

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525601

(P2004-525601A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	D 4 B O 6 4
A 6 1 K 39/35	A 6 1 K 39/35	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	4 H O 4 5
C O 7 K 14/435	C O 7 K 14/435	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-541021 (P2001-541021)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成12年11月27日 (2000.11.27)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月3日 (2002.6.3)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/011776		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250
(87) 国際公開番号	W02001/040266		Frankfurter Str. 25 O, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成13年6月7日 (2001.6.7)		
(31) 優先権主張番号	199 57 904.0	(74) 代理人	100088328
(32) 優先日	平成11年12月1日 (1999.12.1)		弁理士 金田 暢之
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g E 反応性の低減した昆虫毒アレルゲンおよびその製造方法

(57) 【要約】

本発明は組換え昆虫毒アレルゲンおよびその特定の製造方法に関する。このアレルゲンは、それらが自然に存在するのと同じ折りたたみ（コンフォメーション）を用いて製造されるかそれとも異なる折りたたみを用いて製造されるかに応じて変わり得る。自然に存在しない折りたたみのタンパク質は、I g E 反応性またはアレルゲン性が低減され、したがってアレルギー免疫療法において治療剤として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g E 反応性またはアレルゲン性が低減したことを特徴とする組換え昆虫アレルゲン。

【請求項 2】

アレルゲン性が天然アレルゲンに比較して最高 95% まで低減したことを特徴とする請求項 1 に記載の組換え昆虫アレルゲン。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の組換えスズメバチ昆虫アレルゲン。

【請求項 4】

Vespula vulgaris および *Vespula germanica* から得られる請求項 3 に記載の組換え主要アレルゲン抗原 5。 10

【請求項 5】

細菌細胞中でアレルゲンタンパク質を封入体として不溶な形で産生し、前記不溶凝集物を変性させ、この変性生成物を透析によって別の折りたたみコンフォメーションを有する可溶性単量体アレルゲンに変換して単離することを特徴とする実質的に純粋な組換え昆虫毒アレルゲンを単離する方法。

【請求項 6】

変性は還元剤を添加せずに塩化グアジニウムを用いて行われることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

透析は酸性緩衝液を用いて行われることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のアレルゲン性または I g E 反応性が低減した組換え昆虫毒アレルゲンを単離する方法。 20

【請求項 8】

pH 4.5 ~ 5.0 の酢酸ナトリウム緩衝液を用いることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

透析はシステイン含有溶液を用いて行われることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のアレルゲン性または I g E 反応性の正常な組換え昆虫毒アレルゲンを単離する方法。

【請求項 10】

Vespula 種、特に *Vespula vulgaris* および *Vespula germanica*、*Paravespula* 種および *Apis mellifera* から得られるアレルゲンを用いることを特徴とする請求項 5 ~ 9 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 11】

請求項 7 または 8 に記載の方法によって得られる組換えスズメバチ毒アレルゲン。

【請求項 12】

請求項 1 から 4 または 11 に記載の組換えアレルゲンおよび対応するアジュバントおよび賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 9 に記載の方法によって得られる昆虫毒アレルゲンのインビトロでの昆虫刺毒アレルギー診断のための使用。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、製造方法の効率に応じて天然と同一または天然と反対の折りたたみ構造（コンフォメーション）による分化が可能な組換え昆虫毒アレルゲンおよびこれをターゲットとするその製造方法に関する。

【0002】

アレルギー患者、特に昆虫毒アレルギー患者の単一アレルゲン分化診断法（インビトロ（*in vitro*）またはインビボ（*in vivo*））では、天然分子に対応する折りたたみ形が用いられる。

【0003】

天然と反対の折りたたみ形は特定の免疫的治療のために副作用の少ない薬剤として用いることができる。したがってこれらの組換え折りたたみ変異体によれば天然品よりも安全な治療が行える。本発明の方法は生物工学的な製造が医薬品に必要な条件 (GMP) 下に行えるように設計されている。

【0004】

昆虫刺毒アレルギーは主としてスズメバチやミツバチによって引き起こされ、重大な全身症状あるいは場合によっては致命的なアナフィラキシーをもたらすこともある (Muller, U. R.: *Insect stinging allergy*, Gustav Fischer Verlag; 1990)。タイプ1のアレルギーを誘発する物質は、昆虫毒のタンパク質、糖タンパク質またはポリペプチドである。これらのアレルゲンは注入後、感作された人間においてマスト細胞表面に結合したIgE分子と反応する。このタイプのFcRI結合IgE分子がアレルゲンによって互いに架橋すると、結果としてエフェクター細胞の働きによりメディエーター (例えば、ヒスタミン、ロイコトリエン) やサイトカインが放出されこれらに対応した臨床症状が発生する。

10

【0005】

ペプチドであるメリチンに加え酵素のヒアルロニダーゼおよびホスホリパーゼA2がミツバチ毒のアレルゲン性成分として働く (Habermann, E., 1972, *Science* 177, 314-322)。スズメバチの場合も同様に、主要な酵素的に活性化アレルゲンはハチ毒におけるものと類似したヒアルロニダーゼ (Hoffmann, D. R., 1986, *J. Allergy Clin. Immunol.* 78, 337-343) およびホスホリパーゼA1である。スズメバチ毒の最も重要な主要アレルゲンは抗原5であり、これは現在までのところ酵素活性は検出されていない (King他, 1978, *Biochemistry* 17, 5165-5174)。これらのアレルゲンはすべて分子生物学的に同定されており、対応するcDNA分子はクローン化されている (特に、Fang他, 1988, *PNAS*, 895-899; Soldatova他, 1993, *FEBS*, 145-149; Kuchler他, 1989, *Eur. J. Biochem.* 184, 249-254)。cDNA配列を利用するとアレルギーの診断および治療に用い得る組換えアレルゲンを製造することが可能である (ScheinerおよびKraft, 1995, *Allergy* 50, 384-391)。

