



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 24 532 T2** 2007.09.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 283 869 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 1/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 24 532.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB01/01736**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 967 602.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/088085**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.02.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.11.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.02.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(30) Unionspriorität:
506978 18.02.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:
ANERGIS SA, Epalinges, FR

(72) Erfinder:
SPERTINI, Francois, CH-1011 Lausanne, CH

(74) Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **NEUE POLYPEPTIDE AUS BIENENGIFT UND VERFAHREN ZU DEREN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge eines Bienengiftpolypeptids, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 umfasst.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Bienengift (BV) ist eine komplexe Mischung von Antigenen, welche eines oder mehrere toxische Polypeptide einschließen kann. Viele dieser Polypeptide sind hypersensibilisierende Mittel und können zusätzlich hämolytische oder neurotoxische Wirkungen aufweisen.

[0003] Einige Individuen sind hypersensibel gegenüber BV-Polypeptiden. IgE-Antikörper aus BV-hypersensiblen Individuen erkennen mehrere toxische BV-Polypeptide. BV-Polypeptide, die oft als Allergene bezeichnet werden, welche von IgE in BV-hypersensiblen Individuen erkannt werden, können z.B. Phospholipase A₂ (PLA₂), saure Phosphatase, Hyaluronidase, Allergen C und andere Proteine mit hohem Molekulargewicht (MW) einschließen.

[0004] BV-hypersensible Individuen können einem hohen Risiko einer unerwünschten Reaktion (adverse reaction) auf einen Bienenstich ausgesetzt sein. Eine anerkannte Methode zur Verhinderung oder Minimierung ernster unerwünschter Reaktionen, die aus einem Bienenstich resultieren, ist es, das Individuum gegenüber den Allergenen, die in BV vorliegen, zu desensibilisieren. Dieser Schutz kann durch einen Prozess hervorgerufen werden, der Giftimmuntherapie (VIT) genannt wird.

[0005] GB-A-2341389 und WO-A-200015774 offenbaren eine Verwendung von SEQ ID NO: 1, die auf eine Methode zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen usw. gerichtet ist.

[0006] WO-A-9918983 offenbart ein Bienengifttoxin, welches zu dem in der vorliegenden Erfindung beanspruchten ähnlich, aber erkennbar verschieden ist.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels wie in dem unabhängigen Anspruch 1 und den unabhängigen Ansprüchen 6, 7, 8, 14 und den damit zusammenhängenden Unteransprüchen definiert.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die Erfindung basiert teilweise auf der Entdeckung eines neuen Bienengiftproteins, welches Api m 6 genannt wurde. Polypeptide, die von Api m 6-Polypeptiden abgeleitet sind, können z.B. in der Giftimmuntherapie verwendet werden, um anfällige Individuen vor den unerwünschten Wirkungen eines Bienenstichs zu schützen.

[0009] Wenn nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke, die hierin verwendet werden, dieselbe Bedeutung wie sie üblicherweise von einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet, zu welchem diese Erfindung gehört, verstanden wird. Auch wenn Methoden und Materialien, die zu denen, die hierin beschrieben werden, ähnlich oder äquivalent sind, bei der Praktizierung oder dem Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden geeignete Methoden und Materialien nachstehend beschrieben. Auf alle Publikationen, Patentanmeldungen, Patente und andere Referenzen, die hierin erwähnt werden, wird hierin vollinhaltlich Bezug genommen. Im Fall eines Konflikts geht die vorliegende Beschreibung, einschließlich der Definitionen, vor. Zusätzlich dienen die Materialien, Methoden und Beispiele nur zur Veranschaulichung und sollen nicht beschränkend sein.

[0010] Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung und den Ansprüchen deutlich.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHUNG

[0011] **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung der Api m 6-Isoformen. Die Reihenfolge der Aminosäuren in Klammern wurde nicht bestimmt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die Erfindung stellt die Verwendung eines 8 kD-Bienengiftproteins, das Api m 6 genannt wird, welches auf der Grundlage seiner Reaktivität mit IgE-Antisera aus Individuen, die gegenüber Bienengift hypersensibel sind, identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung der Immunantwort auf Bienengift bereit. Vier Isoformen des Api m 6-Polypeptids sind identifiziert worden. Diese sind: Api m 6.01, welches die Aminosäuresequenz einschließt, die in SEQ ID NO: 1 gezeigt ist, und ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 7.190 Da aufweist; Api m 6.02 Da, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 einschließt und ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 7.400 aufweist; Api m 6.03 Da, welches die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 3 einschließt und ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 7.598 Da aufweist; und Api m 6.04, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 4 aufweist und ein Molekulargewicht von 7.808 Da aufweist.

[0013] Die vier Isoformen liegen in ungefähr äquimolaren Mengen vor. Die Isoformen weisen eine gemeinsame zentrale Aminosäuresequenz von 67 Resten auf und unterscheiden sich nur in ihrem Amino- und Carboxylterminus um bis zu 6 Aminosäuren ([Fig. 1](#)). Die gemeinsame 67 Aminosäure-Kernsequenz ist als Api m 6.01 (SEQ ID NO: 1) gezeigt. Api m 6.03 (SEQ ID NO: 3) und Api m 6.04 (SEQ ID NO: 4) weisen einen zusätzlichen N-Terminus „Phe-Gly-Gly-Phe“ in Bezug auf sowohl Api m 6.01 (SEQ ID NO: 1) als auch Api m 6.02 (SEQ ID NO: 2) auf. Weiterhin weisen Api m 6.02 und Api m 6.04 zwei zusätzliche Reste, Pro und Leu, am C-Terminus auf. Die relative Reihenfolge dieser Aminosäuren ist noch nicht bestimmt worden.

[0014] Hier wird die Verwendung von Api m 6-Protein als ein Allergen zur Immuntherapie beschrieben. Die Entwicklung einer neuen Bienengift-Immuntherapiestrategie, die auf überlappenden Peptiden basiert, die von den obigen abgeleitet sind, wird ebenfalls beschrieben.

