

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 12 N 15/29** **C 07 K 14/415**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1990 02281**

(22) Indleveringsdag: **1990-09-21**

(24) Løbedag: **1989-03-23**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-11-23**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-09-29**

(86) International ansøgning nr: **PCT/AU89/00123**

(86) International indleveringsdag: **1989-03-23**

(85) Videreførelsesdag: **1990-09-21**

(30) Prioritet: **1988-03-23 AU 7391/88**

(73) Patenthaver: **The University of Melbourne, Grattan Street, Parkville, VIC 3052, Australien**

(72) Opfinder: **Mohan Bir Singh, 7 Lloyd Court, Templestowe, VIC 3106, Australien**

Terryn Hough, 25 Bowman Street, Mordialloc, VIC 3195, Australien

Piyada Theerakulpisut, 1/74 Canning Street, Carlton, VIC 3053, Australien

Robert Bruce Knox, 274 Balwyn Road, North Balwyn, VIC 3104, Australien

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **DNAsekvens, ekspressionsvektor, værtscelle, cDNA, fremgangsmåde til isolering og identificering af DNA samt anvendelse af DNA-sekvensen for et pollen allergen protein**

(57) Sammendrag:

Det vigtigste allergene protein Lol pI fra pollen fra rajgræs Lolium perenne L. produceres ved rekombinante DNA-metoder. Der beskrives også den DNA-sekvens, som koder for ovennævnte protein, ekspressionsvektorer, værter transformeret med cellelinier indeholdende den kodende sekvens for Lol pI-proteinet. Der beskrives endvidere anvendelse af ovennævnte DNA-sekvenser og rekombinante protein ved nukleinsyrehybridisering, vævsspecifik diagnose og påvisning af specifikke antistoffer i biologiske prøver. Der beskrives desuden den mulige anvendelse af promotersekvensen for Lol pI ved udviklingsmæssig regulering af Lol pI-genekspression eller et hvert andet gen under udvikling af pollen, ved hæmning af pollenudvikling eller -virkning og induktion af nukleær hansterilitet.



Fig. 2a.

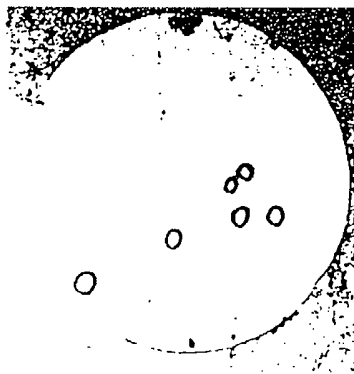


Fig. 2c.

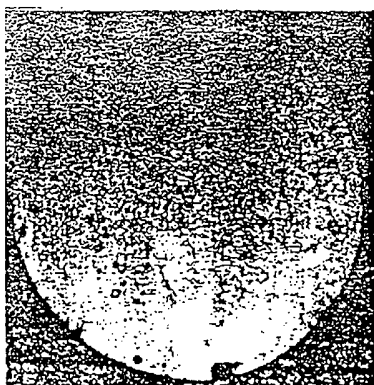


Fig. 2b.

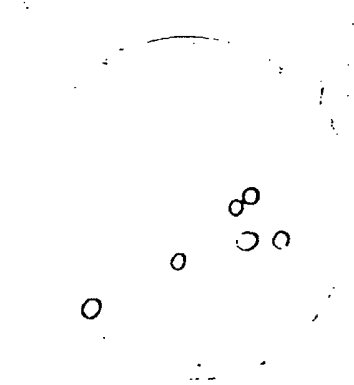


Fig. 2d

Den foreliggende opfindelse angår et vigtigt allergen protein Lol pI fra pollen af rajgræs, Lolium perenne L., samt derivater og homologer heraf, og allergene proteiner, der er immunologisk beslægtet dermed. Den foreliggende opfindelse angår nærmere bestemt en DNA-sekvens, der koder for et allergent protein fra pollen fra familien Poaceae. Den foreliggende opfindelse angår også en ekspressionsvektor og cDNA omfattende DNA-skvens. Den foreliggende opfindelse angår yderligere en fremgangsmåde til isolering og identificering af DNA, der koder for et allergent protein fra græs samt anvendelse af en DNA-sekvens.

10

Allergener udgør de mest talrige proteiner i græspollen, som er den vigtigste årsag til allergene lidelser i tempererede klimaer (Marsh, 1975, Hill et al., 1979). De første beskrivelser af deres allergene proteiner viste, at de er immunokemisk forskellige og er kendt som grupperne I, II, III og IV (Johnson og Marsh 1965, 1966). Under anvendelse af den af International Union og Immunological Societies' (IUIS) for nyligt foreslåede nomenclatur, benævnes disse allergener Lol pI, Lol pII, Lol pIII og Lol pIV. Det vigtigste allergen Lol pI er et surt glycoprotein med molekylvægt på ca. 32 kD, og omfatter fire isoallergene varianter. De andre mindre vigtige allergener, som isoleres fra rajgræspollen, har en molekylvægt på fra 10 til 76 kD (jf. oversigt ifølge Ford and Baldo, 1986). Allergenet Lol pI udgør ca. 5% af den totale mængde ekstraherede pollenproteiner, og er et glycoprotein (Howlett & Clarke, 1981) indeholdende en 5% kulhydratenhed. Undersøgelser med kulhydratspaltning har vist, at kulhydratet ikke bidrager til det allergiske svar. Allergenaktivitet tabes efter proteolytisk fordøjelse (jf. redegørelsen ifølge Baldo, Sutton & Wrigley, 1982), men kan modstå varmebehandling, f.eks. 100 °C i 30 min. ved neutralt pH (Marsh et al., 1966).

Lol pI defineres som et allergen p.g.a. dets evne til at binde specifikt til IgE i sera fra rajgræsfølsomme patienter, til at virke som et antigen ved IgG-svar, og ved at udløse T-cellesvar. De allergene egenskaber er blevet fastlagt ved direkte hudafprøvning på græspollenfølsomme patienter. Resultaterne viste, at 84% var hudfølsomme overfor Lol pI (Freidhoff et al., 1986), hvilket viser dette proteins primære betydning som det vigtigste allergen. Endvidere

30

havde 95% af patienterne, som viste sig at være græspollenfølsomme, specifikt IgE-antistof, der bandt til Lol pI, hvilket blev vist ved immunoblotting (Ford & Baldo, 1986).

- 5 Væsentlig allergen krydsreaktivitet mellem græspollen er blevet vist under anvendelse af en IgE-bindingsanalyse, f.eks. radioallergo-sorbenttesten (Rast), som beskrevet af Marsh (1970) og Lowenstein (1978).

10 Det immunokemiske forhold mellem Lol pI og andre græspollenantigener er blevet vist under anvendelse af både polyklonale og monoklonale antistoffer (jf. Smart og Knox, 1979; Singh & Knox, 1985). Der er blevet fremstillet antistoffer mod både oprensede proteiner og IgE-bindingskomponenter. Disse resultater viste, at det vigtigste allergen, som er til stede i pollen fra nært beslægtede græsarter, immunokemisk svarer til Lol pI (Singh & Knox, 15 1985).

Yderligere baggrundsinformation angående græspollenallergener kan findes i følgende redegørelser:

- 20 Marsh (1975), Howlett & Knox (1984), Baldo, Sutton & Wrigley (1982) og Ford & Baldo (1986).

Nylige fremskridt indenfor biokemien og rekombinant DNA-teknologi har gjort det muligt at syntetisere specifikke proteiner, f.eks. enzymer, under styrede betingelser uafhængig af den organisme, hvorfra de normalt isoleres. Disse biokemiske syntesemetoder benytter enzymer og subcellulære komponenter fra proteinsyntesystemer i levende celler, enten in vitro i cellefri systemer eller in vivo i mikroorganismer. I begge tilfælde er det grundliggende element tilvejebringelsen af en deoxyribonukleinsyre (DNA) med specifik sekvens, 25 hvilken indeholder den information, der er krævet for at specificere den ønskede aminosyresekvens. En sådan specifik DNA-sekvens benævnes et gen. Kodeforholdet, hvormed en deoxyribonukleotidsekvens anvendes til at fastlægge et proteins aminosyresekvens, er velkendt og fungerer ifølge et sæt af fundamentale principper (jf. f.eks. Watson, 1976).

Der kan anvendes et klonet gen til at fastlægge aminosyresekvenser af proteiner syntetiseret af in vitro systemer. DNA-dirigerede proteinsyntesystemer er velkendte indenfor fagområdet. Enkeltstrenget DNA kan induceres til at virke som messenger RNA (mRNA) in vitro, hvilket medfører en meget korrekt translation af DNA-sekvensen.

Det er nu muligt at isolere specifikke gener eller dele heraf fra højere organismer, såsom planter, og at overføre generne eller DNA-fragmenter til en passende vektor, såsom en lambda-gt 11-fag, til mikroorganismer såsom bakterier, f.eks. Escherichia coli. Det overførte gen replikeres og formeres når den transformerede mikroorganisme replikeres. Den transformerede mikroorganisme er følgelig udrustet med evnen til at frembringe det ønskede protein eller gen, som f.eks. koder herfor, og enzym, og derpå overføre denne evne til dets afkom, jf. f.eks. Cohen & Boyer, U.S. Patent nr. 4.237.224 og 4.468.464. De bakterielle kloner indeholdende den rekombinante fag screenes for det bestemte genprodukt (protein) ved hjælp af specifikke antistoffer.

Ifølge den foreliggende opfindelse klones det gen der koder for Lol pI, og dermed muliggøres der fremstilling af recombinant allergen i stor skala.

I et første aspekt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en DNA-sekvens, der udviser mindst 60 % homologi med den i Figur 5 afbildede sekvens og koder for et allergent protein fra pollen fra familien Poaceae. Nærmere bestemt tilhører græsarterne familien Poaceae (Gramineae), og mere fortrinsvis slægten Lolium. Endnu mere fortrinsvis er det allergene protein ejendommeligt ved at være immunologisk krydsreaktivt med antistof mod Lol pI-protein fra Lolium perenne-pollen, nemlig:

30

Pooide (festucoide)-græsser. Gruppe 1: Triticanae: Bromus inermis, glat hejre; Agropyron repens, almindelig kvik; A.cristatum; Secale cereale, rug; Triticum aestivum, hvede. Gruppe 2: Poanae: Dactylis glomerata, hundegræs; Festuca elatior, eng-svingel; Lolium perenne, almindelig

rajgræs; L.multiflorum, Italiensk rajgræs; Poa pratensis, engrapgræs;
P.compressa, fladstrået rapgræs; Avena sativa, havre; Holcus lanatus,
 fløjlsgræs; Anthoxanthum odoratum, vellugtende gulaks; Arrhenatherum
elatius, draphavre; Agrostis alba, krybhvene; Phleum pratense, timothé;
 5 Phalaris arundinacea, rørgræs. Panicoide græsser, Paspalum notatum,
 Bahia-græs, Andropogonoide græsser: Sorghum halepensis, Johnson-græs.

Opfindelsen tilvejebringer endvidere en DNA-sekvens, der udviser mindst 60
 % homologi med den i Fig. 5 afbildede sekvens og koder for et allergent
 10 protein fra et pollen fra græs, som er allergent krydsreaktivt med et allergent
 pollenprotein fra Lolium perenne, som påvist ved IgE-bindingsstudier.

I et andet aspekt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en
 ekspressionsvektor omfattende en DNA-sekvens som ovenfor defineret.
 15 Nærmere bestemt tilvejebringer opfindelsen et rekombinant DNA-molekyle
 omfattende en eukaryotisk eller prokaryotisk replikationsorigin, en
 detekterbar markør, en DNA-sekvens som ovenfor defineret, og eventuelt en
 promotersekvens, som er i stand til at dirigere transkription af det allergene
 protein.

20 I et tredje aspekt tilvejebringer opfindelsen en værtscelle, der er
 transformeret til at udtrykke et protein eller et polypeptid, der kodes af en
 DNA-sekvens som ovenfor defineret. Værtsellen kan være E.coli.

25 Den foreliggende opfindelse tillader derfor fremstilling af rekombinant AP, der
 er immunologisk reaktivt over for antistoffer mod Lol pl, ved hvilken man
 dyrker en værtscelle indeholdende en vektor som ovenfor defineret, hvilken
 vektor indeholder en promoter, der er i stand til ekspression i værtscellen,
 den ovenfor definerede DNA-sekvens, som er anbragt nedenstrøms for og
 30 transkriberes fra promoteren, en selekterbar markør og en DNA-vehikel
 indeholdende en prokaryotisk eller eukaryotisk replikationsorigin, under
 betingelser og i et tidsrum, som er tilstrækkeligt til at opretholde det
 rekombinante DNA-molekyle stabilt og dirigere syntesen af AP.

I et fjerde aspekt tilvejebringer opfindelsen et cDNA omfattende en DNA-sekvens som defineret i ethvert af kravene 1-3, og som kan opnås ved, at man:

- 5 ekstraherer RNA fra rajgræspollen og med affinitetschromatografi udvælger Poly (A+) mRNA, som skal anvendes som template ved syntese af enkeltstrenget cDNA;
- syntetiserer og isolerer dobbeltstrenget cDNA;
- 10 opretter et lambda-gt 11 cDNA-ekspressionsbibliotek;
- screenes lambda-gt 11 cDNA-ekspressionsbiblioteket efter induktion med IPTG under anvendelse af monoklone antistoffer karakteriseret ved Smart et al., *Int Archives of Allergy and Appl Immunol.*, 72, 243-248
- 15 til at afsøge filterløft in duplo og identificere og isolere positive phag-plaques;
- udplader plaquene ved lav densitet og udfører filterløft in duplo af
- 20 plaquene;
- screenes phag-plaquene indeholdende kloner, som producerer protein allergen ved at inkubere filterløftene med allergiske antisera eller med de Smart et al monoklone antistoffer og identificere de kloner, der er
- 25 positive, når de screenes med monoklone antistoffer og positive, når de screenes med allergiske antisera;
- genindvinder cDNA-indføjelser fra de allergiske antisera og den antistof-positive phag og ved størrelsesanalyse identificerer indføjelser
- 30 på ca. 1200 basepar;
- indsætter indføjelserne i en plasmidvektor til sekventering og ekspression;

sekventerer cDNA'et; og

sammenligner det sekventerede DNA's restriktionskort med det i Fig. 9 viste cDNA-restriktionskort og identificerer de kloner, der i det væsentlige har samme restriktionskort som det i Fig. 9 viste.

Opfindelsen indbefatter endvidere en fremgangsmåde til isolering og identificering af DNA, der koder for et allergent protein fra pollen fra græs, ved hvilken man anvender et cDNA som ovenfor defineret som en heterolog probe til isolering af de homologe cDNA-kloner af protein allergener fra pollen fra græs.

I et femte aspekt angår opfindelsen anvendelse af en DNA-sekvens som defineret ovenfor ved fremstilling af et protein eller polypeptid, der kodes af DNA-sekvensen.