20

【0006】

本発明との関係では主要なアレルゲンである抗原5が特に重要である。なぜなら本発明はこの分子を例として用いているからである。これは約25kDaの大きさの非グリコシル化タンパク質である。一次配列は8つのシステイン残基を含むが、これは4個のジスルフィド架橋部があることを示すものである (Hoffman, D. R., 1993, *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 707-716)。昆虫毒アレルギーを効果的に治療するための古典的アプローチは特定の免疫療法すなわち減感作療法 (hyposensitisation) である (Muller, U. R.: *Insect stinging allergy*, Gustav Fischer Verlag; 1990)。この方法では投与量を増大させつつ天然アレルゲン抽出物を患者に皮下注射する。しかしながら、この方法はアレルギー反応、場合によってはアナフィラキシーショックを起こすリスクを伴う。昆虫刺毒の減感作療法は特に強い反応が予想され得るため、治療は現在入院治療に限って行われる。

30

40

【0007】

組換え法により製造されたアレルゲンを用いた治療の最適化は特に昆虫刺毒アレルギーの場合に可能でありうる。組換え法により製造された高純度アレルゲンの、場合によっては患者の個人感作パターンに適合する、決められた多剤混合物 (ScheinerおよびKraft, 1995) を天然アレルゲン起源の抽出物に代えて用い得る。治療に不可欠なT細胞エピトープを損なうことなくIgEエピトープを削除した慎重に変異された組換えアレルゲン (Schramm他, 1999, *J. Immunol.* 162, 2406-2414) によって、このタイプの組換えアレルゲンを用いたより安全な減感作療法をもた

50

らし得る現実的な展望が得られる。

【0008】

大腸菌 (*E. coli*) 中の異種発現から、ほとんどの真核生物タンパク質は「天然の」コンフォメーションを取らず、取ったとしてもわずかであることが知られている。この不正確な折りたたみの結果、これらのタンパク質は多くの場合不溶性である。これは特にシステイン含有タンパク質において観察されている (Kuchler 他、1989、*Eur. J. Biochem.* 184、249-254)。特に抗原 5 は細菌中での発現において天然のコンフォメーションをとらない不溶性凝集体を生じることが報告されている (Monsalve 他、1999、*Protein Express Purif.* 16(3) : 410-416)。このタイプの不溶性凝集体は診断や治療には用いることができない。

10

【0009】

大腸菌 (*E. coli*) に不溶のタンパク質は研究目的では真核生物の発現システム (例えば酵母または昆虫細胞) でしばしば製造されている (Monsalve 他、1999、*Protein Express Purif.* 16(3) : 410-416; Soldatova 他、1998、*J Allergy Clin Immunol* 101 : 691-698)。しかし、真核生物発現システムの不利な点は、特にハイパーグリコシル化が起こり得る点 (Grobe 他、1999、*Eur J Biochem* 263 : 33-40)、タンパク質分解プロセスおよび収量が比較的少ない点 (Glover および Hames (編集)、1995、*Expression Systems*, IRL Press, Oxford - New York - Tokyo) である。したがってこのタイプのタンパク質は、通常、医薬的な診断および治療という意味ではアレルギー学的用法に適さない。

20

【0010】

本発明の方法による天然のコンフォメーションを有する生成物は、アレルギー疾患、特に昆虫刺毒のインビトロまたはインビボでの診断に有利に用いることができる。この天然と同一の折りたたみ形は確立された方法により IgE 抗体の検出に利用できる。

【0011】

一方、本発明により得られ、実質的に IgE 反応性コンフォメーションを有さずまたは部分的にしか有しないものとして区別される変種は、特定の免疫療法製剤の低アレルギー性成分として用いることができる。これまでのおよび以下の記述において、「低アレルギー性」という用語は、本発明に従い、IgE 反応性が低減したことによりアレルギー性が (天然アレルギーと比較して) 好ましくは 5 ~ 95 %、より好ましくは 20 ~ 85 % 低減しまたはなくなっているという意味である。

30

【0012】

本発明は組換えアレルギーがバクテリア (大腸菌) 中で製造できる方法である。第 1 の精製ステップは不溶性凝集タンパク質を相当に富化することによって行う。次いでこれらの不溶性凝集物を還元剤の添加なしに変性する。これに続く透析条件に応じて異なる折りたたみ形が得られる。これらの分子はモノマーで可溶性であることが重要である。第 1 の可溶性折りたたみ変種は天然アレルギーに匹敵する IgE 反応性を有し、したがって診断目的に用いることができる。このタイプの生成物はシステイン含有溶液を用いた透析により得られる。

40

【0013】

他方の可溶性折りたたみ変異体は天然のアレルギーとは構造が異なっており、IgE 反応性が低いまたはないという点で区別される。この理由でこのタイプの変種はより容易に実施できるように改良された免疫療法に適している。このタイプの低アレルギー性生成物は、本発明に従い、酸性緩衝液により好ましくは pH 3.5 ~ 6.5、より好ましくは pH 4.0 から 5.5 の範囲での透析で得ることができる。

【0014】

このように、本発明は IgE 反応性またはアレルギー性が低減されたことを特徴とする組

50

換え昆虫アレルゲンに関する。本発明によればこれらのタンパク質のアレルゲン性は天然のアレルゲンと比較して95%まで低減される。

【0015】

特に本発明は、対応する組換えスズメバチ昆虫アレルゲン、特に *Vesputula vulgaris* および *Vesputula germanica* に由来するものに関する。

