(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 002 T2** 2007.04.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 649 435 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 002.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/06080**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 916 768.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/000493**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.06.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **06.01.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.04.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.04.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.04.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/00*** (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
906395 **29.06.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Kapoor, Archana, San Diego, Calif., US; Munshi, Anil, San Diego, Calif., US

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **MEMBRAN-ASSOZIIERTE IMMUNOGENE PROTEINE DES MYCOBAKTERIEN**

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

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf Membran-assoziierte Polypeptide der Mycobakterien und insbesondere auf den Einsatz solcher Polypeptide und der Nucleinsäuren, welche für diese kodieren, als Vakzine und diagnostische Reagenzien.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Mycobakterien umfassen eine Vielfalt säurefester, grampositiver Bakterien, von denen einige wichtige Krankheiten bei Mensch und Tier verursachen. Beim Menschen sind die beiden meistverbreiteten Krankheiten, die durch Mycobakterien hervorgerufen werden, Tuberkulose (TB) und Lepra, welche jeweils durch eine Infizierung mit M. tuberculosis und M. leprae entstehen.

[0003] Tuberkulose weist sämtliche Hauptmerkmale einer epidemischen Krankheit von globalem Ausmaß auf. Derzeit sind weltweit über 35 Millionen Menschen von Tuberkulose befallen, die jährlich in über 4 Millionen Fällen zum Tode führt. Zu jedem gegebenen Zeitpunkt wird in Indien von beinahe 8 Millionen Menschen berichtet, die an dieser Krankheit leiden, und 500000 Tote sind verzeichnet. Diese Zahlen erfassen möglicherweise nicht die Gesamtheit jener, die in diesem Land an Tuberkulose leiden. Demzufolge scheint die Krankheit sowohl in Indien als auch in vielen anderen Ländern der Erde ein Problem von großer Wichtigkeit darzustellen.

[0004] Verursacht wird Tuberkulose durch M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum und M. microti, den säurefesten, grampositiven Tuberkelbazillen aus der Familie Mycobacteriaceae. Darüber hinaus wurden bei Patienten in Madras und anderen indischen Städten einige lokale pathogene Bakterienstämme von M. tuberculosis isoliert, die sich in mancher Hinsicht von M. tuberculosis-H37Rv unterscheiden, bei dem es sich um einen virulenten Bakterienstamm handelt.

[0005] In jüngsten Jahren wurde bei gewissen, an AIDS erkrankten Personengruppen festgestellt, dass auch sie eine merklich erhöhte TB-Häufigkeit aufweisen. Nun wurde nachgewiesen, dass eine Gruppe von Mycobakterien, bestehend aus M. avium, M. intracellulare und M. scrofulaceum, die gemeinsam als MAIS-Komplex bekannt sind, bei einer Vielzahl an AIDS erkrankter Menschen für eine Krankheitsdissemination verantwortlich ist (Kiehn, u.a., J. Clin. Microbiol., 21: 168–173 (1985); Wong, u.a., Amer. J. Med., 78: 35–40 (1985)).

[0006] Seit Koch im Jahre 1882 M. tuberculosis als Verursacher von Tuberkulose identifiziert hat, sind etliche wissenschaftliche Studien und Bemühungen um öffentliche Gesundheit auf die Diagnose, Behandlung und Kontrolle dieser Krankheit gerichtet. Jedoch stellen die Charakteristiken von M. tuberculosis bei der Forschung zur Verbesserung der Diagnostik und zur Entwicklung wirksamerer Vakzine von jeher ein Hindernis dar. Überdies erschwert die biochemische Zusammensetzung des Organismus die Identifizierung und Reinigung der zellulären Bestandteile, und vielen dieser Materialien fehlt es, sobald sie gereinigt sind, in ihrer Eigenschaft als diagnostische Reagenzien an Sensitivität und Spezifität. Als Ergebnis davon haben sich die diagnostischen und immunoprophylaktischen Maßnahmen gegen mycobakterielle Krankheiten in den letzten fünfzig Jahren nur wenig verändert. Die herkömmlichen Verfahren zur Diagnose von M. tuberculosis sind mühselig, und die Ergebnisse werden mit Verzögerung erhalten.

[0007] Der Bazillus Calmette-Guérin (BCG), ein avirulenter Stamm von M. bovis (Calmette, A., Masson et Cie, Paris (1936)), wird extensiv als Vakzin gegen Tuberkulose eingesetzt. Obwohl bei zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen herausgefunden wurde, dass BCG eine Schutzwirkung gegen Tuberkulose besitzt (Luelmo, F., Am. Rev. Respir. Dis., 125, 70–72 (1982)), ist es dem Bazillus in mehreren Studien nicht gelungen, vor Tuberkulose zu schützen (WHO, Tech. Rep. Ser., 651: 1–15 (1980)), und zwar aus Gründen, die nicht ganz eindeutig sind (Fine, P., Tubercle, 65: 137–153 (1984); Fine, u.a., Lancet, (ii): 499–502 (1986)).