I et sjette aspekt angår opfindelsen anvendelse af en DNA-sekvens som ovenfor defineret eller et cDNA som ovenfor defineret som en probe til isolering og identificering af nukleinsyre, der koder for det allergene protein eller polypeptid.

Yderligere egenskaber ved den foreliggende opfindelse vil fremgå bedre af den efterfølgende detaljerede beskrivelse af foretrukne udførselsformer for opfindelsen i forbindelse med de tilhørende tegninger.

I nærværende beskrivelse anvendes biokemisk standardnomenklatur hvor nukleotidbaserne benævnes som adenin (A); Thymin (T); Guanin (G) og cytosin (C). Andre forkortelser omfatter:

BSA Kvægserumalbumin.

DEPC Diethylpyrocabonat.

DNA Deoxyribonukleinsyre.

	DTT	Dithiothreitol.
	EDTA	Dinatriumethylendiamintetra-acetat.
5	IPTG	Isopropyl-thio-beta-D-galactopyranosid.
	LB-MEDIUM	Luria-Bertani-medium (1% (vægt/volumen) Bactotrypton, 1% (vægt/volumen) NaCl & 0,5% (vægt/volumen) Bacto-gærekstrakt i vand til pH 7,5).
10	LIGATIONSPUFFER (10 x opløsning)	0,66 M Tris Cl (pH 7,5) 50mM MgCl ₂ , 50mM DTT, 10mM ATP.
15	LiCl	Lithiumchlorid.
	PEG	Polyethylenglycol.
20	pfu	Plaquadannende enheder.
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid.
25	PRØVEPUFFER	50mM Tris-Cl, pH 6,8, 1,5% (vægt/volumen) SDS, 50mM DTT, 4M Urinstof, 1m MPMSF.
	SDS	Natriumdodecylsulfat.
30	SM PUFFER	Fagopbevaringspuffer (0,1M NaCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, 50mM Tris HCl pH 7,5, 2% (vægt/volumen) gelatine).
	SSC	20 x opløsning af 3M NaCl, 0,3M Na ₃ -citrate, pH 7,0.
	SSPE	(0,15M NaCl, 10mM natriumphosphat pH 7,7, 1mM

EDTA	Ethylendiamintetra-eddikesyre
TBS	Tris-pufret saltopløsning (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl).
X-gal	5-Brom-4-chlor 3-indolyl-beta-D-galactopyranosid.

På den tilhørende tegninger viser figurene følgende:

Fig. 1 viser identification af Lol pI som det væsentligste allergen fra rajgræspollen med SDS-PAGE og Western-Blotting.

Banerne 1-3. SDS-PAGE-analyse af totale rajgræspollenproteiner og isoleret Lol pI-allergen, farvet med Coomassie-blåt for proteiner. Bane 1, totale pollenproteiner; Bane 2, Lol pI-isoallergen; Bane 3, Lol pI.

Banerne 4-6. Western-blot af proteiner vist i banerne 1-3, hvilket viser specifik binding af monoklonal antistof FMC-AI til Lol pI-allergen. Dette antistof blev anvendt til at screene cDNA-biblioteket for at udvælge Lol pI-allergenkloner. Bane 4, molekylvægtmarkører; Bane 5, isoallergen; Bane 6, Lol pI, 32 kD.

Fig. 2 viser screening af cDNA-biblioteket af rajgræspollen for at udvælge de specifikke kloner som udtrykker Lol pI-protein i lambda-gt 11-vektor. (a,b): "Plaque-løft" af 10^2 - 10^3 rekombinante fager behandlet med specifikt antistof FMC-AI, med (a) cDNA-klon 6, (b) cDNA-klon 12; (c,d): Rescreening af cDNA-klon 12 med (c) monoklonalt antistof FMC-AI, (d) specifikt IgE fra rajgræspollenfølsomme patientsera. Rekombinant fag indeholdende den specifikke allergen DNA-indføjelser påvises ved disse metoder. Antistofferne påviser alle kloner, som indeholder de antigene determinanter af Lol pI, medens IgE binder til kloner indeholdende de allergene determinanter af Lol pI. Alle klonerne var positive overfor monoklonalt antistof FMC-AI, idet dette er basis for screeningen, medens en del binder til IgE, som med klon 12 her.

Fig. 3 viser analyse af E. coli-fusionsprotein for identitet Lol pI.

- Banerne 1-4: SDS-PAGE farvet med Coomassieblåt for proteiner; Bane 1, ikke-rekombinant lysogen lambda-gt 11-ekstrakt; Bane 2, rekombinant lysogen lambda-12RL8-ekstrakt; Bane 3, beta-galactosidase rent E. coli-protein; Bane 4, molekylvægtmarkører, 96KD markøren er anført med en stjerne.
- Banerne 5-7: Transblot på nitrocellulosemembran; Bane 5 og 8, molekylvægtmarkører; Bane 6, rekombinant lysogen lambda-1 2RL8-ekstrakt, a indikerer et fusionsprotein identificeret ved binding med FMC-AI, molekylvægt a>c. Bane 7, rekombinant lysogen lambda-6RL2-ekstrakt, b antyder fusionsproteinet identificeret ved binding af FMC-AI, molekylvægt b>c. Den større molekylvægt af a og b i forhold til c antyder indsættelse af cDNA i gt 11-genomet ved lacZ-stedet.

- Fig. 4 viser analyse af vævs- og organspecificiteten af Lol pI-genet i rajgræs. (a) Slot-blot. 2 µg totalt RNA hver isoleret fra pollen (p), blad (l), rødder (r) og hydratiserede frø (s) blev slot-blottet på nitrocellulosemembran. Hybridisering med radioaktive prober for klonerne 6 og 12 (p6, p12) forekommer med pollen, men der er total mangel på hybridisering med det andet vævsRNA. (b) Northern-blot. Totalt RNA isoleret fra disse rajgræsvæv blev adskilt elektroforetisk på en denaturerende agarose gel, overført til nitrocellulosemembran og proberet med p6. Hybridisering forekommer alene med pollenprøven, andet vævsRNA viser mangel på hybridisering. Dette bevis viser, at Lol pI-genet kun udtrykkes i pollen.

- Fig. 5 viser en DNA-sekvens på 1240 basepar, som repræsenterer cDNA-klonen 12R.

Fig. 6 viser reaktionen mellem rekombinant allergen pGEX-12R (Lol pI) med IgE fra sammenhældt "allergisk" sera. Kulturerne pGEX og pGEX-12R blev dyrket natten over og derpå fortyndet 1:10 i bouillon og dyrket i 2 timer ved

37 °C. De blev induceret med IPTG og dyrket i 1 time ved 37 °C. Bakterierne blev pelletteret og resuspenderet i PBS til 1/20 af dyrkningsmediets volumen. Bakterierne blev lyseret ved frysning, optøning og ultralydbehandling. Efter dette blev der tilsat et tilsvarende volumen SDS-gelprøvepuffer, og prøverne

5 kogte i 3 minutter før de blev sat på en 10-15% gradient SDS-PAGE. De fraskilte proteiner blev overført til nitrocellulosemembran og disse blots blev bearbejdet med henblik på identifikation af IgE-bindingsproteiner under anvendelse af sammemhældte sera fra allergiske patienter. Der blev anvendt ¹²⁵I-mærket anti-human IgE-antistoffer (Kallestad Labs USA) som probe.

10 Fig. 6 viser et typisk autoradiografi hvor bane 1 viser en vektorkontrol uden IgE-binding, medens banerne 2,3 og 4 viser ekspression af rekombinant Lol pI i bakteriekulturer inficeret med pGEX-12R.

Fig. 7 A,b og C viser antigen og allergenligheder for proteiner, der er

15 homologe med Lol pI, i et panel med 17 forskellige græsser. Proteiner blev opløst med SDS-PAGE fra moden pollen som følger: bane a: molekylvægtsmarkører; 1, Bromus inermis; 2, Agropyron cristatum; 3, Secale cereale; 4, Dactylus glomerata; 5, Festuca elatior; 6, Lolium perenne; 7, L. multiflorum; 8, Poa compressa; 9, Avena sativa; 10, Holcus lanatus; 11,

20 Anthoxanthum odoratum; 12, Agrostis alba; 13, Phleum pratense; 14, Phalaris arundinacea; 15, Cynodon dactylon; 16, Sorghum halepensis; 17, Zea mays. Fig. 7A viser proteiner i SDS-PAGE-gel farvet med Coomassieblåt. Fig. 7B viser Western-blot proberet med monoklonalt antistof FMC-A1 specifikt for Lol pI, og viser antigene ligheder mellem Lol pI og

25 homologe allergener i beslægtede græsser, med undtagelse af bane 15, Cynodon dactylon. Fig. 7C viser Western-blot proberet med sammenblandet "allergisk" humansera og anti-IgE-antistoffer, og bekræfter, at Lol pI og dets homologe allergener i andre græsser er det immunodominerende allergen i græspollen.

30

Fig. 8A viser en sammenligning af allergenaktivitet for naturlig og rekombinant Lol pI-protein. Sera fra 28 forskellige patienter, hvoraf nogle er allergiske overfor græspollen, blev anvendt til at sammenligne IgE-binding af naturlig og rekombinant Lol pI-protein. For naturligt Lol pI blev en

referencestandardprøve købt fra The National Institutes of Health (NIAID), Bethesda, USA. Denne prøve blev fortyndet i 1% (vægt/volumen) BSA-opløsning, og 0,5 µg blev dot-blottet på nitrocellulosemembran, og blottene blev anvendt til IgE-bindingsanalyse. For afprøvning af IgE-binding til rekombinant LoI pI-protein blev klonen lambda-gt 11-12R udtrykt i E. coli -værtceller. Der blev anvendt "plaque-løft" på samme måde som dot-blot for afprøvning af IgE-binding. Både plaque-løft og dot-blots blev inkuberet natten over i en 1:10 fortynding af "allergisk" sera, og binding af IgE blev visualiseret under anvendelse af anti-human-kanin IgE (Dakopatts, København, Danmark). Denne inkubation blev fulgt med peroxidasekonjugeret anti-kanin-IgG, og derpå enzymsubstratet for at opnå en farvereaktion. Fig. 8B viser en korrelation mellem allergenaktivitet for naturlig og rekombinant LoI pI.

Fig. 9 viser restriktionskort for cDNA-inføjelsen til lambda-gt 11-12R, og strategien ved nukleotidsekvensering.

Den oprindelige kilde til det genetiske materiale er frisk rajgræspollen fra Lolium perenne L., indsamlet på marker nær Melbourne, Australien, og indsamlet pollen i store portioner fra en leverandør (Greer Laboratories, Lenoir, NC). Disse pollenkilder har ikke til hensigt at begrænse opfindelsens omfang, idet de kun repræsenterer én passende pollenkilde. Den foreliggende opfindelse kan udøves under anvendelse af pollen fra ethvert sted. Fig. 1 viser identifikation af LoI pI som det væsentligste allergen i rajgræspollen.

Udtrykket "gen" anvendes i dets bredeste betydning og refererer til enhver sammenhængende sekvens af nukleotider, hvis transkription fører til et mRNA-molekyle, hvadenten dette mRNA-molekyle kan translateres til et polypeptid eller protein. Genet, der koder for LoI pI, betyder den nukleotidsekvens, der koder for hele polypeptidet eller derivater eller homologer af polypeptidet, hvilke kan indeholde aminosyreerstatninger, deletioner eller additioner. I forbindelse med kulhydratdelen af polypeptidet omfatter derivater ligeledes substitutioner, deletioner eller additioner til

carbohydratdelen. Lol pI-genet refererer også til et cDNA, som er komplementært med det mRNA, som svarer til hele længden eller en del af længden af Lol p I-polypeptidet.

- 5 For nogle aspekter af den foreliggende opfindelse er det ønskeligt at frembringe et fusionsprotein omfattende Lol pI og en aminosyresekvens fra et andet polypeptid eller protein, hvor eksempler på sidstnævnte er enzymer, såsom beta-galactosidase, phosphatase, urease o.lign.. Hovedparten af fusionsproteinerne dannes ved ekspression af et rekombinant gen, hvori 2
- 10 kodende sekvenser er blevet forenet, således at deres læserammer er i fase. Polypeptider kan alternativt binde in vitro med kemiske midler. Alle sådanne fusionsproteiner eller hybride genetiske derivater af Lol pI, eller dens kodende nukleotidsekvens er omfattet af den foreliggende opfindelse. Med homolet eller derivater af Lol pI menes endvidere syntetiske derivater
- 15 heraf. Den heri beskrevne nukleotidsekvens kan anvendes til at frembringe et hvilket som helst antal peptider eller polypeptider ved kemisk syntese, såsom fastfasesyntese, ved velkendte fremgangsmåder. Alle disse kemisk syntetiserede peptider er omfattet af den foreliggende opfindelse. Den foreliggende opfindelse omfatter således også ikke-naturligt Lol pI, fremstillet
- 20 ved hjælp af rekombinante metoder eller ved kemisk syntese. Den foreliggende opfindelse angår endvidere også proteiner, polypeptider eller peptider, der helt eller delvist svarer til den nukleotidkodende sekvens, der er anført i fig. 5.
- 25 Det ligger også indenfor den foreliggende opfindelses rækkevidde at indbefatte Lol pI immunologisk krydsreaktive med antistoffer mod Lol pI. Udtrykket "immunologisk krydsreaktiv" anvendes i dets bredeste betydning og refererer generelt til et protein, der er i stand til at påvise binding til et antistof, hvor sidstnævnte er specifikt for Lol pI. Et sådant immunologisk
- 30 beslægtet allergen omtales heri som en immunologisk slægtning til Lol pI.

Kloning af det cDNA, som koder for Lol pI, var baseret på genkendelsen af det protein, der udtrykkes af Escherichia coli transformeret med lambda-gt 11-fag, under anvendelse af både specifikke monoklonale antistoffer og

specifikt serum IgE fra græspollenfølsomme patienter. To sådanne kloner betegnes 6R og 12R. Der blev også isoleret cDNA-kloner på basis af differentieret antistofbinding. F.eks. blev cDNA-klon 6R isoleret på det grundlag, at det koder for et polypeptid, der er i stand til at binde til
5 monoklonale antistoffer, men ikke til IgE. Polypeptider af denne type mangler tilsyneladende den aminosyresekvens, der specificerer allergeneciteten, og disse cDNA-kloner må således mangle den DNA-sekvens, der koder for samme. De heri anvendte monoklonale antistoffer er FMC-A1, -A5 og -A7, som beskrevet af Knox & Singh (1985).

10

Med henblik på kloning af Lol pI-genet eller derivater heraf blev mRNA først isoleret fra det modne rajgræspollen. Dette mRNA blev anvendt som en template ved syntese af dobbeltstrengede komplementære DNA'er.