【0016】

本発明はさらに、細菌細胞中でアレルゲンタンパク質を封入体として不溶なかたちで製造し、前記不溶凝集物を変性し、この変性生成物を透析によって別の折りたたみコンフォメーションを有する可溶性単量体アレルゲン変換して単離することを特徴とする実質的に純粋な組換え昆虫毒アレルゲンを単離する方法に関する。この変性は好ましくは還元剤を添加せずに塩化グアニウムを用いて行われる。

10

【0017】

本発明は特に、前記の透析を緩衝液、好ましくは酸性緩衝液 pH 4.5 ~ 5.0 の酢酸ナトリウム緩衝液を用いて行うアレルゲン性または IgE 反応性が低減された組換え昆虫毒アレルゲンの単離方法に関する。

【0018】

しかしながら、本発明はまた前記の透析をシステイン含有溶液を用いて行う、通常のアレルゲン性または IgE 反応性を有する組換え昆虫毒アレルゲンの単離方法にも関係する。

【0019】

本発明はまた上述のおよび下記の対応する方法によって得られる組換えスズメバチ毒アレルゲンに関する。

20

【0020】

本発明はさらに IgE 反応性が低減されたまたは消失した対応する組換えアレルゲンおよび対応するアジュバントおよび賦形剤を含む医薬調剤に関する。

【0021】

最後に、本発明は上述のまたは下記の対応する方法によって得られる昆虫毒アレルゲンのインビボおよびインビトロでの昆虫刺毒アレルギー診断のための使用に関する。

【0022】

本発明の方法を以下さらに詳細に説明する。

【0023】

実施例として *Vesputula vulgaris* に由来するスズメバチ毒アレルゲン抗原 5 (Ves v 5) および *Vesputula germanica* に由来する抗原 5 (Ves g 5) を発現ベクター pSE420 にクローン化し、K12 細菌株 M15 pREP4 内に形質転換した。この方法のフローチャートを図 1 に示す。

30

【0024】

発現培養物の接種のために株の前培養を用いて組換えアレルゲンを製造する。発現は IPTG によって誘導され、シカンフラスコ中 LB 培地において 37 °C、酸素供給制限条件 (90 rpm / 分) で行う。5 時間発現させた後、細菌を遠心分離 (5000 x g、10 分、20 °C) で回収する。細胞をリゾチーム添加 (10 µg / g、湿潤重量) により緩衝液 (50 mM Tris / HCl、25% (w / v) ショ糖、pH 8.0) に細胞を再分散させた後、細菌の消化を行う。続いて界面活性剤溶液 (0.2 M NaCl、1% (w / v) DOC、1% (w / v) Nonidet P40) を等量添加する。次いでこの界面活性剤溶液を超音波 (氷上 3 分間、130 ワット、0.5 秒パルス) で処理する。発現生成物は主として不溶性凝集物 (封入体) のかたちで存在するため、これらが高密度であることから、遠心分離 (3000 x g) により残りの部分 (細胞壁断片、リボゾームなど) の大部分から分離することができる。界面活性剤を含む溶液 (1% Triton X-100) による洗浄を 3 回連続することによりさらなる精製を行う。次いで、精製された封入体を変性緩衝液 (6 M 塩化グアニウム、20 mM Tris / HCl、pH 8.0) の添加および室温で 2 時間振盪することにより消化する。

40

【0025】

50

IgE 反応性折りたたみ形を得るためには、変性バッチを透析チューブ（消化限界 12 ~ 14 kDa）に導入し、室温で攪拌しながら 12 時間、システイン溶液（5 mM システイン）の 100 倍量に対して透析する。その後システインを除くためにこれを蒸留水に対して透析する。

【0026】

IgE 反応性が低減されたコンフォメーションを得るためには最初の透析を 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）に対して行う。ここでも蒸留水に対してさらなる透析を行う。除去後水溶性アレルゲンを遠心分離により沈殿凝集物から分離する。上清は所望の可溶性組換えアレルゲンを含む。酢酸ナトリウム緩衝液の代わりに 3.5 ~ 6.5、好ましくは 4.0 ~ 5.5 の緩衝能を有する他の酸性緩衝液を用いることも可能である。このタイプの緩衝系の例は文献に適宜記載されている。

10

【0027】

いずれの方法でも沈殿した組換えアレルゲン生成物は同様なスキームに従ってさらに変性、処理することができる。これにより収量が顕著に増加する。

【0028】

透析ステップ後生成物の純度は 95 % である。塩基性昆虫毒アレルゲンのさらなる精製ステップは、例えば、Source S（ドイツ国フライブルク所在のファルマシア（Pharmacia））を用いた陽イオン交換クロマトグラフィおよびゲルろ過により行う。ゲルろ過は高分子量および低分子量の微量の不純物除去に加えて脱塩にも有効である。

20

【0029】

生成物の品質管理は以下の特徴に基づいて行う。これは抗原 5 に対して表にまとめてある。表中 n 抗原は天然抗原の意味である。

【0030】

【表 1】

性質	天然 IgE 反応性を有する折りたたみ体	IgE 反応性が低減された折りたたみ体
SDS-PAGE（非還元条件）における装置分子量	25 kDa	26~27 kDa
Source S 中の溶離のための塩濃度	320 mM NaCl	400 mM NaCl
プロテアーゼ V8 による開裂	15 kDa 断片 + ペプチド	ペプチド < 10 kDa
抗原 5 特異的モノクローナル抗体	8E3、1E11 による検出	8E3 によつてのみ検出可能
アレルギー患者から得た血清による IgE 反応頻度	> 95%	< 10%
アレルゲン性反応効力	n 抗原 5 に類似	>10 × n 抗原 5 未満