[0008] Die Ausmerzung durch Vakzination, Frühdiagnose und effiziente Therapie bildet ein wichtiges Ziel bei dem Bestreben, Mycobakteriosen zu bekämpfen. Die Lücken im derzeitigen Wissen über die Biologie dieser Pathogene – über deren Aufbau, naturgeschichtliche Entwicklung, Physiologie, Biochemie und immunologische Reaktivitäten – akzentuieren die Notwendigkeit von Versuchen zur Lösung des Rätsels um deren Schwachstellen, so dass wirkungsvollere Wege zur Bekämpfung von Mycobakteriosen eingeschlagen werden können. Zur Entwicklung effizienterer Instrumente für Diagnose und Prävention dieser Krankheiten ist es von Bedeutung, die Immunreaktion auf die Infektion durch mycobakterielle Pathogene zu verstehen. Bisher gibt es keine sinnvolle Definition der mycobakteriellen Komponenten, die beim Ermitteln der zellulären Immunreaktion

maßgeblich sind. Die Antikörper- und T-Zellen-Reaktionen auf die Infektion mit bzw. die Inokulation von abgetöteten Mycobakterien wurden an Mensch und Tier untersucht. Menschliche Patienten mit TB oder Lepra erzeugen Serumantikörper, welche sich gegen mycobakterielle Antigene richten. Obgleich Antikörper eine gewisse Funktion bei der antimycobakteriellen Immunreaktion übernehmen können, bleibt ihre genaue Tätigkeit noch zu klären, weil sich diesen Antikörpern keine Schutzfunktion zuschreiben lässt. Der Schutz gegen mycobakterielle Krankheiten beinhaltet zellvermittelte Immunität.

[0009] Mycobakterien erzeugen keinerlei Substanzen mit direkt toxischer Wirkung, woraus folgt, dass sich ihre Pathogenität aus vielerlei Faktoren ergibt, die bei ihrer Interaktion mit dem infizierten Wirt involviert sind. Intrazellulärer Parasitismus hängt wahrscheinlich von trophischen Faktoren der Wirtszellen ab; denkbar ist, dass deren knapper Vorrat bakteriostatisch ist und eine Rolle beim mycobakteriellen Ruhezustandmechanismus spielt.

[0010] Allgemeingut ist, dass Schutzimmunität bei mycobakterieller Infektion durch spezifische T-Zellen vermittelt wird, welche Makrophagen zu nicht-spezifischer tuberkulozider Aktivität anregen. Beweise deuten darauf hin, dass gamma-Interferon Makrophagen zur H_2O_2-vermittelten Abtötung von Bakterien veranlasst, aber verwandte oder andere MAF-Moleküle (MAF: Macrophage Activating Factor) können ebenfalls involviert sein. Die Gründe, die für die inadäquate bakterizide Funktion an Stellen verantwortlich sind, die über eine reichhaltige T-Zellen-Proliferation verfügen, sind noch nicht geklärt. Die Dissoziation von Hypersensivität vom verzögerten Typ (DTH: Delayed-type Hypersensitivity) und Schutzimmunität hat zu der Ansicht geführt, dass T-Zellen einer distinkten Untergruppe oder Spezifität für die gewonnene Resistenz gegenüber mycobakterieller Infektion verantwortlich sein könnten. Alternativ dazu kann die Beeinträchtigung des Schutzes aus zellulären Folgereaktionen resultieren, nämlich durch Suppressor-T-Zellen und Makrophagen, oder aus der Überstellung von T-Zellen zur Helferfunktion für B-Zellen.

[0011] Im Unterschied zu viralen und einigen parasitären Pathogenen, welche in der Lage sind, die Resistenz des Wirts durch Antigenic Shift zu umgehen, verfügen Mycobakterien über eine elastische Zellwandstruktur und können die immunlogischen Abwehrreaktionen des Wirts durch die Aktion ihrer immunomodulatorischen Zellwandkonstituenten unterdrücken. Während der Erfolg der Schutzimmunisierung gegenüber anderen mikrobiellen Pathogenen in erster Linie von quantitativen Immunitätsparametern abhängt, hat es den Anschein, dass mycobakterielle immunomodulatorische Stimuli eine regulatorische Dysfunktion des Immunsystems des Wirts hervorrufen. Möglicherweise kann diese nicht einfach durch eine entschlossenere Immunisierung unter Verwendung von Vakzinen komplexer Zusammensetzung, wie ganzen Mycobakterien (z.B. BCG), überwunden werden. Vielleicht haben Mycobakterien starke „Hilfs"-Strukturen nicht zur Stärkung der Immunität des Wirts entwickelt, sondern vielmehr zur Zerschlagung von dessen Abwehrkräften zu ineffizienten zellulären Reaktionen, die sich zum Vorteil des Pathogens auswirken. Die Vakzination mit einem abgeschwächten Pathogen wie BCG könnte die Immunreaktionen weiter verstärken, bei jedoch eingeschränktem Schutz für den Wirt; der potentielle Anwendungsbereich für die Immunisierung mit definierten Antigenen muss noch erforscht werden.

[0012] Die Reinigung und die Charakterisierung individueller antigener Proteine sind wesentlich für das Verständnis des Grundmechanismus der DTH-Reaktion auf molekularem Level. Die mögliche funktionelle Rolle von Proteinen mit definierter Struktur sowohl bei der Pathogenese mycobakterieller Krankheiten als auch bei diagnostischen Zwecken bleibt von großem Interesse. Zahlreiche Gruppen haben den Versuch unternommen, mycobakterielle Antigene mittels gängiger biochemischer und immunologischer Verfahren zu definieren, und es wurde sowohl von allgemeinen als auch von speziesspezifischen Antigenen in Mycobakterien berichtet (Minden, u.a., Infect. Immun., 46: 519–525 (1984); Closs, u.a., Scand. J. Immunol., 12: 249–263 (1980); Chaparas, u.a., Am. Rev. Resair. Dis., 122: 533 (1980); Daniel, u.a., Microbiol. Rev., 42: 84–113 (1978); Stanford, u.a., Tubercle, 55: 143–152 (1974); Kuwabara, S., J. Biol. Chem., 250: 2556–2562 (1975)).