15 Udfra dette cDNA-bibliotek af rajgræspollen blev der påvist en rekombinant fag indeholdende Lol pI-indføjelser ved at screene biblioteket med (1) specifikt monoklonalt antistof FMC-A1, (2) specifikt IgE fra sera fra rajgræsfølsomme patienter (fig. 2).

20 Derpå blev EcoRI-linkere fæstnet til begge sider af de valgte kloner af ds-cDNA, og derpå ligeret til EcoRI, lambda-gt 11-vektorarmer (skåret og dephosphoryleret som indkøbt fra Promega). Det rekombinante lambda-gt 11-DNA indeholdende cDNA-indføjelserne blev indpakket i moden fag, og den rekombinante fag fik lov at inficere E. coli-værten.

25

Syntese af beta-galactosidase-rekombinant genfusionsprotein blev induceret ved at tilføje IPTG. Lol pI-beta-galactosidasefusionsproteinet blev derpå påvist under anvendelse af monoklonale antistoffer, som specifikt genkender epitoperne på Lol pI-proteinet.

30

Dette fusionsprotein blev isoleret i præparative mængder fra bakterielysogener, fraktioneret ved SDS-polyacrylamidgelelektrorese, og proteinerne blev overført til nitrocellulosemembraner med henblik på prøbering med monoklonale antistoffer (fig. 3). Disse antistoffer genkendte et

protein, som udviste en molekylvægt, der var større end den af E. coli-beta-galactosidase, hvilket forventes af et allergen-beta-galactosidase-fusionsprotein.

- 5 Den allergene natur af de foreliggende proteiner karakteriseres delvis ved deres binding af de reagene IgE-antistoffer, som er til stede i højt niveau i sera fra allergiske patienter. IgE-bindingen til epitoperne på allergiproteiner kan påvises ved en chromogen analyse, hvor allergener immobiliseret på fast bærer kan visualiseres ved skiftevis inkubation i (1) serum fra allergiske
10 patienter og (2) enzygmærkede anti-IgE-antistoffer.

- Udvalgte cDNA-kloner blev anvendt til at probere total DNA isoleret fra andre rajgræsplanteorganer for at afprøve hvorvidt Lol pl-allergenet er pollen-specifikt eller ej. Der blev benyttet slot-blotting og northern-analyser (fig. 4).
15 Der kunne ikke påvises hybridisering for total RNA fra blade, frø eller rodprøver. Disse resultater antyder, at Lol pl ikke udtrykkes i disse andre organer af rajgræsplanten.

- Udvalgte cDNA-kloner blev ligeret i både M13- og Gamini-vektorer med
20 henblik på sekvensering. De DNA-restriktionsfragmenter, der skal sekvenseres, blev indsat i M13 mp14 (Messing & Vieira, 1982). M13-kloning og DNA-sekvensering ved dideoxykæddeterminering blev udført som beskrevet af Bio-rad Laboratories (1980) og Messing (1983). Der blev anvendt en tilsvarende fremgangsmåde til kloning af allergene proteiner fra pollen fra
25 andre medlemmer af familien Poaceae (Gramineae), som er immunologisk krydsreaktive med antistoffer mod Lol pl eller derivater eller homologer heraf. Sekvensen for cDNA-klon 12R på 1240 basepar er vist i fig. 5. Det er i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse at indbefatte degenererede former for sekvensen og/eller nukleotidsekvenser med i al
30 væsentligt, d.v.s. mindst 60% homologi hermed.

Med den viden kan en lang række ekspressionsvektorer konstrueres til produktion af Lol pl eller derivater heraf. Udtrykket "promoter" anvendes i dets bredeste betydning og betegner almindeligvis den nukleotidsekvens,

- som binder RNA-polymerase og dirigere samme til det korrekte transkriptionelle startsted, hvorpå et gen eller en anden nukleotidsekvens heraf transkriberes. I nærværende forbindelse siges et gen eller en nukleotidsekvens at stå i forbindelse med promoteren, hvilket betyder at promoteren dirigerer transkription af genet eller nukleotidsekvensen.
- 5 Promotoren udvælges også på grundlag af dets evne til at virke i en bestemt vært. Den efterfølgende beskrivelse angår udvikling af prokaryote ekspressionsvektorer, som er i stand til at udtrykke Lol pl-genet eller et gen, som koder for et derivat, homolog eller immunologisk slægtning hertil.
- 10 Samme principper gælder for konstruktion af eukaryote vektorer. I nærværende beskrivelse indbefatter henvisning til Lol pl-genet også henvisning til gener, som koder for derivater, homologer eller immunologiske slægtninge til Lol pl.
- 15 Ved konstruktion af passende prokaryote ekspressionsvektorer er transkriptionstermineringssekvenser ønskelige for at forhindre potentiel gennemlæsning med RNA-polymerasen. For at undgå enhver interferering med transkriptionsterminatorerne kan fagfolk indenfor området eliminere det ikke-kodende 3'-område af Lol pl-genet. Samtidig kan man substituere andre
- 20 kendte transkriptionsterminatorer, f.eks. bakteriofag-lambda-terminatoren. Den foreliggende opfindelse er således på ingen måde begrænset til anvendelse af en hvilken som helst prokaryotisk transkriptionsterminator. Andre transkriptionsterminatorer omfatter f.eks. lpp-terminatorer og fag SP01-terminatoren. Alle ovennævnte terminatorer er tidligere blevet
- 25 karakteriseret og er velkendte indenfor fagområdet og kan konstrueres enten syntetisk eller ud fra kendte plasmider.
- Ekspession af Lol pl-aktivitet i E. coli er på ingen måde begrænset til anvendelse af en bestemt promoter, idet valget af en bestemt promoter ikke
- 30 er kritisk for virkeevnen af dette aspekt ved den foreliggende opfindelse. Promotere, som kan sættes i stedet for den tidligere eksemplificerede lambda-P_L-promoter omfatter, men er ikke begrænset til, E. coli-lactose (lac)-promoteren, E. coli-tryptophan (trp)-promoteren, E. coli-lipoprotein (lpp)-promoteren og bakteriofag-lambda P-promoteren. Endvidere kan en eller

flere promotere anvendes i tandem, såsom f.eks. trp- og lac-promoterne, eller der kan anvendes hybridpromotere, såsom tac-promotere, til at drive ekspressionen af Lol pl-genet. Alle ovennævnte promotere er tidligere blevet karakteriseret, er velkendte indenfor fagområdet og kan konstrueres enten
 5 syntetisk eller ud fra kendte plasmider.

Den foreliggende opfindelse er ikke begrænset til anvendelse af noget bestemt prokaryotisk replicon. Der kendes mange repliconer, såsom de fra plasmider pBR322, pACYC184, pUC-plasmiderne o.lign., og er egnet til
 10 konstruktion af rekombinante DNA-klonings-og-ekspressionsvektorer, der er udformet til at drive ekspression af Lol pl-kodende DNA-forbindelser ifølge den foreliggende opfindelse. Den foreliggende opfindelse er heller ikke begrænset til de aktuelle selekterbare markører, der er tilstede på de eksemplificerede plasmider. Der eksisterer en lang række selekterbare
 15 markører, både for eukaryote og prokaryote værtsceller, og disse er egnet til anvendelse på en rekombinant DNA-klonings-eller-ekspressionsvektor omfattende en DNA-forbindelse (eller sekvens) ifølge den foreliggende opfindelse.

20 Mange modifikationer og variationer af de foreliggende illustrative DNA-sekvenser og -plasmider er mulige. F.eks. tillader degenerering af den genetiske kode substituering af nukleotider i de polypeptidkodende områder, såvel som erstatning af

25 TAG
 ATC

translationsstopsignalet med

30 TAA eller TGA
 ATT ACT

translationsstopsignalerne. Sådanne sekvenser kan afledes fra aminosyre- eller DNA-sekvensen af Lol pl og kan konstrueres ved efterfølgende traditionelle syntese procedurer.

- 5 Udøvelse af den foreliggende opfindelse under anvendelse af prokaryote ekspressionsvektorer samt fremgangsmåder beskrevet i nærværende opfindelse, kan anvendes i forbindelse med en lang række værtsorganismer, navnlig Gram-negative prokaryote organismer, såsom Escherichia coli, E. coli K12, E. coli K12 RV308, E. coli K12 HB101, E. coli K12 C600, E. coli K12 SF8, E. coli K12 RR1, E. coli K12 RR1 M15, E. coli K12 MM294, E. coli SG936, o.lign.. Escherichia coli SG936 er beskrevet af Buell et al. (1985). To af de genetiske mutationer, der er indført i denne stamme, nemlig lon- og htpR -mutationerne, er kendt for at fremme ekspression af ønskede proteiner (jf. f.eks. Goff og Goldberg (1985)). Disse mutationer kan transduceres til andre stammer af E. coli ved P1-transduktion i overensstemmelse med beskrivelsen ifølge Miller (1972).

- Alternativt kan der let anvendes andre prokaryote organismer, såsom Bacillus, Pseudomonas o.lign.. Det vil være nødvendigt med mindre modifikationer i ekspressionsvektorer alt afhængig af den anvendte værtscelle, således at vektoren replikeres, promoteren virker og den selekterbare markør udtrykkes. Sådanne modifikationer er rutine for fagfolk indenfor området.

- 25 Lignende overvejelser gælder ved udvikling af eukaryote ekspressionsvektorer, og mange er opnåelige til anvendelse i pattedyrsceller, gær- og svampeceller og insektceller. En passende referenceguide for udvikling af eukaryote og prokaryote ekspressionsvektorer er beskrevet af Maniatis et al. (1982).

30

Lol pl-promoterer kan isoleres fra genomt rajgræs-DNA ved hjælp af en række procedurer, herunder anvendelse af promoterprobevektorer, "kromosomvandring" og S1-nukleasekortlægning og sekvensering som DNA opstrøms for transkriptionsinitieringsstedet. Alle disse metoder er velkendte

for fagmanden. Under anvendelse af den cDNA-klon, som koder for Lol pI eller et derivat heraf, som probe-DNA for hybridisering, kloner et fragment af DNA, der er nærliggende til, eller omfatter hele eller en del af Lol pI-genet. Derpå anvendes nukleotidsekvensen af Lol pI, som bestemt ifølge foreliggende opfindelse, til at udvikle en nukleotidprimer ved den promoterproximale ende af Lol pI-genet. "Kromosomvandring", S1-endonukleasekortlægning, promoterprober vil let identificere promoteren.

Den foreliggende opfindelse angår følgelig et rekombinant DNA-molekyle omfattende en rajgræspollenpromotersekvens og navnlig promoteren for Lol pI-genet, som er lokaliseret på molekylet, og yderligere med et eller flere restriktionsendonukleasesteder nedstrøms for promoteren, således at den nukleotidsekvens, der indsættes i et eller flere af disse steder, kan transkriberes i den rigtige læseramme. I nærværende beskrivelse har udtrykket "den rigtige læseramme" samme betydning som "i fase". Førnævnte DNA-molekyle vil fortrinsvis også omfatte en selekterbar markør, såsom et antibiotika- eller andet lægemiddelresistensgen, som f.eks. genet kodende for resistens overfor ampicillin, carbanicilin, tetracycline, streptomycin o. lign.. Det rekombinante molekyle vil yderligere omfatte midler til stabil nedarvning i en prokaryot og/eller eukaryot celle. Dette kan opnås ved at det rekombinante molekyle bærer et eukaryotisk og/eller et prokaryotisk replikationsorigin, som beskrevet ovenfor i forbindelse med ekspressionsvektorer.

Det rekombinante molekyle vil alternativt bære et middel til integrering i et værtscellegenom hvorved der tillades replikation af det rekombinante molekyle, synkront med replikation af værtscellegenomet. Eksempler på foretrukne prokaryote værter omfatter bl. a. E. coli, Bacillus og Pseudomonas. Foretrukne eukaryote værter omfatter celler fra gær og svampe, insekter, pattedyr og planter.

De monoklonale antistoffer, der ifølge den foreliggende opfindelse anvendes til at screene cDNA-biblioteket for Lol pI-kloner, udviste krydsreaktivitet med allergene proteiner fra pollen fra forskellige beslægtede græsarter. Dette

viser, at der er homologi mellem allergene proteiner frembragt af disse pollen og Lol pI-allergen, hvilket understøtter den foreliggende opfindelses anvendelighed til alle beslægtede græsarter. Denne homologi kan f.eks. udnyttes til at isolere DNA, som koder for andre allergene proteiner uden behov for proteinmikrosekvensering og oligo-nukleotidprimere. Den foreliggende opfindelse angår også antistoffer mod rekombinant Lol pI. Sådanne antistoffer er påtænkt at være anvendelige ved udvikling af påvisningsanalyser (immunoanalyser) for Lol pI, navnlig under overvågning af et terapeutisk eller diagnostisk regimen, og ved oprensning af Lol pI. Antistofferne kan være monoklonale eller polyklonale. Det ligger endvidere indenfor opfindelsens rækkevidde at indbefatte ethvert andet antistof (monoklonalt eller polyklont), der er rettet mod det ovenfor omtalte første antistof. Den foreliggende opfindelse angår endvidere anvendelse af disse første eller anden antistoffer i påvisningsanalyser og f.eks. ved overvågning af virkninger af et diagnostisk eller administreret farmaceutisk præparat. Det ligger endvidere indenfor den foreliggende opfindelses rækkevidde at indbefatte antistoffer mod de glycosylerede områder af Lol pI (hvor de er til stede) og mod ethvert molekyle, der er kompleksbundet med Lol pI. Et antistof mod Lol pI omfatter følgelig antistoffet mod Lol pI eller antigene dele heraf og mod ethvert associeret molekyle (f.eks. glycosylerede områder, lipidområder, bærermolekyler, sammensmeltede proteiner o.lign.).

Det heri betragtede Lol pI eller dele heraf oprenses og benyttes derpå ved antistoffremstilling. Der kan opnås både polyklonale og monoklonale antistoffer ved immunisering med Lol pI og begge typer er anvendelige ved immunoanalyser. Fremgangsmåder til opnåelse af begge typer sera er velkendte indenfor fagområdet. Polyklont sera er mindre foretrukket, men fremstilles forholdsvis let ved at et passende laboratoriedyr injiceres med en effektiv mængde af det oprensede Lol pI eller antigene dele heraf, at serum fra dyret indvindes og at specifikt sera isoleres ved en hvilken som helst af de kendte immunoadsorbentmetoder. Selvom antistoffer fremstillet ved denne fremgangsmåde kan anvendes ved næsten en hvilken som helst type immunoanalyse er de almindeligvis mindre favorable på grund af den potentielle heterogenitet af produktet.

Anvendelse af monoklonale antistoffer ved immunoanalyse foretrækkes navnlig på grund af evnen til at producere dem i store mængder, samt på grund af homogeniteten af produktet. Fremstilling af hybridomacellelinier til fremstilling af monoklonale antistoffer, hidrører ved at sammensmelte en udødeliggjort cellelinie og lymfocytter, der er sensibiliseret overfor det immunogene præparat, ved metoder, som er velkendt for fagfolk indenfor området (jf. f.eks. Douillard og Hoffman (1981) og Kohler og Milstein (1975; 1976)).