30

【0031】

本発明による方法はすべての種類の昆虫毒アレルゲンに適している。用いた精製技術および組換えクローンおよびクローン発現技術は当業者に公知であり利用可能なものであって、さらに同様の公知の方法で置き換えることができる。

40

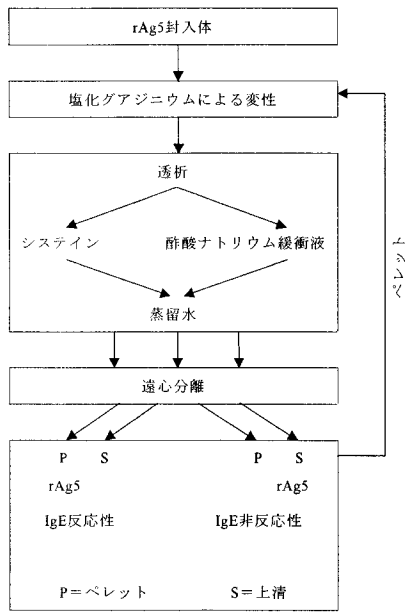
【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例の方法のフローチャートである。

【 図 1 】

方法のフローチャート
r A g 5 = 組換え抗原 5



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Juni 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/40266 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/00 (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11776
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 2000 (27.11.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 57 904.0 1. Dezember 1999 (01.12.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUICK, Roland [DE/DE]; Mühlenkamp 19, 22303 Hamburg (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Loenshöhe 2, 21465 Wentorf (DE). FIEBIG, Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, 21493 Schwarzenbek (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INSECT POISON ALLERGENS WITH REDUCED IGE REACTIVITY AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: INSEKTENGIFT-ALLERGENE MIT VERMINDERTER IGE-REAKTIVITÄT UND VERFAHREN ZU IH-
RER HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to recombinant insect poison allergens and to a specific method for producing them. Said allergens can be varied according to whether they are produced using folds (conformations) that are identical or different to those that occur naturally. The proteins with folds that do not occur naturally have a reduced IgE reactivity or allergenicity and can therefore be used as therapeutic agents in the immunotherapy of allergies.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante Insektengift-Allergene sowie ein Verfahren zu ihrer gezielten Herstellung, wobei sich besagte Allergene je nach Durchführung des Herstellungsverfahrens durch naturidentische oder naturfremde Faltungen (Konformationen) unterscheiden lassen. Dabei zeigen die Proteine mit naturfremder Faltung eine verminderte IgE-Reaktivität bzw. Allergenität und lassen sich so als Therapeutikum in der Immuntherapie von Allergien einsetzen.

WO 01/40266 A2

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

Insektengift-Allergene mit verminderter IgE-Reaktivität und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung betrifft rekombinante Insektengift-Allergene sowie ein Verfahren zu
5 ihrer gezielten Herstellung, wobei sich besagte Allergene je nach Durchführung
des Herstellungsverfahrens durch naturidentische oder naturfremde Faltungen
(Konformationen) unterscheiden lassen.

Eine Anwendung für Faltungsformen, die dem natürlichen Molekül entsprechen,
10 besteht in der Einzelallergen-differenzierten Diagnostik (*in vitro* oder *in vivo*) von
Allergikern, speziell Insektengiftallergikern.

Die naturfremden Faltungsformen können als nebenwirkungsarme Therapeutika
zur spezifischen Immuntherapie eingesetzt werden. Damit könnten diese rekombi-
15 nanten Faltungsvarianten eine sicherere Behandlung als der Naturstoff bewir-
ken. Das Verfahren ist so konzipiert, daß eine biotechnologische Herstellung unter
Bedingungen, die für Pharmazeutika notwendig sind (GMP), durchgeführt
werden kann.

20 Insektenstichallergien werden hauptsächlich von Wespen und Honigbienen ver-
ursacht und können zu schweren systemischen Symptomen bis hin zur potenziell
tödlich verlaufenden Anaphylaxie führen (Müller, U.R., in: *Insect sting allergy*,
Gustav Fischer Verlag; 1990). Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen
handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide des Insektenvenoms.
25 Diese Allergene reagieren nach Injektion mit den bei sensibilisierten Per-
sonen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden
solche FcεRI-gebundenen IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt,
führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene) und
Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen
30 Symptomen.

Als allergene Bestandteile des Bienenvenoms wirken neben dem Peptid Melittin
die Enzyme Hyaluronidase und Phospholipase A2 (Habermann, E, 1972, *Science*
177, 314-322). Im Fall der Wespe kommen als enzymatisch aktive Hauptallerge-

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

ne ebenfalls eine Hyaluronidase, die der des Bienenvenoms ähnlich ist (Hoffmann, D.R., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 337-343) und eine Phospholipase A1 vor. Das wichtigste Hauptallergen des Wespengiftes ist das Antigen 5, für das bisher keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte (King et al., 5 1978, Biochemistry 17, 5165-5174). Sämtliche der genannten Allergene sind bereits molekularbiologisch charakterisiert und die entsprechenden cDNA-Moleküle kloniert (u.a. Fang et al., 1988, PNAS, 895-899; Soldatova et al., 1993, FEBS, 145-149; Kuchler et al., 1989, Eur. J. Biochem. 184, 249-254). Mit Hilfe von cDNA Sequenzen ist es möglich, rekombinante Allergene herzustellen, die in der 10 Diagnostik und Therapie von Allergien Verwendung finden könnten (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50, 384-391).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist das Hauptallergen Antigen 5 von besonderer Bedeutung, da sich die Erfindung dieses Moleküls beispielhaft 15 bedient. Es handelt sich dabei um ein ca. 25 kDa großes, nicht glykosyliertes Protein. Die Primärsequenz beinhaltet 8 Cysteinreste, was auf vier Disulfidbrücken hinweist (Hoffman, D.R., 1993, J. Allergy Clin Immunol. 92: 707-716). Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Insektengiftallergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Müller, U.R., in: Insect sting allergy, Gustav Fischer Verlag; 1990). Dabei 20 werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen bis zum anaphylaktischen Schock. Da gerade im Fall von Insektenstichhyposensibilisierungen mit starken Reaktionen zu rechnen ist, wird zur Zeit ausschließlich stationär behandelt. 25