[0013] Über das mycobakterielle Genom sind nur sehr wenige Informationen verfügbar. Anfänglich wurden grundlegende Studien betrieben, um die Genomgröße, den G/C-Gehalt und den Grad der DNA-Homologie zwischen den verschiedenen mycobakteriellen Genomen zu beurteilen (Grosskinsky, u.a., Infect. Immun., 57, 5: 1535–1541 (1989); Garcia, u.a., J. Gen. Microbiol., 132: 2265–2269 (1986); Imaeda, T., Int. J. Sys. Bacteriol., 35, 2: 147–150 (1985); Clark-Curtiss, u.a., J. Bacteriol., 161 3: 1093–1102 (1985); Baess, I., u.a., B., Acta. Path. Microbiol. Scand., (1978) 86: 309–312; Bradley, S.G., Am. Rev. Respir. Dis., 106: 122–124 (1972)). Jüngst wurden rekombinante DNA-Verfahren für das Klonen und die Expression mycobakterieller Gene eingesetzt. Genomische DNA-Fragmente von M. tuberculosis, M. leprae und einigen anderen mycobakteriellen Spezies wurden zur Konstruktion der Lambda-gtII-Phage (Young, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 2583–2587 (1985); Young, u.a., Nature (London), 316: 450–452 (1985)) oder anderer vektorbasierter rekombinanter Genbibliotheken benutzt. Diese Bibliotheken wurden mit monoklonalen Antikörpern der Maus durchsucht (Engers,

u.a., Infect. Immun., 48: 603–605 (1985); Engers, u.a., Infect. Immun., 51: 718–720 (1986)), und auch polyklonale Antisera und einige immunodominante Antigene wurden identifiziert. Beim Hauptantigen unter diesen handelte es sich um fünf 12, 14, 19, 65 & 71 kDa-Antigene von M. tuberculosis (Young, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 2583–2587 (1985); Shinnick, u.a., Infect. Immun., 55(7): 1718–1721 (1987); Husson und Young, Proc. Natl. Sc. Acad., 84: 1679–1683 (1987) und um fünf 12, 18, 23, 36 & 65 kDa-Antigene von M. leorae (Young, u.a., Nature (London), 316: 450–452 (1985)). Ein paar Homologe einiger dieser Antigene wurden ebenfalls bei einigen anderen mycobakteriellen Spezies (z.B. BCG) identifiziert (Yamaguchi, u.a., FEB 06511, 240: 115–117 (1988); Yamaguchi, u.a., Infect. Immun., 57: 283–288 (1989); Matsuo, u.a., J. Bacteriol., 170, 9: 3847–3854 (1988); Radford, u.a., Infect. Immun., 56, 4: 921–925 (1988); Lu, u.a., Infect. Immun., 55, 10: 2378–2382 (1987); Minden, u.a., Infect. Immun., 53, 3: 560–564 (1986); Harboe, u.a., Infect. Immun., 52, 1: 293–302 (1986); Thole, u.a., Infect. Immun., 50, 3: 800–806 (1985)). Jedoch sind diese Antigene entweder intrazelluläre oder sezernierte Moleküle.

[0014] Zwar ist M. bovis-BCG als Vakzin gegen Tuberkulose weithin zum Einsatz gekommen, aber die Bestimmung der Membran-assoziierten Polypeptide von Mycobakterium, die eine schützende Immunreaktion induzieren können, ist in hohem Maße wünschenswert. Die Verwendung eines solchen Membran-assoziierten Polypeptids oder der DNA, welche für dieses kodiert, ermöglicht die Erzeugung rekombinanter Vakzine, z.B. mycobakterieller Membran-assoziierter Immunogene, die beispielsweise in einem als Live Carrier eingesetzten Virus oder Bakterium wie Vaccinia-Virus oder Salmonella, etc. exprimiert werden, oder die Anzeige nicht-mycobakterieller Immunogene auf der Oberfläche eines kultivierbaren mycobakteriellen Stamms, der als rekombinantes Lebendvakzin verwendbar ist.

[0015] Dementsprechend besteht hierbei eine Aufgabe darin, Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Nucleinsäuren zu bieten, die für ein Membran-assoziiertes Polypeptid von Mycobakterien kodieren.

[0016] Weiterhin besteht hierbei eine Aufgabe darin, Membran-assoziierte Polypeptide von Mycobakterien zur Verfügung zu stellen und die Nucleinsäuren, welche für diese kodieren.

[0017] Weiterhin besteht hierbei eine Aufgabe darin, Vakzine zu bieten, welche die Gesamtheit oder einen Teil des Membran-assoziierten Polypeptids eines Mycobakteriums nutzen oder die DNA, welche für ein solches Membran-assoziiertes Polypeptid kodiert.

[0018] Weiterhin ist es eine Aufgabe, Reagenzien zu bieten, welche besagtes Membran-assoziiertes Polypeptid mit einem Mycobakterium umfassen oder DNA, welche dafür kodiert, was von Nutzen bei Diagnostikassays für mycobakterielle Infektion ist.

[0019] Noch eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Promotersequenz zur Verfügung zu stellen, welche den Promoter des Membran-assoziierten Polypeptids umfasst, welcher Genexpression sowohl in Mycobakterien als auch in anderen Mikroorganismen wie E. coli. steuern kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] In Übereinstimmung mit den obengenannten Aufgaben umfasst die Erfindung isolierte Nucleinsäure, welche für die Gesamtheit oder einen Teil eines Membran-assoziierten Polypeptids eines Mycobakteriums kodiert, wie in Anspruch 1 dargelegt, und ferner umfasst die Erfindung das Membran-assoziierte Polypeptid, wofür von besagter DNA kodiert wird. Das Membran-assoziierte Polypeptid kennzeichnet sich durch die Fähigkeit, eine Immunreaktion auf pathogene Mycobakterien oder jene Mycobakterien nachzuweisen, aus welchen das Membran-assoziierte Polypeptid oder ein Teil desselben abgeleitet ist. Zu derartigen Mycobakterien zählen M. bovis, M. tuberculosis und M. bovis-BCG.

