

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1668/90

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

(22) Anmeldetag: 8. 8.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1995

(45) Ausgabetag: 25. 7.1996

(56) Entgegenhaltungen:

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

(73) Patentinhaber:

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

(54) REKOMBINANTES DNA-MOLEKÜL FÜR ALLERGENE DES ERLENPOLLENS, DAMIT HERGESTELLTE PROTEINE BZW. POLYPEPTIDE, SOWIE DEREN ANWENDUNG

(57) Gezeigt wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Hauptallergens *Ain g I* aus Erlenpollen besitzt, oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop davon umfaßt, oder eine Nukleotidsequenz, die mit dieser Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder die aus dieser Sequenz durch Degeneration ableitbar ist. Weiters wird ein durch dieses DNA-Molekül kodiertes Protein bzw. Polypeptid und dessen Verwendung beschrieben.

AT 401 179 B

Die Erfindung bezieht sich auf das Klonieren von Pollenallergenen, im besonderen auf die Klonierung und Expression von DNA, die für das Hauptallergen von Erlenpollen, *Aln g I*, kodiert.

Es ist seit langem bekannt, daß eine Typ I-Allergie gegen Pollenproteine mit Beschwerden wie juckende und gerötete Augen, Schnupfen, Lidödeme, Husten und Asthmabeschwerden in Zusammenhang steht. In dieser Hinsicht nehmen die Pollen frühblühender Bäume (Birke, Hasel, Erle, Hainbuche) eine wichtige Stellung ein. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, die Allergene dieser Pollen genau zu identifizieren und zu charakterisieren (1-4). Fortschritte hinsichtlich der exakten Charakterisierung der Pollenallergene wurden durch die Heterogenität der in Verwendung befindlichen Pollenextrakte behindert. Ungefähr 8 Allergene des Erlenpollen rufen beim Atopiker eine IgE-Antwort hervor und eines davon, *Aln g I*, ein 17 kD Protein, reagiert mit einem Großteil der Allergikerseren als das Hauptallergen (5,6).

Mindestens 10% der Bevölkerung leiden zu verschiedenen Zeiten und in verschiedenem Ausmaß an Pollenallergien. Diese Allergien werden durch IgE-Antikörper vermittelt, die mit Pollenproteinen reagieren. Es besteht die Möglichkeit einer Therapie der Pollenallergien durch Hyposensibilisierung, d.h. durch die regelmäßige und langsam ansteigende Gabe der die Allergie auslösenden Proteine.

Es ist daher eines der Ziele der vorliegenden Erfindung, eine Methode für die Herstellung von Pollenallergenen, insbesondere für *Aln g I*, bereitzustellen, um dieses Allergen für diagnostische Tests, für den Nachweis der entsprechenden Allergie und auch für eine Therapie (Hyposensibilisierung) zur Verfügung zu haben.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein rekombinantes DNA-Molekül bereitgestellt, dessen Nukleotidsequenz als Polypeptid exprimiert werden kann, das die antigenen Eigenschaften des Hauptallergens der Erle, *Alnus sp.*, besitzt, oder als Peptid, das mindestens ein Epitop davon umfaßt, oder eine Nukleotidsequenz, die mit solch einer Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder durch Degeneration aus dieser abgeleitet werden kann. In einer bestimmten Konstruktion kann diese Nukleotidsequenz als das Hauptallergen *Aln g I* der Erle exprimiert werden, oder als ein Peptid, das mindestens ein Epitop davon umfaßt. Diese Nukleotidsequenz kann dadurch gekennzeichnet werden, daß sie die gesamte Sequenz oder Teile dieser Sequenz, wie in Figur 1 gezeigt, beinhaltet.

Pollen von Birke, Erle, Hasel und Hainbuche besitzen in bezug auf ihre IgE-Bindung ähnliche Hauptallergene, die - soweit bekannt - auf Aminosäureebene ein hohes Ausmaß an Homologie aufweisen. Daher bezieht sich die gegenwärtige Erfindung nicht nur auf das Hauptallergen der Erle, sondern auch auf andere Pollenallergene, die durch DNA-Sequenzen kodiert werden, die mit der Nukleotidsequenz von *Aln g I* unter stringenten Bedingungen hybridisieren oder aus dieser durch Degeneration abgeleitet werden können.