Eine Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen besonders bei der Insektenstichallergie möglich. Definierte, ggf. auf individuelle Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen rekombinant hergestellten Allergenen (Scheiner and Kraft, 1995) könnten Extrakte aus 30 natürlichen Allergenquellen ablösen. Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit solchen rekombinanten Allergenen führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spe-

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

zifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essenziellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schranim et al., 1999, J. Immunol. 162, 2406-2414).

Von der heterologen Expression in *E.coli* ist bekannt, daß die meisten eukaryontischen Proteine nicht oder nur in geringem Ausmaß die 'natürliche' Konformation annehmen. Eine Folge von diesen Fehlfaltungen ist häufig die Unlöslichkeit dieser Proteine. Dies ist besonders bei cysteinhaltigen Proteinen zu beobachten (Kuchler et al., 1989, Eur. J. Biochem. 184, 249-254). Insbesondere von Antigen 5 wurde berichtet, daß die Expression in Bakterien zu unlöslichen Aggregaten führt, die nicht die natürliche Konformation besitzen (Monsalve et al., 1999, Protein Express Purif. 16(3): 410-416). Solche unlöslichen Aggregate sind weder zur Diagnostik noch zur Therapie nutzbar.

Häufig werden die in *E.coli* unlöslichen Proteine für Forschungszwecke in einem eukaryontischen Expressionssystem dargestellt, wie z.B. Hefe oder Insektenzellen (Monsalve et al., 1999, Protein Express Purif 16(3): 410-416; Soldatova et al., 1998, J Allergy Clin Immunol 101:691-698). Nachteile der eukaryontischen Expressionssysteme stellen jedoch vor allem mögliche Hyperglykosylierungen (Grobe et al., 1999, Eur J Biochem 263:33-40), proteolytische Degradationsprozesse und vergleichsweise kleine Produktausbeuten dar (Glover and Hames (eds.), 1995, Expression Systems, IRL Press, Oxford-New York-Tokyo). Für die allergologische Anwendung im Sinne einer pharmazeutisch-medizinischen Diagnostik und Therapie sind solche Proteine deshalb meist ungeeignet.

Die Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens, welche die natürliche Konformation besitzen, können in der In-vitro- und In-vivo-Diagnostik von allergischen Erkrankungen, speziell der Insektenstichallergie, vorteilhaft angewendet werden. Diese naturidentische Faltungsform steht zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

Andererseits können die mit Hilfe der Erfindung hergestellten Varianten, die sich durch eine im wesentlichen nicht oder nur partiell IgE-reaktive Konformation auszeichnen, als hypoallergene Komponenten in Präparaten zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Unter dem Ausdruck "hypoallergen" wird

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

oben und unten erfindungsgemäß eine verminderte bis fehlende, vorzugsweise um 5 bis 95 %, insbesondere 20 bis 85 %, verminderte Allergenität (gegenüber dem natürlichen Allergen) verstanden, welche durch eine verminderte IgE-Antwort bedingt ist.

5

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine Methode, mit der rekombinante Allergene in Bakterien (*E.coli*) hergestellt werden können. Durch hohe Anreicherung der unlöslichen Protein-Aggregate findet ein erster Reinigungsschritt statt. Diese Aggregate werden dann ohne Zusatz von Reduktionsmitteln
10 denaturiert. In Abhängigkeit von den folgenden Dialysebedingungen werden unterschiedliche Faltungsformen erhalten. Entscheidend ist, daß es sich dabei um monomere und lösliche Moleküle handelt. Die eine lösliche Faltungsvariante besitzt eine dem natürlichen Allergen vergleichbare IgE-Reaktivität und kann demnach für diagnostische Zwecke verwendet werden. Eine solches Produkt wird
15 durch Dialyse mit Cystein-haltiger Lösung erhalten.

Die anderen alternativen löslichen Faltungsvarianten sind strukturell verschieden von dem natürlichen Allergen und zeichnen sich durch verminderte oder fehlende IgE-Reaktivität aus. Aus diesem Grund sind solche Varianten geeignet, um eine
20 verbesserte Immuntherapie zu ermöglichen. Ein solches hypoallergenes Produkt wird erfindungsgemäß durch Dialyse mit sauren Puffern, vorzugsweise in einem pH-Wert-Bereich zwischen 3,5 und 6,5, insbesondere zwischen 4,0 und 5,5 gewonnen.

25 Gegenstand der Erfindung ist somit rekombinantes Insektenallergen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine verminderte IgE-Reaktivität, bzw. Allergenität besitzt. Erfindungsgemäß ist die Allergenität dieser Proteine bis zu 95%, im Vergleich zu dem natürlichen Allergen reduziert.

30 Gegenstand ist insbesondere ein entsprechendes rekombinantes Wespen-Insektenallergen, insbesondere aus *Vespula vulgaris* und *Vespula germanica*.

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von im wesentlich reinen rekombinanten Insektengiftallergenen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die allergenen Proteine in Bakterienzellen in unlöslicher Form als "inclusion bodies" hergestellt, besagte unlösliche Aggregate denaturiert werden und die denaturierten Produkte durch Dialyse in lösliche, monomere Allergene unterschiedlicher Faltungs-Konformationen überführt und isoliert werden. Vorzugsweise erfolgt besagte Denaturierung mit Guanidinium-Chlorid ohne Zusatz von Reduktionsmitteln.