[0021] Um ein besonderes mycobakterielles Membran-assoziiertes Polypeptid handelt es sich bei einer ionenbewegenden 79-kD-ATPase. Extrazelluläre, intrazelluläre und transmembrane Domänen werden in diesem mycobakteriellen Membran-assoziierten Polypeptid basierend auf dessen DNA und abgeleiteter Aminosäuresequenz identifiziert.

[0022] Außerdem umfasst die Erfindung Vakzine, welche ein Membran-assoziiertes mycobakterielles Polypeptid oder eine Expressionsform einer Nucleinsäure nutzen, welche dafür kodiert. Mycobakterielle Promotersequenzen sind in der Lage, Genexpression sowohl in Mycobakterien als auch in anderen Mikroorganismen wie E. coli zu steuern. Solche Promoter stammen aus mycobakteriellen Genen, die für Membran-assoziierte ATPasen kodieren. Ein bevorzugter Promoter ist jener des Gens, das für das M. bovis-BCG-79-kD-Memb-

ran-assoziierte Polypeptid kodiert. Diese Promotersequenz ist besonders nützlich zur Expression maßgeblicher Gene in Mycobakterien.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0023] **Fig.** 1 veranschaulicht die Ergebnisse eines Immunoscreening rekombinanter Kolonien, welche M. bovis-BCG-DNA (Tafel A) und M. tuberculosis-H37Rv-DNA (Tafel B) tragen; das Immunoscreening erfolgt mittels Sera von TB-Patienten, bei denen die Anwesenheit von M. bovis-BCG-Antigenen und M. tuberculosis-H37Rv-Antigenen, die mit den Antisera in Reaktion treten können, durch ein qualitatives Signal angezeigt wird.

[0024] **Fig.** 2 zeigt den Vergleich von Restriktionskarten rekombinanter Klone, welche BCG-DNA tragen, die mittels des hierin beschriebenen Immunoscreening-Assays (Tafel B) identifiziert wird, mit den Restriktionskarten jeweils fünf immunodominanter Antigene von M. tuberculosis und M. bovis-BCG genomischer DNAs (Husson und Young, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 1679–1683 (1987); Shinnick, u.a., Infect. Immun., 55: 1718–1721 (1987) (Tafel A)). Die Restriktionskarten in jeder Tafel wurden mit dem gleichen (im oberen Abschnitt angegebenen) Maßstab erstellt, und Restriktionsstellen sind über den Restriktionskarten angegeben. Die gepunktete Linie in Tafel A stellt die nicht-mycobakterielle DNA dar. Restriktionsenzyme: B, BamHI, E, EcoRI, G, BglII, K, KpnI, P, PvuI, X, XhoI, N, HincII, U, PvuII, Ps, PstI, Hi, HindIII. In Tafel A handelt es sich bei A um SalI, und s ist SacI. In Tafel B handelt es sich bei S um SalI.

[0025] **Fig.** 3 veranschaulicht die Ergebnisse einer Western-Blot-Analyse des beschallten Überstands des rekombinanten Klons pMBB51A, der ein BCG-DNA-Insert trägt, das im Anschluss an das Immunoscreening der rekombinanten Kolonien identifiziert wird. Die obere Tafel stellt die Reaktivität von MBB51A (Bahn 2) und E. coli (Bahn 1) mit Sera von TB-Patienten dar. Die untere Tafel (Teil A) gibt die Reaktivität von MBB51A (Bahnen 1 und 2) und E. coli (Bahn 3) mit in Kaninchen gezüchteten anti-H37Rv-Sera wieder. Teil B veranschaulicht die Reaktivität von MBB51A (Bahnen 1 und 2) und E. coli (Bahn 3) mit dem zweiten Antikörper alleine. Pfeile geben die Position des immunoreaktiven 90-kD-BCG-Proteins an, das durch das rekombinante MBB51A exprimiert wird, welches bei der negativen Kontrolle abwesend war.

[0026] **Fig.** 4 zeigt die Nukleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 1) von Klon-pMBB51A-3.25-kb-Insert-DNA, die das immunoreaktive MBB51A-Gen von M. bovis-BCG enthält, das für eine ionenbewegende ATPase kodiert, und zwar mit einer abgeleiteten Molekularmasse von 79 kD. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr.2) ist unterhalb der Nukleotidsequenz aufgeführt. Upstream liegende Promoterelemente sind unterstrichen. Die Transkriptionsterminationsregion wird durch entgegengesetzte Pfeile angezeigt. Die 5' und 3' flankierenden Regionen sind ebenfalls dargestellt.

[0027] Fig. 5 veranschaulicht ein schematisches Modell, welches für das 79 kD-Protein abgeleitet ist, für das von pMBB51A kodiert wird, der eine ionenbewegende ATPase von BCG darstellt. Das Modell betrachtet nur die strukturellen und funktionellen Merkmale, die bei den anderen ionenbewegenden ATPase-Homologen transmembraner Domänen des Proteins hervortreten. Unter funktionellem Gesichtspunkt werden wichtige Aminosäurereste angegeben mit (P) für Prolin an Position 400, (D) für Asparaginsäure an Position 443, (G) für Glycin an Position 521 und (A) für Alanin an Position 646. Ziffern kennzeichnen Aminosäurereste, welche grob die Grenzen der Transmembrandomänen bestimmen.

