



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 837 T2 2005.03.17**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 868 198 B1**

(51) Int Cl.7: **A61K 47/48**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 837.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL96/00181**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 940 708.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/22364**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.12.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **26.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.03.2005**

(30) Unionspriorität:

11643695 18.12.1995 IL

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem/Jerušalajim, IL

(72) Erfinder:

FISHMAN, Ala, 91120 Jerusalem, IL; YARKONI, Shai, 91120 Jerusalem, IL; LORBERBOUM-GALSKI, Haya, 91120 Jerusalem, IL

(74) Vertreter:

Haseltine Lake Partners GbR, 81669 München

(54) Bezeichnung: **FCepsilon-PE, EIN CHIMÄRES PROTEIN FÜR DIE GEZIELTE BEHANDLUNG ALLERGISCHER REAKTIONEN, EINE METHODE FÜR DESSEN HERSTELLUNG UND PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN DIE DAS PROTEIN BEINHALTEN**

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 Erfindung betrifft allgemein einen neuen Therapieansatz für allergische Reaktionen. Die Erfindung betrifft insbesondere ein chimäres FcεRI-PE-Protein zur gezielten Eliminierung von FcεRI-exprimierenden Zellen, ein Verfahren zu seiner Herstellung und pharmazeutische Zusammensetzungen damit. Das chimäre Protein besteht aus einem Zelltargetingrest aus dem IgE-Molekül, der mit Zelltötungskomponenten verknüpft ist, die Zellen, welche den spezifischen Rezeptor überexprimieren, erkennen und töten. Die im erfindungsgemäßen Chimärenprotein verwendete Tötungskomponente ist das Bakterientoxin Pseudomonas exotoxin (PE) – ein Produkt der Pseudomonas aeruginosa.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Rund zwanzig Prozent der Weltbevölkerung leiden an unterschiedlichen allergischen Erkrankungen wie Asthma, allergische Rhinitis, Lebensmittelallergie, atopischer Dermatitis und Anaphylaxie. Der besorgniserregende Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen im letzten Jahrzehnt zeigt einen klaren Bedarf an einer wirksameren Behandlung.

[0003] Die Wechselwirkung zwischen IgE und Mastzellen oder Basophilen ist der primäre Effektorweg in allergischen Reaktionen. IgE bindet an den hochaffinen Rezeptor (FcεRI), da sein konstanter Teil fast ausschließlich an der Oberfläche dieser Zellen gefunden wird. Die Bindung selbst führt trotz der niedrigen Dissoziationsrate nicht zu einer Stimulation der Zelle. Die Vernetzung von dem an der Zelloberfläche gebundenen IgE durch das multivalente Antigen bewirkt aber eine Aggregation des Rezeptors und startet eine plötzliche Zelldegranulation, wobei Allergievermittler wie Histamin und Serotonin freigesetzt werden.

[0004] Dass die Ausschüttung des FcεRI-Rezeptors auf Zellen beschränkt ist, die an der allergischen Reaktion beteiligt sind, macht sie zu interessanten Kandidaten für die zielgerichtete Immuntherapie mit chimären Zytotoxinen. Chimäre Zytotoxine sind eine neue Klasse Targetingmoleküle, die durch Genfusion hergestellt werden können. Sie setzen sich zusammen aus Zelltargeting- und Zelltötungs-Komponenten und können Zellen, welche bestimmte Rezeptoren überexprimieren, erkennen und eliminieren.

[0005] Das in den Chimärprotein-Konstrukten verwendete bakterielle Toxin Pseudomonas exotoxin (PE) ist ein Produkt der Pseudomonas aeruginosa. Nach Eintritt in das Zytoplasma inhibiert das PE durch seine ADP-Ribosylierungsaktivität die Proteinsynthese und führt so zum Tod der Zelle (Middleb-

rook, J.I., und Dorland, R.B. 1984, Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. Microbiol. Rev. 48, 199.). Wirksame Chimäre Zytotoxine wurden hergestellt durch die Fusion von cDNAs, welche verschiedene Wachstumsfaktoren bzw. Einzelketten-Antikörper kodieren, mit der eines PE-Derivats, der die immanente Fähigkeit zur Bindung an einer Zelle fehlt. Eines dieser chimären Proteine heißt IL₂-PE₄₀. Es ist so aufgebaut, dass es gezielt aktivierte T-Zellen, welche IL₂-Rezeptoren überexprimieren, hergestellt zur Erfassung und selektiven Eliminierung, binden und vernichten kann. Es besitzt nachweislich eine effektive und selektive immunsuppressive Wirkung in verschiedenen Modellen für Autoimmunerkrankungen, bei der Transplantatabstoßung und bei Krebs (Lorberboum-Galski, H. 1994, Interleukin 2-Pseudomonas exotoxin A (IL₂-PE₄₀) chimeric protein for targeted immunotherapy and the study of immune response. J. Toxicol.-Toxin Reviews, 13 (1), 105).

[0006] Der ganze rekombinante konstante Teil von IgE (Fcε) besitzt nach der Expression in Bakterien eine Affinität für den FcεRI-Rezeptor und zwar vergleichbar mit der des nativen IgE. Er kann auch die Basophilen sensibilisieren für eine anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung. Als man rekombinante Fragmente von Human-Fcε, exprimiert in Bakterien, auf die Bindung an den Rezeptor untersuchte, erwies sich ein Peptid mit den Resten 301–376 von den Nahtstellen der Domänen 2 und 3 des konstanten Bereichs als geeignet für eine hochaffine Bindung an den Rezeptor. Es wird auch berichtet, dass für die Bindung des Rezeptors eine Dimerisierung der ε-Kette nicht erforderlich ist (Helm, B., Marsc, P., Vercelli, D., Padlan, E., Gould, N., und Geha, R. 1988, The mast cell binding site on human immunoglobulin E. Nature 331, 180.).

[0007] US-A-5,082,927 offenbart ein chimäres Protein IL₄-PE₄₀, das selektiv Zellen tötet, die IL-4-Rezeptoren tragen. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die dieses Fusionsprotein enthalten, sowie ihre Anwendung zur Behandlung bestimmter Tumoren sind ferner beschrieben.

[0008] WO-A-90/12592 betrifft ein Fusionsprotein mit PE₄₀ als Tötungs-Rest und einem Antikörper als Targeting-Rest. Ein spezifischer FcεRI-Targeting-Rest ist nicht offenbart, ebenso wenig ein Fusionsprotein zur Behandlung von allergischen Reaktionen, Hyperplasie und allergischen Erkrankungen.

[0009] Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein weiteres chimäres Fusionsprotein bereitzustellen, das als aktive Substanz in pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzt werden kann. Diese Aufgabe wird durch das in Anspruch 1 offenbarte Protein gelöst. Pharmazeutische Zusammensetzungen und Verwendungen dieser Proteine sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

[0010] Die Erfindung betrifft im Allgemeinen einen neuen Ansatz für die Therapie allergischer Reaktionen. Derzeit sind die am meisten bekannten Medikamentengruppen zur Behandlung von Asthma und Allergieerkrankungen:

1. β_2 -Agonisten – sie bewirken eine Erweiterung der Atemwege durch eine Stimulation von β_2 -adrenergen Rezeptoren.
2. Methylxanthine – Relaxantien für glatte Muskeln – bewirken eine Erweiterung der Bronchien.
3. Glukokortikoide – vermindern Entzündungen.
4. Cromolynnatrium – verhindern eine Degranulierung der Mastzellen.
5. Antihistaminika – unterbrechen die Wirkung von Histamin auf seine Zielzellen.

[0011] Trotz ihrer weiten Verwendung besitzen diese Medikamente in vieler Hinsicht erhebliche Nachteile:

1. Spezifität: Mit Ausnahme von Cromolynnatrium wirken diese Medikamente nicht spezifisch auf die Mastzellen. Sie können somit nicht die Freisetzung der Allergievermittler unterbinden, sondern sie blockieren die Wirkungen oder drehen sie um. Die Behandlung mit diesen Arzneimitteln ist auf die Symptome gerichtet. Sie kann erst nach Ausbruch der allergischen Reaktion beginnen und erlaubt somit keinen prophylaktischen Einsatz der Medikamente.
2. Toxizität: Sie sind nicht spezifisch. Die Medikamente wirken auf die verschiedenen Gewebe und Organe und haben erhebliche Nebenwirkungen. Die wichtigste Nebenwirkung von β_2 -Agonisten ist Tremor; sie verursachen aber auch Herzrhythmusstörungen. Methylxanthine stimulieren das zentrale Nervensystem, verursachen Nervosität, Übelkeit, Brechreiz, Anorexie, Kopfschmerz und Herzmuskel-bedingte Tachycardie. Bei hohen Plasmaspiegeln besteht die Gefahr von Krämpfen und Arrhythmien. Antihistaminika beeinflussen das Zentralnervensystem und wirken sedierend. Steroide sind besonders schädigend. Sie unterdrücken die Funktion von Hypophyse und Niere, stören den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt, verursachen Bluthochdruck, Hyperglykämie, erhöhte Infektionsanfälligkeit, Osteoporose und bei Kindern eine Hemmung Wachstums.
3. Zeitdauer der Wirkung: β -adrenerge Agonisten, Aminoxanthine und Antihistaminika sind zumeist nur kurzfristig wirksame Medikamente und müssen als solche regelmäßig verabreicht werden. Steroide sind langfristig wirkende Medikamente, haben eine lange Induktionszeit und sind in Notfällen nur von geringem Nutzen.

[0012] Das einzige mastzellenspezifische Medikament ist Cromolynnatrium. Dieses Medikament kann prophylaktisch und im wesentlichen ohne Nebenwirkungen verabreicht werden. Es hat jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit, eine lange Induktionszeit, es

kann nur lokal angewendet werden und nur ein Teil der Patienten spricht darauf an. Diese Faktoren begrenzen alle den Einsatz von Cromolynnatrium.

[0013] Seit einigen Jahren versucht man die Wechselwirkung zwischen IgE und seinem hochaffinen Rezeptor als Ansatzpunkt für die Behandlung von Allergien zu verwenden. Rekombinante Peptide, die Teilstrukturen von IgE oder Fc ϵ RI enthalten, wurden untersucht auf eine kompetitive Inhibierung der Wechselwirkung zwischen IgE und Fc ϵ RI (Helm, B., Kebo, D., Vercelli, D., Glovsky, M.M., Gould, H., Ishizaka, K., Geha, R., und Ishizaka, T., 1989, Blocking the passive sensitization of human mast cells and basophil granulocytes with IgE antibodies by a recombinant human ϵ -chain fragment of 76 amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9465; sowie Ra, C., Kuromitsu, S., Hirose, T., Yasuda, S., Furuichi, K., und Okumura, K. 1993, Soluble human high affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. Int. Immunol. 5, 47; Haak-Frendscho, M., Ridgway, J., Shields, R., Robbins, K., Gorman, C., und Jardieu, P., 1993, Human IgE receptor α -chain IgG chimera blocks passive cutaneous anaphylaxis reaction in vivo. J. Immunol. 151, 351). Monoklonale Antikörper gegen IgE, welche die Bindung von IgE an den Rezeptor blockieren, ohne eine Degranulation der Mastzellen hervorzurufen, wurden ebenfalls getestet (Baniyash, M., und Eshhar, Z. 1984, Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. Eur. J. Immunol. 14, 799) oder gegen Fc ϵ RI (Kitani, S., Kraft, D., Fischler, C., Mergenhagen, S.E., und Siraganian, R. P. 1988, Inhibition of allergic reactions with monoclonal antibody to the high affinity IgE receptor. J. Immunol. 140, 2585.). Jedoch ist die Affinität von IgE zu Fc ϵ RI sehr hoch ($K_M=10^{-10}M$), so dass das IgE-Molekül – einmal an seinen Rezeptor gebunden – einige Wochen an der Zellmembran verbleibt. Überdies kann die Mastzelle bei niedriger Rezeptorbelegung aktiviert werden – eine Quervernetzung von unter 5% der Rezeptoren genügt, um eine Degranulation der Mastzellen auszulösen. Diese beiden Eigenschaften des Systems erschweren die Hemmung durch Kompetitoren und mindern so ihren klinischen Wert. Das vorliegende antiallergische Molekül hängt in sehr viel weniger von der Konkurrenz mit IgE ab. Einmal in die Zielzelle über einen nichtbesetzten IgE-Rezeptor eingedrungen, wirkt das chimäre Protein auf die Zielzelle. Darüber hinaus sollte die frühe Expression des Rezeptors bei der Mastzellreifung unreife Zielzellen vor der Freisetzung der Mediatoren ausschalten. Da der Rezeptor nicht auf Stammzellen exprimiert wird, ist insgesamt keine Schädigung des Knochenmarks zu erwarten.