Weiters stellt diese Erfindung ein Expressionsplasmid bereit, das eine wie oben beschriebene Nucleotidsequenz beinhaltet und eine Wirtszelle, die dieses Expressionsplasmid beherbergt.

Weiters stellt diese Erfindung synthetische Proteine oder Polypeptide bereit, die die Antigenität von Teilen oder der Gesamtheit von *Aln g I* besitzen oder von Allergenen anderer pflanzlicher Gewebe, die aufgrund eines hohen Ausmaßes an Aminosäurehomologie (7) von wenigstens 50% zu Teilen oder der Gesamtheit von *Aln g I* antigene Kreuzreaktivität zeigen, d. h. daß Antikörper oder zelluläre Antigenbindungsstellen, die eigentlich gegen *Aln g I* gerichtet sind, an diese Moleküle ebenfalls binden können.

Dieses synthetische Produkt kann Fusions- und Nichtfusionsproteine umfassen, die einen Polypeptidanteil enthalten, der die Antigenität eines Teiles oder der Gesamtheit von *Aln g I* besitzt.

Die Methode zur Herstellung eines synthetischen Proteins oder Polypeptides umfaßt die Schritte der Kultur von prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen, die das beschriebene Expressionsplasmid beinhalten und die Reinigung des synthetischen Proteins oder der Polypeptide aus der Kultur.

Der Begriff "synthetisch" bezieht sich hier aber auch auf Proteine oder Polypeptide, die durch Klonierung und Expression der hier beschriebenen Nukleotidsequenz oder durch chemische Synthese nach dieser Nukleotidsequenz hergestellt werden.

Die synthetischen Proteine oder Polypeptide oder synthetischen Allergene, die gemäß dieser Erfindung erzeugt werden, besitzen die Antigenität des nativen Allergens. Wie gezeigt werden konnte, produziert ein cDNA-Klon, der für *Aln g I* kodiert, ein Nichtfusionsprotein, das mit IgE aus Allergikerseren reagiert. Daher wäre es möglich, dieses Protein als Antigen bei diagnostischen Tests und als Bestandteil von Therapeutika bei der Hyposensibilisierung zu verwenden.

Im besonderen können die synthetischen Allergene als diagnostische Reagentien *in vitro* und *in vivo* verwendet werden, da ihre Antigenität der des nativen Erlenpollenallergens entspricht, und sie daher IgE aus Seren von Erlenpollenallergikern binden können.

MATERIAL UND METHODEN

1. Poly A + RNA-Isolation aus Pollen und Synthese des 1. cDNA-Stranges

- 5 Polyadenylierte mRNA wurde aus reifem Erlenpollen (Allergon AB, Engelsholm, Schweden) isoliert (1).
 An dieser wurde wie folgt der
1. Strang der cDNA synthetisiert:
 - 2 µl 10x Puffer (480mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 60 mM MgCl₂, 400 mM KCl, pH 4,8)
 - 2 µl 10mM Dithiothreitol (DTT)
 - 10 1 µl Primer BP-A (100 ng/µl, Nukleotidsequenz siehe Figur 2)
 - 2 µl 25mM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), d.h. je 25mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
 - 11 µl H₂O
 - 1 µl poly A + RNA (3 µg)
 - 15 1 µl AMV Reverse Transkriptase (United States Biochemical Corporation (USB), Cleveland, Ohio, USA) 32 Units

Diese Reaktion mit einem Summenvolumen von 20 µl wurde für 2 Stunden bei 42° C inkubiert, dann mit 1x TE Puffer (10 mM Tris, 1mM Ethylendinitrietetraessigsäure (EDTA), pH 8,0) 1:1 verdünnt und bei 4° C aufbewahrt.

- 20 2. "Polymerase chain reaction" (PCR)

Die PCR wurde an den in Schritt 1 hergestellten RNA-DNA-Hybridmolekülen durchgeführt. Als Primer für das 5'-Ende der Moleküle wurde ein Gemisch folgender zwei Oligodesoxynukleotide verwendet:

- 25 Nr. 2482 5'- GTT TTC AAT TAC GAA GCG GAA AC -3'
 Nr. 2490 5'- GTT TTC AAT TAC GAA GCG GAG AC -3'

Die Nukleotidsequenz dieser Oligodesoxynukleotide wurde von der durch Edman-Abbau teilweise bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenz von *Aln g I* abgeleitet.