[0028] **Fig.** 6 zeigt die Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung von BamHI-Verdau genomischer DNAs von M. bovis-BCG (Bahn 6), M. tuberculosis-H37Rv (Bahn 5), M. smegmatis (Bahn 4) und M. vaccae (Bahn 3) unter Verwendung von pMMB51A-DNA-Insert (Bahn 8) als Sonde. Tafel A stellt Ethidiumbromid-gefärbtes Gel dar, und Tafel B gibt die Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung wieder.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0029] Wie hierin gebraucht, ist ein „Membran-assoziiertes Polypeptid" eines Mycobakteriums als beliebiges mycobakterielles Membran-assoziiertes Polypeptid definiert, das in der Lage ist, eine Immunreaktion gegen das Wildtyp-Mycobakterium nachzuweisen, welches das Membran-assoziierte Polypeptid enthält. Beruhend auf der beobachteten Kreuzreaktivität des 79 kD Membran-assoziierten Polypeptids eines M. bovis-BCG mit einem Antiserumpool von an Tuberkulose leidenden Patienten und der Kreuzhybridisierung zwischen der DNA, die für das 79 kD Membran-assoziierte Polypeptid kodiert, und der DNA von M. tuberculosis-H37Rv ist jedoch ein Membran-assoziiertes Polypeptid nicht auf jenes eingegrenzt, das hierin anhand von M. bovis-BCG identifiziert wird. Vielmehr umfasst dieses Homologe zu der ionenbewegenden 79 kD-ATPase in M. bovis und

M. tuberculosis.

[0030] Wie hierin gebraucht, umfasst „Nucleinsäure" sowohl DNA oder RNA als auch modifizierte Nucleinsäure, worin ein nachweisbares Label eingegliedert wurde oder worin verschiedene Modifikationen zur Verbesserung der Stabilität vorgenommen wurden, z.B. die Eingliederung von Phosphorothioatbindungen in das Phosphoribose-Rückgrat, etc. Solch eine Nucleinsäure beinhaltet auch Sequenzen, die für die Antisense-Sequenz der DNA kodieren, die für das Membran-assoziierte Polypeptid kodiert, so dass die nun wohlbekannte Antisense-Technologie anwendbar ist, um die Expression derartiger Membran-assoziierter Polypeptide zu modulieren.

[0031] Bei einigen Aspekten der Erfindung wird die Nucleinsäuresequenz, die für das Membran-assoziierte Polypeptid des Mycobakteriums kodiert, als Vakzin eingesetzt.

[0032] Wenn sie in dieser Art gebraucht wird, ist die Nucleinsäure gemeinhin eine „exprimierbare Nucleinsäure", die alle Expressionsregulationssequenzen enthält, die zur Kontrolle von Transkription und Translation der Nucleinsäure in einem bestimmten Wirtssystem notwendig sind. In einigen Vakzin-Ausführungsformen kodiert die DNA für ein chimäres Polypeptid, das zumindest eine Transmembrandomäne des Membran-assoziierten Polypeptids und ein „immunogenes Polypeptid" enthält. Die Transmembrandomäne wird verwendet, um das immunogene Polypeptid auf der Oberfläche eines bestimmten Wirtsorganismus, z.B. eines attenuiertes Lebendvakzins, anzuzeigen. Wenn das Membran-assoziierte Polypeptid mehr als eine Transmembranregion umfasst, können eine oder mehrere Transmembranregionen mit einem immunogenen Polypeptid verwendet werden. Auf diese Weise hat z.B. die ionenbewegende 79 kD-ATPase, wie in **Fig. 5** dargestellt, mindestens drei extrazelluläre Domänen, in welche ein immunogenes Polypeptid mittels wohlbekannter Verfahren eingebaut werden kann, die rekombinante DNA-Technologie einschließen. Obwohl bevorzugt wird, dass mehr als eine Transmembranregion benutzt wird, um ein immunogenes Polypeptid anzuzeigen, sind Fachleute auf diesem Gebiet problemlos dazu in der Lage, die Länge derartiger Membran-assoziierter Polypeptide zu variieren, um eine immunogene Reaktion zu maximieren oder die Menge des Membran-assoziierten Polypeptids zu minimieren, das in solchen Anwendungen eingesetzt wird.

[0033] Wie hierin gebraucht, umfasst „immunogenes Polypeptid" die Gesamtheit oder einen Teil eines beliebigen Polypeptids, das sich potentiell in einem Vakzin oder einer diagnostischen Anwendung nutzen lässt. So kann das immunogene Polypeptid heterologe Immunogene umfassen, d.h. Immunogene aus nicht-mycobakteriellen Quellen, z.B. Salmonella oder Shigella, oder aus anderen Mycobakterien, aus denen das Membran-assoziierte Polypeptid abgeleitet ist, z.B. Immunogene aus Mycobakterium tuberculosis, die mit einem Membran-assoziierten Polypeptid von M. bovis-BCG verschmolzen sind. Allerdings sind in einigen Fällen homologe Immunogene verwendbar. Beispielsweise kann jede der extrazellulären Domänen, wie hierin in **Fig. 5** dargestellt, kombiniert und angezeigt werden, und zwar durch Kombination mit einer oder mehreren Transmembrandomänen aus dem Membran assoziierten Polypeptid, welches diese normalerweise enthält. Alternativ dazu lassen sich die interzellulären Domänen mittels geeigneter Transmembranregionen aus dem gleichen Molekül extrazellulär anzeigen.