Ulig fremstilling af polyklonalt sera afhænger valget af dyret på tilgængeligheden af passende udødeliggjorte linier, som er i stand til at sammensmelte med lymfocytter. Mus og rotte har været det valgte dyr ved hybridomateknologi og anvendes fortrinsvis. Mennesker kan også anvendes som kilde til sensibiliserede lymfocytter, hvis der er passende udødeliggjort human (eller ikke-human)-cellelinier tilgængelige. I forbindelse med den foreliggende opfindelse kan det valgte dyr injiceres med fra ca. 0,1 mg til ca. 20 mg af det rensede LoI pI eller dele heraf. Almindeligvis emulgeres injektionsmaterialet i Freund's fuldstændige adjuvans. Det kan også være påkrævet med "boosting"-injektioner. Påvisning af antistoffremstillingen kan udføres ved at teste antisera med passende mærket antigen. Der kan opnås lymfocytter ved at fjerne milten eller lymfekirtler fra sensibiliserede dyr på steril måde og udføre fusion. Alternativt kan lymfocytter stimuleres eller immuniseres in vitro, som f.eks. beskrevet af Reading (1982).

Der er blevet udviklet en række cellelinier, som er egnet til fusion, og valget af enhver bestemt linie til hybridiseringsprotokoller styres af et hvilket som helst af en række kriterier, såsom hastighed, ensartetheden af vækstbetingelser, mangel i metabolismen for en komponent i vækstmediet og potentialet for god fusionsfrekvens.

Hybrider indenfor arter, navnlig mellem ens stammer, fungerer bedre end fusioner mellem arter. Der er flere cellelinier opnåelige, herunder mutanter, der er udvalgt for tab af evnen til at secernere myeloma immunoglobulin.

Cellefusion kan induceres enten med virus, såsom Epstein-Barr- eller Sendai-virus, eller polyethylenglycol. Polyethylenglycol (PEG) er det mest virksomme middel til fusion af somatiske pattedyrsceller. PEG kan være
5 toksisk for celler og der bør afprøves forskellige koncentrationer for deres virkning på levedygtigheden før fusionsforsøg. PEG molekylvægt kan ligge på fra 1000 til 6000. Det giver bedst resultater når det fortyndes til fra ca. 20% til ca. 70% (vægt/vægt) i saltopløsning eller serumfrit medium. I det foreliggende tilfælde foretrækkes udsættelse for PEG ved 37 °C i ca. 30
10 sekunder og anvendelse af museceller. Der undgås ekstrem temperatur (d.v.s. ca. 45 °C) og det kan være nyttigt at præinkubere hver komponent i fusionssystemet ved 37 °C før fusion. Forholdet mellem lymfocytter og maligne celler optimeres for at undgå cellefusion mellem miltceller, og der anvendes sædvanligvis et forhold på fra ca. 1:1 til ca. 1:10.

15 De vellykkede sammensmeltede celler kan adskilles fra myelomalinen ved hjælp af enhver metode, der er kendt indenfor fagområdet. Den mest almindelige og foretrukne metode er at vælge en malign linie, som er hyposanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT)-deficient, hvilken
20 ikke vil vokse i et aminopterinholdigt medium, som kun tillader vækst af hybrider, og som i det væsentlige består af 1×10^{-4} M hyposanthin, 1×10^{-5} M aminopterin og 3×10^{-5} M thymidin, hvilket almindeligvis er kendt som HAT-medium. Fusionsblandingen kan vokse i det HAT-holdige dyrkningsmedium umiddelbart efter fusionen 24 timer senere. Skemaer for supplering af mediet
25 fastsætter almindeligvis opretholdelse i HAT-medium i 2 uger og derpå fodring med enten regulært dyrkningsmedium eller hyposanthin, thymidinholdigt medium.

30 De voksende kolonier testes derpå for tilstedeværelsen af antistoffer, som genkender det antigene præparat. Påvisning af hybridomaantistoffer kan udføres under anvendelse af en analyse, hvor antigenet er bundet til en fast bærer og får lov til at reagere på hybridomasupernatanter indeholdende formodede antistoffer. Tilstedeværelsen af antistoffer kan påvises med "sandwich"-metoder under anvendelse af en lang række indikatorer. De

fleste almindelig anvendte metoder er tilstrækkelig følsomme til anvendelse ved de omfang af antistofkoncentrationer, som secernerer under hybridvækst.

- 5 Kloning af hybrider kan udføres efter 21-23 dages cellevækst i udvalgt medium. Kloning kan udføres ved cellebegrænsende fortynding i væskeformig fase eller ved direkte udvalg af enkelte celler, som vokser i halvfast agarose. Ved begrænset fortynding fortyndes cellesuspensionerne serievis til opnåelse af en statistisk mulighed for kun en celle pr. brønd. Ved
10 agarosemetoden udsås hybrider i et halvfast øvre lag over et nedre lag indeholdende forsyningsceller. Kolonier fra det øverste lag kan opsamles, og eventuelt overføres til brønde.

- Antistofsecernerende hybrider kan vokse i forskellige vævskulturkolber til
15 opnåelse af supernatanter med varierende koncentration af antistoffer. For at opnå højere koncentrationer kan hybrider overføres til dyr til opnåelse af inflammatorisk ascites. Antistofholdig ascites kan derpå høstes 8-12 dage efter indtraperitonealinjektion. Ascites indeholder en større koncentration af antistoffer, men omfatter både monoklonale antistoffer og immunoglobuliner
20 fra den inflammatoriske ascites. Derpå kan antistofoprensning opnås f.eks. ved affinitetschromatografi.

- Tilstedeværelse af den foreliggende LoI pl eller antistoffer, der er specifikke for samme, i en patients serum, plante- eller dyrevæv eller vævsekstrakt kan
25 påvises ved at anvende antistoffer, der fremstilles som beskrevet ovenfor, enten monoklonale eller polyklonale ved faktisk enhver type immunanalyse. En lang række immunoanalysemetoder er opnåelige som det fremgår af henvisningen til U.S. patentet nr. 4.016.043, nr. 4.424.279 og nr. 4.018.653. Disse omfatter selvfølgelig både enkeltsteds- og tostedes- eller "sandwich"-
30 analyser af den ikke-kompetitive type, således som de traditionelle kompetitive bindingsanalyser. Sandwichanalyser er blandt de mest anvendelige og almindeligt anvendte analyser, og favoriseres i forbindelse med den foreliggende opfindelse. Der eksisterer en række variationer af sandwichanalysen, og alle er omfattet af den foreliggende opfindelse. Ved en

- almindelig ligefrem analyse immobiliseres et umærket antistof kort fortalt på en fast bærer, og prøven, der skal testes, bringes i forbindelse med det bundne molekyle. Efter et passende inkubationstidspunkt, som er tilstrækkelig til at tillade dannelse af et sekundært antistof-antigenkompleks, tilsættes et andet antistof, der er mærket med et rapportørmekyle, som er i stand til at frembringe et påvisligt signal, og inkuberes derpå i tilstrækkelig tid til dannelse af et tertiært kompleks af antistof-antigen-mærket antistof, (d.v.s. antistof- LoI pI-antistof). Eventuelt uomsat materiale vaskes bort og tilstedeværelsen af antigenet bestemmes ved at observere et signal, der frembringes af rapportørmekylet. Resultaterne kan enten være kvalitative ved simpel observation af det synlige signal, eller kvantificeres ved at sammenligne med en kontrolprøve, som indeholder en kendt mængde haptent. Variationer af den ligefremme analyse omfatter en samtidig analyse, hvor både prøve og mærket antistof sættes samtidig til det bundne antistof, eller en omvendt analyse, hvor det mærkede antistof og prøve, der skal testes, først kombineres, inkuberes og derpå samtidig sættes til bundet antistof. Disse metoder er velkendte for fagfolk indenfor området, og omfatter enhver mindre variation, som er indlysende.
- Selv om den efterfølgende beskrivelse angår påvisning af LoI pI er den ligeledes anvendelig til påvisning af antistoffer mod LoI pI, og har til hensigt at være en passende beskrivelse heraf. Ved den typiske ligefremme sandwichanalyse bindes et første antistof med specifitet for LoI pI eller antigene dele heraf ifølge den foreliggende opfindelse enten covalent eller passivt til en fast overflade. Den faste overflade er typisk glas eller en polymer, hvor de hyppigst anvendte polymerer er cellulose, polyacrylamid, nylon, polystyren, polyvinylchlorid eller polypropylen. Den faste bærer kan have form af rør, kugler, mikropladeskiver eller enhver anden overflade der er egnet til at udføre en immunoanalyse. Bindingsprocesserne er velkendte indenfor fagområdet og består almindeligvis i tværbinding, covalentbinding eller fysisk adsorption, hvor polymer-antistofkomplekset vaskes ved fremstilling af forsøgsprøven. En delprøve af den prøve, der skal undersøges, sættes derpå til det faste fasekompleks og inkuberes ved 25 °C i et tidsrum, som er tilstrækkeligt til at tillade binding af enhver underenhed,

som er tilstede i antistoffet. Inkubationstidsrummet vil variere, men vil almindeligvis ligge på fra ca. 2 til 40 min. Efter inkubationstidsrummet vaskes antistofsubunitfastfasen og tørres og inkuberes med et andet antistof, der er specifikt for en del af haptenen. det andet antistof er bundet til et rapportørmolekyle, som anvendes til at indikere binding af det andet antistof til haptenen.

Med udtrykket "rapportørmolekyle", som det anvendes i nærværende beskrivelse menes et molekyle, som p.g.a. dets kemiske natur tilvejebringer et analytisk identificerbart signal, som tillader påvisning af antigenbundet antistof. Påvisningen kan være enten kvalitativ eller kvantitativ. De hyppigst anvendte rapportørmolekyler ved denne type analyser er enten enzymer, fluorophorer eller radionuklid-indeholdende molekyler (d.v.s. radioisotoper). I forbindelse med en enzymimmunoanalyse er enzymet konjugeret til det andet antistof, almindeligvis ved hjælp af glutaraldehyd eller periodat. Det vil imidlertid let forstås, at der eksisterer en lang række forskellige konjugationsmetoder, som er let opnåelige for fagfolk. Almindelig anvendte enzymer omfatter bl.a. peberrodsperoxidase, glucoseoxidase, beta-galactosidase og alkalisk phosphatase. De substrater, som skal anvendes sammen med specifikke enzymer, udvælges almindeligvis med henblik på udvikling af en påviselig farveændring efter hydrolyse med det tilsvarende enzym. F.eks. er p-nitrophenylphosphat egnet til anvendelse sammen med alkaliske phosphatasekonjugater. Til peroxidasekonjugater anvendes der hyppigst 1,2-phenylendiamin, 5-aminosalicylsyre eller toluidin. Det er også muligt at benytte fluorogene substrater, som giver et fluoriserende produkt, i stedet for de ovenfor anførte chromogene substrater. I alle tilfælde sættes det enzymmærkede antistof til det første antistof-haptenkompleks, får lov til at bindes, og derpå vaskes overskydende reagens bort. En opløsning indeholdende det passende substrat sættes derpå til det tertiære kompleks af antistof-antigen-antistof. Substratet vil reagere med det enzym, der er bundet til det andet antistof, hvilket giver et kvalitativt visuelt signal, som kan yderligere kvantificeres, sædvanligvis spektrofotometisk til opnåelse af en indikation på den haptenmængde, som er til stede i prøven. Udtrykket

"rapportørmolekyle" omfatter også anvendelse af celleagglutinerings eller hæmning af agglutinerings, såsom røde blodlegemer på latexkugler o.lign..

Alternativt kan en fluoriserende forbindelse, såsom floresein og rhodamin, kobles til antistoffer uden at ændre deres bindingskapacitet. Ved aktivering ved belysning med lys med en bestemt bølgelængde adsorberer det fluorochrommærkede antistof lysenergien, hvilket inducerer en exciterbar tilstand i molekylet fulgt af emission af lyset ved en karakteristisk farve, der er visuel påviselig med et lysmikroskop. Som ved EIA får det fluorescensmærkede antistof lov til at binde til det første antistof-haptenkompleks. Efter fravask af det ubundne reagens, udsættes det resterende tertiære kompleks for lys med passende bølgelængde, hvor observeret fluoreoscens indikerer tilstedeværelse af haptener af interesse. Immunofluorescens- og EIA-metoder er begge meget etablerede indenfor fagområdet og foretrækkes navnlig i forbindelse med den foreliggende fremgangsmåde. Der kan imidlertid også benyttes andre rapportørmolekyler, såsom radioisotop-, Chemiluminiscerende eller bioluminiscerende molekyler. Det vil let fremgå for fagfolk indenfor området hvordan fremgangsmåden kan varieres for at passe til det krævede formål. Det vil også fremgå, at ovennævnte kan anvendes til direkte eller indirekte (d.v.s. ved hjælp af antistoffer) påvisning af Lol pl ifølge opfindelsen.

P.g.a. tilstedeværelsen af allergener i miljøet fortsætter høfeber og sæsonbetonet astma med at have væsentlige morbiditet og socio-økonomisk virkning i de vestlige lande, på trods af fremskridt indenfor deres farmacologi og immunologi. Selvom det til rådighed værende spektrum af medikamenter, herunder anti-histaminer og steroider, har medført en betydelig forbedring i behandling af allergene lidelser er der stadig beklageligvis bivirkninger forbundet med langtidsanvendelse. P.g.a. disse problemer er der udvist fornyet interesse for immunoterapi af allergiske lidelser. Immunoterapi involverer injektion af potente allergenekstrakter for at desensibilisere patienter mod allergiske reaktioner (Bousquet & Michel, 1989). Desværre er de pollenpræparater, der anvendes som allergener, polyvalente og af dårlig kvalitet. Følgelig er de anvendte koncentrationer ofte høje for at inducere

IgG-svar, men de kan være lethale p.g.a. udløsning af systemiske reaktioner, herunder anafylaksi. Det klonede genprodukt eller syntetiske peptider baseret på allergensekvensen tilvejebringer et ufarligt medie for terapi, idet det kan kvalitetskontrolleres, karakteriseres og standardiseres.

5

Den nøjagtige mekanisme for symptomatisk lindring forbliver hypotetisk. Det er fastlagt, at desensibiliseringsterapi inducerer dannelse af allergenspecifik ikke-mastcellebindende IgG, som blokerer kombinationen af mastcellebundet IgE og allergen. Dette forhindrer mediatorfrigørelse og udløsning af det allergiske svar. Nylige undersøgelser af følsomhed overfor ambrosiapollen viste, at der eksisterer en korrelation mellem allergenspecifikke IgG-niveauer og lindring for allergisymptomer (Lichtenstein et al., 1983). Anvendelse af reagenser, som kan udløse allergenspecifik IgG-produktion, kan øge det vellykkede omfang af denne behandling væsentligt.