- 30 Als Primer für das 3'-Ende der Moleküle wurde der T 7 Primer (Pharmacia) verwendet, der auch Bestandteil des BP-A Primers ist.

- Folgender Ansatz wurde für die Reaktion verwendet:
- 2.5 µl des Reaktionsgemisches aus Punkt 1
 - 5.0 µl 10x PCR Puffer (400 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10% Gelatine, 100 mM Tris, pH 8,3)
 - 2.0 µl T7 Primer (Pharmacia) 20 pmol, Nukleotidsequenz siehe Figur 2
 - 35 4.0 µl Primermix zu gleichen Teilen Nr. 2482 und 2490 100 pmol
 - 2.5 µl 2mM dNTPs (Pharmacia)
 - 1.5 µl 100 mM MgCl₂
 - 32,5 µl H₂O (ad 50 µl)

- 40 Zugabe von 1 Unit Taq DNA Polymerase (USB). Das Reaktionsgemisch wurde 30 Sekunden bei 93° C, 30 Sekunden bei 55° C und 1 Minute bei 72° C inkubiert. Dieser Zyklus wurde insgesamt 30x durchlaufen.
 Zum Abschluß wurde das Reaktionsgemisch noch weitere 10 Minuten bei 72° C gehalten.

3. Klonierung des PCR-Fragmentes und Sequenzierung

- 45 Das in der Reaktion aus Punkt 2 synthetisierte DNA-Fragment wurde aus einem 1,5% Agarosegel mittels DEAE-Papier isoliert (8). Anschließend wurde dieses Fragment an den 5'-Enden kinasiert.

a) Kinasierung

- 50 10 µl DNA (500 ng *Aln g I* DNA)
 2,5 µl 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
 7,0 µl γ-³²P-ATP, 10 mCi/ml (Amersham, Little Chalfont, England)
 4,5 µl H₂O
 1,0 µl Polynukleotidkinase (Boehringer)

- 55 Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Minuten bei 37° C inkubiert.
 Danach erfolgte eine weitere Zugabe von 1 µl Polynukleotidkinase und eine Inkubation für 60 Minuten bei 37° C.

AT 401 179 B

b) Klenowauffüllungsreaktion

Zur obigen Reaktion erfolgte eine Zugabe von:

1 µl 2mM dNTPS (Pharmacia)

5 1 µl Klenowfragment (≈ 2 Units)

Die Reinigung des kinasierten und aufgefüllten DNA-Fragmentes erfolgte über eine "Nick™ Column" (Pharmacia) und wurde anschließend mit Äthanol und Natriumacetat gefällt (9).

c) BglII Verdau des Fragmentes

10

An die *Aln g I* Sequenz wurde durch die Verwendung des BP-A-oligodesoxinukleotides (Figur 2) in der PCR eine Polyklonierungssequenz am 3'-Ende angefügt. Aus dieser Sequenz wurde die BglII Schnittstelle zur Spaltung mit dem Restriktionsenzym BglII ausgewählt, um das Fragment in die entsprechende BglII Stelle des pBluescript^R Plasmides (Stratagene, La Jolla, California, USA) zu ligieren. Durch die Klenowreaktion wurden am 5'-Ende der Sequenz bereits glatte Enden erzeugt. Die gesamte gefällte DNA aus 2b) wurde in 2 µl 10x BglII Puffer (Boehringer) gelöst. Es erfolgte eine Zugabe von 17 µl H₂O und 1 µl BglII (11 Units). Das Reaktionsgemisch wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das so geschnittene Fragment wurde aus einem 1,5% Agarosegel mittels DEAE-Papier eluiert (8).