[0034] In einer abgewandelten Vakzin-Ausführungsform wird vielmehr das Membran-assoziierte Polypeptid von Mycobakterien als Teil eines Vakzins genutzt als die kodierende DNA. Derartige proteinöse Vakzine werden mit wohlbekannten Adjuvantia formuliert und wohletablierten Standards zufolge verabreicht, welche Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind.

[0035] Die Nucleinsäure, die für das Membran-assoziierte Polypeptid der Erfindung kodiert, ist als Diagnostikum einsetzbar, um basierend auf Hybridisierung mit Wildtyp-Genen, welche das infektiöse Mycobakterium enthält, eine Infektion nachzuweisen. Ein derartiger Nachweis kann die direkte Hybridisierung von DNA umfassen, die aus einer geeigneten diagnostischen Probe extrahiert wird, oder die PCR-Amplifikation mit Primern aus der Nukleotidsequenz der Nucleinsäure, die für das Membran-assoziierte Polypeptid der Erfindung kodiert. Falls die PCR-Amplifikation mittels Primern in einer konservierten Region vorgenommen wird, kann die Anwesenheit von Mycobakterien in einer diagnostischen Probe bestimmt werden. Wenn diese in einer nicht-konservierten Region, die speziesspezifisch ist, erfolgt, wird das spezifische Mycobakterium, das eine Infektion verursacht, durch den diagnostischen Assay ermittelt.

[0036] Außerdem kann das Membran-assoziierte Polypeptid der Erfindung verwendet werden, um die Anwesenheit von Antikörpern in den Sera von Patienten nachzuweisen, bei denen möglicherweise eine Infektion mit Mycobakterien vorliegt. Zu derartigen Nachweissystemen zählen Radioimmunoassays und verschiedene Modifikationen davon, die Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt sind. Überdies ist das erfindungsgemäße Membran-assoziierte Polypeptid einsetzbar, um die Anwesenheit einer Zell-vermittelten Immunreaktion in ei-

ner biologischen Probe nachzuweisen. Derartige Assaysysteme sind Fachleuten auf diesem Gebiet ebenfalls wohlbekannt und beinhalten gemeinhin die klonale Expansion einer Subpopulation von T-Zellen, die auf Stimuli des Membran-assoziierten Polypeptids reagieren. Bei einer solchen Verwendung lässt sich die humorale und/oder Zell-vermittelte Reaktion eines Patienten bestimmen und im Verlauf der Krankheit überwachen.

[0037] Rekombinante Klone, die für immunogene Proteinantigene von M. bovis-BCG kodieren, wurden aus einer genomischen Bibliothek von M. bovis-BCG-DNA isoliert. Insbesondere DNA-Fragmente, die für vier Proteinantigene von M. bovis-BCG kodieren, wurden isoliert durch Erforschung einer pBR322-Bibliothek von M. bovis-BCG-DNA mit Sera von TB-Patienten, absorbiert auf E. coli. Die Restriktionskarten dieser vier rekombinanten Klone unterscheiden sich von jenen der fünf immunodominanten Antigene von Mycobakterien (Young, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 2583–2587 (1987); Husson und Young, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 1679–1683 (1987); Shinnick, u.a., Infect. Immun., 55: 1718–1721 (1987)), was anzeigt, dass diese geklonten Proteinantigene neuartig sind. Einer der rekombinanten DNA-Klone kodierte für ein immunoreaktives Protein mit einer apparenten Molekularmasse von 90 kD gemäß Western-Blot-Analyse. Die vollständige Nukleotidsequenz der Insert-DNA dieses Klons wurde bestimmt. Dabei wurde herausgefunden, dass der Klon einen mycobakteriellen Promoter und einen monocistronischen OLR trägt, der für ein Protein von 761 Aminosäuren mit einer abgeleiteten Molekularmasse von 79 kD kodiert. Dieses 79 kD-Protein besaß eine extensive Homologie mit ionenbewegenden ATPasen von S. faecalis (Solioz, u.a., J. Biol. chem., 262: 7358–7362 (1987)), E. coli (Hesse, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 4746–4750 (1984)) sowie mehreren anderen Organismen und stellt so eine ionenbewegende ATPase oder eine potentielle K^+-ATPase von BCG dar. Mittels Computeralgorithmen wurde bestimmt, dass es sich bei dieser ionenbewegenden ATPase um ein Membranprotein handelt und dass sie ein Homolog in dem beim Menschen pathogenen M. tuberculosis-H37Rv hat, aber nicht in M. vaccae und M. smegmatis, welche nicht pathogen sind. Als Ergebnis davon sind neuartige BCG-Immunogene verfügbar, die bei der Prävention, Diagnose und Behandlung von Tuberkulose und anderen mycobakteriellen Infektionen von Nutzen sein können. Einsetzen lassen sich diese Immunogene beispielsweise bei der Entwicklung hochspezifischer serologischer Tests, um Patienten nach Individuen zu durchsuchen, welche Antikörper gegen M. tuberculosis erzeugen oder welche mit M. tuberculosis infiziert sind, weiterhin bei der Entwicklung von Vakzinen gegen die Krankheit und bei der Beurteilung der Effizienz, mit welcher infizierte Individuen behandelt werden.