10 Gegenstand der Erfindung ist insbesondere ein Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Insektengiftallergenen mit verminderter Allergenität, bzw. IgE-Reaktivität, bei dem zur Dialyse saure Puffer, vorzugsweise Natriumacetat-Puffer mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0, eingesetzt werden.

15 Gegenstand der Erfindung ist aber auch ein Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Insektengiftallergenen mit normaler Allergenität, bzw. IgE-Reaktivität, wobei zur Dialyse Cystein-haltige Lösungen eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein rekombinantes Wespengiftallergen, 20 welches nach dem entsprechenden oben und unten beschriebenen Verfahren erhältlich ist.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zubereitung, welche ein entsprechendes rekombinantes Allergen mit verminderter, bzw. abgeschwächter IgE-Reaktivität sowie entsprechende Hilfs- und Trägerstoffe enthält. 25

Letztlich ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von Insektengiftallergenen, erhältlich nach einem entsprechenden oben oder unten beschriebenen Verfahren zur in vivo und in-vitro Diagnose von Insektenstichallergien. 30

Im nachfolgenden wird das Verfahren im Detail beschrieben:

Beispielhaft wurden die Wespengiftallergene Antigen 5 von *Vespula vulgaris* (Ves v 5) und Antigen 5 von *Vespula germanica* (Ves g 5) in den Expressionsvektor

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

pSE420 kloniert und in den K12-Bakterienstamm M15 pREP4 transformiert. Ein Fließschema des Verfahrens findet sich in Abbildung 1.

Zur Herstellung der rekombinanten Allergene wird eine Vorkultur des Stammes zum Animpfen einer Expressionskultur genutzt. Die Expression, durch IPTG induziert, findet in einem Schikankolben bei 37°C in LB-Medium und limitierter Sauerstoffversorgung statt (90 rpm/min). Die Bakterien werden nach 5 stündiger Expression durch Zentrifugation geerntet (5000xg, 10 min, 20°C). Der Bakterienaufschluß erfolgt nach Resuspension der Zellen in Puffer (50mM Tris/HCl, 25% (w/v) Sucrose, pH 8.0) durch Lysozymzugabe (10µg/g Naßgewicht). Es folgt die Zugabe des gleichen Volumens von Detergenzlösung (0.2 M NaCl, 1%(w/v) DOC, 1%(w/v) Nonidet P40). Diese Aufschlußlösung wird anschließend mit Ultraschall behandelt (3 min auf Eis, 130 Watt, 0.5 s Impuls). Da die Expressionsprodukte primär als unlösliche Aggregate (Einschlusskörper, 'inclusion bodies') vorliegen, können sie aufgrund ihrer hohen Dichte von einem Großteil der übrigen Komponenten (Zellwandfragmente, Ribosomen etc.) durch Zentrifugation bei 3000 x g abgetrennt werden. Die weitere Reinigung erfolgt durch drei aufeinanderfolgende Waschschrte mit detergenzhaltigen Lösungen (1% Triton X-100). Im Anschluß werden die gereinigten Einschlusskörper durch Zugabe von Denaturierungspuffer (6M Guanidinium-Chlorid, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0) aufgeschlossen und 2 h bei RT geschüttelt.

Zur Gewinnung von IgE-reaktiven Faltungsformen wird der Denaturierungsansatz in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 12-14 kDa) gefüllt und gegen das 100 fache Volumen Cysteinilösung (5mM Cystein) 12 h unter Rühren bei RT dialysiert. Im Anschluß erfolgt eine Dialyse gegen destilliertes Wasser, um das Cystein zu entfernen.

Um Konformationen mit verminderter IgE-Reaktivität zu erhalten, wird die erste Dialyse gegen 20 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5.0) durchgeführt werden. Auch hier erfolgt eine weiterer Dialyse gegen destilliertes Wasser. Nach Entnahme werden die wasserlöslichen Allergene durch Zentrifugation von den ausgefallenen Aggregaten abgetrennt. Der Überstand enthält die gewünschten löslichen

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

rekombinanten Allergene. Anstelle von Natriumacetat-Puffer können auch andere saure Puffer verwendet werden, welche in einem Bereich von 3,5 bis 6,5, vorzugsweise 4,0 und 5,5 zu puffern vermögen. Beispiele solcher Puffersysteme sind in der Literatur hinlänglich beschrieben.

5

Die bei beiden Methoden anfallenden präzipitierten rekombinanten Allergene können nochmals denaturiert und nach dem gleichen Schema behandelt werden. Dadurch wird die Ausbeute deutlich erhöht.

- 10 Nach den Dialyseschritten sind die Produkte zu ca. 95% rein. Weitere Reinigungsschritte der basischen Insektengiftallergene sind Kationenaustauschchromatographie (Puffer pH 7.2) mit z.B. Source S (Pharmacia, Freiburg, Germany) und Gelfiltration. Die Gelfiltration dient neben der Abtrennung von hoch- und niedermolekularen Minimalverunreinigungen auch zur Entsalzung.