20 d) Ligation des DNA Fragmentes in das pBluescript^R KS+ Plasmid

Als Klonierungsvektor wurde das pBluescript^R KS+ Plasmid (Stratagene) ausgewählt und mit den Restriktionsenzymen EcoRV (liefert glatte Enden; an diese wird das 5'-Ende des *Aln g I*-Fragmentes ligiert) und BamHI (liefert mit BglII kompatible, überstehende Enden; an diese wird das 3'-Ende des *Aln g I* Fragmentes ligiert) geschnitten. Die Phosphatreste an den 5'-Enden des Plasmides wurden mit alkalischer Phosphatase entfernt (10), um unspezifische Religation des Vektors zu vermeiden.

Ligation des *Aln g I* Fragmentes in das pBluescript^R KS+ Plasmid:

20 ng DNA aus 2c) in 10 µl H₂O gelöst

30 2,0 µl 10x Ligationspuffer (200 mM Tris, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 500 µg/ml Rinderserumalbumin; pH 7,6)

1,0 µl 10 mM ATP

3,0 µl pBluescript^R KS+ geschnitten mit EcoRV und BamHI (≈ 50 ng)

4,0 µl H₂O

1,0 µl T4 DNA Ligase Boehringer (≈ 3 Units)

35 Die Inkubation dieser Reaktion erfolgte für 4 Stunden bei Raumtemperatur.

e) Transformation kompetenter *E.coli* Wirtszellen

40 Die Transformation wurde in *E.coli* XL1-Blue Zellen (Stratagene) durchgeführt (11). Die Selektion positiver Klone wurde auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) Kulturplatten mittels des Blau-Weiß-Indikationssystems durchgeführt (12).

f) Sequenzierung der *Aln g I* DNA

45 Die Sequenzierung der *Aln g I* DNA wurde mittels eines T7 Sequenzierungskits (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4) Expression der *Aln g I* DNA und Nachweis der IgE Bindung des daraus resultierenden Proteins

50 a) Das DNA-Insert aus dem pBluescript^R KS+ Vektor, das die für *Aln g I* kodierende Sequenz beinhaltet, wurde einer Mutagenese nach Kunkel (13) unterzogen. Um die *Aln g I* Sequenz am 5'-Ende zu vervollständigen und sie mit dem ATG Kodon und einer zusätzlichen EcoRI Schnittstelle zu versehen, wurde folgendes Oligodesoxinukleotid synthetisiert:

55 5'- CTT CGT AAT TGA AAA CAC CCA TGA ATT CCG ATA CCG TCG A - 3'

und für die Mutagenese verwendet. Dadurch konnte die *Aln g I* Sequenz in der richtigen Orientierung mittels der EcoRI Schnittstelle am 5'-Ende und mittels der HindIII Schnittstelle am 3'-Ende des Gens in das Expressionsplasmid pKK 223-3 (Pharmacia) ligiert werden. *E.coli* K12 JM105 Zellen (*thi*, *rpsL*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *delta(lacpro AB)/F'*, *thraD36*, *proAB*, *lacI^qZ delta M15*) wurden mit diesem Plasmid

transformiert. Nach erfolgter Proteinsynthese wurden die Bakterienzellen geerntet und mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Das Lysat wurde auf einem SDS-Polyacrylamid aufgetrennt. Der Nachweis von rekombinantem *Aln g I* Nichtfusionsprotein wurde mittels Immunoblot erbracht. IgE aus Allergikerseren konnte von dem rekombinanten *Aln g I* gebunden werden.

5 Der Nachweis des gebundenen IgE erfolgt mit ¹²⁵J-markiertem anti-Human IgE (Pharmacia).

b) Das DNA-Insert aus dem pBluescript^R KS+ Plasmid, das die für *Aln g I* kodierende Sequenz beinhaltet, wurde mittels EcoRI Linkern (Boehringer) in die Expressionsplasmide pEX A, pEX B und pEX C (14), die den Leserahmen des Insertes jeweils um ein Nukleotid verschieben, ligiert. Dadurch kommt in einem Fall der für *Aln g I* korrekte Leserahmen erreicht und die Produktion eines rekombinanten *Aln g I* - Fusionsproteins induziert werden. Die Fähigkeit dieses rekombinanten *Aln g I* - Fusionsproteins IgE aus Erlenpollen-Allergikerseren zu binden wurde mittels Immunoblot erbracht. Der Nachweis des gebundenen IgE erfolgte mit ¹²⁵I-markiertem anti-Human IgE (Pharmacia).