Sequenzen und entsprechende SEQ ID-Nummern

[0015] Die Sequenzen und entsprechenden SEQ ID NOs, die hierin diskutiert werden, beinhalten die Folgenden:

SEQ ID NO: 1 Api m 6.01 (7.190 Da) Aminosäuresequenz (67 aa)
 SEQ ID NO: 2 Api m 6.02 (7.400 Da) Aminosäuresequenz (69 aa)
 SEQ ID NO: 3 Api m 6.03 (7.598 Da) Aminosäuresequenz (71 aa)
 SEQ ID NO: 4 Api m 6.04 (7.808 Da) Aminosäuresequenz (73 aa)

Api m 6-Polypeptide

[0016] Ein Aspekt der Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von isolierten Api m 6-Polypeptiden und -Proteinen zur Herstellung von Arzneimitteln für die Regulierung der Immunantwort. Native Api m 6-Proteine können durch ein geeignetes Reinigungsschema isoliert werden, indem Standardproteinreinigungstechniken verwendet werden. Alternativ kann ein Api m 6-Protein oder -Polypeptid chemisch synthetisiert werden, indem Standardpeptidsynthesetechniken verwendet werden, oder kann durch rekombinante DNA-Techniken erzeugt werden.

[0017] Ein „isoliertes“ oder „gereinigtes“ Protein oder ein biologisch aktiver Anteil von diesem ist im Wesentlichen frei von Material (z.B. anderen, verunreinigenden Proteinen) aus der Zellsuspension, der Gewebequelle oder der Giftpräparation, aus welcher das Api m 6-Protein stammt, oder im Wesentlichen frei von chemischen Vorläufern oder anderen Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wurde. Der Ausdruck „im Wesentlichen frei von anderem Material“ beinhaltet Präparationen von Api m 6-Protein, in welchen das Protein von zellulären Komponenten der Zelle, aus welcher es isoliert oder rekombinant erzeugt wird, getrennt ist. In einer Ausführungsform beinhaltet der Ausdruck „im Wesentlichen frei von anderem Material“ Präparationen von Api m 6-Protein mit weniger als ca. 30% (bezogen auf das Trockengewicht) an nicht-Api m 6-Protein (hierin ebenfalls als ein „kontaminierendes Protein“ bezeichnet), bevorzugter weniger als ca. 20% an nicht-Api m 6-Protein, noch bevorzugter weniger als ca. 10% an nicht-Api m 6-Protein und am meisten bevorzugt weniger als ca. 5% nicht-Api m 6-Protein. Wenn das Api m 6-Protein oder ein biologisch aktiver Anteil von diesem rekombinant erzeugt wird, ist es ebenfalls im Wesentlichen frei von Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als ca. 20%, bevorzugter weniger als ca. 10% und am meisten bevorzugt weniger als ca. 5% des Volumens der Proteinpräparation aus.

[0018] Der Ausdruck „im Wesentlichen frei von chemischen Vorläufern oder andern Chemikalien“ beinhaltet Präparationen von Api m 6-Protein, in welchen das Protein von chemischen Vorläufern oder anderen Chemikalien, welche an der Synthese des Proteins beteiligt sind, getrennt ist. In einer Ausführungsform beinhaltet

der Ausdruck „im Wesentlichen frei von chemischen Vorläufern oder anderen Chemikalien“ Präparationen von Api m 6-Protein, welche weniger als ca. 30% (bezogen auf das Trockengewicht) an chemischen Vorläufern oder nicht-API m 6-Chemikalien, bevorzugter weniger als ca. 20% chemische Vorläufer oder nicht-API m 6-Chemikalien, noch bevorzugter weniger als ca. 10% chemische Vorläufer oder nicht-API m 6-Chemikalien und am meisten bevorzugt weniger als ca. 5% chemische Vorläufer oder nicht-API m 6-Chemikalien aufweisen.

[0019] Biologisch aktive Anteile eines Api m 6-Proteins beinhalten Peptide, welche die Aminosäuresequenz umfassen, die in irgendeiner der SEQ ID NOs: 1–4 gezeigt ist, welche weniger Aminosäuren als die Api m 6-Proteine in voller Länge beinhalten und wenigstens eine Aktivität eines Api m 6-Proteins, z.B. die Fähigkeit, die T-Zell-Proliferation zu stimulieren, oder die Fähigkeit, IgE-Antikörper aus z.B. einem Individuum, das gegenüber Bienengift hypersensibel ist, zu binden, zeigen. Typischerweise umfassen biologisch aktive Anteile eine Domäne oder ein Motiv mit wenigstens einer Aktivität des Api m 6-Proteins. Ein biologisch aktiver Anteil eines Api m 6-Proteins kann ein Polypeptid sein, welches beispielsweise 10, 15, 25, 35, 45, 55, 60 oder 65 oder mehr Aminosäuren in der Länge aufweist.

[0020] Das Api m 6-Protein weist eine Aminosäuresequenz auf, die in irgendeiner der SEQ ID NOs: 1–4 gezeigt ist. Vorzugsweise weist das Api m 6-Protein die Aminosäuresequenz eines Proteins auf, das aus Bienengift aus einer Apis spp., z.B. Apis mellifera, isoliert wurde.

[0021] Wenn Peptide, die von den Api m 6-Proteinen oder Varianten, die hierin beschrieben sind, abgeleitet sind, verwendet werden, um ein Individuum, das gegenüber einem Proteinallergen sensibel ist, z.B. durch subkutane Verabreichung zu tolerisieren, wird das Peptid vorzugsweise von einem Proteinallergen der Gattung Apis abgeleitet. Lang überlappende Peptide, welche wenigstens ein Epitop des Apis-Allergens Phospholipase A₂ umfassen, sind beschrieben worden. Siehe z.B. Kammerer, et al., Clin and Exp Allergy 27: 1016–1026 (1997) und Kammerer, et al., J Allergy Clin Immunol 100: 96–103 (1997).