[0014] Das IgE-System ist sehr vielschichtig und komplex. Die Wechselwirkungen zwischen IgE und den Bindestrukturen dienen vielen Funktionen jenseits der allergischen Reaktion, von denen sich eini-

ge erst abzuzeichnen. Monoklonale Antikörper gegen IL-4, gegen den IL-4-Rezeptor oder den niederaffinen IgE-Rezeptor unterdrücken in Maus die Expression von IgE, haben aber eine allgemeinere immunsuppressive Wirkung. Der Vorteil der Erfindung ist darin ersichtlich, dass der hochaffine IgE-Rezeptor zielgerichtet ist und nicht das IgE-System insgesamt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Die Erfindung betrifft allgemein einen neuen Ansatz für die Therapie allergischer Reaktionen, die auf der gezielten Tötung von Zellen, welche den Fc ϵ -RI-Rezeptor exprimieren, durch das chimäre Zytotoxin Fc₂₋₃-PE₄₀ beruht. Eine Sequenz, welche die Aminosäuren 301–437 aus der Fc-Region des Maus-IgE-Moleküls kodiert, wurde genetisch fusioniert mit PE₄₀ – einer trunkierten Form von PE, der die Zellbindungsdomäne fehlt. Das chimäre, in *E. coli* erzeugte Protein tötet spezifisch und effizient sowohl Maus-Mastzelllinien, die den Fc ϵ -RI-Rezeptor exprimieren, als auch primäre Mastzellen, die vom Knochenmark stammen.

[0016] Die Erfindung stellt ein chimäres Protein zur gezielten Eliminierung von Fc ϵ -RI exprimierenden Zellen bereit, das besonders geeignet für die Therapie allergischer Reaktionen ist. Dieses chimäre Protein besteht aus einer Zelltargeting-Komponente für die Fc ϵ -RI-exprimierenden Zellen und einer Zelltötungs-Komponente. Die bevorzugte Tötungskomponente ist das bakterielle Toxin *Pseudomonas* exotoxin (PE). Dieses *Pseudomonas* exotoxin ist ein Produkt der *Pseudomonas aeruginosa*.

[0017] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung des Proteins. Dieses chimäre Protein wird hergestellt durch gentechnisches Fusionieren der Fc-Region des Maus-IgE-Moleküls mit PE₄₀, welches eine trunkierte Form von PE ist, der die Zellbindungsdomäne fehlt.

[0018] Ebenso stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Allergierkrankungen sowie zur Behandlung von Hyperplasien und malignen Tumoren bereit, welche als wirksamen Bestandteil das oben erwähnte chimäre Protein und ein herkömmliches Adjuvanz umfasst.

[0019] Die Erfindung stellt darüber hinaus ein Verfahren zur Herstellung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bereit, welche die gentechnisch fusionierte Fc-Region des Maus-IgE-Moleküls zu PE₄₀ und – sofern nötig – als Zusatz ein herkömmliches Adjuvanz umfassen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können entsprechend der Erfindung in jeder geeigneten Form als Injektion, in topischer Anwendung oder zur oralen Verabreichung bereitgestellt werden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0020] Das erfindungsgemäße chimäre Fc-PE-Protein weist gegenüber den bekannten Medikamenten eine Reihe von Vorzügen auf:

1. Spezifität: Fc-PE ist hochspezifisch und greift nur Zellen (Mastzellen und Basophile) an, die für die Freisetzung der Allergiemediatoren verantwortlich sind. Da es den allergischen Anfall verhindert, kann es als Mittel zur prophylaktischen Behandlung von großem Wert sein.
2. Toxizität: Da es auf die Effektorzellen und nicht auf deren Zielorgane wirkt, sind von Fc-PE – wenn überhaupt – nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. Da der Rezeptor ferner nicht auf Stammzellen exprimiert wird, sind auch keine Schädigungen des Knochenmarks oder eine immunsuppressive Wirkung anzunehmen. Die Wiederherstellung eines normalen physiologischen Zustandes ist innerhalb weniger Wochen nach Ende der Behandlung zu erwarten.
3. Zeitdauer der Wirkung: Da die Reifung der Mastzellen einige Wochen in Anspruch nimmt, ist der Wirkung von Fc-PE ein Langzeiteffekt zuzusprechen, womit die Notwendigkeit der häufigen Verabreichung entfällt. Die Ergebnisse von in-vitro-Studien haben überdies gezeigt, dass die zelluläre Proteinsynthese in weniger als 4 Stunden um 80% reduziert wird, so dass eine relativ kurze Induktionszeit für Fc-PE anzunehmen ist. Es kann somit in der Akutphase allergischer Reaktionen eingesetzt werden.

[0021] Fc ϵ -PE ist auch wertvoll für die Behandlung von Hyperplasien und Malignitäten der Mastzellen und Basophilen, z.B. der systemischen Mastozytose (von der gut- als auch der bösartigen Form) und der Basophilenleukämie. Wegen der massiven Nebenwirkungen ist Patienten mit benigner Mastozytose eine Chemotherapie nicht möglich. Auch gibt es kein gutes klinisches Verfahren zur Behandlung maligner Erkrankungen. Das chimäre Fc ϵ -PE-Protein kann wegen seiner hohen Wirksamkeit und Selektivität sowohl bei gut- als auch bei bösartige Erkrankungen eingesetzt werden, wenn Fc ϵ -RI-Rezeptor exprimierende Zellen daran beteiligt sind.

[0022] Die nachstehende Versuchsergebnisse zeigen, dass das erfindungsgemäße chimäre Fc₂₋₃-PE₄₀-Protein ein vielversprechender Kandidat für eine wirksame und gezielte Allergitherapie ist.

[0023] Die Erfindung stellt ein chimäres zytotoxisches Fc ϵ -PE-Protein zur gezielten Eliminierung Fc ϵ -RI exprimierender Zellen bereit, welches insbesondere geeignet ist für die Therapie allergischer Reaktionen wie Asthma, allergische Rhinitis, Lebensmittelallergien, atopische Dermatitis und Anaphylaxie.

[0024] Es wird nun die Erfindung im Einzelnen anhand der nachstehenden Versuche näher beschrieben. Diese Versuche dienen der Veranschaulichung und Klarstellung der Erfindung. Sie ist aber nicht hierauf beschränkt.

1. Konstruktion einer Fc ϵ -PE₄₀-Proteinchimäre.

[0025] Für die Targeting-Komponente der Proteinchimäre wurden Fragmente der konstanten Region (Fc ϵ) von Maus-IgE verwendet, da sie sowohl an humane als auch an hochaffine Maus-IgE-Rezeptoren binden (Conrad, D. H., Wingard, J.R., und Ishizaka, T. 1983, The interaction of human and rodent IgE with the human basophil IgE-receptor. *J.Immunol.* 130, 327.).

[0026] Wir haben eine den Aminosäuren 301–437 entsprechende Sequenz eingesetzt, die den CO-OH-Terminus der Domäne 2 und die gesamte Domäne 3(C₂'-C₃) enthält. Ebenso haben wir eine den Aminosäuren 225–552 entsprechende Sequenz eingesetzt, welche die gesamten C₂-C₄-Domänen enthält. Die cDNA für diese Fragmente wurde mittels RT-PCR aus von B-Zellen der Maus isolierter RNA gewonnen, die nach einer Isotop-Umschaltung IgE sowie einen spezifischen Primersatz sezernierten. Aus der Milz einer 6 Wochen alten BALB/c-Maus gewonnene B-Zellen wurden durch eine Negativauswahl unter Verwendung von anti-Thy1.2 und Kaninchen-Komplement getrennt. Die Zellen (2×10⁶ Zellen/ml) wurden in Anwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS, 10 µg/ml) und IL-4 (500 U/ml) 5 Tage inkubiert, um eine Isotop-Umschaltung zur Erzeugung von IgE zu induzieren. Nach 5 Tagen wurde die Gesamtmenge an Zell-RNA isoliert (RNAzol™ B-Isolationskit, hergestellt von der Fa. Biotex Laboratories, Houston, USA.). Die Gesamt-RNA (2,5 µg) wurde anschließend unter Verwendung des Reverse Transcription System (Fa. Promega, USA) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in Erststrang-cDNA reverse transkribiert. Die cDNA wurde anschließend auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit TE-Puffer (10 mM TRIS-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) verdünnt und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

[0027] Es wurden mittels PCR Fc ϵ -Fragmente unter Verwendung von cDNA und einem Paar synthetischer Oligonukleotidprimer 5'-GCG GAT CCC ATA TGG AGC AAT GGA TGT CGT-3' (Sense, beginnend am Nukleotid 406 nach Genbanksequenz J00476) und 5'-GCG GAT CCC ATA TGT GGG GTC TTG GTG ATG GAA C-3' (Antisense, beginnend am Nukleotid 813) für die Fc₂₋₃-Sequenz und 5'-GCG GAT CCC ATA TGC GAC CTG TCA ACA TCA CTG-3' (Sense, beginnend am Nukleotid 175) und 5'-GCG GAT CCC ATA TGG GAG GGA CGG AGG GAG G-3' (Antisense, beginnend am Nukleotid 1167) für die Fc ϵ ₂₋₄-Sequenz erzeugt.

[0028] Synthetische Oligonukleotide wurden auf einem DNA-Synthesizer der Fa. Applied Biosystems synthetisiert und auf Kartuschen zur Aufreinigung von Oligonukleotiden aufgereinigt. Es wurde das Vent-Polymerase™-Enzym (Fa. Biolabs) zur Amplifikation verwendet. Die Reaktionsmischung wurde in einem DNA-Thermocycler (MJ Research, Inc., USA) 33 Zyklen lang inkubiert. Jeder Zyklus bestand aus 1 min bei 95°C, 1 min bei der Annealingtemperatur und 2 min bei 72°C. Die MgSO₄-Konzentration und die für jeden Primer verwendete Annealingtemperatur war: 2,5 mM und 61°C für Fc₂₋₃' und 2 mM und 57°C für Fc₂₋₄.