15

Die Qualitätskontrollen der Produkte basieren auf folgenden charakteristischen Eigenschaften, die tabellarisch für Antigen 5 zusammengestellt sind:

nAntigen = natürliches Antigen

Eigenschaft	Faltung mit natürlicher IgE-Reaktivität	Faltung mit verminderter IgE-Reaktivität
App. MW in der SDS-PAGE (nicht reduzierende Bed.)	25 kDa	26-27 kDa
Salzkonz. zur Elution in der Source S	320 mM NaCl	400 mM NaCl
Spaltung mit Protease V8	15 kDa Fragment + Peptide	Peptide < 10 kDa
Antigen 5 spezifische monoklonale Antikörper	Detektion durch 8E3, 1E11	Detektion nur mit 8E3 möglich
Frequenz IgE-Reaktivität mit Allergikern	> 95%	<10%
Allergene Potenz	ähnlich nAntigen 5	>10 x geringer als nAg5

- 20 Das Verfahren gemäß der Erfindung ist für alle Arten von Insektengiftallergenen geeignet. Die verwendeten Aufreinigungstechniken sowie rekombinante Klonierungs- und Expressionstechniken sind dem Fachmann bekannt und zugänglich und können durch bekannte ähnliche Verfahrenstechniken ersetzt werden.

WO 01/40266

PCT/EP00/11776

Patentansprüche

1. Rekombinantes Insektenallergen, dadurch gekennzeichnet, daß es eine verminderte IgE-Reaktivität, bzw. Allergenität besitzt.
5
2. Rekombinantes Insektenallergen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Allergenität bis zu 95 % im Vergleich zum natürlichen Allergen reduziert ist.
10
3. Rekombinantes Wespen-Insektenallergen nach Anspruch 1 oder 2.
4. Rekombinantes Hauptallergen Antigen 5 aus *Vespula vulgaris* und *Vespula germanica* nach Anspruch 3.
15
5. Verfahren zur Gewinnung von im wesentlich reinen rekombinanten Insektengiftallergenen dadurch gekennzeichnet, daß die allergenen Proteine in Bakterienzellen in unlöslicher Form als "inclusion bodies" hergestellt werden, besagte unlösliche Aggregate denaturiert werden und die denaturierten Produkte durch Dialyse in lösliche, monomere Allergene unterschiedlicher Faltungskonformationen überführt und isoliert werden.
20
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Denaturierung mit Guanidinium-Chlorid ohne Zusatz von Reduktionsmitteln erfolgt.
25
7. Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Insektengiftallergenen mit verminderter Allergenität, bzw. IgE-Reaktivität nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Dialyse saure Puffer eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Natriumacetat-Puffer mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0 eingesetzt wird.
30

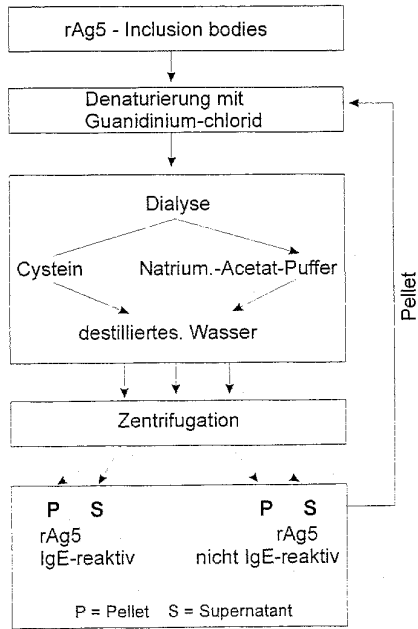
WO 01/40266

PCT/EP00/11776

9. Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Insektengiftallergenen mit normaler Allergenität, bzw. IgE-Reaktivität nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Dialyse Cystein-haltige Lösungen eingesetzt werden.
- 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Allergene der Spezies *Vespula spec.*, insbesondere *Vespula vulgaris* und *Vespula germanica*, *Paravespula spec.* und *Apis mellifera* verwendet werden.
- 10 11. Rekombinantes Wespengiftallergen, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8.
12. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend ein rekombinantes Allergen gemäß der Ansprüche 1 bis 4 oder 11 sowie entsprechende Hilfs- und Trägerstoffe.
- 15 13. Verwendung von Insektengiftallergenen, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9, zur in-vitro Diagnose von Insektenstichallergien.

Abbildung 1: Fließschema zum Verfahren

rAg5 = rekombinantes Antigen 5



【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Juni 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/40266 A3(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/435, (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH;
A61K 38/17, G01N 33/68, A61P 37/08 Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11776

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. November 2000 (27.11.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 57 904.0 1. Dezember 1999 (01.12.1999) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungstaaten mit Ausnahme von
US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder (für alle Bestimmungstaaten mit Ausnahme von
US): SUCK, Roland [DE/DE]; Mühlenkamp 19, 22303
Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CROMWELL, Oliver
[DE/DE]; Loenshöhe 2, 21465 Westorf (DE). FIEBIG,
Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, 21493 Schwarzenbek
(DE).(81) Bestimmungstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Bestimmungstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 28. Februar 2002Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.(54) Title: INSECT POISON ALLERGENS WITH REDUCED IGE REACTIVITY AND METHOD FOR PRODUCING THE
SAMEA3 (54) Bezeichnung: INSEKTENGIFT-ALLERGENE MIT VERMINDERTER IGE-REAKTIVITÄT UND VERFAHREN ZU IH-
RER HERSTELLUNGWO 01/40266 (57) Abstract: The invention relates to recombinant insect poison allergens and to a specific method for producing them. Said
allergens can be varied according to whether they are produced using folds (conformations) that are identical or different to those
that occur naturally. The proteins with folds that do not occur naturally have a reduced IgE reactivity or allergenicity and can therefore
be used as therapeutic agents in the immunotherapy of allergies.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante Insektengift-Allergene sowie ein Verfahren zu ihrer gezielten Her-
stellung, wobei sich besagte Allergene je nach Durchführung des Herstellungsverfahrens durch naturidentische oder naturfremde
Faltungen (Konformationen) unterscheiden lassen. Dabei zeigen die Proteine mit naturfremder Faltung eine verminderte IgE-Reak-
tivität bzw. Allergenität und lassen sich so als Therapeutikum in der Immuntherapie von Allergien einsetzen.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 00/11776		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/435 A61K38/17 G01N33/68 A61P37/08				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	KING T.P. ET AL.: "Murine T and B cell response to natural and recombinant hornet venom allergen Dol m 5.02 and its recombinant fragments" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1995, pages 577-584, XP002173770 page 578 ("Expression of r-Dol m 5 and its fragments"; "Immunization of mice") abstract --- -/-	1,2,12		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 7 August 2001	Date of mailing of the international search report 31/08/2001			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3010	Authorized officer Schmidt, H			