[0022] Komplexe von Analogen und Derivaten der Api m 6-Proteine und Varianten können chemisch synthetisiert werden. Beispielsweise kann ein Peptid, welches einem Anteil eines vorstehend erwähnten Peptids entspricht, der eine gewünschte Domäne umfasst oder der eine gewünschte Aktivität in vitro vermittelt, unter Verwendung eines Peptidsynthesegeräts synthetisiert werden. In Fällen, wo natürliche Produkte in dem Verdacht stehen, Mutanten zu sein, oder aus neuen Spezies isoliert werden, kann die Aminosäuresequenz eines vorstehend erwähnten Proteins, das aus der natürlichen Quelle isoliert wurde, z.B. durch direktes Sequenzieren des isolierten Proteins bestimmt werden. Die Peptide können ebenfalls durch Hydrophilieanalyse analysiert werden (siehe z.B. Hopp und Woods, Proc Natl Acad Sci USA 78: 3824–3828 (1981)), welche verwendet werden kann, um die hydrophoben und hydrophilen Bereiche der Peptide zu identifizieren, was so bei der Planung von Substraten zur experimentellen Manipulation wie beispielsweise in Bindungsexperimenten, der Antikörpersynthese usw. hilft. Eine Sekundärstrukturanalyse kann ebenfalls durchgeführt werden, um Bereiche eines Peptids zu identifizieren, welche spezifische Struktur motive annehmen. Siehe z.B. Chou und Fasman, Biochem 13: 222–223 (1974). Manipulation, Translation, Sekundärstrukturvorhersage, Hydrophilie- und Hydrophobizitätsprofile, Vorhersage und graphische Darstellung des offenen Leserasters und Bestimmung von Sequenzhomologien können unter Verwendung von Computersoftwareprogrammen erreicht werden, die im Stand der Technik verfügbar sind. Andere Methoden der Strukturanalyse einschließlich, aber nicht beschränkt auf Röntgenkristallographie (siehe z.B. Engstrom, Biochem Exp Biol 11: 7–13 (1974)); Massenspektroskopie und Gaschromatographie (siehe z.B. Methods in Protein Science, 1997. J. Wiley and Sons, New York, NY) und Computermodellierung (siehe z.B. Fletterick und Zoller, Herausg., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) können ebenfalls verwendet werden.

[0023] In einigen Ausführungsformen wird die Verwendung von einem oder mehreren Api m 6-Peptiden, wenn diese in einer Zusammensetzung vorliegen, in welcher ein Api m 6-Peptid um wenigstens 3 Aminosäuren mit wenigstens einem anderen Api m 6-Polypeptid in der Zusammensetzung überlappt, betrachtet. In den meisten Ausführungsformen überlappen die Peptide zwischen 5 und 10 Aminosäuren. In gewissen Ausführungsformen beinhaltet eine Zusammensetzung, die zur Tolerisierung verwendet wird, einen Satz von Polypeptidfragmenten, welcher die gesamte Länge des Api m 6-Proteins abbildet. In einer zusätzlichen Ausführungsform können die Aminosäuresequenzen von einem oder mehreren Peptiden erzeugt und durch einen Linker verknüpft werden, um die Sensibilität gegenüber der Verarbeitung durch Antigen-präsentierende Zellen zu erhöhen. Ein solcher Linker kann irgendeine nicht-Epitop-Aminosäuresequenz oder ein anderes geeignetes Linker- oder Verknüpfungsmittel sein.

[0024] Die Verwendung von Api m 6-Proteinen mit veränderten Aminosäuresequenzen kann ins Auge gefasst

werden. Die Änderungen verändern die Funktionen der Variantenproteine in Bezug auf das anfängliche Api m 6-Protein nicht und entsprechen Api m 6-Proteinen mit der Aminosäuresequenz von irgendeiner der SEQ ID NOs: 2–4. Aminosäuresubstitutionen finden vorzugsweise an „nicht-essentiellen“ Aminosäureresten statt. Ein „nicht-essentieller“ Aminosäurerest ist ein Rest, welcher in der Wildtyp-Sequenz von Api m 6 (z.B. die Sequenz von irgendeiner der SEQ ID NOs: 1–4) geändert werden kann, ohne die biologische Aktivität zu verändern, wogegen ein „essentieller“ Aminosäurerest für die biologische Aktivität benötigt wird. Beispielsweise wird vorhergesagt, dass Aminosäurereste, die bei den Api m 6-Proteinen aus verschiedenen Spezies, z.B. verschiedenen Apis spp., konserviert sind, gegenüber einer Veränderung besonders unzugänglich sind.

[0025] Die T-Zell-stimulierende Aktivität kann getestet werden, indem T-Zellen, die aus einem Individuum erhalten wurden, das gegenüber Api m 6-Proteinen und Varianten, die hierin beschrieben sind, sensibel ist (d.h. einem Individuum, das eine Immunantwort auf das Proteinallergen oder Proteinantigen aufweist), mit einem Api m 6-Protein oder einer Variante kultiviert werden, und das Vorliegen oder Fehlen der Proliferation durch die T-Zellen als Reaktion auf das Peptid bestimmt wird, wie beispielsweise durch die Aufnahme von tritiummarkiertem Thymidin gemessen wird. Stimulationsindizes für Reaktionen von T-Zellen auf Peptide, die in den Verfahren der Erfindung nützlich sind, können als die maximalen Zählimpulse pro Minute (CPM) berechnet werden, die als Reaktion auf das Peptid aufgenommen wurden, geteilt durch die CPM des Kontrollmediums. Beispielsweise kann ein Peptid, das von einem Proteinallergen abgeleitet ist, einen Stimulationsindex von ca. 2,0 aufweisen. Ein Stimulationsindex von wenigstens 2,0 wird zu Zwecken des Definierens von Peptiden, welche als immuntherapeutische Mittel nützlich sind, im Allgemeinen als positiv betrachtet. Bevorzugte Peptide weisen einen Stimulationsindex von wenigstens 2,5, insbesondere wenigstens 3,5 und am meisten bevorzugt wenigstens 5,0 auf.

Auf Api m 6 basierende pharmazeutische Zusammensetzungen

[0026] Die Api m 6-Proteine (Allergene), Peptide (hierin ebenfalls als „aktive Verbindungen“ bezeichnet) der Erfindung können zur Einarbeitung in pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur Verabreichung zur Immuntherapie geeignet sind, verwendet werden. Solche Zusammensetzungen umfassen typischerweise das Protein oder den Antikörper und einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Wie hierin verwendet soll der Ausdruck „pharmazeutisch verträglicher Träger“ jegliches und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, antibakterielle und antifungale Mittel, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und dergleichen einschließen, die mit einer pharmazeutischen Verabreichung kompatibel sind. Die Verwendung solcher Medien und Mittel für pharmazeutisch aktive Substanzen ist im Stand der Technik wohlbekannt. Außer insoweit als irgendein herkömmliches Medium oder Mittel mit der aktiven Verbindung inkompatibel ist, wird die Verwendung von diesen in den Zusammensetzungen erwogen. Ergänzende aktive Verbindungen können ebenfalls in die Zusammensetzungen eingearbeitet werden. Wie hierin verwendet sind die Ausdrücke ‚pharmazeutische Zusammensetzung‘ und ‚therapeutische Zusammensetzung‘ austauschbar.

