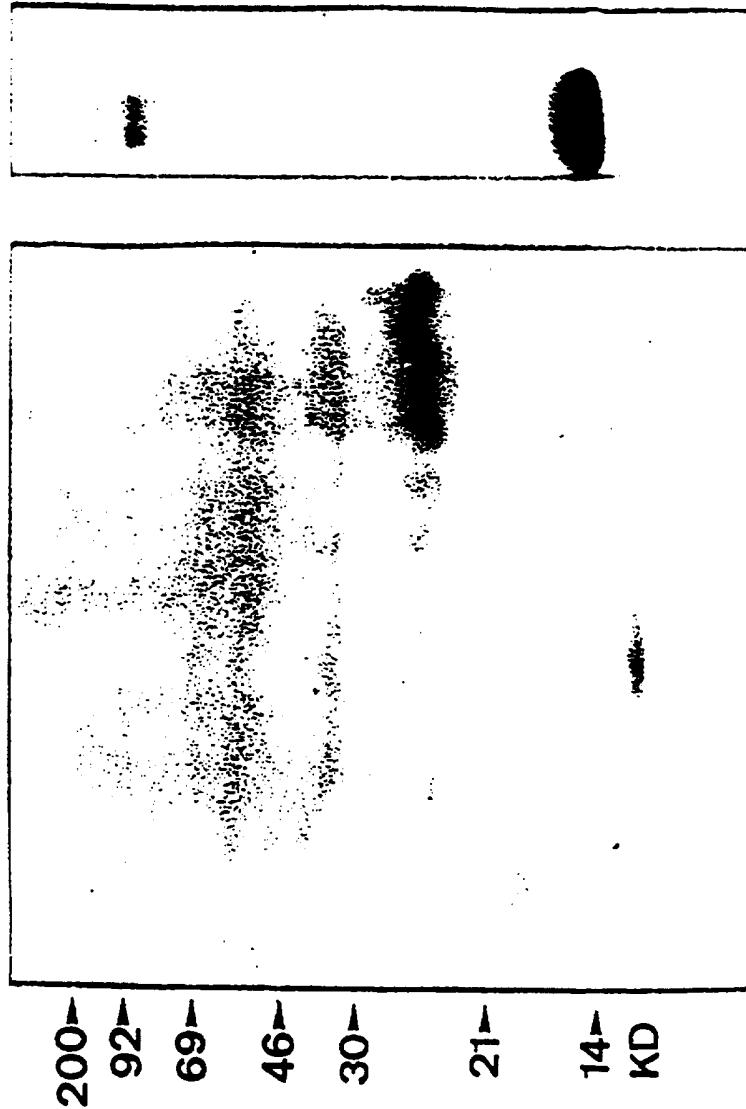


FIG. 6

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