[0029] Das pHL906-Plasmid, welches IL₂-PE₄₀ kodiert, ist zuvor beschrieben worden (Fishman, A., Bar-Kana, Y., Steinberger, I., und Lorberboum-Galski, H., 1994, Increased cytotoxicity of IL2-PE chimeric proteins containing targeting signal for lysosomal membranes. *Biochem.* 33, 6235.). Das pHL906-Plasmid wurde mittels NdeI geschnitten und ergab so das größere Fragment von 3596 bp. Das obige Fc ϵ -Fragment wurde in die NdeI-Seite von pHL906 eingefügt. Die sich daraus ergebenden Plasmide pAF2302 und pAF2415, kodierend für die jeweiligen Fragmente C₂-C₃ und C₂-C₄, jedes am 5'-Ende fusioniert zu PE₄₀, wurden mittels Restriktions- und Sequenzanalyse charakterisiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur Transformation und Herstellung der Plasmide wurde der Escherichia coli Bakterienstamm HB101 verwendet.

1. Exprimierung und teilweise Aufreinigung der chimären Proteine

[0030] Das neu konzipierte, durch das Plasmid pAF2302 kodierte chimäre Fc ϵ -PE₄₀-Protein wurde im E. coli Stamm BL21 (lambda-DE3) exprimiert, der ein T7 RNA-Polymerasegen in lysogener und induzierbarer Form trägt. Die Induktion erfolgte über 180 min bei OD₅₀₀ 0,5 mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG, 1 mM Endkonzentration). Ein Pellet exprimierender Zellen wurde in 0,2 mg/ml Lysozym-haltigem TE-Puffer (50 mM TRIS, pH 8,0, 1 mM EDTA) suspendiert, mit Ultraschall aufgeschlossen (3x 30 s Pulse) und 30 min bei 30000 xg zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde abgetrennt und zur Untersuchung gelagert. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M TRIS pH 8,6, 1 mM EDTA, 0,05 M NaCl und 10 mM DTT) denaturiert und 30 min bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde mittels Zentrifugation 15 min bei 30000 xg geklärt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde anschließend gegen 0,1 M Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,25 mM NaCl und 0,25 mM L-Arginin 16 h dialysiert. Das Dialysat wurde 15 min bei 15000 xg zentrifugiert und der sich daraus ergebende Überstand (mit Guanidiniumhydrochlorid behandelte, nichtlösliche Fraktion) als Quelle der chimären Proteine eingesetzt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese (siehe Fig. 2)

charakterisiert. Das Proteinprofil der gesamten Zell-extrakte zeigte die hohen Expressionsspiegel des chimären Proteins auf.

[0031] Das Protein wurde weiter mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen PE (siehe **Fig. 3A**) und gegen IgE (Fa. Serotec, England) (siehe **Fig. 3B**) charakterisiert. Die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proben wurden auf Nitrozellulose übertragen und wie beschrieben im Immunoblot eingesetzt (Lorberboum-Galski, H., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V., Ashya, S., und Pastan, I., 1988, Cytotoxic activity of an interleukin 2 – Pseudomonas exotoxin chimeric protein produced in Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1992.). Ein Vectastain ABC Kit (Fa. Vector Laboratories, USA) wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Chimäre reagierte mit beiden Antikörpern und bestätigte somit das Klonieren und die Herstellung eines chimären in-frame-Proteins in voller Länge.

[0032] Die subzelluläre Fraktionierung der exprimierenden Zellen zeigte, dass die nichtlösliche Fraktion (Inclusion Bodies) besonders reich an chimärem Protein war (siehe **Fig. 2**). Daher wurde diese Fraktion als Quelle für das chimäre Protein verwendet.

[0033] Die ADP-Ribolysierungsaktivität der getesteten Proben wurde wie bereits beschrieben unter Verwendung von mit Elongationsfaktor 2 als Substrat angereicherten Weizenkeimextrakten gemessen und bestätigte die enzymatische Aktivität des neuen chimären Proteins (Ergebnisse nicht gezeigt).

2. Wirkung des chimären Fc₂₋₃-PE₄₀-Proteins auf Maus- Mastzell-Zelllinien

[0034] Der zytotoxische Effekt des chimären Proteins wurde an verschiedenen Zelllinien von Maus-Mastzellen getestet, die bekanntermaßen den FcεRI-Rezeptor exprimieren. Die zytotoxische Aktivität des chimären Proteins wurde mittels Hemmung der Proteinsynthese über den Einbau von [³H]-Leucin gemessen. Verschiedene Konzentrationen des chimären Proteins, mit 0,25% bovinem Serumalbumin in Phosphatpuffer (PBS) gelöst, wurden zu 2×10⁴ Zellen/0,2 ml eingetragen und 20 h in 96-Well-Platten angesetzt. Es folgte eine 8 h dauernde Pulsmarkierung mit 2μCi von [³H]-Leucin. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz des Kontrollexperiments angegeben, in welchem die Zellen nicht dem chimären Protein ausgesetzt waren. Alle Assays wurden in drei verschiedenen Experimenten als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

[0035] Es wurden drei Zelllinien der Targetzellen, die FcεRI-Rezeptor exprimieren, eingesetzt: MC-9, eine aus der Leber vom Mausfötus stammende und von IL₃ für ihr Wachstum abhängige Mastzelllinie; C57, eine IL₃-unabhängige, aus dem Knochenmark

der Maus stammende Mastzelllinie; und die Abelson-Virus-transformierte Mastzelllinie, die aus unreifer Plazenta in der Graviditätsmitte der Maus stammt.

[0036] Die dosisabhängige Zytotoxizität von Fcε-PE₄₀ konnte für alle getesteten Zelllinien gezeigt werden (siehe **Fig. 4**). Die MC-9- sowie die C57-Linien reagierten äußerst empfindlich auf das chimäre Toxin mit jeweils einer ID₅₀ von 50–75 ng/ml beziehungsweise 100–125 ng/ml. Die Abelson-Zellen waren sehr viel weniger empfindlich (ID₅₀ von 1200–1500 ng/ml).

4. Spezifität der Fcε-PE₄₀-Reaktion

[0037] Um die Spezifität der Fc₂₋₃-PE₄₀-Aktivität zu verifizieren, wurden zwei Kontrollproteine PE₄₀ und Fc₂₋₃-PE_{40M} erzeugt und auf ihre Wirkung auf Target- oder Nichttargetzellen geprüft. Für die Konstruktion von Fc₂₋₃-PE_{40M} wurde die Region zur Kodierung der 122 Aminosäuren am C-terminalen Ende von PE mit EcoRI und BamHI entfernt und durch ein entsprechendes Fragment mit einer Deletion an der Aminosäure 553 ersetzt.

[0038] PE₄₀, das über keine eigenen Targeting-Eigenschaften verfügt, hatte – wie zu erwarten – keine Wirkung auf die Targetzelllinien (siehe **Fig. 4**). Fc₂₋₃-PE_{40M}, das eine Fc₂₋₃-Komponente in Verbindung zu einer mutierten, enzymatisch inaktiven Form von PE₄₀ besitzt, hatte ebenso keine zytotoxische Wirkung auf die Targetzellen (siehe **Fig. 4**).

[0039] Zudem war es möglich, die zytotoxische Wirkung von Fc₂₋₃-PE₄₀ gegen Targetzellen mittels vollständigem Maus-IgE (40 μg/ml, siehe **Fig. 5A**) oder mittels polyklonalem anti-PE-Antikörper (10 μg/ml, siehe **Fig. 5B**) zu blockieren.

[0040] Die Wirkung von Fc₂₋₃-PE₄₀ wurde auch an verschiedenen Nicht-Targetzelllinien aus Maus getestet (siehe Tabelle 1). Alle Zelllinien hämopoetischen Ursprungs blieben vom chimären Protein unbeeinflusst. Überraschenderweise sprachen Zelllinien von Fibroblasten und Hepatomen in einem bestimmten Maße auf das chimäre Toxin an, obwohl die ID₅₀-Werte um das zwanzigfache höher lagen als die der MC-9-Zellen (siehe Tabelle 1).

[0041] Die obigen Daten zeigen, dass der toxische Effekt von Fc₂₋₃-PE₄₀ auf Mastzelllinien aufgrund einer spezifischen Reaktion erfolgt, die durch die Fc₂₋₃-Komponente vermittelt wird, welche den zytotoxischen Teil der Chimäre (PE₄₀) in die Zelle trägt.

5. Wirkung chimärer Proteine auf primäre Mastzellen

[0042] Da es wahrscheinlich ist, dass frische Maus-Mastzellen anders als etablierte Zelllinien reagieren, haben wir auch von normaler Maus stammen-

de primäre Mastzellen auf ihr Ansprechen auf $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ getestet. Unter Anwesenheit von IL_3 zwei Wochen lang kultiviert, differenziert Knochenmark der Maus in eine fast reine Zellpopulation mit der Morphologie unreifer Mastzellen, die Granula enthalten und $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor exprimieren.

[0043] BALB/c-Mäuse (4 bis 6 Wochen alt) wurden getötet und das Knochenmark unter aseptischen Bedingungen aus dem Oberschenkelknochen in 0,9%ige kalte NaCl-Lösung gespült. Die Zellsuspension wurde zweimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, bei 300 xg 10 min zentrifugiert und schließlich in RPMI 1640 Medium resuspendiert, enthaltend 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 5×10^{-5} (β -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 20 U/ml rekombinantes Maus- IL_3 . Die Zellen wurden 2 bis 3 Wochen bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ml bei 37°C in 5%- CO_2 -haltiger befeuchteter Atmosphäre in Zellkulturflaschen angezüchtet. Das Medium wurde alle sieben Tage gewechselt. Ab dem siebenten Tag wurde der Kultur rekombinantes IL_4 (10 U/ml) zugegeben.

[0044] Um den Reifungsprozess zu verfolgen, wurden die Zellen auf Objektträger gegeben, mit saurem Toluidinblau (pH 1,0) gefärbt und mikroskopisch in Öl-Immersion untersucht.

[0045] Die Wirkung der chimären Proteine wurde an aus Knochenmark gewonnenen Mastzellen am 16. Tag der Kultur getestet (Bone marrow derived mast cells, BMMC). $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ hatte eine dosisabhängige Wirkung auf BMMC mit einer ID_{50} von 125 ng/ml (siehe **Fig. 6**): Bei einer hohen Dosierung von chimärem Protein erfolgte eine nahezu 100%ige Hemmung der Proteinsynthese. Keines der Kontrollproteine $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40\text{M}}$ oder PE_{40} hatte einen zytotoxischen Effekt auf BMMC (siehe **Fig. 6**). Folglich sprachen die primären Mastzellen auf das chimäre Protein ähnlich wie die etablierten Mastzelllinien an (siehe **Fig. 4** und **Fig. 6**).

6. Rezeptorspezifität von $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$

[0046] Abgesehen von dem hochaffinen $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor sind drei weitere Membranoberflächenstrukturen zur Bindung von IgE mit niedriger Affinität beschrieben – der niederaffine $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ -Rezeptor, das ϵBP -Galaktosid-bindende Protein (auch als MAC-2 oder CBP35 bezeichnet) sowie der $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ -Rezeptor. Diese Strukturen zeigen sich auf verschiedenen Zelltypen hauptsächlich hämopoietischen Ursprungs aber auch auf Fibroblasten (ϵBP). $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ und ϵBP zeigen sich zusätzlich zu $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ auf Mastzellmembranen. Da es unser Ziel war, nur Mastzellen als Target zu verwenden, war der Nachweis entscheidend, dass das chimäre Protein diese Strukturen nicht erkennt

und folglich nicht durch diese internalisiert werden kann. Theoretisch erfüllt unser chimäres Protein nicht die Bindungsanforderungen der niederaffinen IgE-Bindungsstrukturen $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$, ϵBP und $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$. $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ bindet nur disulfidverbundene ϵ -Kettendimere, während bei unserem Protein die Domäne 4 fehlt, die wesentlich für die Dimerisierung ist. ϵBP bindet nur glykosyliertes IgE – in Bakterien erzeugtes $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ ist nicht glykosyliert. $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ bindet IgE-Immunkomplexe, jedoch kein freies IgE. Dennoch wurde das Problem der Rezeptorbindung experimentell hinterfragt.