15

Den for tiden værende immunterapi er en af de hyppigst anvendte behandlinger indenfor allergologien, og betragtes i USA som det første valg. Fordele ved denne behandling for pollenrhinitis er, at behandlingen tager op til 3 år, medens pharmacoterapien må udføres under hele patientens levetid. Patienter indgivet pollenekstrakter med henblik på immunoterapi udviste en klinisk fordel, som varede 4 år efter behandlingens afslutning (Grammer et al., 1984).

25

Følgelig er Lol pl, dets derivater, homologer eller immunologiske slægtninge anvendelig til udvikling af en vaccine til desensibilisering af mennesker mod allergier forårsaget af græspollen.

30

De aktive bestanddele i en farmaceutisk sammensætning omfattende Lol pl e.lign., skal udvise fremragende terapeutisk aktivitet, f.eks. med hensyn til desensibilisering af mennesker, der er allergiske overfor græspollen, når det indgives i mængder, som afhænger af det bestemte tilfælde. F.eks. kan fra 0,5 µg til ca. 20 mg pr. kg legemsvægt indgives pr. dag. Dosisregimer kan justeres med henblik på at tilvejebringe det optimale terapeutiske svar. Der kan f.eks. indgives flere inddelte doser dagligt, eller dosen kan reduceres

proportionalt som indikeret af den kritiske terapeutiske situation. Den aktive forbindelse kan indgives på traditionel måde, såsom oralt, intravenøst (når den er vandopløselig), intramuskulært, subcutant, intranasalt, intradermalt eller med suppositorie eller ved implantering (under anvendelse af langsomt frigørende molekyler). Alt afhængig af administrationsvejen, kan de aktive bestanddele, som omfatter LoI pl e.lign., kræves at være belagt med et materiale for at beskytte bestanddelene mod virkningerne af syrer og andre naturlige betingelser, som kan inaktivere bestanddelene. F.eks. vil den lave lipofilitet af LoI pl e.lign. tillade at det ødelægges i tarmkanalen af enzymer, som er i stand til at spalte peptidbindinger, og i maven ved syrehydrolyse. For at indgive LoI pl e.lign. på anden måde end ved parenteral indgivelse kan det belægges med eller indgives med et materiale, som forhindrer dets inaktivering. F.eks. kan LoI pl e.lign. indgives i en adjuvans, indgives sammen med enzyminhibitorer eller i liposomer. Adjuvans anvendes i dets bredeste betydning og omfatter enhver immunstimulerende forbindelse, såsom interferon. Adjuvanser til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelse omfatter resorcinoler, ikke-ioniske surfaktanter, såsom polyoxyethylenoleyl ether og n-hexadecylpolyethylenether. Enzyminhibitorer omfatter pancreastrypsininhibitor, diisopropylfluorophosphat (DEP) og trasylol. Liposomer omfatter vand-i-olie-i-vand CGF-emulsioner, såvel som traditionelle liposomer.

De aktive forbindelser kan også indgives parenteralt eller intraperitonealt. Dispersioner kan også fremstilles i glycerol, væskeformige polyethylen-glycoler og blandinger heraf samt i olier. Under almindelige betingelser for opbevaring og anvendelse indeholder disse præperater et konserveringsmiddel for at forhindre vækst af mikroorganismer.

De farmaceutiske former, der er egnede til injicerbar anvendelse, omfatter sterile vandige opløsninger (når de er vandopløselige) eller dispersioner og sterile pulvere til uventet fremstilling af sterile injicerbare opløsninger eller dispersioner. I alle tilfælde må formen være steril og være væskeformig i et sådant omfang, at der eksisterer let sprøjtbarhed. Det må være stabilt under betingelserne for fremstilling og opbevaring og må konserveres mod den

kontaminerende virkning af mikroorganismer, såsom bakterier og svampe. Bæreren kan være et opløsningsmiddel eller dispersionsmedium, der f.eks. indeholder vand, ethanol, polyol (f.eks. glycerol, propylenglycol, og væskeformig polyethylenglycol o.lign.), passende blandinger heraf og vegetabiliske olier. Den passende fluiditet kan opretholdes ved f.eks. at anvende en belægning, såsom licithin, ved opretholdelse af den krævede partikelstørrelse i tilfældet med dispersion og ved anvendelse af superfaktanter. Forebyggelsen af mikroorganismers virkning kan ske ved hjælp af forskellige antibakterielle og antisvampemidler, f.eks. parabener, chlorbutanol, phenol, sorbinsyre, thimerosal o.lign. I mange tilfælde vil det foretrækkes at indbefatte isotone midler, f.eks. sukkerarter eller natriumchlorid. Længerevarende absorption af de injicerbare sammensætninger kan ske ved i sammensætningen at anvende midler, der forsinket absorption, f.eks. aluminiummonostearat og gelatine.

Der fremstilles sterile injicerbare opløsninger ved at inkorporere de aktive forbindelser i den krævede mængde i det passende opløsningsmiddel sammen med forskellige af de andre ovenfor angivne bestanddele, som krævet, fulgt af filtersterilisering. Almindeligvis fremstilles dispersioner ved at inkorporere de forskellige steriliserede aktive bestanddele i en steril vehikel, som indeholder det basale dispersionsmedium og de krævede andre bestanddele blandt de ovenfor anførte. I tilfældet med sterile pulver til fremstilling af sterile injicerbare opløsninger er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuumtørring og frysetørring, som giver et pulver af den aktive bestanddel samt enhver yderligere ønsket bestanddel fra forudgående sterilfiltrerede opløsninger heraf.

Når Lol pl e.lign. er passende beskyttet som beskrevet ovenfor, kan den aktive forbindelse indgives oralt, f.eks. med et inert fortyndingsmiddel, eller med en fordøjelig spiselig bærer, eller den kan omslutes af en hård eller blød gelatinekapsel eller komprimeres til tabletter, eller kan inkorporeres direkte i levnedsmidlet i kosten. Til oral terapeutisk indgivelse kan den aktive forbindelse inkorporeres med excipienser og anvendes i form af nedsvælgelige tabletter, buccale tabletter, pastiller, kapsler, eleksirer,

suspensioner, siruper, oblater o.lign. Sådanne sammensætninger og præparater bør indeholde mindst en vægtprocent af den aktive forbindelse. Procentdelen af sammensætningerne og præparaterne kan selvfølgelig varieres og kan passende ligge mellem fra ca. 5 til ca. 80 vægtprocent af enheden. Mængden af aktive forbindelse i sådanne terapeutisk anvendelige sammensætninger er således, at der vil opnås en passende dosis. Foretrukne sammensætninger eller præparater ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles således, at en oral enhedsdosisform indeholder mellem ca. 10 µg og 2000 mg af den aktive forbindelse.

10

Tabletterne, pastillerne, pillerne, kapslerne o.lign. kan også indeholde følgende: Et bindemiddel, såsom gummigragacanth, acacia, majsstivelse eller gelatine; excipienser såsom dicalciumphosphat; et deintegreringsmiddel, såsom majsstivelse, kartoffelstivelse, alginsyre o.lign.; et smøremiddel, såsom magnesiumstearate; og et sødemiddel såsom saccharose, lactose eller saccharin kan tilsættes eller et smagsmiddel, såsom pebermynte, vintergrøntolie eller kirsebærsmag. Når enhedsdosisformen er en kapsel kan den udover materialer af ovennævnte type indeholde en væskeformig bærer. Der kan være forskellige andre materialer tilstede som belægninger eller til på anden måde at modificere dosisenhedens fysiske form. F.eks. kan tabletter, piller eller kapsler belægges med shellac, sukker eller begge dele. En sirup eller eleksir kan indeholde den aktive forbindelse, saccharose som et sødemiddel, methyl- og propylparabener som konserveringsmiddel, et farvestof og et smagsstof, såsom krisebær- eller orangesmag. Selvfølgelig bør ethvert materiale, der anvendes til fremstilling af en hvilken som helst enhedsdosisform, være farmaceutisk ren og i alt væsentligt ikke-toxisk i de benyttede mængder. Endvidere kan den aktive forbindelse inkorporeres i præparater og formulationer med langvarig frigørelse.

30

I nærværende beskrivelse omfatter udtrykket "farmaceutisk acceptabel bærer" ethvert og alle opløsningsmidler, dispersionsmedier, belægninger, antibakterielle og antisvampemidler, isotone og absorptionsforsinkende midler o.lign. Anvendelse af sådanne medier og midler til farmaceutisk aktive

forbindelser er velkendt indenfor fagområdet. Med undtagelse af for så vidt nogen af de traditionelle medier eller midler er inkompatible med den aktive bestanddel, er anvendelse heraf i de terapeutiske sammensætninger omfattet. Der kan også inkorporeres supplerende aktive bestanddele i sammensætningerne.

Det er navnlig fordelagtigt at formulere parenterale sammensætninger på enhedsdosisform for at lette indgivelsesmåden og dosens ensartethed. Udtrykket enhedsdosisform som det anvendes i nærværende beskrivelse, henviser til fysisk adskilte enheder, som er egnede som enhedsdoser til pattedyrsindivider, som skal behandles. Hver enhed indeholder en forud bestemt mængde af aktivt materiale, der er beregnet til at frembringe den ønskede terapeutiske virkning i forbindelse med den krævede farmaceutiske bærer. Specifikationen af de nye enhedsdosisformer ifølge opfindelsen dikteres af og er direkte afhængige af (a) det aktive materiales enestående egenskaber og den særlige terapeutiske virkning, som skal opnås, og (b) de begrænsninger der indenfor fagområder er forbundet med sammensætning af et sådant aktivt materiale til behandling af en lidelse i levende individer ved en sygdomstilstand, hvor legemets sundhed forringes, hvilket er beskrevet detaljeret nedenfor.

Den vigtigste aktive bestanddel blandes med henblik på passende og effektiv indgivelse i virksomme mængder med en passende farmaceutisk acceptabel bærer på enhedsdosisform, som beskrevet ovenfor. En enhedsdosisform kan f.eks. indeholde den vigtigste aktive forbindelse i mængder på fra 0,5 µg til ca. 200 mg. Udtrykt i andele er den aktive bestanddel almindeligvis til stede i fra ca 0,5 µg til ca. 2000 mg pr. ml bærer. I tilfældet med sammensætninger indeholdende yderligere aktive bestanddele fastlægges doserne under henvisning til den sædvanlige dosis og indgivelsesmåde for disse bestanddele.

Den foreliggende opfindelse er yderligere illustreret ved nedenstående ikke-begrænsende eksempler.

EKSEMPEL 1

Ekstrahering af RNA.

- 5 4 g frisk rajgræspollen (indvundet fra marker nær Melbourne og opbevaret under flydende N₂) blev opslæmmet i 10 ml ekstraktionspuffer (50mM Tris-puffer, pH9, 0,2M NaCl, 10mM Mg-acetat) indeholdende 10mM vanadyl-ribonukleosidkomplekser (Berger & Birkenmeier, 1979) og 0,1% DEPC. Pollenslammet blev malet i en mortor og stødt under flydende N₂ i 10-20 min
- 10 for at tilvejebringe et homogenat, hvori alle pollenkorn var ødelagt. Opslæmningen blev overført til Nalgene-centrifugerør med 1% (vægt/volumen) SDS, 10mM EDTA og 0,5% (vægt/volumen) N-lauroylsarcosin. Et tilsvarende volumen varm pufret phenol af høj kvalitet (fra IBI) behandlet med 0,1% (vægt/volumen) hydroxyquinoline (Maniatis et al.,
- 15 1982) blev tilsat, og blandingen blev rystet i 10 min. Et tilsvarende volumen af 24:1 dele chloroform:isoamylalkohol blev tilsat og rystningen blev fortsat. Rørene blev centrifugeret ved 15.000 omdrejninger pr. min i 20 min ved 10 °C for at adskille faserne og fjerne uopløseligt materiale og cellerester. Den vandige fase blev reekstraheret med P:C:I 4 gange indtil phenolfasen forblev
- 20 klar (med faseadskillelse ved 2.500 omdrejninger pr. min i 15 min ved stuetemperatur) og den vandige fase blev overført til Corex-centrifugerør. 2,5 volumen af 100% (volumen/volumen) ethanol blev tilsat og opløsningen blev blandet med pipette og fik lov til at præcipitere natten over ved -20 °C, og roteret ved 15.000 omdrejninger pr. min i 20 min ved 0 °C. Peletten blev
- 25 genopslæmmet i 10 ml EDTA for at fjerne vanadyl-ribonukleosidkomplekser, og der blev tilsat LiCl for at opnå en endelig koncentration på 2M. Opløsningen blev opretholdt ved 0 °C natten over og centrifugeret ved 15.000 omdrejninger pr. min i 30 min ved 4 °C. Pelletten blev vasket med koldt 2M LiCl hvor 5mM EDTA (pH 7,3), væsken blev hældt fra, og pelletten
- 30 blev genopslæmmet i 1 ml vand. Opløsningen blev opvarmet til 65 °C og der blev tilsat 0,1 ml 3M Na-acetat og 2,2 ml ethanol til præcipitation af totalt RNA ved -20 °C natten over. Pelletten blev vasket blidt med 70% (volumen/volumen) ethanol, vakuumtørret og genopslæmmet i 0,5 ml vand.

Opslæmningen blev opbevaret ved -70 °C indtil den skulle anvendes til poly (A+) RNA-udvælgelse.

5 Et gram rajgræspollen indeholdte 1 mg totalt RNA. Poly (A+) mRNA blev udvalgt ved affinitetschromatografi på Poly (U)-Sephrose (Pharmacia) i henhold til standardmetoder. Integriteten af poly (A+) mRNA blev undersøgt ved dets evne til at virke som en template for syntese af enkeltstrengt cDNA såvel som for dets translationelle aktivitet i kaninreticulocytssystemet.

10 EKSEMPEL 2

Fremstilling af cDNA-kloner.

15 Syntese af første cDNA-streng var ud fra 5 µg (poly A+) RNA i 50 µl reaktionspuffer (50mM Tris-puffer, pH 8,3) indeholdende 40mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 1mM dATP, 1mM dGTP, 1mM dTTP og 1mM dCTP, 50 enheder human placental ribonukleaseinhibitor (HPRI), 5 µg oligodeoxythymidylsyreprimer, 80 µCi [Alpha-³² P] dCTP (3000Ci/mmol; Amersham) og 100 enheder reverstranskriptase. Blandingen blev inkuberet i 60 min ved 42
20 °C. Den anden cDNA-streng blev syntetiseret under anvendelse af mRNA/cDNA hybrider som substrat, 4 enheder E. coli DNA-ribonuklease H til frembringelse af indskæringer i mRNA-template, og 115 enheder E.coli DNA-polymerase 1 til katalysering af erstatningerne af mRNA-strengen med DNA. Reaktionsblandingen blev inkuberet sekvensvis ved 12 °C i 60 min og
25 derpå blev reaktionen standset ved at opvarme ved 70 °C i 10 min. Der blev tilsat 10 enheder T4 DNA-polymerase for at fjerne små 3'-fremspring fra den første cDNA- streng (Gubler & Hoffmann, 1983). Reaktionen blev standset ved at tilsætte en tiendedel volumen 20mM EDTA og 1% (vægt/volume) SDS. Dobbeltstrengt (ds) cDNA blev oprenset ved phenol/chloroform-
30 ekstrahering fulgt af præcipitation med ethanol.