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 00/11776
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	SUCK R. ET AL.: "Purification and immunobiological characterization of folding variants of the recombinant major wasp allergen ves v 5 (antigen 5)" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 121, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 284-291, XP001010205 the whole document	1-13
X	MONSALVE R.I. ET AL.: "Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (<i>Vespa vulgaris</i>) and paper wasp (<i>Polistes annularis</i>), in bacteria and yeast" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 16, August 1999 (1999-08), pages 410-416, XP002173771 cited in the application page 414, column 1, paragraph 2 -page 415, column 1, paragraph 2; figure 5	1-4,11
X	SOLDATOVA L.N. ET AL.: "Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with <i>Escherichia coli</i> " THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 101, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 691-698, XP001014760 cited in the application page 692 "Expression of Hya in <i>E.coli</i> , purification, and refolding"; abstract	1,2,5
A	FÖRSTER E. ET AL.: "Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with hymenoptera allergy" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 95, no. 6, June 1995 (1995-06), pages 1229-1235, XP001014781 abstract	1-4

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11776

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/435 A61K38/17 G01N33/68 A61P37/08		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Batr. Anspruchs Nr.
X	KING T.P. ET AL.: "Murine T and B cell response to natural and recombinant hornet venom allergen Do1 m 5.02 and its recombinant fragments" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 154, 1995, Seiten 577-584, XP002173770 Seite 578 ("Expression of r-Do1 m 5 and its fragments"; "Immunization of mice") Zusammenfassung --- -/--	1, 2, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
¹⁾ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : <ul style="list-style-type: none"> *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Thematik angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsberechtigter Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsberechtigter Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist 		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts	
7. August 2001	31/08/2001	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2940, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Beauftragter Schmidt, H	

6

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Int. Ionales Aktenzeichen
 PCT/EP 00/11776

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bezt. Anspruch Nr.
X,P	SUCK R. ET AL.: "Purification and immunobiological characterization of folding variants of the recombinant major wasp allergen ves v 5 (antigen 5)" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, Bd. 121, 1. April 2000 (2000-04-01), Seiten 284-291, XP001010205 das ganze Dokument ---	1-13
X	MONSALVE R.I. ET AL.: "Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (<i>Vespa vulgaris</i>) and paper wasp (<i>Polistes annularis</i>), in bacteria and yeast" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 16, August 1999 (1999-08), Seiten 410-416, XP002173771 in der Anmeldung erwähnt Seite 414, Spalte 1, Absatz 2 -Seite 415, Spalte 1, Absatz 2; Abbildung 5 ---	1-4,11
X	SOLDATOVA L.N. ET AL.: "Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with <i>Escherichia coli</i> " THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, Bd. 101, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 691-698, XP001014760 in der Anmeldung erwähnt Seite 692 "Expression of Hya in <i>E.coli</i> , purification, and refolding"; Zusammenfassung ---	1,2,5
A	FÖRSTER E. ET AL.: "Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with hymenoptera allergy" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, Bd. 95, Nr. 6, Juni 1995 (1995-06), Seiten 1229-1235, XP001014781 Zusammenfassung -----	1-4

6

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Q

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, T J, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 サック、 ローラント

ドイツ連邦共和国 2 2 3 0 3 ハンブルク ミューレンカンブ 1 9

(72) 発明者 クロムヴェル、 オリヴァー

ドイツ連邦共和国 2 1 4 6 5 ヴェントルフ ロエンスヘーエ 2

(72) 発明者 フィービク、 ヘルマット

ドイツ連邦共和国 2 1 4 9 3 シュヴァルツェンベク ベッカーヴェーク 1 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA38 CA04 EA04 GA11

4B064 AG01 AG31 CA02 CA19 CC24 CE06

4C085 AA02 BB03 CC24 DD02 DD41 DD62 DD86 EE06 FF24

4H045 AA10 AA20 AA30 CA51 DA83 EA22 FA72 FA73 GA01 GA10

HA05

专利名称(译)	具有降低的IgE反应性的昆虫毒液过敏原及其制备方法		
公开(公告)号	JP2004525601A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2001541021	申请日	2000-11-27
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	サックローラント クロムヴェルオリヴァー フィービクヘルマツト		
发明人	サック、ローラント クロムヴェル、オリヴァー フィービク、ヘルマツト		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/35 A61P37/08 C07K14/00 C07K14/435 C12N15/09 C12P21/00 C12P21/02		
CPC分类号	C07K14/43568 A61K39/00 C07K14/43563		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/00.D A61K39/35 A61P37/08 C07K14/435 C12P21/02.C G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA38 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE06 4C085/AA02 4C085/BB03 4C085/CC24 4C085/DD02 4C085/DD41 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA51 4H045/DA83 4H045/EA22 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/GA01 4H045/GA10 4H045/HA05		
代理人(译)	伊藤 克博		
优先权	19957904 1999-12-01 DE		
其他公开文献	JP5597336B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种重组昆虫毒液过敏原及其具体制备方法。过敏原可以根据它们是否使用与天然存在的相同折叠(构象)或使用不同折叠制造而变化。非天然存在的折叠蛋白的IgE反应性或变应原性降低,因此可用作过敏性免疫疗法中的治疗剂。