[0047] Experimente mit ϵBP und $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ wurden an C57-Mastzellen durchgeführt, die bekanntermaßen zusätzlich zu $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ diese Rezeptoren exprimieren. Um zu prüfen, ob das Chimäre Protein über die $\text{Fc}\gamma\text{RII/III}$ -Rezeptoren in die Zelle eindringen kann, wurden die Zellen vor der Zugabe des chimären Proteins mit dem 2.4G2-Antikörper (Fa. Pharmingen) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vorinkubiert. Es wurde gezeigt, dass dieser monoklonale Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne sowohl von $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ - als auch $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ -Rezeptor bindet, ein kompetitiver Inhibitor der IgE-Bindung ist. Es war kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den mit dem Antikörper vorinkubierten Zellen in der Reaktion der Zelle auf $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ zu finden (siehe **Fig. 7A**).

[0048] Als nächstes untersuchten wir, ob ϵBP an der Zytotoxizität von $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ beteiligt ist. Da ϵBP an den Kohlenhydratdeterminanten der Zellmembran hängt, verursacht die Zugabe von Laktose zum Kulturmedium dessen Dissoziation von der Zelloberfläche. Wir fanden keinen Unterschied der Reaktion der Zelle auf $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ in Anwesenheit oder Abwesenheit von Laktose (25 mM) (siehe **Fig. 7B**).

[0049] Es wurden zusätzliche Experimente an Fibroblastenzelllinien, die teilweise auf das chimäre Protein ansprechen, in Anwesenheit von 2.4G2-Antikörper und Laktose durchgeführt (siehe Tabelle 1). Wieder gab es keinen Unterschied in der $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ -Zytotoxizität gegen behandelte Zellen und Kontrollzellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

[0050] Um zu prüfen, ob $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ auf Zellen wirkt, die $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ tragen, setzten wir die Zelllinie 0.12A3 ein – ein murines B-Zell-Hybridoma, das $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ -Rezeptor exprimiert. Die 0.12A3-Zellen sprachen selbst bei hoher Dosierung (>5000 ng/ml) überhaupt nicht auf $\text{Fc}_{2-3}\text{-PE}_{40}$ an (siehe **Fig. 8**). Da diese Linie den Rezeptor in Langzeitkultur verliert, wurde dem Assay eine FACS-Analyse mit dem B3B4-Antikörper gegen den Rezeptor (Fa. Pharmingen) nachgeschaltet. Die Ergebnisse zeigten, dass der Rezeptor auf 54% der Zellen exprimiert wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

[0051] Ein weiteres Experiment wurde an frischen B-Splenozyten der Maus durchgeführt, die 16 h mit

LPS (50 µg/ml präinkubiert wurden, um die Expression von FcεRII zu stimulieren. Fc₂₋₃-PE₄₀ zeigte keine Wirkung (Ergebnisse nicht gezeigt) auf diese B-Splenozyten, obwohl 69% der Zellen den Rezeptor exprimierten, wie mittels FACS-Analyse bestimmt wurde.

[0052] Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Fc₂₋₃-PE₄₀ nicht an die niederaffinen IgE-Bindungsstrukturen, nämlich FcεRII, FcRII/III und εBP, bindet.

7. Wirkung von Fc₂₋₃-PE₄₀ auf die Zelldegranulation

[0053] Aufgrund der möglichen klinischen Anwendbarkeit von Fc₂₋₃-PE₄₀ war es wichtig zu prüfen, ob die Behandlung von Mastzellen mit Fc₂₋₃-PE₄₀ zu einer – nach der FcεRI-Bindung durch das chimäre Protein ausgelöst – Freisetzung von Allergiemediatoren führt.

[0054] C57-Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit [³H]-Hydroxytryptamin (10 µCi/ml) inkubiert. Die Zellen wurden zur Entfernung von ungebundenem [³H]-Hydroxytryptamin dreimal gewaschen, bei 2 × 10⁵ Zellen/0,5 ml in 24-Well-Gewebekulturplatten in Tyrode-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 5,6 mM Glukose, 0,5% BSA) plattiert und mit IgE (10 µg/ml) bei 4°C 1 h inkubiert. MgCl₂ und CaCl₂ wurden anschließend bis zur Endkonzentration von jeweils 1 mM beziehungsweise 1,6 mM eingetragen, gefolgt von einer 30 min dauernde Inkubation mit Dinitrophenyl-Humanserumalbumin (DNP-HSA 50 ng/ml) oder mit verschiedenen Konzentrationen von chimärem Protein für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C. Die zellfreien Überstände wurden mittels Zentrifugation gesammelt und die freigesetzte Menge an [³H]-Hydroxytryptamin gemessen. Es wurde keinerlei Degranulation bei irgendeiner der getesteten Konzentrationen von chimärem Protein beobachtet (siehe Fig. 9a). Zur Kontrolle wurden mit IgE vorinkubierte Zellen mit DNP unter den gleichen Bedingungen umgesetzt. Der Degranulationseffekt von DNP ist deutlich sichtbar (siehe Fig. 9a). Fc₂₋₃-PE₄₀ verursachte auch im späteren Stadium seiner Interaktion mit der Targetzelle keine Degranulation (siehe Fig. 9b), während es die Proteinsynthese bis zu über 80% hemmt (siehe Fig. 9c). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Fc₂₋₃-PE₄₀ zu keinem Zeitpunkt während seiner Interaktion mit der Zelle Degranulation auslöst.

8. Elektrophoretische Charakterisierung von Fc₂₋₃-PE₄₀

[0055] Die unter nichtreduzierten Bedingungen (ohne 2-Mercaptoethanol im Probenpuffer) gefahrene Western-Blot-Analyse der durch Elektrophorese aufgetrennten Proben ließ erkennen, dass das chimäre Fc₂₋₃-PE₄₀-Protein überwiegend als Monomer vorliegt (siehe Fig. 10b). Für die Native PAGE wurde auf

2-Mercaptoethanol im Probenpuffer verzichtet und die Proben nicht erhitzt. Zusätzlich wurde SDS durch das gleiche Volumen Wasser sowohl im Gel, im Probenpuffer und im Elektrodenlaufpuffer ersetzt. Unter nichtdenaturierenden Bedingungen läuft das chimäre Protein als breite Bande (siehe Fig. 10c). Ein einzelnes natives System kann nicht zwischen den Auswirkungen der molekularen Masse, der Ladung und der Konformität auf die elektrophoretischen Laufeigenschaften des Proteins unterscheiden. Jedoch zeigt die Nähe der Moleküle in der Bande an, dass in diesen Parametern keine großen Abweichungen vorliegen können.

9. Internalisierungsassay

[0056] Die in-vitro-Aktivität des chimären Proteins wird aufgrund seiner Internalisierung erzielt. Um zu prüfen, ob das chimäre Protein internalisiert wird, wurden 5 × 10⁵ Zellen /3 ml eine Stunde mit 20 µg des chimären Proteins bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde das Pellet mit 0,5 ml einer sauren Lösung (0,15 M NaCl, 0,15 M Essigsäure (pH 3)) 3 min auf Eis behandelt, um membrangebundenes chimäres Protein zu entfernen. Der pH wurde anschließend durch Zugabe von 50% FCS neutralisiert und anschließend dreimal mit RPMI/10% FCS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 0,3 ml RIPA-Lysepuffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 15% SDS, 1 % Deoxycholsäure, 1 % Nonidet P-40) lysiert. Verschiedene Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Immuno-Blot unter Verwendung von anti-PE Antikörper und dem ECL-Nachweissystem (Fa. Amersham) untersucht. Die Western Blot-Analyse zeigte zweifelsfrei, dass das chimäre Fc₂₋₃-PE₄₀-Protein in die Targetzellen internalisiert wurde (siehe Fig. 11).

Patentansprüche

1. Chimäres Protein aus einer Zelltargeting-Komponente für FcεRI-exprimierende Zellen und einer Zelltötungs-Komponente, so dass man eine gezielte Eliminierung von FcεRI-exprimierende Zellen erzielt, zur Verwendung als ein Medikament.
2. Chimäres Protein nach Anspruch 1, wobei die Zelltötungskomponente das bakterielle Toxin Pseudomonas Exotoxin (PE) ist.
3. Chimäres Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Zelltargeting-Komponente die Fc-Region vom Maus-IgE-Molekül ist.
4. Chimäres Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zelltargeting- und Zelltötungskomponenten gentechnisch verbunden wurden.
5. Chimäres Protein nach einem der Ansprüche 1

bis 4, wobei eine Sequenz, welche die Aminosäuren 225–552 aus dem Fc-Bereich des Maus-IgE-Moleküls kodiert, gentechnisch verbunden wurde mit PE₄₀ – einer trunkierten Form von PE, der die Zellbindungsdomäne fehlt.

6. Chimäres Protein nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch 1 bis 4, wobei die Sequenz, welche die Aminosäuren 301–437 aus dem Fc-Bereich von Maus-IgE-Molekül kodiert, gentechnisch verbunden wurde mit PE₄₀ – einer trunkierten Form von PE, der die Zellbindungsdomäne fehlt.

7. Verwendung eines chimären Proteins nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die auch ein pharmazeutisches Adjuvanz enthält.

8. Verwendung eines chimären Protein nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und Therapie von allergischen Reaktionen, allergischen Krankheiten, Erkrankungen, an denen FcεRI-Rezeptor exprimierende Zellen beteiligt sind, Asthma, allergische Rhinitis, Nahrungsmittelallergien, atopische Dermatitis, Anaphylaxis, Hyperplasia.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, bestimmt für eine Injektion (intravenös, intraarteriell, subcutan, intramuskulär, intraperitoneal), für eine intranasale, intrathecale, intradermale, transdermale Verabreichung, zur Inhalation, eine topische Anwendung, orale Verabreichung, verzögerte Freisetzung und den enterischen Weg.