[0027] Pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die Api m 6-Proteine, Peptide oder Varianten von diesen enthalten, können an ein Säugetier (wie z.B. einen Menschen), der gegenüber Api m 6 sensibel ist, in einer Form verabreicht werden, welche zu einer Abnahme bei der T-Zell-Antwort des Säugetiers bei anschließender Exposition an das Proteinallergen führt. Wie hierin verwendet ist eine Abnahme oder Modifikation der T-Zell-Antwort eines Säugetiers, das gegenüber einem Proteinallergen sensibel ist, definiert als Nichtansprechen oder Abschwächung bei den Symptomen auf das Proteinallergen in dem Säugetier, wie durch standardmäßige klinische Verfahren festgestellt wird (siehe z.B. Varney, et al., British Medical Journal 302: 265–269 (1990)), einschließlich einer Abschwächung bei den von dem Allergen hervorgerufenen asthmatischen Zuständen. Wie hierin erwähnt beinhaltet eine Abschwächung bei den Symptomen auf ein Allergen jegliche Verringerung bei der allergischen Reaktion eines Säugetiers wie z.B. eines Menschen auf das Allergen nach einem Behandlungsregime mit einem Peptid, wie hierin beschrieben wird. Diese Abschwächung bei den Symptomen kann in einem Menschen subjektiv (z.B. fühlt sich der Mensch bei Exposition an das Allergen beschwerdefreier) oder klinisch, wie z.B. mit einem Standardhauttest, bestimmt werden.

[0028] Die Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, um ein Individuum gegenüber einem Proteinallergen oder einem anderen Proteinantigen zu desensibilisieren oder tolerisieren, kann durchgeführt werden, indem Verfahren mit Dosierungen und für Zeiträume, die wirksam sind, um die Sensibilität eines Individuums gegenüber einem Proteinallergen oder einem anderen Proteinantigen zu verringern (d.h. um die allergische Reaktion zu verringern) verwendet werden. Wirksame Mengen der therapeutischen Zusammensetzungen werden gemäß Faktoren wie z.B. dem Grad der Sensibilität des Individuums gegenüber dem Proteinallergen, dem Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit des Peptids (der Peptide), eine Antigenreaktion in dem Individuum hervorzurufen, variieren. Dosisregimes können

so eingestellt werden, dass sie die optimale therapeutische Reaktion liefern. Beispielsweise können mehrere aufgeteilte Dosen täglich verabreicht werden, oder die Dosis kann proportional verringert werden, wie es durch die Erfordernisse der therapeutischen Situation vorgegeben wird.

[0029] Eine pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung wird so formuliert, dass diese mit dem für sie gedachten Verabreichungsweg kompatibel ist. Beispiele von Verabreichungswegen beinhalten die parenterale, z.B. intravenöse, intradermale, subkutane, orale (z.B. Inhalation), transdermale (topische), transmukosale und rektale Verabreichung. Lösungen oder Suspensionen, die zur parenteralen, intradermalen oder subkutanen Anwendung verwendet werden, können die folgenden Komponenten beinhalten: ein steriles Verdünnungsmittel wie z.B. Wasser zur Injektion, Salzlösung, nichtflüssige Öle, Polyethylenglycole, Glycerin, Propylenglycol oder andere synthetische Lösungsmittel; antibakterielle Mittel wie z.B. Benzylalkohol oder Methylparabene; Antioxidantien wie z.B. Ascorbinsäure oder Natriumbisulfit; Chelatbildner wie z.B. Ethylendiamintetraessigsäure; Puffer wie z.B. Acetate, Citrate oder Phosphate und Mittel zur Einstellung der Toxizität wie z.B. Natriumchlorid oder Dextrose. Der pH kann mit Säuren oder Basen wie z.B. Salzsäure oder Natriumhydroxid eingestellt werden. Das parenterale Präparat kann in Ampullen, Wegwerfspritzen oder Fläschchen für mehrere Dosen, die aus Glas oder Kunststoff gefertigt sind, eingeschlossen sein.

[0030] Die Verabreichung, z.B. die subkutane Verabreichung, eines Api m 6-Proteins oder eines Variantenpeptids wie hierin beschrieben an ein Säugetier wie z.B. einen Menschen kann geeignete T-Zell-Subpopulationen so tolerisieren oder anergisieren, dass diese gegenüber dem Proteinallergen nichtansprechend werden und bei der anschließenden Exposition nicht daran teilnehmen, eine Immunantwort zu stimulieren. Zusätzlich kann die Verabreichung eines solchen Peptids das Lymphokinsekretionsprofil im Vergleich zu der Exposition an das natürlich vorkommende Proteinallergen oder einen Anteil von diesem modifizieren (z.B. zu einer Abnahme von IL-4 und/oder einer Zunahme bei IL-2 führen). Weiterhin kann die Exposition an das Peptid T-Zell-Subpopulationen beeinflussen, welche normalerweise an der Reaktion auf das Allergen teilnehmen, so dass diese T-Zellen von der Stelle (den Stellen) der normalen Exposition an das Allergen weg zu der Stelle der therapeutischen Verabreichung des Peptids hin gezogen werden. Diese Umverteilung der T-Zell-Subpopulationen kann die Fähigkeit des Immunsystems eines Individuums, die gewöhnliche Immunantwort an der Stelle der normalen Exposition an das Allergen zu stimulieren, verbessern oder verringern, was zu einer Abschwächung bei den allergischen Symptomen führt.

[0031] Zusätzlich kann die Verwendung der oben beschriebenen Api m 6-Proteine, Peptide oder deren Varianten in einem Präparat zur Immuntherapie zu niedrigeren Spiegeln an IgE-Stimulationsaktivität führen. Vorzugsweise führt die Verabreichung zu einer minimalen IgE-stimulierenden Aktivität. Wie hierin verwendet bezieht sich minimale IgE-stimulierende Aktivität auf die IgE-Produktion, die geringer ist als der Umfang der IgE-Produktion und/oder IL-4-Produktion, welcher durch das gesamte Api m 6-Proteinallergen stimuliert wird.