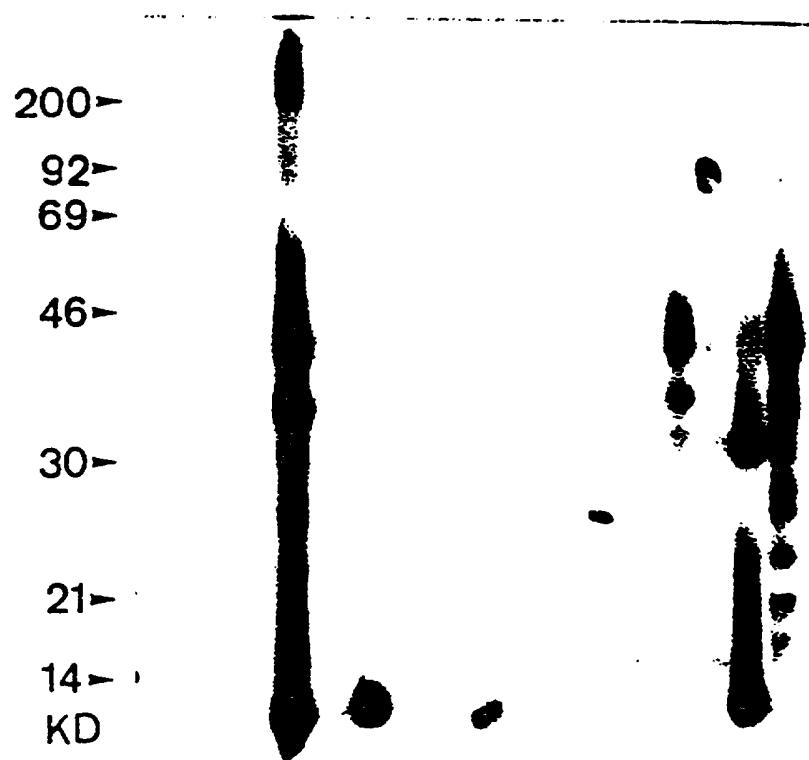


FIG. 7

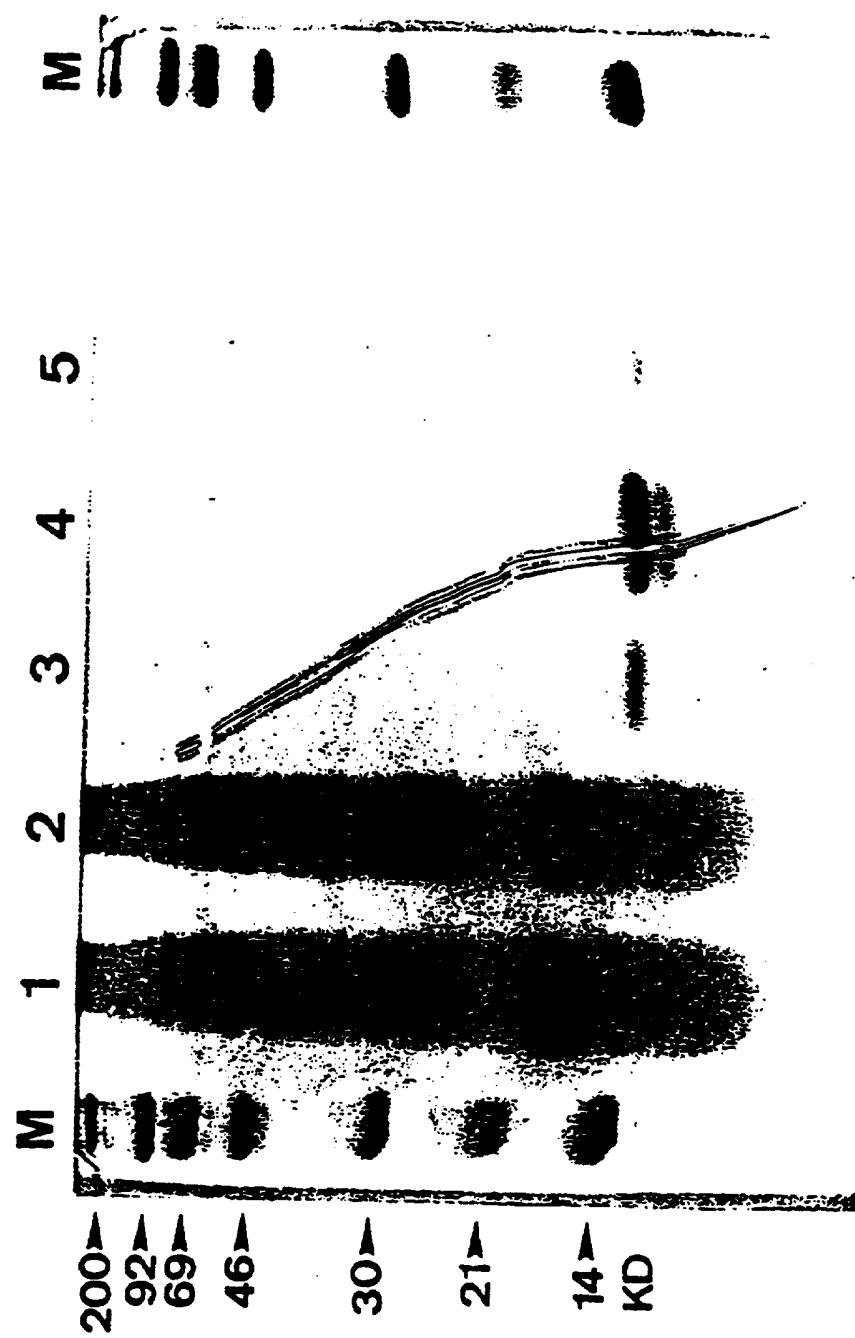


FIG. 8