For at konstruere et lambda-gt 11-cDNA-ekspressionsbibliotek blev 500 ng dobbeltstrengt cDNA inkuberet med 20 enheder EcoR1-methylase ved 37 °C i 60 min.

1 µg phosphoryleret EcoR1 linkere (5'd[pGGAATTCC]) blev ligeret til det dobbeltstrengede cDNA i en ligationspuffer med 5 enheder T4 DNA-ligase ved 15 °C natten over. Det med EcoR1-linker forsynede cDNA blev fordøjet med 100 enheder EcoR1 linkere gennem en Sephacrylsøjle.

50 ng linkerforsynet cDNA blev ligeret til 1 µg dephosphoryleret EcoR1-skåret lambda-gt 11-DNA(Promega) med 2,5 enheder T4 DNA-ligase i 20 timer ved 15 °C i et samlet volumen på 10 µl. Det ligerede lambda-gt 11-DNA blev præcipiteret med 30 mM Na-acetat og 2,7 volumen ethanol ved 70 °C i 2 timer. Lambda-gt 11-DNA ligeret til cDNA blev indpakket *in vitro* ved 20 °C i 2 timer under anvendelse af 25 µl lambda-indpakningsblanding (Promega). cDNA-biblioteket blev titreret på E. coli-stamme Y1090r på plader indeholdende 1 mg/ml X-gal, og 0,4 mg/ml IPTG. cDNA blev forstærket som pladelysate på E. coli-stamme Y1090r- ved en tæthed på 15.000 plaques pr. 150 mm plade.

EKSEMPEL 3

20 Screening af lambda-gt 11 cDNA-bibliotek under anvendelse af specifikke monoklonale antistofprober.

Rajgræspollenallergenspecifikke monoklonale antistoffer blev udviklet og karakteriseret af Smart et al. (1983). Sera fra patienter, der er allergiske overfor rajgræspollen, blev venligst tilvejebragt fra Dr. David Hill fra Royal Children's Hospital, Melbourne.

Nedenstående procedure til screening af lambda-gt 11-ekspressionsbiblioteket er en modification af en tidligere beskrevet metode (Huynh, Young & Davis, 1985). En enkelt koloni af E. coli Y1090r- blev dyrket ved 37 °C med god gennemluftning to OD600 på 0,7-0,9 i LB-medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin og 0,4% (vægt/volumen) maltose. Cellerne blev pelleteret og genopslæmmet i 10 mM MgSO₄ i 40% af kulturvolumenet. E. coli Y1090r- cellerne (0,3 ml) blev derpå inficeret med

- ca. 18.000-20.000 rekombinante fager ved 37 °C i 15 min, blev udpladet på 150mB BL-plader i 0,7% (volume/vægt) agarose og inkuberet ved 42 °C i 3 timer. Pladerne blev tildækket med tørre 132 mm nitrocellulosefiltre der forudgående var gennemvædet i 10mIPTG, blev derpå inkuberet i 6 timer
- 5 ved 37 °C og filtrene blev fjernet. Et andet IPTG-behandlet filter blev anbragt på bakterieplænen og pladerne blev inkuberet natten over ved 37 °C. Filterplaqueløft blev tørret ved stuetemperatur og vasket med TBS i 10 min. TBS blev fjernet og der blev tilsat 10 ml TBS indeholdende 10% (vægt/volume) ikke-fedt mælkepulver, og filtrene blev rystet blidt i en time,
- 10 blev drænet, skyllet i 30 sekunder med TBS og derpå vasket i 10 min med TBS samt 0,1% (volumen/volumen) Tween-20 fulgt af yderligere 2 vask med TBS i hver 10 min. Filtrene blev inkuberet i 3 timer i TBS indeholdende 2% (vægt/volumen) BSA og monoklonale antistoffer (ascites) mod rajgræspollenallergener ved fortynding på 1:500 under blid rystning. Efter
- 15 vask i TBS/0,1% (volumen/volumen) Tween-20, blev filtrene inkuberet i 1,5 time i TBS indeholdende 2% (vægt/volumen) BSA og peroxidasekonjugeret affinitetsoprenset anti-mus-IgG ved fortynding på 1:500. Filtrene blev vasket og udviklet under anvendelse af frisk chromogent peroxidasesubstrat 4-chlor-I-naphtol, 60 mg opløst i 20 ml iskold methanol, og 80 ml TBS indeholdende
- 20 0,03% (volumen/volumen) H₂O₂. Til hvert filter blev der anvendt 10 ml udviklingsopløsning. Efter at purpurrøde pletter var fremkommet på filtrene blev udviklingsopløsningen fjernet og filtrene blev vasket med destilleret vand for at standse reaktionen.
- 25 Det udviklede filter blev anvendt til at lokalisere specifikke plaqueområder på pladen, svarende til et positivt signal. Positive fag-plaque blev løftet fra pladen som agarosepropper og den eluerede fag blev oprenset til individuelle antigenpositive lambda-gt 11-kloner ved at genscreene ved lav tæthed på 85 mm petriskåle med 82 mm nitrocellulosecirkler. Efter opnåelse af
- 30 plaqueoprensning blev hver af lambda-gt 11-klonerne, som bærer allergen cDNA, udpladet ved lav tæthed og der blev fremstillet filterløft in dublo. Det rekombinante allergens evne til at binde med antisera fra allergiske patienter blev bestemt under anvendelse af samme procedure som beskrevet ovenfor, med undtagelse af, at filterløft natten over blev inkuberet i den allergiske

antisera ved en fortynding på 1:10, hvorimod det første løft blev behandlet med monoklonale antistoffer.

EKSEMPEL 4

5

Fremstilling af rekombinante allergenproteiner ud fra lambda-gt 11-rekombinante lysogener og Western-blot-analyse.

- 10 Bakterier (E. coli stamme Y1089), som skal lysogeniseres med den rekombinante fag, blev dyrket til mættethed i LB-medium (pH 7,5) indeholdende 0,2% (vægt/volumen) maltose ved 37 °C. En ml celler blev indvundet ved centrifugering og genopslæmmet i 300 µl LB-medium, indeholdende 10mM MgCl₂. Cellerne (ca. 1×10^8 celler) blev inficeret med
- 15 ca. 1×10^9 pfu lambda-gt 11-rekombinant fag indeholdende cDNA-indføjelser, der koder for de allergene proteiner, (f.eks. klon 12R og klon 6R), ved 32 °C i 20 min. De inficerede celler blev serievis fortyndet og udpladet ved en tæthed på 100-200 kolonier pr. plade, og inkuberet natten over ved 32 °C. Individuelle kolonier blev afsat som pletter på LB-kopiplader, hvoraf en blev inkuberet ved 42 °C og den anden ved 32 °C natten over.
- 20 Rekombinante lysogenkloner blev indikeret ved vækst ved 32 °C, men ikke ved 42 °C, og forekom med en hyppighed på 20% for klon 12R og 3-4% for klon 6R.

- 25 For at opnå en præparativ mængde af de rekombinante allergene proteiner, blev en enkelt lysogen koloni af Y1089 inokuleret i 10 ml LB-medium og inkuberet ved 32 °C under god gennemluftning, indtil OD600 havde nået 0,5. Kulturen blev hurtigt overført til et 42 °C varmt vandbad, og inkuberet i 20 min under rystning.

- 30 lac-operonrepressoren blev inaktiveret ved tilsætning af 100 µl 1M IPTG. Kulturen blev derpå inkuberet ved 37 °C i 1 time, hvilket muliggør, at lac Z-genet udtrykkes, og de allergene proteiner syntetiseres som et fusionsprotein med beta-galactosidase. Celler blev høstet ved rotation ved 3000 omdrejninger pr. min i 10 min ved stuetemperatur, blev genopslæmmet i 150

ml prøvepuffer, og umiddelbart frosset i flydende nitrogen. Cellerne blev lyseret ved optøning ved stuetemperatur. Til elektroforetisk analyse af proteiner blev 150 µl SDS-prøvepuffer indeholdende bromphenolblåt-sporfarvestof sat til frysning-optøningslysatsat. Prøver blev kogt i 3 min, og uopløseligt materiale blev fjernet ved mikrocentrifugering i 3 min.

Proteinerne blev genopløst ved 7-10% (vægt/volumen) SDS-polyacrylamid-gelelektroforese, og visualiseret ved farvning med Coomassieblåt med dobbelte prøver elektroblottet til nitrocellulosefilter under anvendelse af Bio-Rad Trans Blot- apparatet (0,15 amp natten over). Fusionsproteiner blev påvist med monoklonale antistoffer, og visualiseret under anvendelse af den tidligere beskrevne screeningsprocedure.

EKSEMPEL 5

15

Northern analyse.

Totalt RNA blev ekstraheret fra pollen, blade, hydratiserede frø og rodprøver som tidligere beskrevet for pollen, og 20 µg RNA/prøve blev elektroforetiseret i formaldehyd/1,2% (vægt/volumen) agarosegeler (Maniatis et al., 1982), gennemløbet ved 70V i 4 timer i gennemløbspuffer indeholdende 20 mM morpholinopropansulfonsyre, 5 mM natriumacetat og 0,1 mM EDTA, til pH 7,0. RNA'erne blev overført til nitrocellulose (Hybond C)-filtre, og præekvilibreret i 2 timer ved 50 °C i hybridiseringspuffer indeholdende 50% (volumen/volumen) deioniseret formamide, 2 x SSPE, 7% (vægt/volumen) SDS, 0,5% (vægt/volumen) ikke-fedt mælkepulver, 1% PEG 20.000, og 0,5 mg/ml ikke-homologt laksespermbærer-DNA. Frisk hybridiseringspuffer indeholdende den tilfældigt primede Lol pI-DNA-probe blev tilsat og inkuberet ved 50 °C natten over for at opnå hybridisering. Filtre blev vasket omhyggeligt i 2 x SSC, 0,1% (vægt/volumen) SDS i 15 min ved RT, derpå 0,5 x SSC, 1% (vægt/volumen) SDS ved 50 °C i 15 min, fulgt af kort skylning i 0,5 x SSC, 0,1% (vægt/volumen) SDS, blottet let og indhyllet i Glad-indpakning. Kodakfilm blev eksponeret i 18 timer ved -70 °C.

EKSEMPEL 6

Ekspression af Lol pl-cDNA-produkter reageret med IgE fra allergisera.

- 5 cDNA-indføjesen fra lambda-gt 11-12R, som koder for Lol pl, blev klonet til EcoR1-stedet på plasmidekspressionsvektoren pGEX, hvor det kan udtrykkes som et fusionsprotein med glutathiontransferase. E. coli inficeret med dette plasmid pGEX-12R eller med den ikke-rekombinante vektor alene, blev dyrket i en kultur med logaritmisk fase, og bakterierne blev pelletteret ved
- 10 centrifugering. Disse bakterier blev lyseret, og de totale proteiner blev adskilt på SDS-PAGE gel. Et western-blot viste, at kun de bakterier, som indeholdt rekombinante plasmider, besad en proteinkomponent, der var reaktivt med specifikt IgE i sera fra donorer, der var allergiske overfor røjgræspollen. Resultaterne er vist i fig. 6.

15

EKSEMPEL 7

Krydsreaktivitet af Lol pl med homologe allergener fra andre græspollen.

- 20 Lol pl er et protein med molekylvægt på 34 kD, og SDS-PAGE viser, at andre almindelige græsser har et homologt protein med tilsvarende molekylvægt. Resultaterne ifølge den foreliggende opfindelse viser, at disse proteiner deler en fælles antigen epitop (påvist med monoklonale antistoffer), og er allergener med hensyn til specifik IgE-binding. Resultaterne er vist i fig.
- 25 7. På grund af denne allergene lighed er Lol pl det immunodominerende allergen i græspollen. En konsekvens heraf er, at cDNA-klonen 12R kan anvendes som en heterolog probe til isolering af de homologe cDNA-kloner for allergener for andre græspollen.

LITTERATURLISTE

- Baldo, B.A., Sutton, R., og Wrigley, C.W. (1982). Grass allergens with particular reference to cereals. *Prog. Allergy* 30, 1-66. (Karger, Basel).
- 5 Berger, S.L., og Birkenmeier (1979). Inhibition of tractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. *Biochemistry* 18; 5143-5149.
- 10 Bousquet, J. & Michel, F.B. (1989). Specific Immunotherapy: A treatment of the Past? *Allergy and Clinical Immunology News* 1: 7-10.
- Buell et al. (1985). *Nucleic Acids Research* 13 1923-1958.
- 15 Douillard, J.Y. og Hoffman (1981). Basic facts about hybridomas in *Compendium of Immunology*, Vol II, red. af Schwartz.
- Ford & Baldo B.A. (1986). A re-examination of Ryegrass (*Lolium perenne*) pollen Allergens. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*
- 20 81; 193-203.
- Friedhoff, L.R., Ehrlich-Kantzky, E., Grant, J.H., Meyers, D.A., Marsh, D.G. (1986). A study of the human immune response to *Lolium perenne* (Rye) pollen and its components, Lol pI and Lol pII (Rye I and Rye II). *Journal of*
- 25 *Allergy and clinical immunology*.
- Goff og Goldberg (1985). *Cell* 41: 587.595.
- Grammer et al., 1984. Persistence of efficacy after a brief course of
- 30 polymerized ragweed allergens: A controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73:484-489.
- Gubler, V. og Hoffman, B.J. (1983). *Gene* 25, 263.

- Hill, D.J., Smart, I.J. og Knox, R.V. (1979). Childhood asthma and grass pollen aerobiology in Melbourne. *Medical Journal of Australia* 1, 426-429.
- Howlett, B.J. og Clarke, A.E. (1981). Isolation and partial Characterization of two antigenic glycoproteins from ryegrass (Lolium perenne) pollen. *Biochemical Journal*, 197, 695-706.
- Howlett, B.J., & Knox, R.B. (1984). Allergic interactions; in Heslop-Harrison J, Linskens, H.F. (red.) *Encyclopaedia of Plant Physiology* 17, 655-674.
- 10 Springer, heidelberg.
- Huynh, T.V., Young, R.A. og davis, R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in Lambda-gt 10 and lambda-gt 11. In Glover, D.M. (red.); *DNA cloning; A practical approach Vol. 1.* side 49-78. IRL Press, Oxford.
- 15 Johnson, P. & Marsh, D.G. (1965). "Isoallergens" from ryegrass pollen. *Nature*, 206, 935-.
- Johnson, P. & Marsh, D.G. (1966). Allergens from common ryegrass pollen (Lolium perenne). I. Chemical composition and structure. *Immunochemistry* 3, 91-100.
- 20 Kohler, G. og Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-49.
- Kohler, G. og Milstein, C. (1976). *European Journal of Immunology* 6: 511-519.
- Lichtenstein, L.M. et al. (1983). *Int. Cong. of Allergology and Clin. Immunol.* J.W. Kerr ond A. Ganderson (red.).
- 30 Lowenstein, H. (1978). Quantitive immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis ad isolation of allergens. *Prog. allergy*, 25, 1-62. (Karger, Basel).