[0032] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur Verwendung als Injektionsmittel geeignet sind, beinhalten sterile wässrige Lösungen (wo die Peptide oder das Protein wasserlöslich sind) oder Dispersionen und sterile Pulver zur extemporierten Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen. Zur intravenösen Verabreichung beinhalten geeignete Träger physiologische Salzlösung, bakteriostatisches Wasser, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) oder phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). In allen Fällen muss die Zusammensetzung steril sein und sollte in dem Ausmaß flüssig sein, dass eine leichte Handhabbarkeit mit einer Spritze gegeben ist. Sie muss unter den Bedingungen der Herstellung und der Lagerung stabil sein und muss gegenüber der kontaminierenden Wirkung von Mikroorganismen wie z.B. Bakterien und Pilzen konserviert sein. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder Dispersionsmedium sein, welches beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (z.B. Glycerol, Propylenglycol und flüssiges Polyethylenglycol und dergleichen) und geeignete Mischungen von diesen enthält. Die richtige Fließfähigkeit kann beispielsweise durch die Verwendung eines Beschichtungsmittels wie z.B. Lecithin, durch die Beibehaltung der benötigten Teilchengröße in dem Fall der Dispersion und durch die Verwendung von Tensiden beibehalten werden. Eine Verhinderung der Tätigkeit von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und antifungale Mittel, z.B. Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Ascorbinsäure, Thimerosal und dergleichen erzielt werden. In vielen Fällen wird es bevorzugt sein, isotonische Mittel, z.B. Zucker, Polyalkohole wie z.B. Mannitol, Sorbitol, Natriumchlorid in die Zusammensetzung aufzunehmen. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch Aufnahme eines Mittels, welches die Absorption verzögert, z.B. Aluminiummonostearat und Gelatine, in die Zusammensetzung erreicht werden.

[0033] Sterile injizierbare Lösungen können hergestellt werden, indem die aktive Verbindung (z.B. ein Api m 6-Protein, Peptide oder ein anti-Api m 6-Antikörper) in der benötigten Menge in ein geeignetes Lösungsmittel mit einem oder einer Kombination der oben aufgezählten Bestandteile nach Bedarf eingearbeitet wird, worauf

eine Filtersterilisation folgt. Im Allgemeinen werden Dispersionen hergestellt, indem die aktive Verbindung in ein steriles Vehikel eingebracht wird, welches ein grundlegendes Dispersionsmedium und die benötigten anderen Bestandteile von denen, die oben aufgezählt wurden, enthält. In dem Fall der sterilen Pulver zur Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen sind die bevorzugten Herstellungsmethoden Vakuumtrocknen und Gefriertrocknen, was ein Pulver des aktiven Bestandteils plus jeglichem zusätzlichen gewünschten Bestandteil aus einer vorher steril filtrierten Lösung von diesen ergibt.

[0034] Orale Zusammensetzungen beinhalten im Allgemeinen ein inertes Verdünnungsmittel oder einen essbaren Träger. Diese können in Gelatinekapseln eingeschlossen werden oder zu Tabletten komprimiert werden. Zu dem Zweck der oralen therapeutischen Verabreichung kann die aktive Verbindung in Arzneiträger eingearbeitet werden und in der Form von Tabletten, Pastillen oder Kapseln verwendet werden. Orale Zusammensetzungen können ebenfalls hergestellt werden, indem ein flüssiger Träger zur Anwendung als Mundwäsche verwendet wird, wobei die Verbindung in dem flüssigen Träger oral angewendet wird und gegurgelt (swished) und ausgespuckt oder geschluckt wird. Pharmazeutisch kompatible Bindemittel und/oder Hilfsmaterialien können als Teil der Zusammensetzung eingeschlossen werden. Die Tabletten, Pillen, Kapseln, Pastillen und dergleichen können irgendeinen der folgenden Bestandteile oder Verbindungen mit einer ähnlichen Natur enthalten: ein Bindemittel wie z.B. mikrokristalline Cellulose, Tragantgummi oder Gelatine; einen Arzneiträger wie z.B. Stärke oder Lactose, ein Desintegrationsmittel wie z.B. Alginsäure; Primogel oder Maisstärke; ein Schmiermittel wie z.B. Magnesiumstearat oder Sterotes; ein Gleitmittel wie z.B. kolloidales Siliciumdioxid; ein süßendes Mittel wie z.B. Sucrose oder Saccharin; oder einen Geschmacksstoff wie z.B. Pfefferminz, Methylsalicylat oder Orangengeschmack.

[0035] Zur Verabreichung durch Inhalation werden die Verbindungen in der Form eines Aerosolsprays aus einem unter Druck stehenden Behälter oder Spender, welcher ein geeignetes Treibmittel, z.B. ein Gas wie z.B. Kohlendioxid, enthält, oder einem Zerstäuber abgegeben.

[0036] Eine systemische Verabreichung kann ebenfalls über trans mukosale oder transdermale Mittel erfolgen. Zur trans mukosalen oder transdermalen Verabreichung werden Penetrationsmittel, welche für die zu durchdringende Barriere geeignet sind, in der Formulierung verwendet. Solche Penetrationsmittel sind allgemein im Stand der Technik bekannt und beinhalten beispielsweise zur trans mukosalen Verabreichung Detergentien, Gallensalze und Fusidinsäurederivate. Eine trans mukosale Verabreichung kann durch die Verwendung von Nasensprays oder Suppositorien erreicht werden. Zur transdermalen Verabreichung werden die aktiven Verbindungen zu Salben, Balsamen, Gelen oder Cremes formuliert, wie im Stand der Technik allgemein bekannt ist.

[0037] Die Verbindungen können ebenfalls in der Form von Suppositorien (z.B. mit herkömmlichen Suppositoriengrundstoffen wie z.B. Kakaobutter und anderen Glyceriden) oder von Retentionseinläufen zur rektalen Abgabe hergestellt werden.