[0038] Ferner können auf Grundlage der Nukleotidsequenz der pMBB51A-Insert-DNA geeignete Oligonukleotidprimer zur PCR-Amplifikation eingesetzt werden, wobei M. bovis-BCG- oder M. tuberculosis-H37Rv-DNA als Template benutzt wird. Solch ein PCR-Amplifikationsschema kann somit für den Nachweis mycobakterieller DNA in einer gegebenen Probe nützlich sein. Außerdem lässt sich durch eine vernünftige Wahl des Primer-Designs ein derartiges Amplifikationsverfahren für die taxonomische Klassifikation mycobakterieller DNAs anpassen. Bei Verwendung von Primern zur Flankierung einer stark konservierten Region wie der ATP-Bindungsstelle ist beispielsweise die PCR-Amplifikation für alle mycobakteriellen Spezies gängig, wohingegen bei Verwendung von Primern aus nicht-konservierten Bereichen die Amplifikation speziesspezifisch erfolgen kann.

Beispiel 1

Isolation und Charakterisierung von Genen. die für immunogene Proteinantigene von Mycobakterium bovis-BCG und Mycobakterium tuberculosis-H37Rv kodieren

A. Konstruktion rekombinanter DNA-Bibliotheken von M. bovis-BCG-DNA und Mycobakterium tuberculosis-H37Rv

[0039] Konstruiert wurde eine Bibliothek rekombinanter DNA von genomischer M. bovis-BCG-DNA, wobei pBR322 eingesetzt wurde, ein High-Copy-Number-Plasmidvektor (Bolivar, u.a., Gene, 2: 95–133 (1977)) mit antibiotischen Markern (Ampizillin und Tetracyclin) und mehreren unique Cloning-Sites. M. bovis-BCG-Zellen wurden aus einer Kultur in deren später logarithmischer Wachstumsphase geerntet, und DNA mit hoher Molekularmasse wurde durch das Verfahren von (Eisenach, u.a., J. Mol. Biol., 179: 125–142 (1986)) mit geringfügigen Modifikationen isoliert. BCG-DNA wurde mit BamHI vollständig verdaut, und ein Shotgun-Cloning dieser Fragmente in die BamHI-Stelle von pBR322 wurde durchgeführt. Die genomische Bibliothek wurde in E. coli-Bakterienstamm-DHI umgesetzt, und Rekombinanten wurden auf der Basis von Ampizillinresistenz und Tetracyclinsensitivität selektioniert. Das Ziel dieser Herangehensweise bestand darin, Restriktionsfragmente mit breitgefächerter Größe zu erzeugen, um die Bibliothek nicht auf DNA-Fragmente aus einem bestimmten Größenbereich einzuschränken. Zudem gewährleistete diese Klonierungsstrategie weitgehend, dass beliebige Rekombinanten, die zur Expression mycobakterieller Antigene ausgewählt wurden, die Expression wahrscheinlich vielmehr anhand eines mycobakteriellen Promoters als anhand des Tet-Promoters von pBR322 her-

beiführen würden.

[0040] Die in dieser Weise konstruierte BCG-Bibliothek enthielt 2051 Klone mit BCG-Herkunft. Auf analoge Art wurde eine genomische Bibliothek von Mycobacterium tuberculosis-H37Rv-DNA konstruiert, wordurch 1100 Klone erhalten wurden.

[0041] Die Größe der BCG-DNA-Inserts lag in einem Bereich von 0.9 bis 9.5 kb. Die Durchschnittsgröße der in pBR322 eingefügten Mycobakterien-DNA-Fragmente wurde auf etwa 4 kb geschätzt. In Anbetracht dessen, dass die Genomgröße von BCG 4.5×10^3 kb beträgt (Bradley, S. G., J. Bacteriol., 113: 645–651 (1973), Imaeda, u.a., Int. J. Syst. Bacteriol., 32, 456–458 (1982)), würden ungefähr 1000 Klone mit dieser durchschnittlichen Insert-Größe das ganze Genom des Mikroorganismus umfassend darstellen.

B. Isolation rekombinanter DNA-Klone, die für Mycobakterium bovis-BCG- und Mycobakterium tuberculosis-H37Rv-Proteinantigene kodieren

[0042] Zur Identifizierung von Rekombinanten, welche mycobakterielle Antigene exprimieren, wurde ein CIA (Colony Immunoscreening Assay) eingerichtet, um rekombinante Kolonien mit geeigneten Antisera zu durchsuchen. Sera von zwanzig Patienten mit jüngst diagnostizierter aktiver Lungentuberkulose wurden zur Verwendung beim Immunoscreening gepoolt. Keiner der Patienten hatte vor dieser Studie eine Tuberkulosebehandlung erhalten, und ihre Sputa ergaben in allen Fällen ein positives Ergebnis für säurefeste Bakterien. Gepoolte Sera wurden auf einem E. coli-Sonikat bei 4°C über Nacht absorbiert, um zu E. coli-Antigenen kreuzreaktive Antikörper zu beseitigen und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis während des Immunoscreenings zu verbessern.