Maniatis, T., Fritsch, E.G. og Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

5 Marsh, D.G., Haddad, Z.H. og Campbell, D.H. (1970). A new method for determining the distribution of allergenic fractions in biological materials: Its application to grass pollen extracts. *J. Allergy*, 46, 107-121.

10 Marsh, D.G. (1975). Allergens and the genetics of allergy; in M. Sela (red.), *The Antigens*, Vol. 3, side 271-359. (Academic Press Inc., London, New York).

15 Marsh, D.G., Milner, F.M. og Johnson, P. (1966). The allergenic activity and stability of purified allergens from the pollen of common ryegrass. *International Archives of Allergy* 29, 52-.

Messing, J. (1983). New M13 Vectors for cloning. *Methods in Enzymology - Recombinant DNA techniques* 101, Part C. side 20-78.

20 Messing, J. & Vieira, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*; 19, 269-276.

Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

25 Reading, J. (1982). *Journal of Immunological Methods* 53: 261-291.

30 Singh, M.B. & Knox, R.B. (1985). Grass pollen allergens: Antigenic relationships detected using monoclonal antibodies and dot blotting immunoassay. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 78, 300-304.

Smart, I.J., Heddle, R.J., Zola, M., Bradley, J. (1983). Development of monoclonal antibodies specific for allergenic components in ryegrass (*Lolium*

perenne) pollen. International Archives of Allergy and Applied Immunology 72
243-248.

5 Smart, I.J. & Knox, R.B. (1979). Rapid batch fractionation of ryegrass pollen
allergens. International Archives of Allergy and Applied Immunology 62, 173-
187.

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

Patentkrav

1. DNA-sekvens, k e n d e t e g n e t ved, at den udviser mindst 60 %
homologi med den i Fig. 5 afbildede sekvens og, at den koder for et allergent
5 protein fra pollen fra familien Poaceae.
2. DNA-sekvens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pollenet er pollen
fra Lolium perenne.
- 10 3. DNA-sekvens, k e n d e t e g n e t ved, at den udviser mindst 60 %
homologi med den i Fig. 5 afbildede sekvens og, at den koder for et allergent
protein fra et pollen fra græs, som er allergent krydsreaktivt med et allergent
pollenprotein fra Lolium perenne, som påvist ved IgE-bindingsstudier.
- 15 4. Ekspressionsvektor, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter en DNA-
sekvens som defineret i ethvert af kravene 1-3.
5. Værtscelle, k e n d e t e g n e t ved, at den er transformeret til at
udtrykke et protein eller et polypeptid, der kodes af en DNA-sekvens som
20 defineret i ethvert af kravene 1-3.
6. Værtscelle ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at den er E coli.
7. cDNA, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter en DNA-sekvens som
25 defineret i ethvert af kravene 1-3 og kan opnås ved, at man:

ekstraherer RNA fra rajgræspollen og med affinitetschromatografi
udvælger Poly(A+) mRNA, som skal anvendes som template ved
syntese af enkeltstrengt cDNA;
30 syntetiserer og isolerer dobbeltstrengt cDNA;

opretter et lambda-gt 11 cDNA-ekspressionsbibliotek;

5 screener lambda-gt 11 cDNA-ekspressionsbiblioteket efter induktion med IPTG under anvendelse af monoklone antistoffer karakteriseret ved Smart et al., *Int Archives of Allergy and Appl Immunol.*, 72, 243-248 til at afsøge filterløft in duplo og identificere og isolere positive phag-plaques;

udplader plaquene ved lav tæthed og udfører filterløft in duplo af plaquene;

10 screener phag-plaquene indeholdende kloner, som producerer protein allergen ved at inkubere filterløftene med allergiske antisera eller med de Smart et al monoklone antistoffer og identificere de kloner, der er positive, når de screenes med monoklone antistoffer og positive, når de screenes med allergiske antisera;

15 genindvinder cDNA-indføjjelsen fra de allergiske antisera og den antistof-positive phag og ved størrelsesanalyse identificerer indføjjelser på ca. 1200 basepar;

20 indsætter indføjjelserne i en plasmidvektor til sekventering og ekspresion;

sekventerer cDNA'et; og

25 sammenligner det sekventerede DNA's restriktionskort med det i Fig. 9 viste cDNA-restriktionskort og identificerer de kloner, der i det væsentlige har samme restriktionskort som det i Fig. 9 viste.

8. Fremgangsmåde til isolering og identificering af DNA, der koder for et
30 allergent protein fra pollen fra græs, kendetegnet ved, at den indbefatter anvendelse af et cDNA ifølge krav 7 som en heterolog probe til isolering af de homologe cDNA-kloner af protein allergener fra pollen fra græs.

9. Anvendelse af en DNA-sekvens ifølge ethvert af kravene 1-3 ved fremstilling af et protein eller et polypeptid, der kodes af DNA-sekvensen.
10. Anvendelse af en DNA-sekvens ifølge ethvert af kravene 1-3 eller et cDNA ifølge krav 7 som en probe til isolering og identificering af nukleinsyre, der koder for det allergene protein eller polypeptid.
- 5

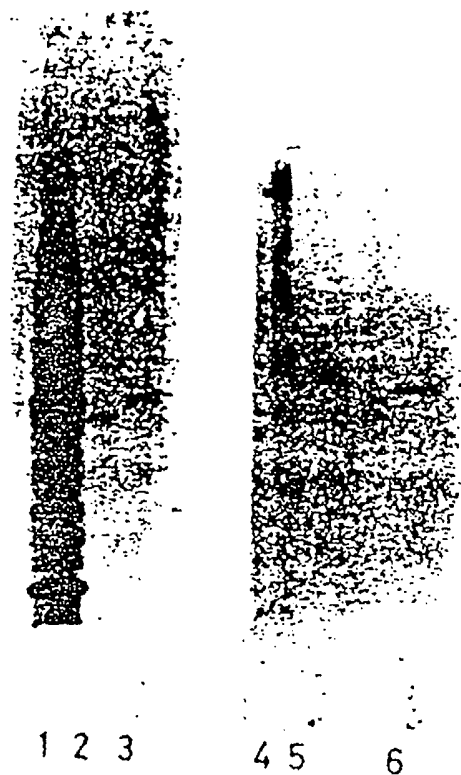


Fig. 1.

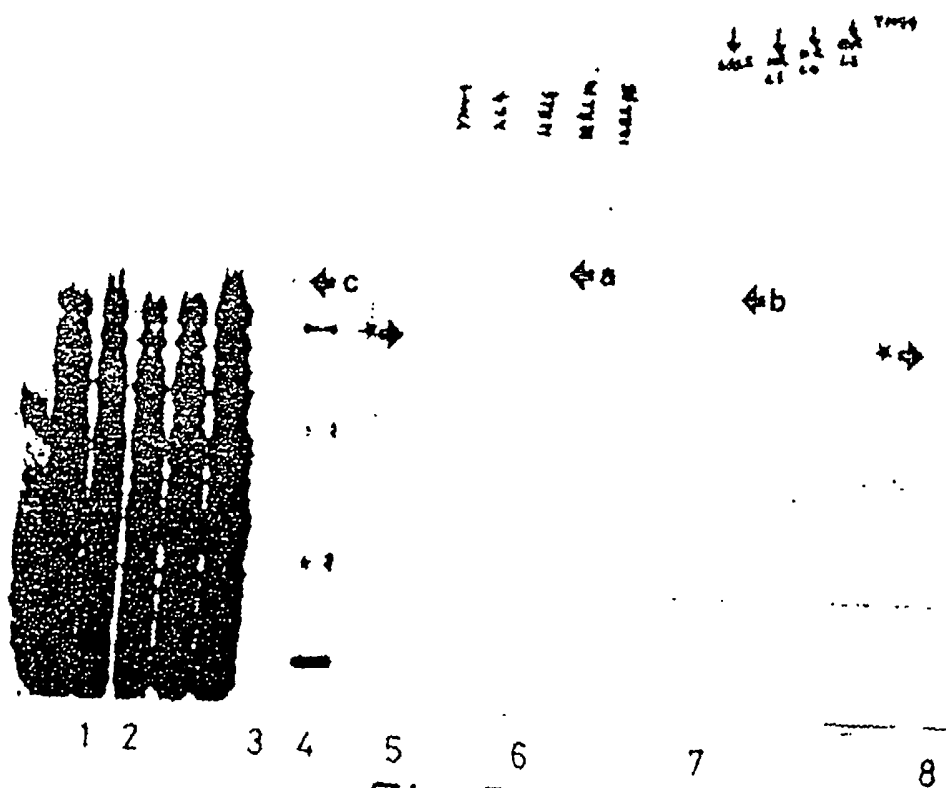


Fig. 3.



Fig. 2a.

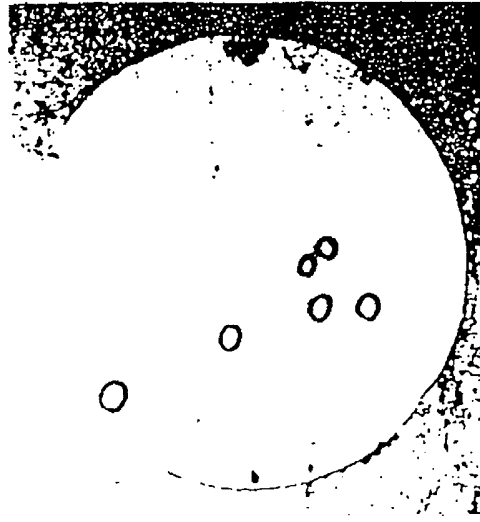


Fig. 2c.

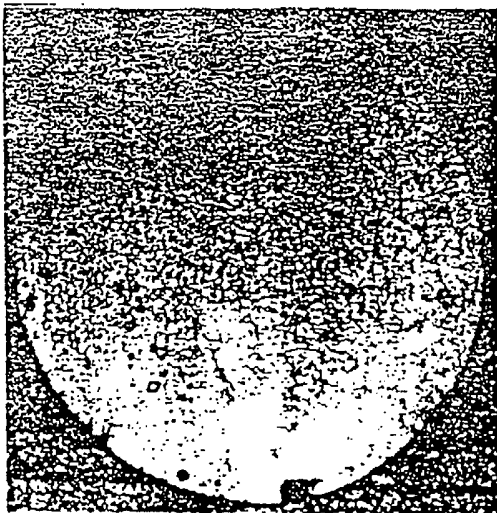


Fig. 2b.



Fig. 2d

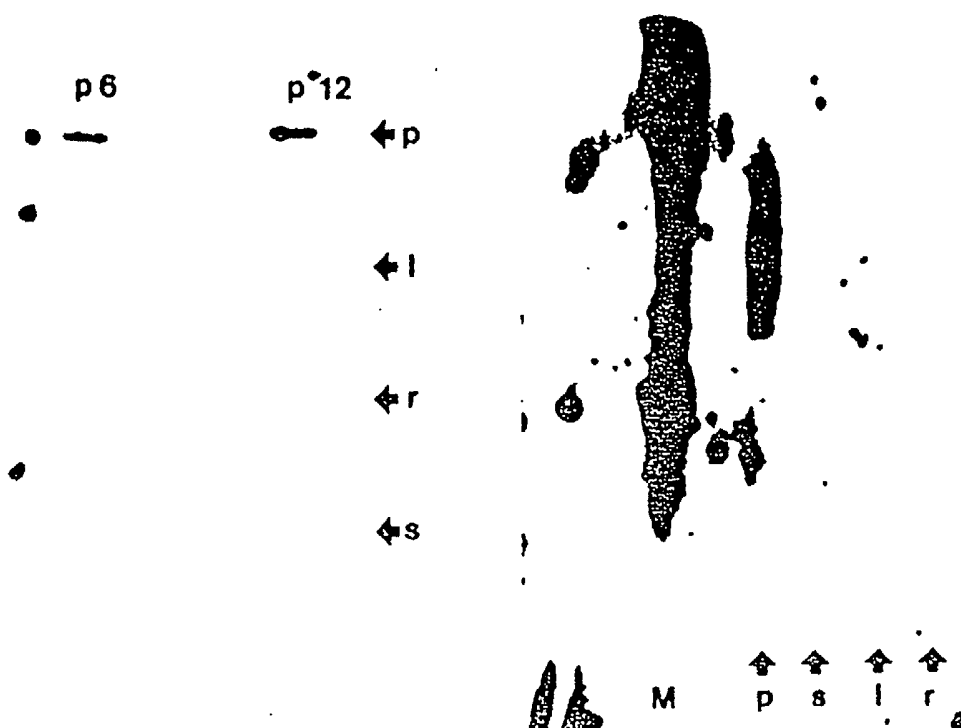


Fig.4a.

Fig.4b.



Fig.6.

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

Fig.5(1).

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

Fig.5(2).

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

Fig.5(3).