[0038] In einer Ausführungsform werden die aktiven Verbindungen mit Trägern, welche die Verbindung gegen eine schnelle Eliminierung aus dem Körper schützen, wie z.B. einer Formulierung zur kontrollierten Freisetzung, einschließlich Implantaten und mikroeingekapselten Abgabesystemen, hergestellt. Biologisch abbaubare, biokompatible Polymere wie z.B. Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglycolsäure, Kollagen, Polyorthoester und Polymilchsäure können verwendet werden. Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen sind für die Fachleute auf dem Gebiet offensichtlich. Die Materialien können ebenfalls im Handel von der Alza Corporation und der Nova Pharmaceuticals, Inc. erhalten werden. Liposomale Suspensionen (einschließlich Liposomen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen virale Antigene auf infizierte Zellen abzielen) können ebenfalls als pharmazeutisch verträgliche Träger verwendet werden. Diese können gemäß Verfahren, welche den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, beispielsweise wie in dem U.S.-Patent Nr. 4,522,811 beschrieben, hergestellt werden.

[0039] Es ist besonders vorteilhaft, orale oder parenterale Zusammensetzungen zur leichten Verabreichung und Gleichmäßigkeit der Dosierung in Dosiseinheitsform zu formulieren. Dosiseinheitsform wie hierin verwendet bezieht sich auf physikalisch getrennte Einheiten, die als einheitliche Dosen für den zu behandelnden Patienten geeignet sind; jede Einheit enthält eine vorherbestimmte Menge an aktiver Verbindung, die so berechnet wurde, dass diese die gewünschte therapeutische Wirkung in Verbindung mit der erforderlichen pharmazeutischen Träger erzeugt. Die Spezifikation für die Dosiseinheitsformen der Erfindung wird von den einzelnen Charakteristika der aktiven Verbindung und der bestimmten therapeutischen Wirkung, die erreicht werden soll, und den Grenzen, welche der Technik der Zubereitung einer solchen aktiven Verbindung zur Behandlung von Individuen eigen sind, diktiert und sind direkt davon abhängig.

[0040] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in einen Behälter, eine Packung oder einen Spender, zusammen mit Anweisungen zur Verabreichung, eingeschlossen werden.

[0041] Die Erfindung umfasst weiterhin wenigstens eine Verwendung einer therapeutischen Zusammensetzung, welche Api m 6 enthält, zur Behandlung einer Krankheit, an welcher eine Immunantwort auf ein Proteinantigen (z.B. ein Allergen, ein Autoantigen usw.) beteiligt ist, welche wenigstens ein Peptid mit einem ausreichenden Prozentsatz der T-Zell-Epitope des Proteinantigens umfasst, so dass bei einem wesentlichen Prozentsatz einer Population von Individuen, welche gegenüber dem Proteinantigen sensibel sind, die Reaktion solcher Individuen auf das Proteinantigen wesentlich verringert wird, unter der Voraussetzung, dass das wenigstens eine Peptid nicht das gesamte Proteinantigen umfasst.

[0042] [vorstehend erwähnte Peptid oder Nukleinsäuren davon zur Verwendung als ein Diagnostikum, ein Standard oder eine Kontrolle in den vorstehend erwähnten Assays.]

BEISPIELE

[0043] Die Erfindung wird weiter in den folgenden Beispielen beschrieben, welche den Umfang der Erfindung, der in den Ansprüchen beschrieben wird, nicht beschränken. Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Identifizierung, Charakterisierung und Anwendungen des Api m 6-Proteins.

Beispiel 1 Reinigung von Api m 6-Isoformen (Vergleichsbeispiel)

[0044] Das Api m 6-Protein wurde in Untersuchungen identifiziert, welche die Reaktivität von IgE-Seren untersuchten, die von Patienten stammten, welche gegenüber gereinigten Bienengift (BV)-Proteinen hypersensibel waren.

[0045] Serum und mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden von BV-hypersensiblen Patienten erhalten (Klasse II–IV, gemäß der Klassifizierung nach Mueller). Müller, J Asthma Res 3: 331–333 (1966). Alle Patienten wiesen BV-spezifische IgE ($\geq 0,35$ kU/l; CAP®-System, Pharmacia, Uppsala, Schweden) und positive intradermale Hauttests ($\geq 0,1$ µg/ml, Pharmed®[®], ALK, Hørsholm, Dänemark) auf.

[0046] BV-Proteine wurde durch 15% SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter nichtreduzierenden Bedingungen getrennt und in CAPS/Methanol-Puffer (10 mM CAPS, 10% Methanol, pH 11) auf PVDF-Membranen gebロットet. Die Membranen wurden mit fettfreier Milch (5%) in phosphatgepufferter Salzlösung, welche 0,1% Tween 20 enthielt (PBS-Tween), blockiert, dann mit Seren von Patienten (1/10 in PBS-Tween) für 24 h bei 4°C inkubiert. Die spezifische IgE-Bindung wurde nachgewiesen, indem ein biotinylierter monoklonaler Maus-anti-human-IgE-Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) verwendet wurde, worauf eine Inkubation mit Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) (UBI, Lucerna Chem AG, Luzern, Schweiz) folgte. Die Peroxidaseaktivität wurde durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL, Amersham, UK) sichtbar gemacht.

[0047] Die Analyse von IgE-Seren von 43 Patienten, welche mit getrennten BV-Proteinen reaktiv waren, zeigte eine vorher nicht beschriebene Bande bei ca. 8 kD in 18 (42%) der Proben. Das 8 kD-Protein, welches der beobachteten 8 kD-Bande entsprach, wurde von anderen BV-Proteinen durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Chromatographie wurde durchgeführt, indem vollständiges BV (Apis mellifera) (Latexan, Rosans, Frankreich) in 50% Ameisensäure lyophilisiert wurde. Partikel wurden durch Zentrifugation und Filtration vor der Auftragung der Probe auf eine BioRad P-60-Säule (2,5 × 100 cm) (BioRad, Glattbrugg, Schweiz), die in 50% Ameisensäure äquilibriert war, entfernt. Saure Bedingungen wurden verwendet, um die Melittin-Tetramerbildung zu minimieren. Bello, et al., Biochemistry 21: 461–465 (1982). Fraktionen von 4 ml wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 6,5 ml/h gesammelt. Jede Fraktion wurde lyophilisiert, in 0,02 N Essigsäure gelöst und durch SDS-PAGE analysiert. Laemmli, Nature 227: 680–685 (1970). Fraktionen, welche die 8 kD-Bande enthielten, eluierten in einem breiten Peak zwischen den Peaks von zwei anderen Bienengiftproteinen, PLA₂ und Melittin. Eine MALDI-TOF-Massenspektrometrieanalyse dieser Fraktionen zeigte das Vorliegen von vier Proteinen mit Molekulargewichten von 7.190, 7.400, 7.598 und 7.808 Da.