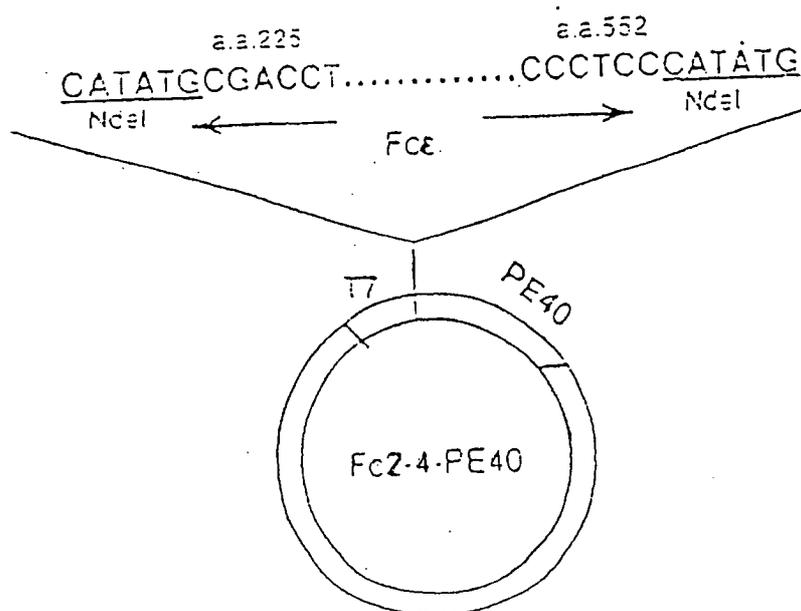
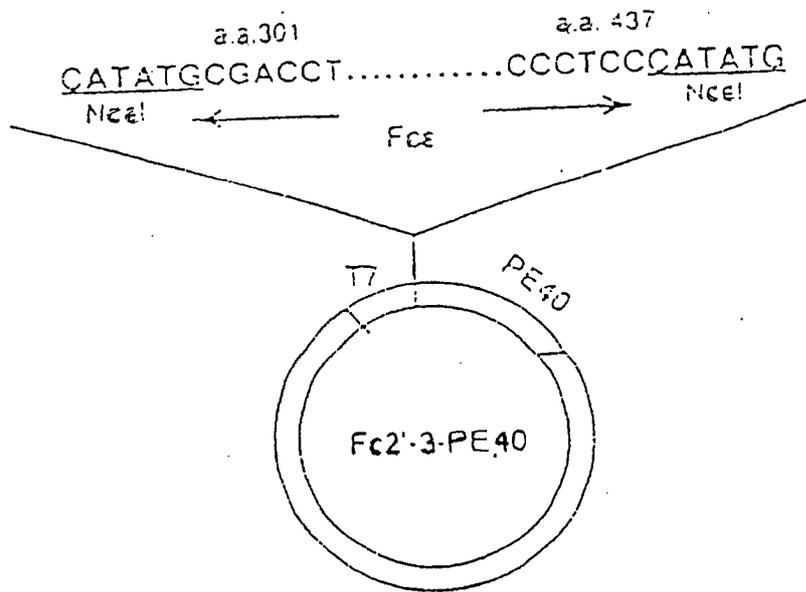
10. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 7 bis 9, umfassend den Schritt des gentechnischen Fusionierens der Fc-Region vom Maus-IgE-Molekül mit PE.

11. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 7 bis 9, umfassend die Verwendung eines Plasmids, wobei ein Promotor funktionell mit einem DNA-Molekül verbunden wird, das ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1: Zeichnung von kodierenden Plasmiden für die chimären Proteine Fc_{2'-3}-PE₄₀ und Fc₂₋₄-PE₄₀



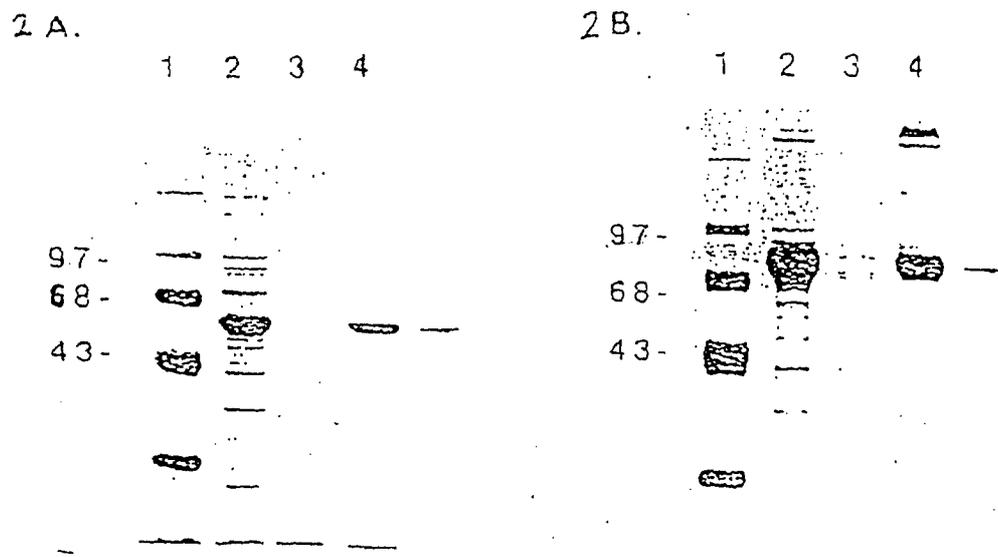


FIG. 2: Analyse der chimäres Fc_ε-PE₄₀-Protein-haltigen Zellfraktionen mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die 5 µg Gesamtprotein enthaltenden Proben wurden auf 10%ige Gele geladen. (A) Fc_ε2-3-PE₄₀ exprimierende Zellen. Spur 1, Marker; Spur 2, Gesamtzellextrakt; Spur 3, lösliche Fraktion; Spur 4, nichtlösliche Fraktion. (B) Fc_ε2-4-PE₄₀ exprimierende Zellen. Beschreibung der Fraktionen siehe A.

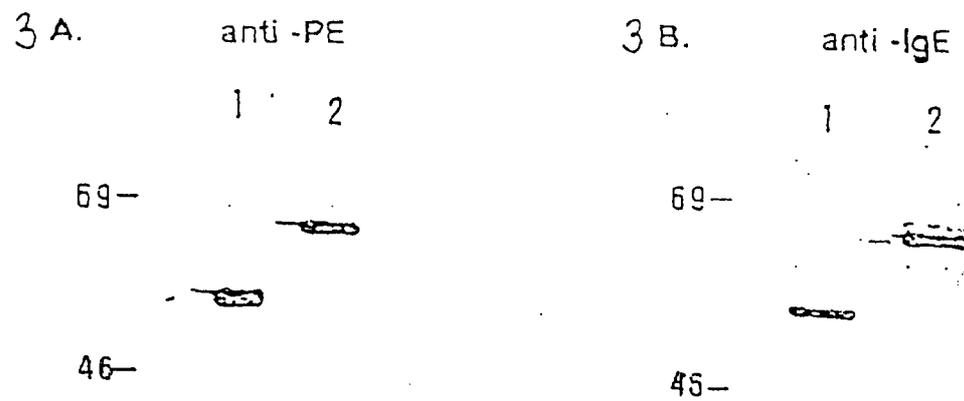


FIG. 3: Immuno-Blotting der nichtlöslichen, chimäres $Fc\epsilon$ -PE₄₀-Protein-haltigen Fraktionen mit Antikörpern gegen PE (A) und IgE (B). Proben, die 1 μ g Gesamtprotein enthalten, wurden auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgele geladen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurden auf Nitrozellulose übertragen und wie im Materialien- und Methodenteil beschrieben abgearbeitet. (A) anti-PE: Spur 1, Fc_{2-3} -PE₄₀; Spur 2: Fc_{2-4} -PE₄₀. (B) anti-IgE: Beschreibung der Spuren siehe A

4A.

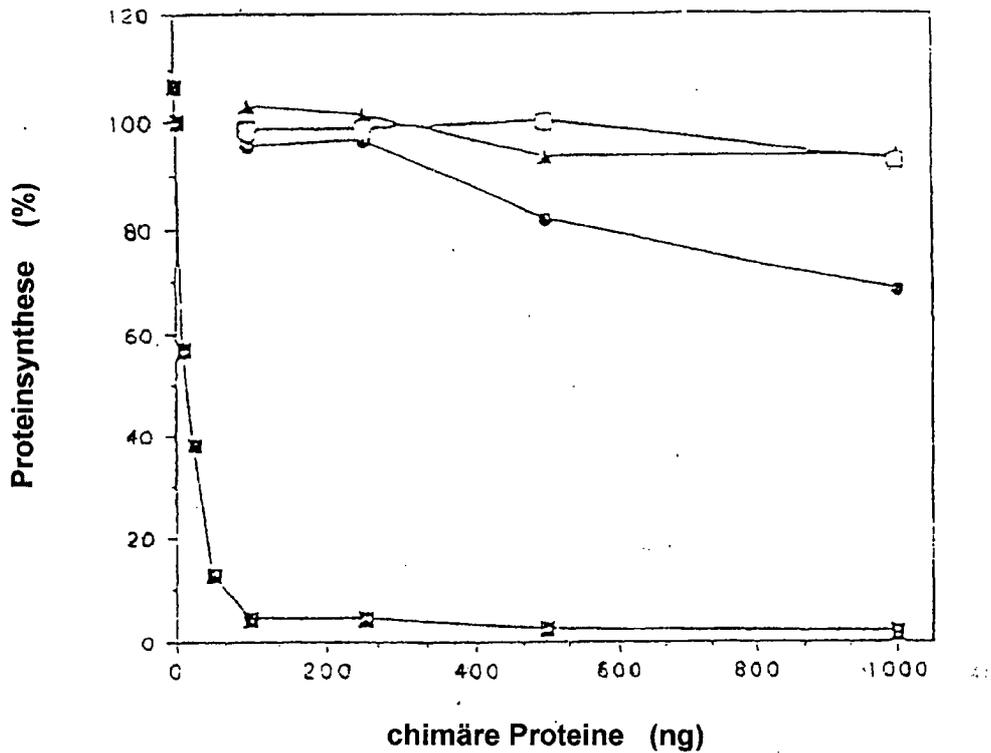
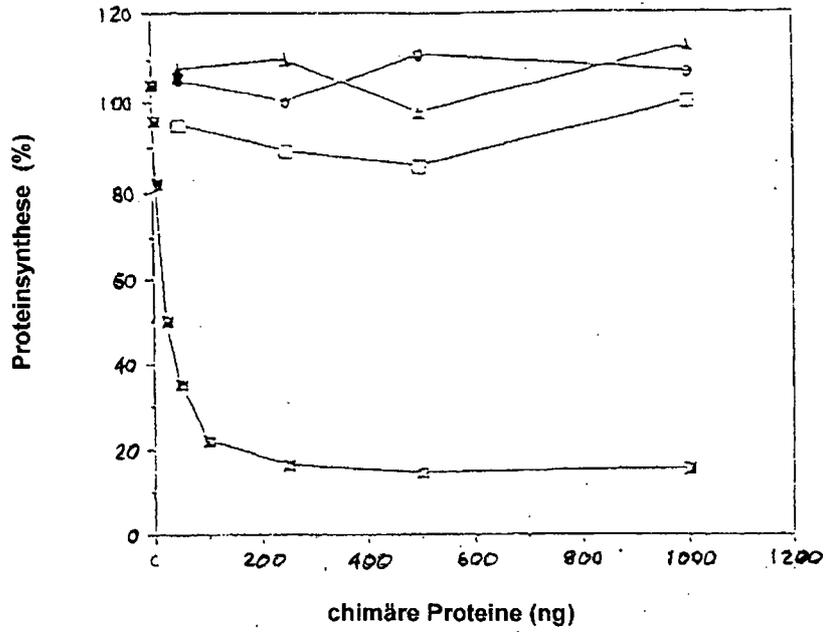
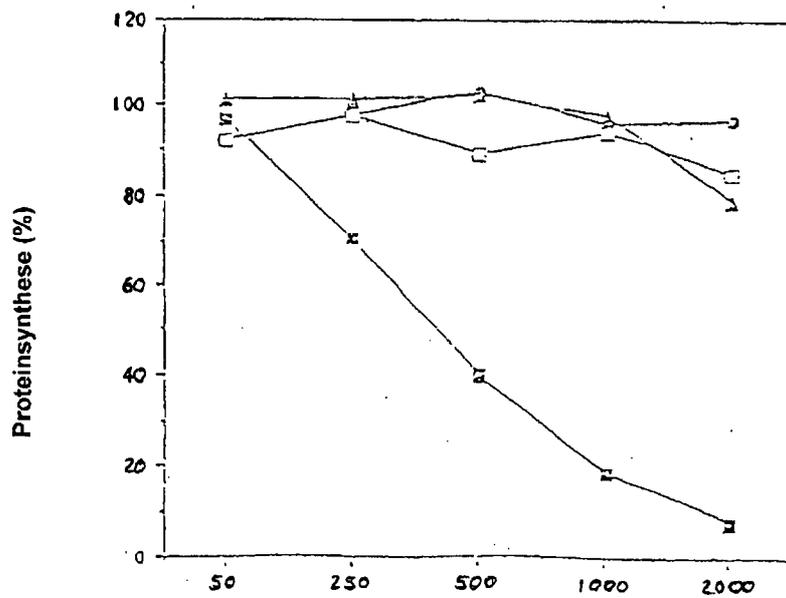