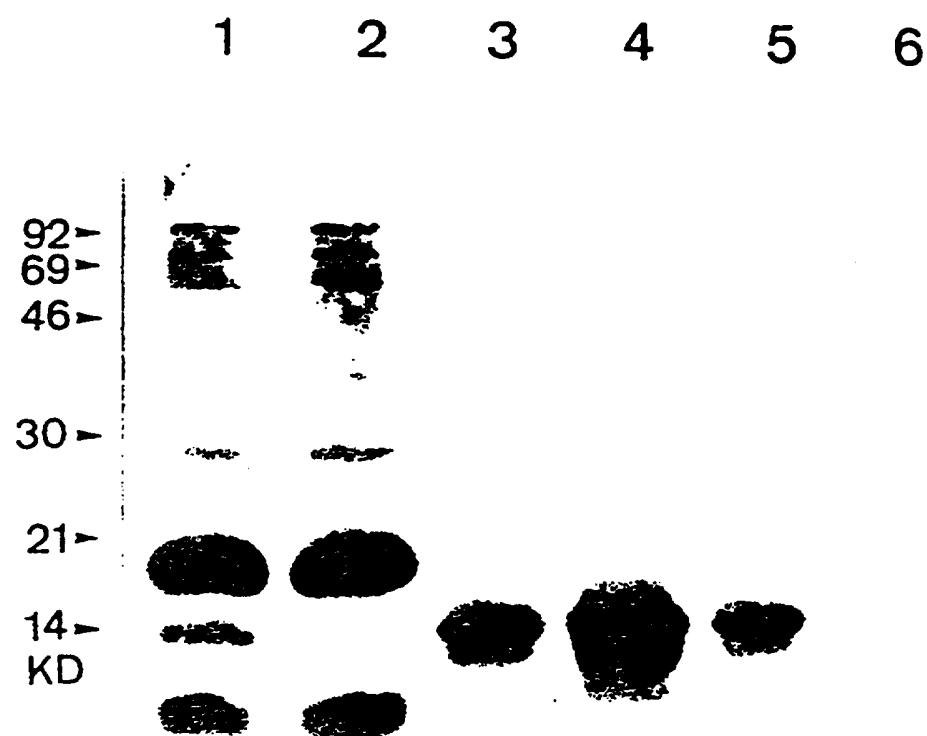


FIG. 9

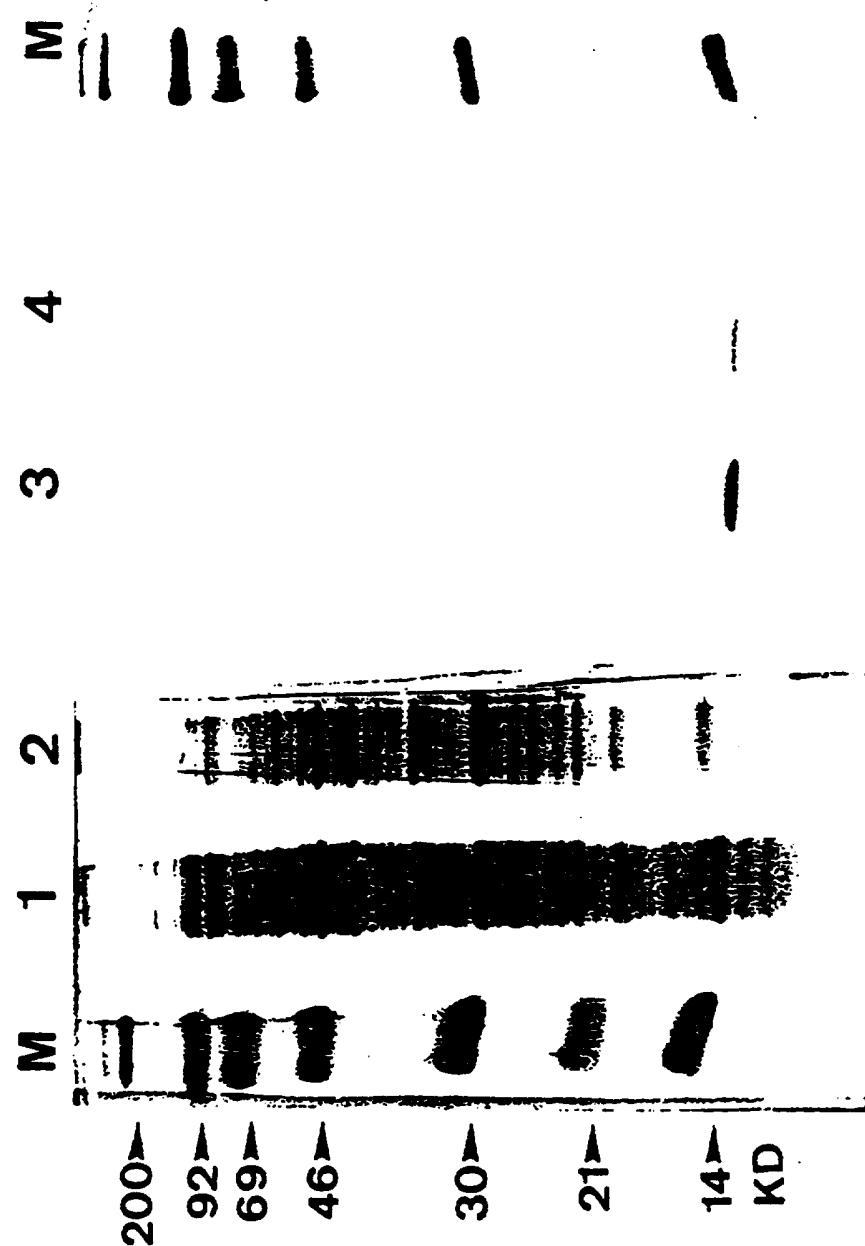


FIG. 10