[0048] Die vier Proteine wurden weiter durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, wobei zwei Läufe durch eine C₄-Säule (Phenomex W-Porex 5; 250 × 46 mm; Rancho Palos Verdes, CA, USA) verwendet wurden. Ein Wasser-Acetonitril-Gradient wurde zur Trennung verwendet (Puffer A: 10% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser; Puffer B: 90% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser). Alle vier Proteine wurden durch IgE von einem BV-hypersensiblen Patienten, welcher bei dem anfänglichen Screening auf das 8 kDa-Protein positiv

war, erkannt. Die vier Proteine wurden Api m 6.01, Api m 6.02 und Api m 6.03 bzw. Api m 6.04 genannt.

Beispiel 2 Aufklärung der Aminosäuresequenz der Api m 6-Isoformen (Vergleichsbeispiel)

[0049] Die Aminosäuresequenz der 8 kDa-Proteinisoformen wurde durch zwei Ansätze bestimmt: N-terminale Sequenzanalyse durch Edman-Abbau und C-terminale Sequenzierung unter Verwendung von Carboxypeptidasen in Kombination mit Massenspektrometrie.

[0050] Die aminoterminal Sequenzanalyse von Proteinen und proteolytischen Fragmenten wurde mit einem Puls-Flüssigphasen-Mikrosequenziergerät, Modell 477A (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt, indem Standardprogramme verwendet wurden. Die Proteine wurden reduziert (8 M Harnstoff, 0,15 M Tris-HCl, 2,5 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), pH 8,6) und alkyliert (7,5 mM Natriumiodacetat), bevor sie auf einer C₈-Umskehrphasensäule entsalzt wurden. Alkyliertes 7,6 kD (Api m 6.03)-Protein wurde mit Trypsin (Sequenziergrad, Boehringer Mannheim AG, Rotkreuz, Schweiz) über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (50 mM Tris-HCl, pH 8,6); Fragmente wurden durch HPLC (C₈-Säule 5 µm HAlsil™, 2,1 × 100 mm; Higgins Analytical Inc.) getrennt.

[0051] Die carboxylterminale Sequenzanalyse von Proteinen und proteolytischen Fragmenten wurde durch Matrixunterstützte Laserdesorption-Ionisation-Flugzeit (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie auf einem Voyager-DE™RP (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) durchgeführt. Patterson, et al., Anal Chem 67: 3971–3978 (1995). V8-Proteinase (Endoproteinase Glu-C) wurde von Promega (Zürich, Schweiz) gekauft und gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Endoproteinase Arg-C, Sequenziergrad, Endoproteinase Asp-N, Sequenziergrad, Carboxypeptidase Y, Sequenziergrad, und Carboxypeptidase A wurden von der Boehringer Mannheim AG (Rotkreuz, Schweiz) gekauft. Die enzymatische Fragmentierung mit Arg-C wurde entweder bei Raumtemperatur (RT) oder bei 4°C in 15 mM HEPES-Puffer (pH 8) mit 10 mM DTT durchgeführt. Das Verhältnis Enzym zu Protein betrug 1/50 (Gew./Gew.). Die Reaktion wurde gestoppt, indem Matrixlösung (gesättigte Lösung von Sinapinsäure, 10 mg/ml, in Acetonitril/Wasser 30/70% (Vol/Vol)) zugegeben wurde. Fragmente aus dem Asp-N-Verdau (Verhältnis Enzym zu Protein von 1/125 (Gew./Gew.) in 15 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5) von reduzierten Proteinen (2 mM DTT in Wasser, 37°C über Nacht) wurden durch HPLC zur weiteren Analyse getrennt. Die Bestimmung von freien SH-Gruppen von Cysteinen wurde durch Inkubation mit N-Ethylmaleimid (NEM) durchgeführt. C-terminale Aminosäuren wurden durch Inkubation von Proteinen mit Carboxypeptidase A (Verhältnis Enzym zu Protein von 1/10 bis 1/100 (Gew./Gew.) in 15 mM HEPES-Puffer, pH 7,5) oder Carboxypeptidase Y (Verhältnis Enzym zu Protein von 1/10 bis 4/100 (Gew./Gew.) in 15 mM Ammoniumacetat, pH 6) bei 4°C oder Raumtemperatur bestimmt. Die experimentellen Bedingungen wurden für jede Substratpräparation optimiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Matrixlösung gestoppt.

[0052] Die ersten 48 Aminosäuren wurden durch direkte Sequenzierung des reduzierten und alkylierten Proteins aufgeklärt. Überlappende innere Segmente wurden durch Sequenzierung von HPLC-gereinigten tryptischen Peptiden erhalten. Die C-terminale Sequenz konnte andererseits nur bestimmt werden, indem unter Verwendung von Carboxypeptidasen sequenziert wurde. Die C-terminalen Reste wurden in unabhängigen Experimenten unter Verwendung von entweder Carboxypeptidase Y oder A aufgeklärt. Lange Strecken von Sequenzdaten, die durch N-terminale Analyse erhalten wurden, wurden weiterhin durch C-terminale Analyse bestätigt. Die Aminosäuresequenzen der Api m 6-Isoformen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1 Aminosäuresequenzen von Api m 6.01, 6.02, 6.03 und 6.04

GGFGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRCQRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCRGLGYLRNKKKVCVPRSKCG	(SEQ ID NO: 1)
GGFGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRCQRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCRGLGYLRNKKKVCVPRSKCG (P, L)	(SEQ ID NO: 2)
FGGFGGFGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRCQRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCRGLGYLRNKKKVCVPRSKCG	(SEQ ID NO: 3)
FGGFGGFGGLGGRGKCPSEIFSRCDGRCQRFPCNVVPKPLCIKICAPGCVCRGLGYLRNKKKVCVPRSKCG (P, L)	(SEQ ID NO: 4)

[0053] Api m 6.03 wurde weiterhin durch Massenspektrometrie nach Inkubation mit entweder Endoproteinase Arg-C, Asp-N oder V8 analysiert. Die Signale für proteolytische Peptide waren mit der theoretischen Masse der erwarteten Fragmente konsistent und bestätigten die Positionen von Arginin-, Aspartat- und Glutamatresten.