FIG. 4: Zytotoxische Aktivität verschiedener chimärer Proteine gegen MC-9-Zellen (A), C57-Zellen (B) und Abelson-Zellen (C). Die Zellen wurden 20 h mit den nichtlöslichen Fraktionen inkubiert, welche die chimären Proteine -■- FC₂₋₃-PE₄₀, -●- FC₂₋₄-PE₄₀, -▲- FC₂₋₃-PE_{40M} oder -□-PE₄₀ in verschiedenen Konzentration (bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration) enthielten. Es wurden Experimente mit MC-9-Zellen in Anwesenheit von Il₃ (20 U/ml) und Il₄ (10 U/ml) durchgeführt. Der Einbau von [³H]-Leucin in die Zellproteine wurde wie im Materialien- und Methodenteil beschrieben gemessen. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der Proteinsynthese der Kontrollzellen, die nicht den chimären Proteinen ausgesetzt wurden, dargestellt.

4B.



4C.



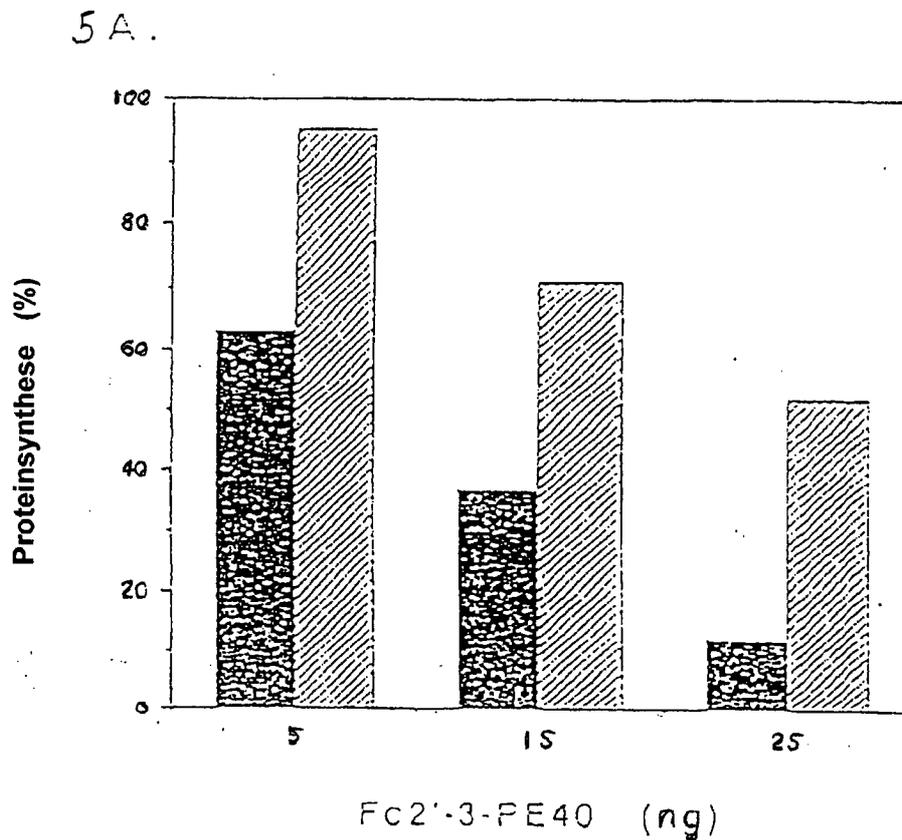
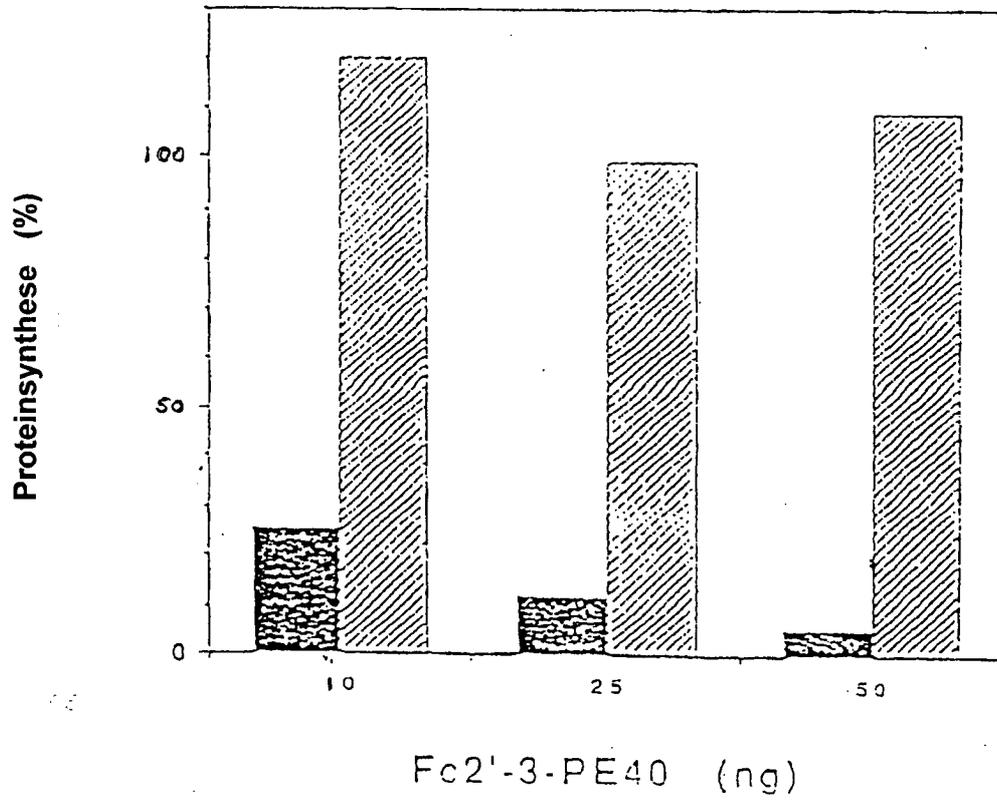


FIG. 5: Hemmung der Fc_{2'-3}-PE₄₀- Zytotoxizität durch (A) IgE und (B) anti-PE. Die Zellen wurden vor der Zugabe von Fc_{2'-3}-PE₄₀ 1 h bei 4°C mit 7,5 µg komplettem IgE (40 mg/ml) inkubiert. Einige Minuten vor der Zugabe von Fc_{2'-3}-PE₄₀ wurde anti-PE (10 mg/ml) eingetragen. Alle weiteren experimentellen Bedingungen entsprachen der Beschreibung siehe FIG. 4.

Vollbalken: Fc_{2'-3}-PE₄₀ in Abwesenheit des Kompetitors; schraffierte Balken: in Anwesenheit des Kompetitors.

5 B.



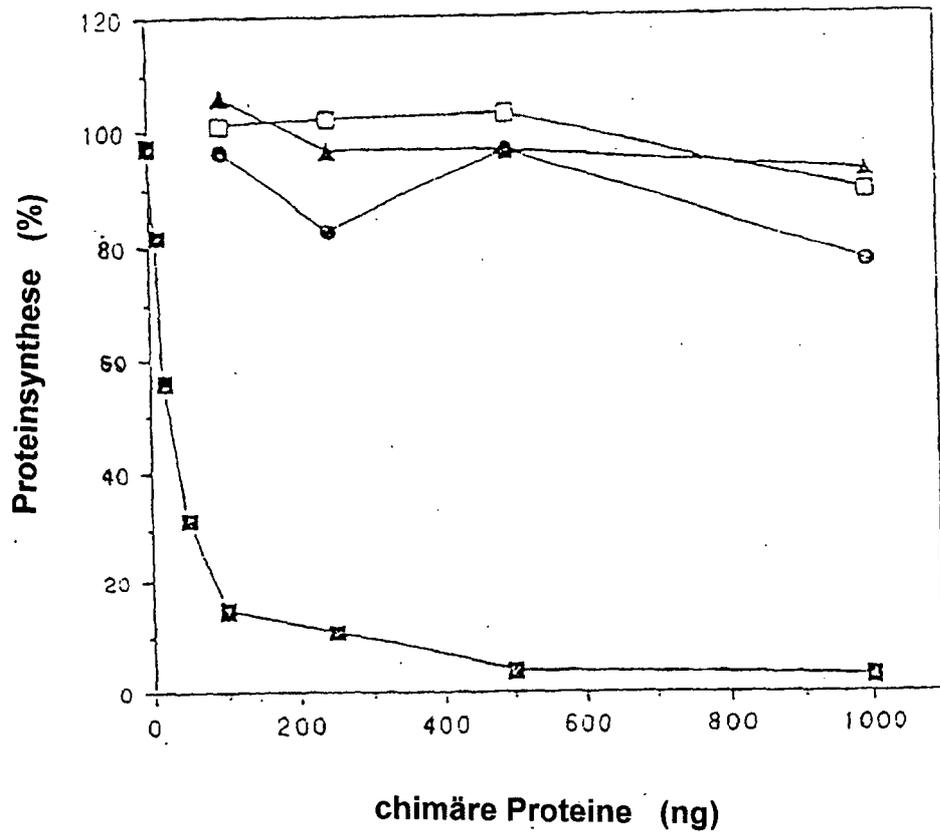


FIG. 6: Zytotoxische Aktivität verschiedener chimärer Proteine gegen primäre Mastzellen aus dem Knochenmark (BMMC). Knochenmark wurde wie im Materialien- und Methodenteil beschrieben kultiviert. Am 16. Tag der Kultur wurden die Experimente in Anwesenheit von Il_3 (20 U/ml) und Il_4 (10 U/ml) wie in FIG. 4 beschrieben durchgeführt. Die Symbole entsprechen denen in FIG. 4.