10 Fig. 1 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz von *Aln g I* mit einer Länge von 665 Nukleotiden. Die Sequenz besteht aus einer kodierenden Region von 483 Nukleotiden, einer nichtkodierenden Region von 162 Nukleotiden und einem poly-A-Schwanz von 20 Nukleotiden. Die von den Basentriplets abgeleitete Aminosäuresequenz von *Aln g I* ist unter dem jeweiligen Kodon angegeben. Daraus ergibt sich für das vollständige Protein eine Länge von 159 Aminosäuren.

15 Fig. 2 veranschaulicht die Nukleotidsequenz des BP-A-Primers, der für die Synthese des 1. cDNA Stranges eingesetzt wurde. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BgIII (Nukleotide 19-24) und HindIII (Nukleotide 31-36) sind unterstrichen. Die Sequenz des T7 Primers (Nukleotide 4-17), der als Primer für die PCR-Amplifikation von *Aln g I* verwendet wurde und der Bestandteil von BP-A ist, ist ebenfalls vermerkt.

Referenzen

- 25
1. Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen *Bet v I*, is highly homologous to a pea resistance response gene. EMBO J., 8, 1935-1938.
 2. Ipsen, H. and Hansen, O.C. (1990) Physicochemical and immunological characteristics of allergens. In: Epitopes of atopic allergens. Schon, A.H., Kraft, D., Kunkel, G. (eds) UCB, Brussels, Belgium, pp3-8.
 - 30 3. Rumpold, H., Rohac, M., Bohle, B., Braitenbach, M., Scheiner, O., Kraft, D. (1990) The relationship of *Bet v I* epitopes recognized by patients' IgE and monoclonal anti-*Bet v I* antibodies. In: Epitopes of atopic allergens. Schon, A.H., Kraft, D., Kunkel, G. (eds) UCB, Brussels, Belgium, pp26-28.
 4. Valenta, R., Breiteneder, H., Pettenburger, K., Breitenbach, M., Scheiner, O., Kraft, D. (1990) RNA- and DNA-sequence similarities of the major allergens of birch, alder, hazel and hornbeam pollens. In: Epitopes of atopic allergens. Schon, A.H., Kraft, D., Kunkel, G. (eds) UCB, Brussels, Belgium, pp73-76.
 - 35 5. Florvaag, E. and Elsayed, S. (1984) Comparative studies on tree pollen allergens. VIII. Immunological properties of the alder (*Alnus incana*) pollen extract. Int. Arch Allergy appl. Immunol. 75: 300-308.
 6. Florvaag, E., Elsayed, S., Apold, J. (1982) Comparative studies on tree pollen allergens. II. Isolation of alder (*Alnus incana*) pollen allergens: purification and some characteristics of the major allergen pl 4.78. Int. Arch Allergy appl. Immunol. 67: 49-56.
 - 40 7. Needleman, S.B., Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J.Mol.Biol. 48: 443-453.
 8. Ausubel, F.M. (ed) (1987) Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and Wiley Interscience: John Wiley and Sons, New York. Unit 2.6.
 - 45 9. Zitat wie 8. Unit 2.1.
 10. Zitat wie 8. Unit 3.10.
 11. Zitat wie 8. Unit 1.8.
 12. Zitat wie 8. Unit 1.
 - 50 13. Kunkel, T.A., Roberts, J.D., Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. In: Methods in Enzymology Vol. 154. Wu, R. and Grossman, L. (eds) Academic Press, Inc., pp367-382.
 14. Nagai, K., Thøgersen, H.C. (1984) Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. Nature 309: 510-512.
- 55