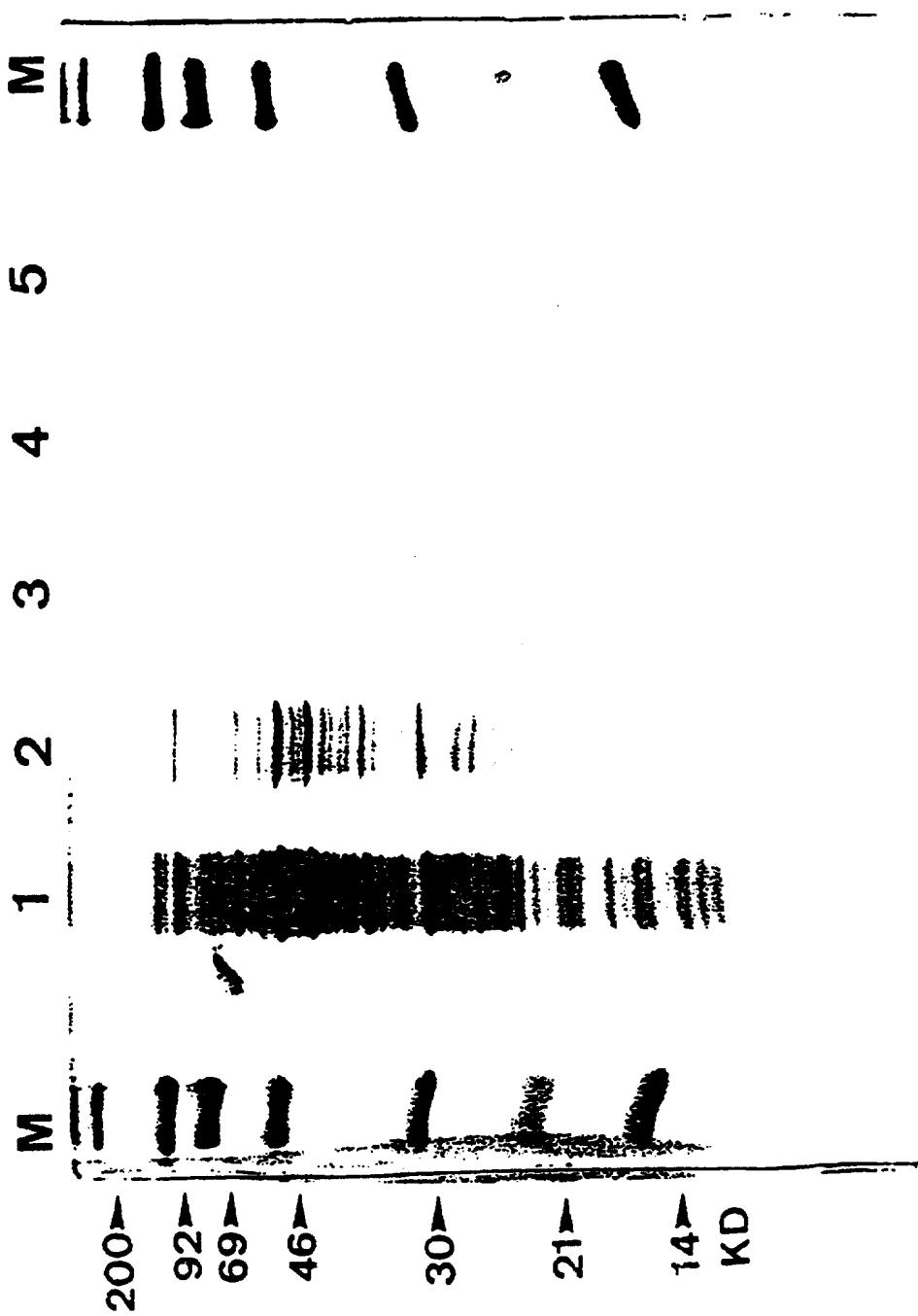


FIG. 11

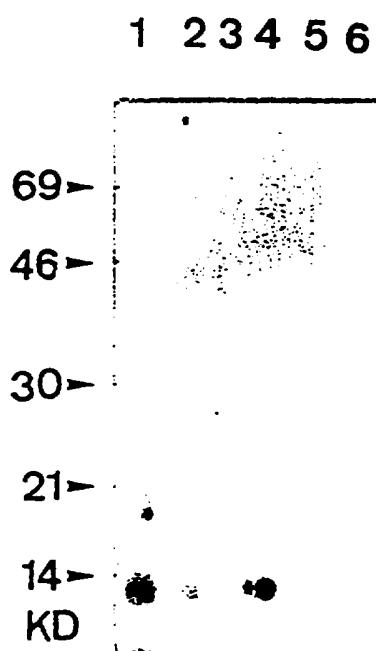


FIG. 12