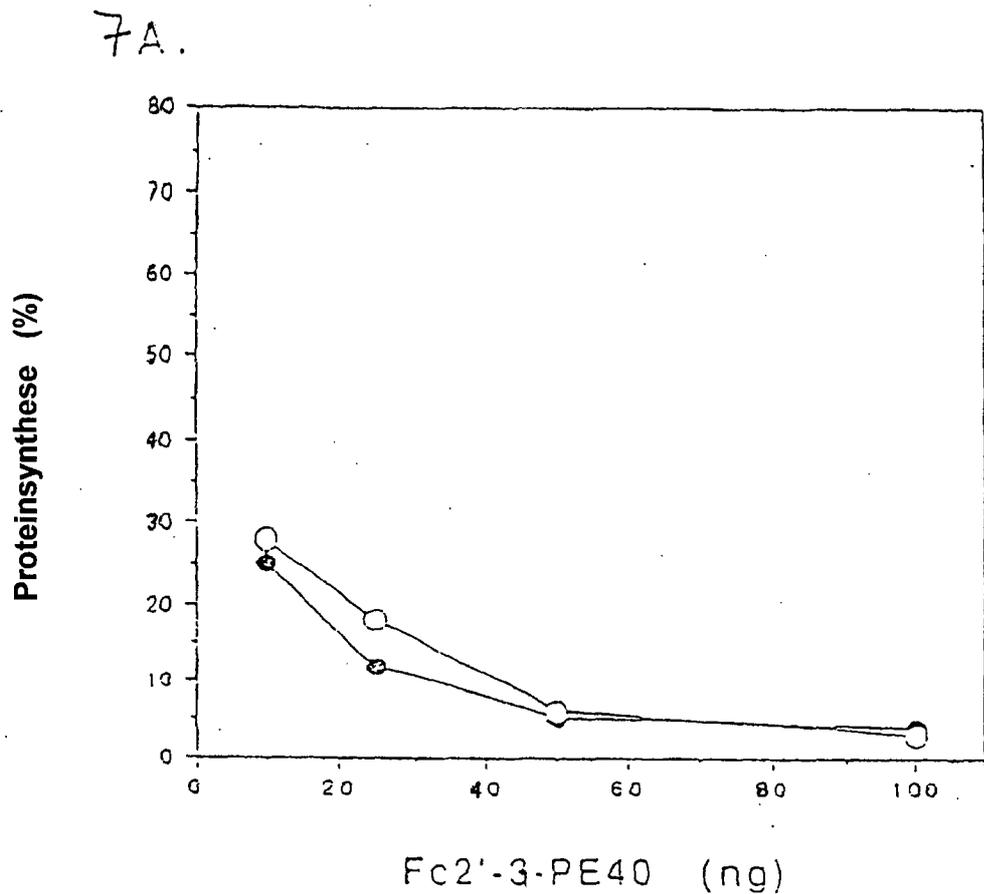


FIG. 7A: Zytotoxische Aktivität verschiedener chimärer Proteine gegen C57-Zellen in Anwesenheit von anti-Fc γ RII/III (2.4G2). Die Zellen wurden vor Zugabe von Fc_{2'-3}-PE₄₀ 30 min bei 37°C mit 2.4G2 (50 μ g/ml) oder Galaktose (25 mM) inkubiert. Alle weiteren experimentellen Bedingungen entsprachen der Beschreibung siehe FIG. 4. (A) Fc_{2'-3}-PE₄₀ in Abwesenheit (-●-) oder in Anwesenheit (-○-) von 2.4G2.

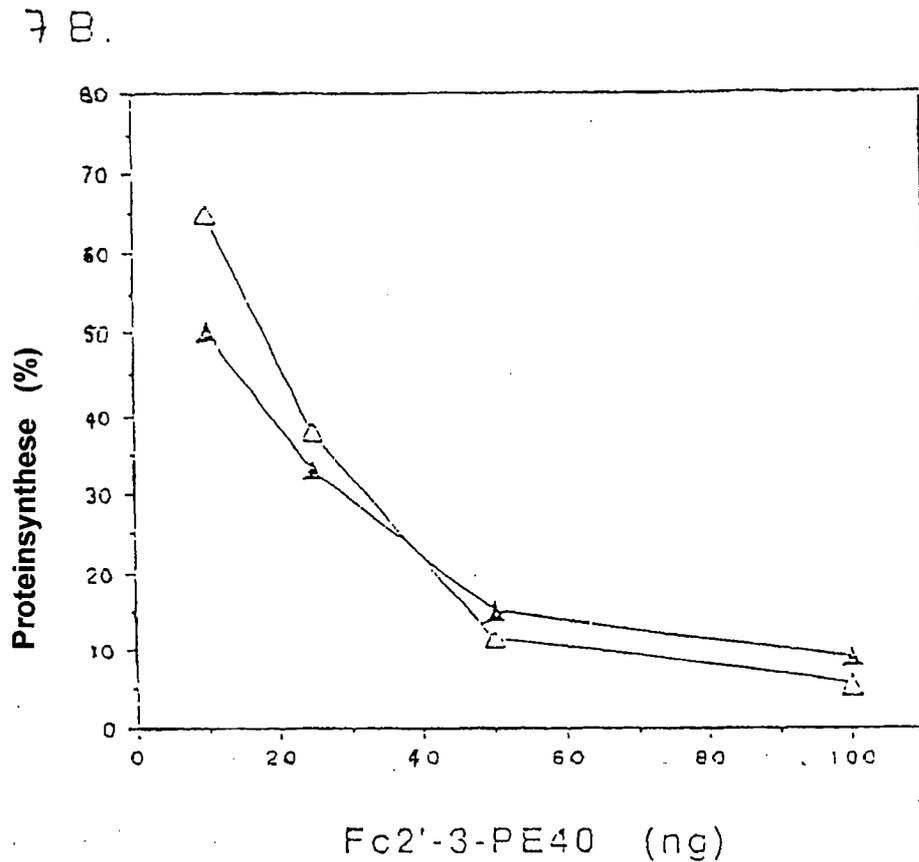


FIG. 7B: Zytotoxische Aktivität verschiedener chimärer Proteine gegen C57-Zellen in Anwesenheit von Galaktose. Die Zellen wurden vor Zugabe von Fc_{2'-3}-PE₄₀ 30 min bei 37°C mit 2.4G2 (50 µg/ml) oder Galaktose (25 mM) inkubiert. Alle weiteren experimentellen Bedingungen entsprachen der Beschreibung siehe FIG. 4. (B) in Abwesenheit (-△-) oder in Anwesenheit (-▲-) von Galaktose.

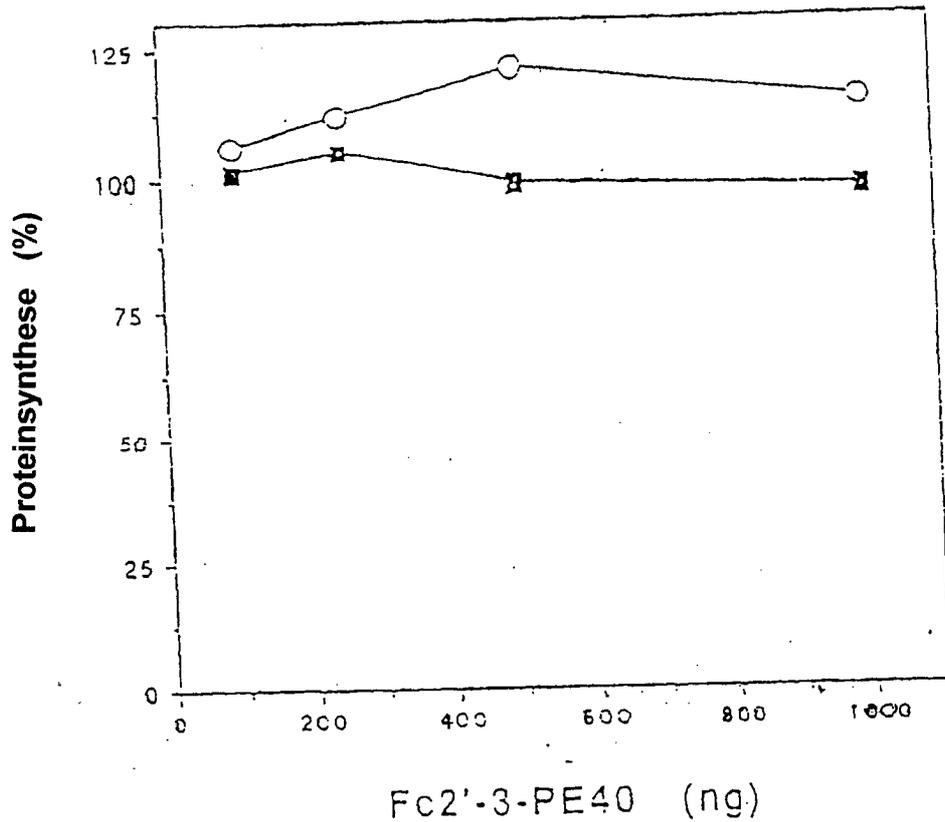


FIG. 8: Zytotoxische Aktivität verschiedener chimärer Proteine gegen Fc ϵ R1I hervorbringende Zellen. -○- B-Splenozyten. -■- 0.12A3-B-Zell-Hybridom. Die B-Splenozyten wurden 16 h mit LPS (50 μ g/ml) und IL₄ (50 U/ml) vorinkubiert. Alle weiteren experimentellen Bedingungen entsprachen der Beschreibung siehe FIG. 4.

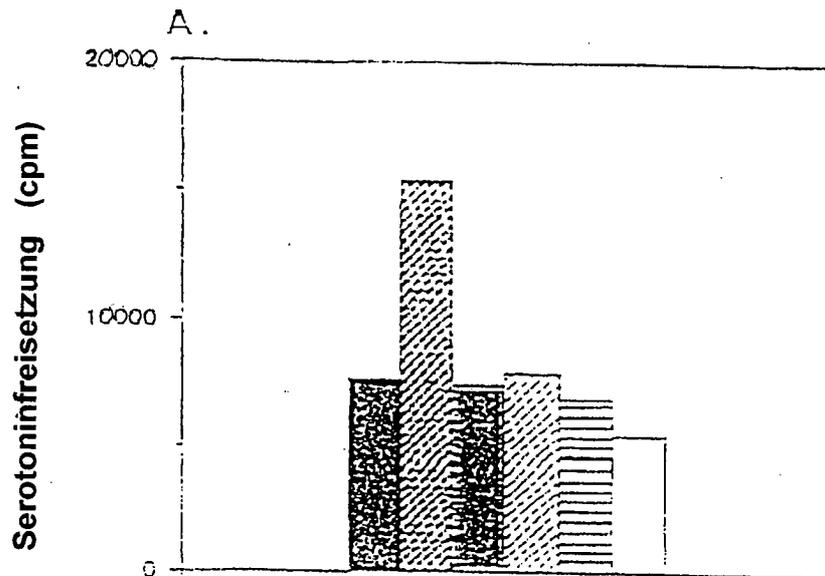
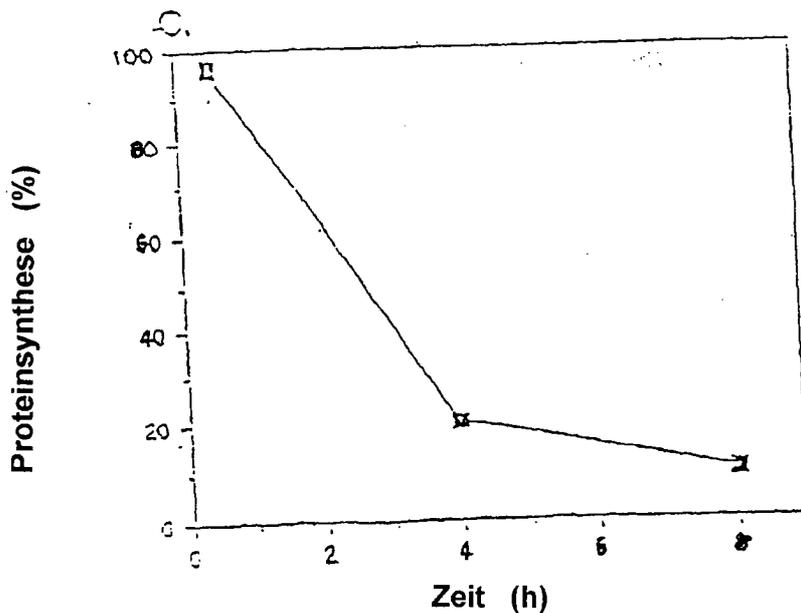
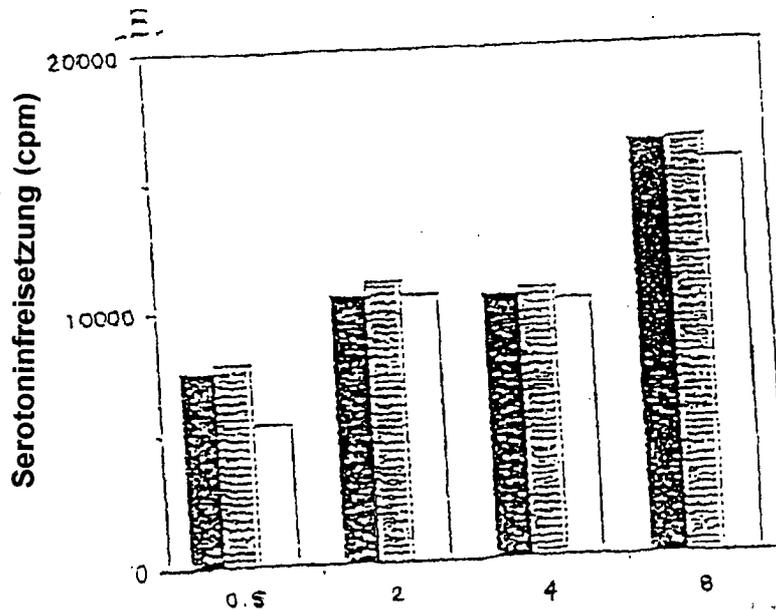