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA Molekül, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Hauptallergens Aln g I aus Erlenpollen besitzt, oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop des Hauptallergens Aln g I umfaßt, wobei die Nukleotidsequenz der gesamten Sequenz oder Teilen dieser Sequenz, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist, entspricht oder einer Nukleotidsequenz, die mit dieser Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder die aus dieser Sequenz durch Degeneration ableitbar ist.
2. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für Aln g I, das Hauptallergen aus Pollen der Erle (*Alnus sp.*), kodiert, oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop davon umfaßt.
3. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleotidsequenz besitzt, die für ein Polypeptid kodiert, das Kreuzreaktivität mit und einen hohen Homologiegrad zu dem Hauptallergen Aln g I aus Erlenpollen besitzt.
4. Rekombinantes DNA Expressionsplasmid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Nukleotidsequenz beinhaltet, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des Hauptallergens aus Erlenpollen Aln g I zeigt, oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop von Aln g I besitzt, wobei die Nukleotidsequenz der gesamten Sequenz oder Teilen dieser Sequenz, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist, entspricht oder einer Nukleotidsequenz, die mit solch einer Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder aus dieser durch Degeneration ableitbar ist.
5. Wirtssystem, insbesondere *E.coli*, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Expressionsplasmid nach Anspruch 4 beherbergt.
6. Synthetisches Protein oder Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Antigenität des gesamten Erlenpollen Hauptallergens Aln g I oder von Teilen davon besitzt, wobei es eine Aminosäuresequenz umfaßt, die mit der Sequenz oder Teilen davon, wie sie in Figur 1 dargestellt ist, übereinstimmen.
7. Synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Fusionsprodukt ist, welches einen Polypeptidanteil enthält, der die Antigenität des gesamten Erlenpollen Hauptallergens Aln g I oder von Teilen davon besitzt, und welches an ein zusätzliches Polypeptid fusioniert ist, das durch die DNA des Expressionsvektors kodiert wird.
8. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch 6 oder 7 enthält.
9. Verfahren zur in vitro Diagnose einer Allergie gegen Erlenpollen bei Patienten, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Diagnose den Nachweis einer Reaktion von IgE dieser Patienten mit einem synthetischen Protein oder Polypeptid nach den Ansprüchen 6 - 8 umfaßt.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

Aln 9 I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
ATG GGT GTT TTC AAT TAC GAA GCG GAA ACC CCC TCC GTT ATC CCA GCG GCT CGG CTG TTC
Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Ala Glu Thr Pro Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Leu Phe

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
AAG GCC TTT ATC CTT GAT GGC GAT AAG CTC CTT CCA AAG GTT GCA CCT GAA GCT GTT AGC
Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Lys Leu Leu Pro Lys Val Ala Pro Glu Ala Val Ser

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
AGT GTT GAG AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGG CCT GGA ACC ATC AAG AAG ATC ACC TTT CCC
Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Thr Phe Pro

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
GAA GGC AGC CCT TTT AAG TAC GTA AAG GAG AGG GTT GAT GAG GTT GAT CGC GTA AAC TTC
Glu Gly Ser Pro Phe Lys Tyr Val Lys Glu Arg Val Asp Glu Val Asp Arg Val Asn Phe

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
AAA TAC AGC TTC AGC GTG ATC GAG GGT GGT GCC GTG GGC GAC GCA CTG GAG AAG GTC TGT
Lys Tyr Ser Phe Ser Val Ile Glu Gly Gly Ala Val Gly Asp Ala Leu Glu Lys Val Cys

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
AAC GAG ATC AAG ATA GTG GCA GCC CCT GAT GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG
Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Ala Pro Asp Gly Gly Ser Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys

121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140
TTC CAC ACC AAA GGC GAC CAT GAG ATA AAT GCA GAG CAG ATT AAG ATT GAA AAA GAA AAG
Phe His Thr Lys Lys Gly Asp His Glu Ile Asn Ala Glu Gln Ile Lys Ile Glu Lys Glu Lys

141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160
GCC GTG GGA CTT CTC AAG GCC GTT GAG AGC TAC CTC TTG GCA CAC TCT GAT GCC TAC AAC
Ala Val Gly Leu Leu Lys Ala Val Glu Ser Tyr Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

161
TAA ATTCTGCCTAATTTTATGATCAGCTTGCATGTGTTCTTGTCAAGCCATAAATACTGCTTAACCTCGTCTTGTCTAATA
End

AAATGAGGCTGTTAGTCGTTTATGAGTACGTAATAATGACACCCCAACATATGAGCCCAATTGCTTATGAATAGAGTT

AGGTTCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

Figur 1