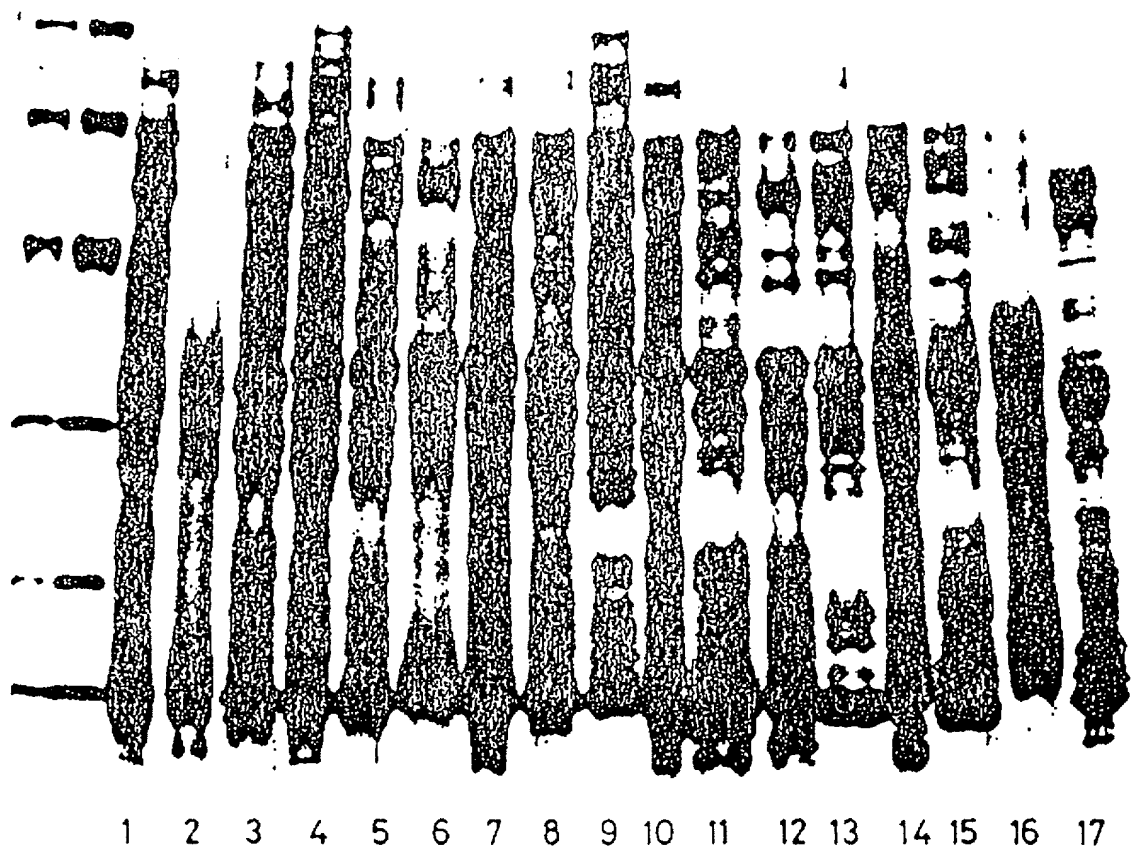


Fig. 7a.

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



Fig. 7b.

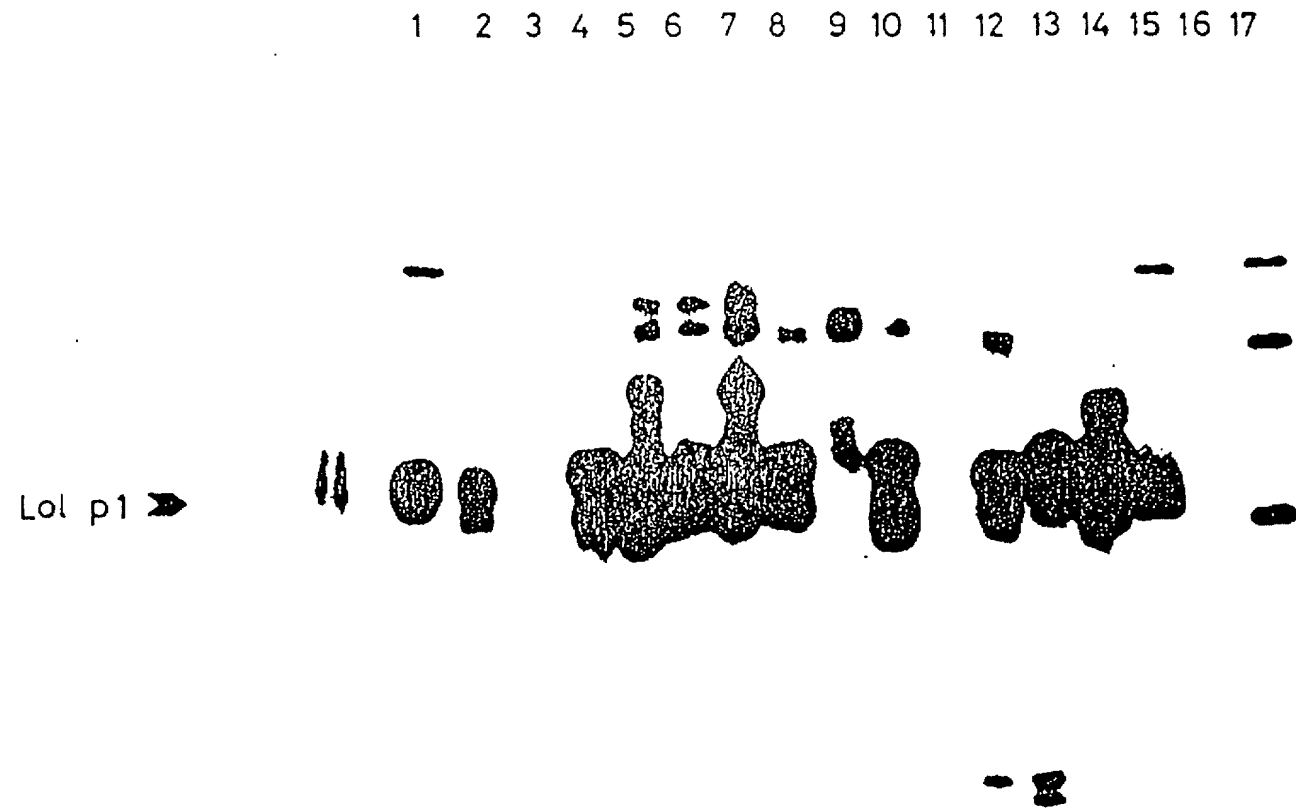


Fig. 7c.

Lol p I

NATURLIG ALLERGENICITET/REKOMBINANT PROTEIN

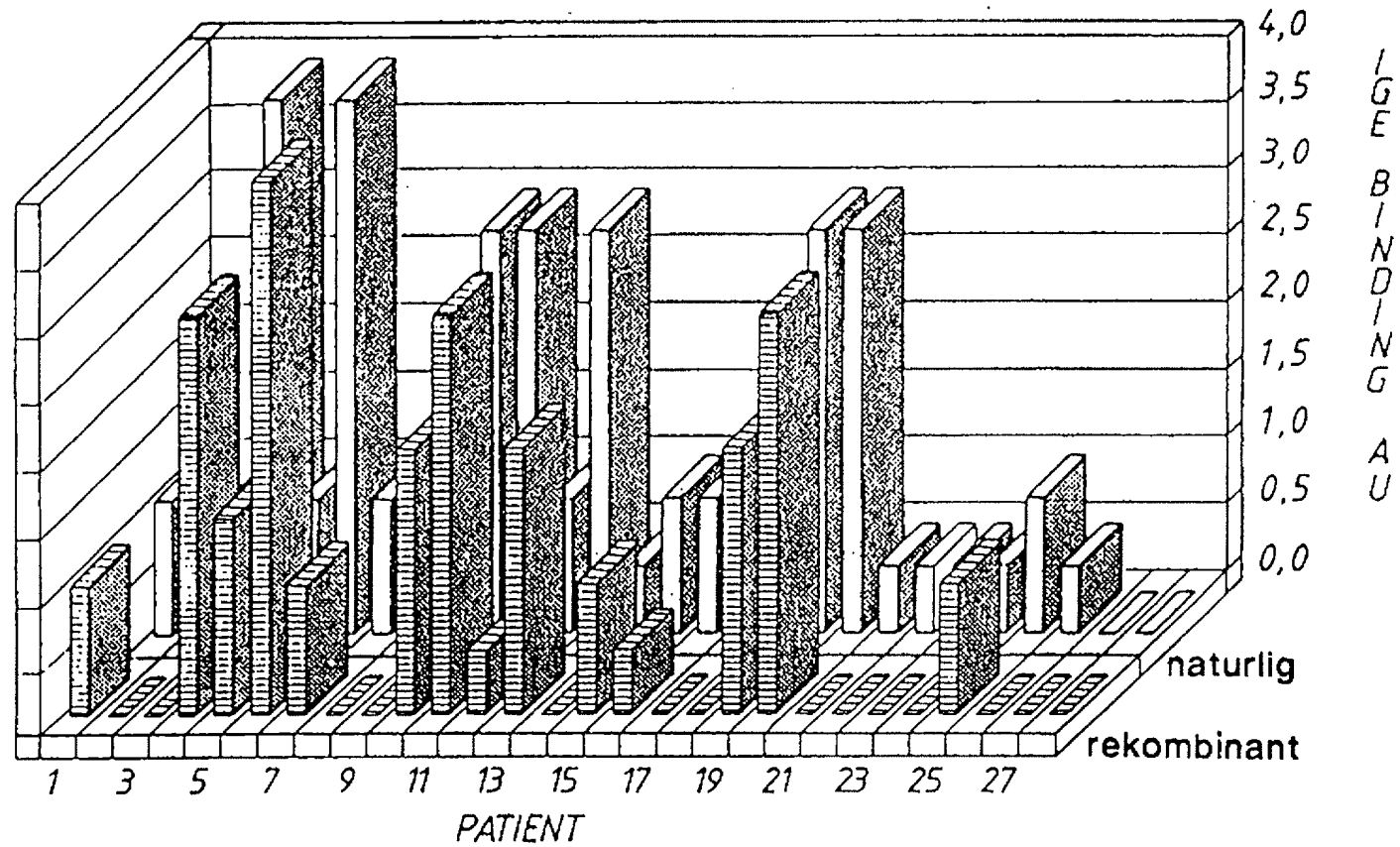
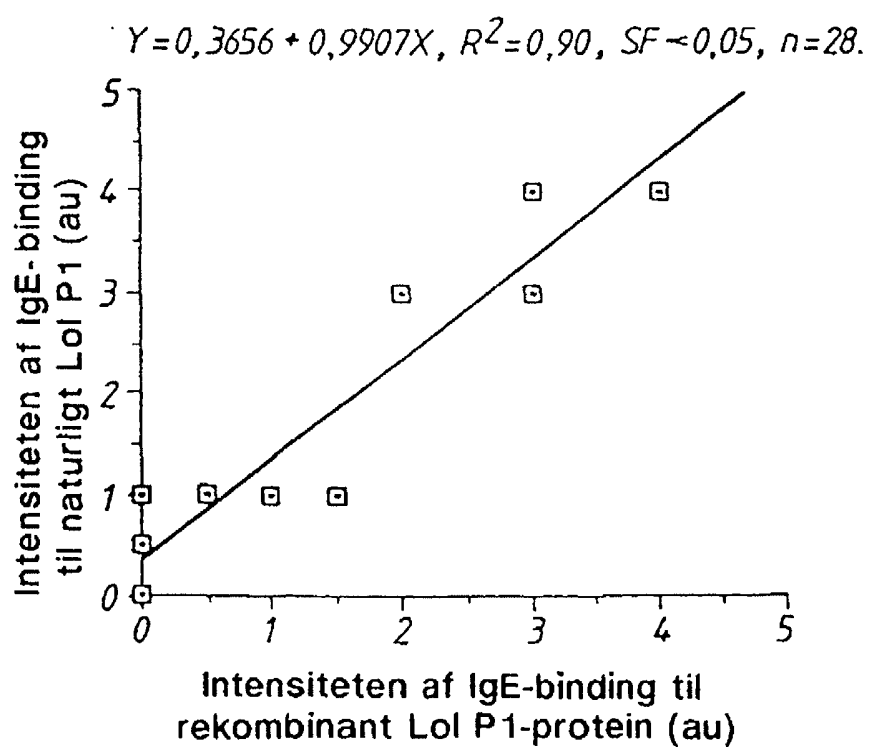
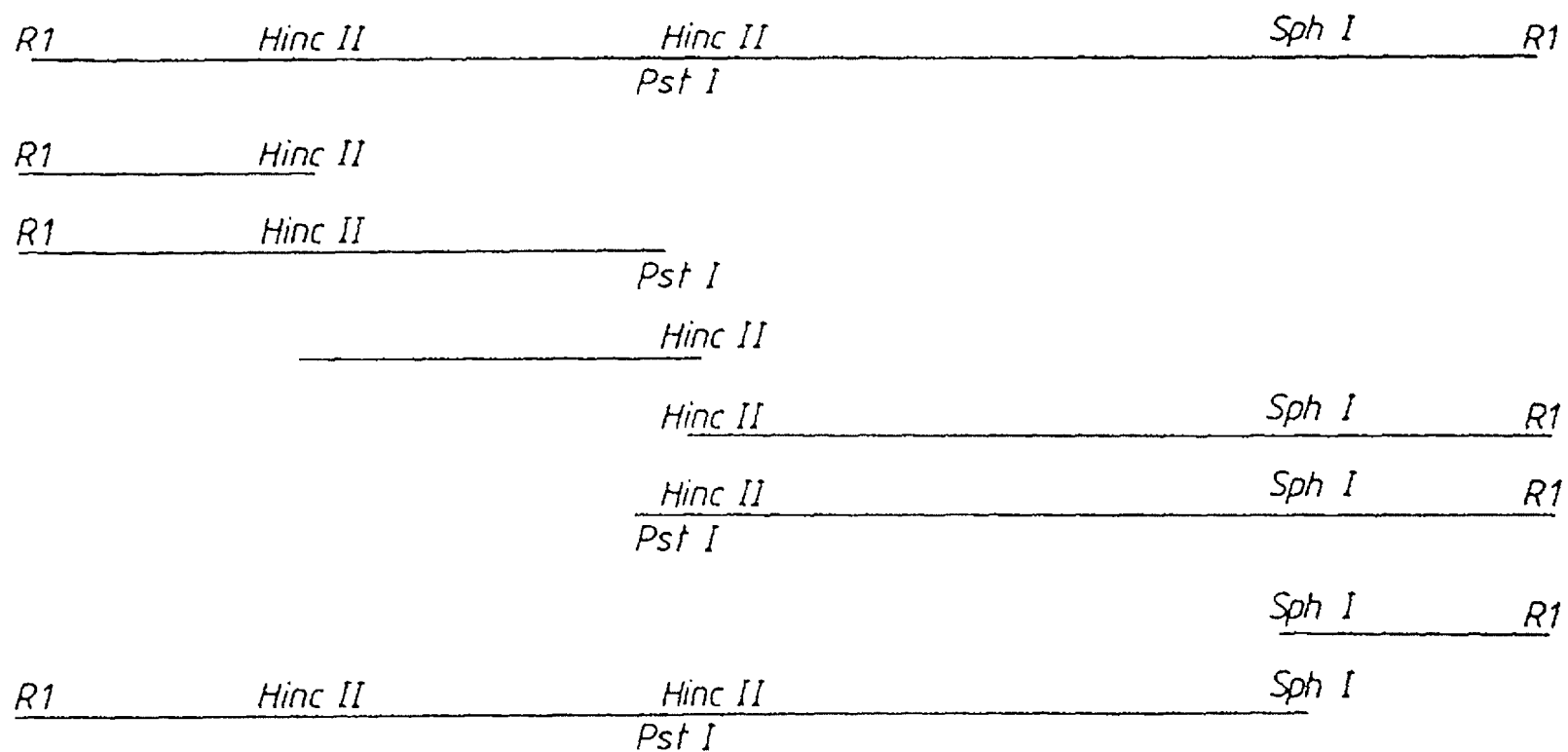


Fig. 8a.

*Fig.8b.*



100bp

Fig.9.