FIG. 9: (A) Wirkung von Fc₂₋₃-PE₄₀ auf die Serotoninfreisetzung von C57-Zellen. (A) Die Zellen wurden über Nacht mit [³H]-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat markiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und 30 min verschiedenen Fc₂₋₃-PE₄₀-Konzentrationen ausgesetzt. Die Kontrollzellen wurden mit IgE präinkubiert und mit DNP umgesetzt. Das in das Medium freigesetzte [³H]-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat wurde gemessen: ■ Kontrolle, □ IgE-DNP, □ 100 ng □ 250, □ 1000 ng oder □ 5000 ng Fc₂₋₃-PE₄₀.

FIG. 9 B: Zellen wurden mit FC_{2-3} -PE₄₀ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde

die Freisetzung von [3 H]-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat in das Medium gemessen; die Legendes entsprechen A.

FIG. 9 C: Zeitabhängige Zytotoxizität von FC_{2-3} -PE₄₀ gegen C57-Zellen. Unmarkierte Zellen wurden wie in (B) inkubiert. Zum selben Zeitpunkt wurden die Zellen 1 h mit [3 H]-Leucin gepulst und der Einbau in die Zellproteine gemessen. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der Proteinsynthese der nicht den chimären Proteinen ausgesetzten Kontrollzellen dargestellt.

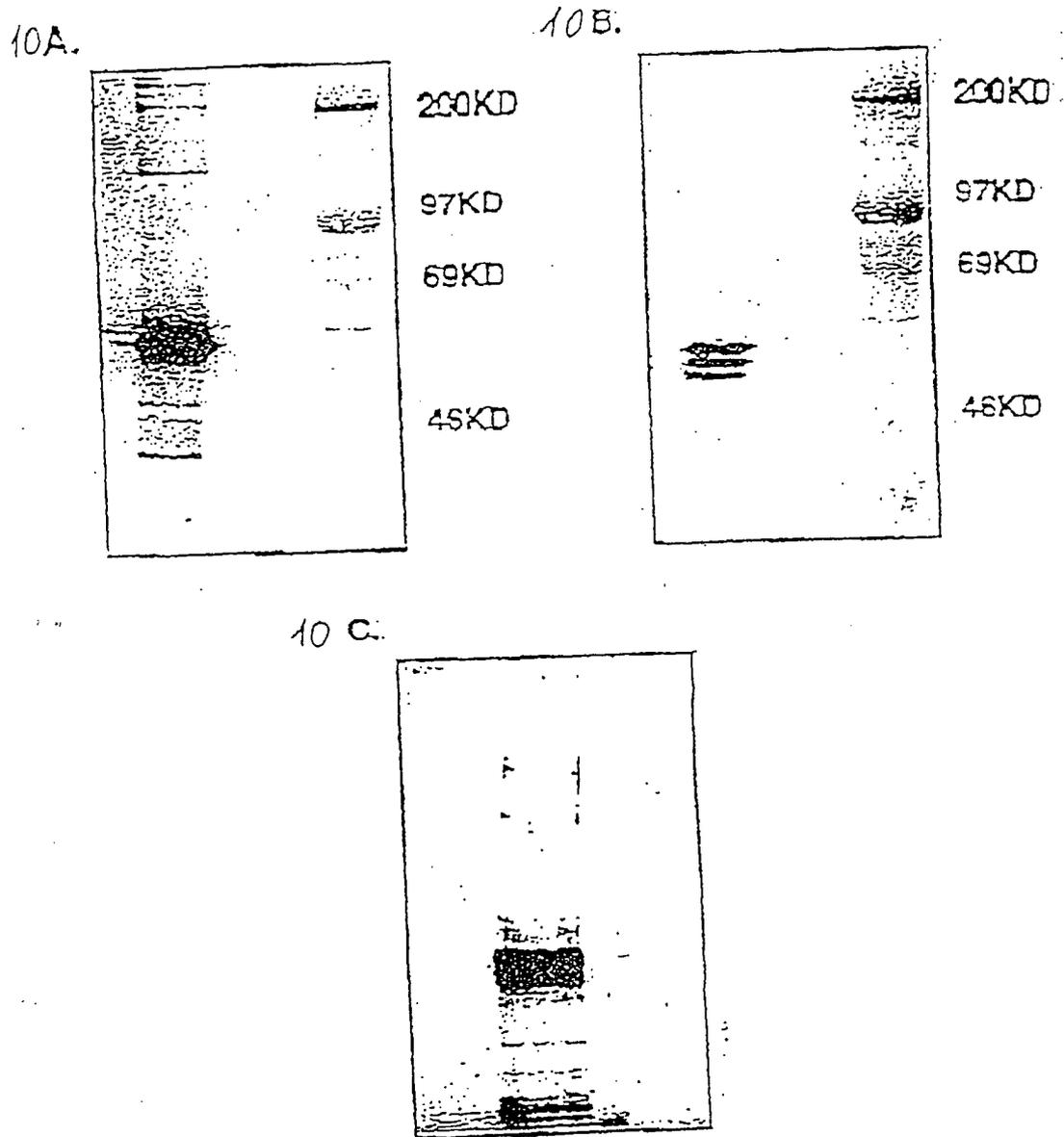


FIG.10: Immuno-Blotting des unter folgenden Bedingungen mit anti-PE unter Elektrophorese aufgetrennten chimären $F_{C_{2-3}}-PE_{40}$ -Proteins: A) in SDS unter reduzierenden Bedingungen, B) in SDS unter nichtreduzierenden Bedingungen und C) ein nichtdenaturierendes Gel (d.h. ohne Reduktion, ohne SDS).

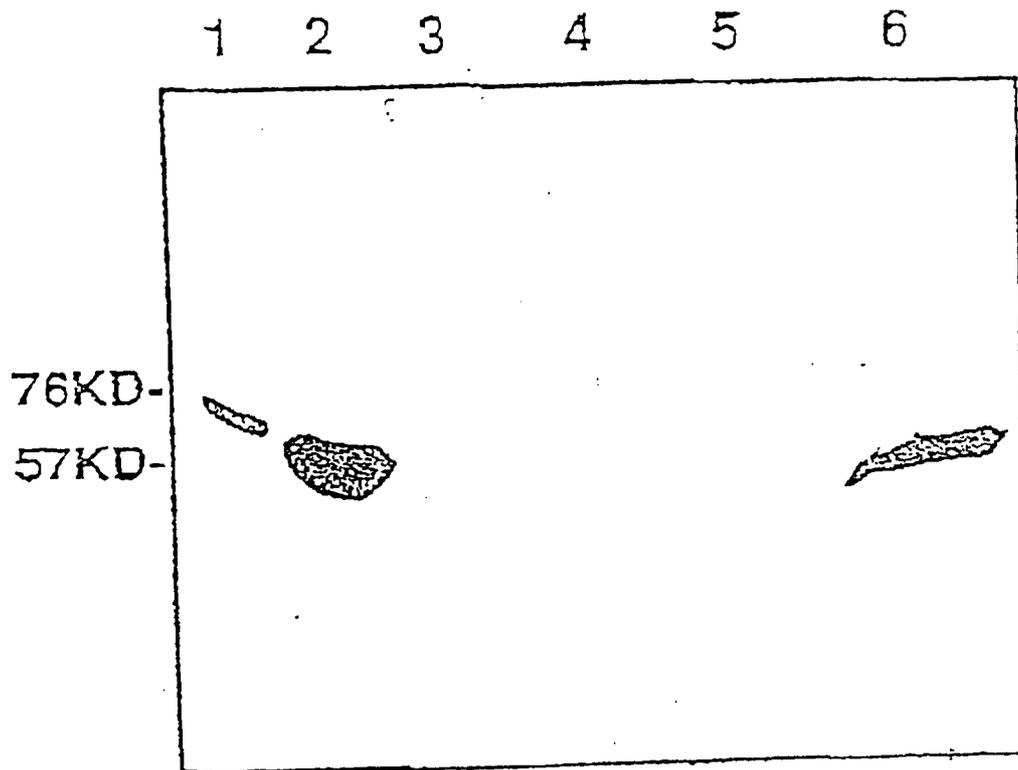


FIG. 11: Internalisierung des chimären FC_{2-3} - PE_{40} -Proteins durch MC-9-Zellen. 20 μ l von jeder der folgenden Fraktionen enthaltenden Proben wurden auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgele geladen: Spur 1, 40 ng FC_{2-3} - PE_{40} ; Spur 2, Zellüberstände; Spur 3, letztes Waschen vor der Säurebehandlung; Spur 4, saurer Waschüberstand; Spur 5, letztes Waschen nach der Säurebehandlung; und Spur 6, lysierte Zellen.

Tabelle 1: Zytotoxizität von chimärem FC ₂₋₃ -PE ₄₀ -Protein gegen verschiedene Mauszellen				
	Zelllinie	Zellursprung	ID ₅₀ (ng/ml)	
Zielzellen	MC-9	Mastzellen	50-100	
	C57 BM1C	Mastzellen primäre Mastzellen aus dem Knochenmark	100-125	
	Abelson	transformierte Mastzellen	1200-1500	
Nicht-Targetzellen	L ₁₀ A	B-Zelle, ohne Sekretion	>10000	
	X ₁₀ B UT PD1.1 EL-4 Erythroleukämie	B-Zelle, ohne Sekretion B-Zelle, ohne Sekretion T-Zelle, unreif T-Zelle reif	>10000 >10000 >10000 >10000 >10000 >10000	
	LTK Hepatoma	Fibroblast	1900 1500	