[0054] EMBL- und SWISS PROT-Datenbanksuchen auf Proteinsequenzhomologie und eine computerunterstützte Proteinanalyse wurden durchgeführt, indem die Wisconsin Package Version 9.1 Software (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) angewendet wurde. Datenbanksuchen zeigten, dass Api m 6 eine zu dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Domänensignatur enthielt, welche von vielen ansonsten nicht

verwandten Proteinen geteilt wird. Siehe Davis, New Biol 2: 410–419 (1990). Es wurde keine offensichtliche Homologie zu bekannten Proteinen gefunden, selbst wenn eine Profilsuche mit dem besonderen Cystein-Spacing-Motiv „CX₈CX₃CX₃CX₈CX₃CX₃C“ (wobei X eine beliebige Aminosäure ist) durchgeführt wurde.

Beispiel 3 Erzeugung von Antikörpern gegen Api m 6-Isoformen (Vergleichsbeispiel)

[0055] Eine B-Zell-Hybridomlinie, welche monoklonale anti-Api m 6.03 (SEQ ID NO: 3)-Antikörper erzeugte, wurde ausgehend von Mäusen, die mit Api m 6.03 (SEQ ID NO: 3) immunisiert wurden, etabliert. Der Überstand der Hybridomkultur wurde 1:25.000 in PBS-Tween 1% Milch verdünnt und mit Membranen für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die spezifische Antikörperbindung wurde mit HRP-konjugiertem Schaf-anti-Maus-Ig-Antikörper (Amersham, UK) nachgewiesen, und die Peroxidasereaktivität wurde durch erhöhte Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

ÄQUIVALENTE

[0056] Anhand der vorstehenden detaillierten Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen der Erfindung sollte deutlich werden, dass ein neues Bienengiftallergen beschrieben wurde. Auch wenn hierin besondere Ausführungsformen im Detail offenbart wurden, erfolgte dieses nur als Beispiel zu Zwecken der Veranschaulichung.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge eines Bienengift-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 umfasst, wobei die Verabreichung der wirksamen Menge von SEQ ID NO: 1 eine Immunreaktion des Patienten gegen das Bienengift hemmt.

2. Verwendung nach Anspruch 1, außerdem umfassend die Zubereitung eines zweiten Bienengift-Polypeptids.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei das zweite Bienengift-Polypeptid ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus Phospholipase A₂, Hyaluronidase, Allergen C, Mellitin, Adolapin, Minimin, Protease-Inhibitor, und saurer Phosphatase, und glycosylierten IgE-Bindungsproteinen, oder Analogen oder Derivaten davon besteht.

4. Verwendung nach Anspruch 1, außerdem umfassend die Zubereitung eines oder mehrerer zusätzlicher Bienengift-Polypeptide.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das eine oder die mehreren zusätzlichen Bienengift-Polypeptide ausgewählt werden aus der Gruppe, die aus Phospholipase A₂, Hyaluronidase, Allergen C, Mellitin, Adolapin, Minimin, Protease-Inhibitor, und saurer Phosphatase, und glycosylierten IgE-Bindungsproteinen, oder Analogen oder Derivaten davon besteht.

6. Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die zwei überlappende Bienengift-Polypeptidfragmente, die mindestens 30 Aminosäuren lang sind, wobei die überlappenden Fragmente die gesamte Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 bilden, umfasst, und wobei die Verabreichung der Fragmente eine Immunreaktion des Patienten gegen das Bienengift hemmt.

7. Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die zwei überlappende Bienengift-Polypeptidfragmente, die mindestens 20 Aminosäuren lang sind, umfasst, wobei die überlappenden Fragmente die gesamte Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 bilden, und wobei die Verabreichung der Fragmente eine Immunreaktion des Patienten gegen das Bienengift hemmt.

8. Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die zwei überlappende Bienengift-Polypeptidfragmente, die mindestens 10 Aminosäuren lang sind, umfasst, wobei die überlappenden Fragmente die gesamte Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 bilden, und wobei die Verabreichung der Fragmente eine Immunreaktion des Patienten gegen das Bienengift hemmt.

9. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8, außerdem umfassend die Zubereitung eines oder mehrerer zusätzlicher Bienengift-Polypeptide.

10. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das eine oder die mehreren zusätzlichen Bienengift-Polypeptide ausgewählt werden aus der Gruppe, die aus Phospholipase A₂, Hyaluronidase, Allergen C, Mellitin, Adolapin, Minimin, Protease-Inhibitor, saurer Phosphatase, und glycosylierten IgE-Bindungsproteinen, oder Analogen oder Derivaten davon besteht.

11. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8, wobei sich die zwei überlappenden Bienengift-Polypeptidfragmente um drei Aminosäuren überlappen.

12. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8, wobei sich die zwei überlappenden Bienengift-Polypeptidfragmente um 5 Aminosäuren überlappen.

13. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8, wobei sich die zwei überlappenden Bienengift-Polypeptidfragmente um 10 Aminosäuren überlappen.

14. Verwendung eines Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regulierung einer Immunantwort auf Bienengift bei einem Patienten, umfassend die Zubereitung einer wirksamen Menge eines Bienengift-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 umfasst, wobei die Verabreichung der wirksamen Menge von SEQ ID NO: 1 eine allergische Reaktion des Patienten gegen das Bienengift verringert.

15. Verwendung nach Anspruch 14, außerdem umfassend die Zubereitung eines zweiten Bienengift-Polypeptids.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei das zweite Bienengift-Polypeptid ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus Phospholipase A₂, Hyaluronidase, Allergen C, Mellitin, Adolapin, Minimin, Protease-Inhibitor, und saurer Phosphatase, und glycosylierten IgE-Bindungsproteinen, oder Analogen oder Derivaten davon besteht.

17. Verwendung nach Anspruch 14, außerdem umfassend die Zubereitung eines oder mehrerer zusätzlicher Bienengift-Polypeptide.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei das eine oder die mehreren zusätzlichen Bienengift-Polypeptide ausgewählt werden aus der Gruppe, die aus Phospholipase A₂, Hyaluronidase, Allergen C, Mellitin, Adolapin, Minimin, saurerer Phosphatase, Protease-Inhibitor, und saurer Phosphatase, und glycosylierten IgE-Bindungsproteinen, oder Analogen oder Derivaten davon besteht.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