[0043] Über Nacht wurden individuelle rekombinante Kolonien auf Nitrocellulosemembranen gezüchtet, und ein Immunoscreening wurde wie erläutert ausgeführt, allerdings mit geringfügigen Modifikationen. Die Kolonien wurden zwecks Freisetzung der geklonten mycobakteriellen Antigene in Chloroformdampf lysiert und dann auf dem Nitrocellulosepapier immobilisiert. Die immobilisierten Antigene wurden mit TB-Sera in Reaktion gebracht, und die Bindung des Antikörpers wurde durch gängige Verfahren mittels eines Nachweissystems kenntlich gemacht, welches Meerrettichperoxidase-Protein A nutzt. Die mit den rekombinanten Klonen erhaltenen Signale wurden mit jenen verglichen, die im Fall von E. coli-Kolonien, welche allein den pBR322-Vektor beherbergten, erhalten wurden, was als negative Kontrolle zur Beurteilung des Signal-Rausch-Verhältnis diente. Zwecks Feststellung, ob die Immunoreaktivität der rekombinanten Klone durch anti-mycobakterielle Antikörper bedingt war oder durch eine Reaktion mit normalen Serumkomponenten, wurde ein weiterer CIA an den ausgewählten Rekombinanten vorgenommen, wobei TB-Sera und normale menschliche Sera (NHS: Normal Human Sera) verwendet wurden, die auf E. coli in einer zu der zuvor für TB-Sera beschriebenen analogen Weise absorbiert worden waren. Nur jene Klone, welche selektiv mit TB-Sera und nicht mit HNS reagierten, wurden als unzweifelhaft auf die Anwesenheit mycobakterieller Antigene hinweisend angesehen. Die Anwendung dieser Herangehensweise mittels Immunoscreening zwecks Identifizierung rekombinanter Kolonien, die mycobakterielle DNA-Inserts tragen, welche mycobakterielle Antigene exprimieren können, wird nachstehend erläutert:
Fig. 1 zeigt das Ergebnis des mittels Sera von TB-Patienten durchgeführten Immunoscreenings rekombinanter Kolonien, welche M. bovis-BCG-DNA (Tafel A) oder M. tuberculosis-H37Rv-DNA (Tafel B) tragen. Die Kolonien wurden auf Nitrocellulosepapier über Nacht gezüchtet, dann lysiert, um das geklonte mycobakterielle Antigen freizusetzen, und in Reaktion mit den Antikörpern gebracht. Die Anwesenheit von mycobakteriellem Antigen wird durch ein qualitatives Signal in den rekombinanten Klonen angezeigt, welches bei der negativen Kontrolle nicht auftritt, welche Kolonien umfasst, die allein den pBR322-Vektor beherbergen. Ein ähnlicher Assay wurde mit normalem menschlichem Serum wiederholt, um die Spezifität der geklonten mycobakteriellen Antigene zu ermitteln. 51 rekombinante Kolonien, welche M. bovis-BCG-DNA-Inserts trugen, und 45 rekombinante Kolonien, welche M. tuberculosis-H37Rv-DNA-Inserts trugen, wurden mittels des obigen Verfahrens durchsucht; 14 Klone mit BCG-Herkunft (Tafel A) und 2 Klone mit H37Rv-Herkunft (Tafel B) wiesen unterschiedlich starke Signale auf, welche die Immunoreaktivität dieser Klone (**Fig.** 1) anzeigten. Alle diese Klone wurden auch auf Immunoreaktivität mit NHS getestet. Allerdings hat mit Ausnahme von 3 Klonen, die eine geringfügige Reaktivität auf NHS zeigten, keiner dieser Klone mit NHS reagiert, was zu erkennen gab, dass diese exprimierten mycobakteriellen Antigene selektiv mit TB-Sera reagierten. Somit resultierte dieses Verfahren in der direkten Identifikation rekombinanter Klone, welche für mycobakterielle Antigene kodieren. Diese Strategie ist allgemein auf mycobakterielle Genbanken anwendbar, die in Plasmid- oder Cosmidvektoren erzeugt werden, um Gene, die in E. coli exprimiert werden, zumindest bis zu der durch den Immunoassay nachweisbaren Grenze zu identifizieren.

C. Restriktionskartierung immunoreaktiver Mycobakterium bovis-BCG-DNA-Rekombinanten

[0044] Die Insert-DNAs von vier der durch die TB-Sera isolierten Klone rekombinanter DNA von immunoreaktivem BCG wurden mit Restriktionsendonukleasen kartiert. Tafel B in **Fig.** 2 zeigt die Restriktionskarten genomischer DNA, abgeleitet für die geklonte BCG-DNA, in vier Rekombinanten, wobei SalI von A repräsentiert wird, BamHI von B, EcoRI von E, BglII von G, KpnI von K, PvuI von P, SacI von S und XhoI von X. Dann wurden diese Restriktionskarten mit jenen verglichen, die zuvor für die fünf immunodominanten Antigene von M. tuberculosis/M. bovis-BCG konstruiert worden waren (Young, u.a, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 2583–2587 (1985)); Husson, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 1679–1683 (1987); Shinnick, u.a., Infect. Immun., 55, 7: 1718–1721 (1987)) (**Fig.** 2 Tafel A). Da die in den Tafeln A und B dargestellten Restriktionskarten mit dem gleichen Maßstab angelegt wurden, sind die Unterschiede zwischen den beiden offensichtlich. Es gibt keine ähnlichen Regionen zwischen den Restriktionskarten rekombinanter Klone immunoreaktiver BCG und jenen der zuvor charakterisierten immunodominanten Antigene von M. tuberculosis/M. bovis-BCG. Daraus kann gefolgert werden, dass die geklonten BCG-DNA-Inserts in den vier Rekombinanten neuartig sind.

Beispiel II

Isolation und Charakterisierung eines Gens, das für eine ionenbewegende BCG-ATPase kodiert

A. Identifikation eines neuartigen BCG-Antigens

[0045] Einer der vier immunoreaktiven BCG-Klone, nämlich pMBB51A, ließ die Anwesenheit eines Proteins von Mr 90 kD erkennen, und zwar bei einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung von sowohl TB-Sera als auch polyklonalem anti-H37Rv-Antiserum, das in Kaninchen gezüchtet wurde (**Fig.** 3). Eine ähnliche Western-Blot-Analyse von pMBB51A mit einem Pool aus einigen anti-mycobakteriellen monoklonalen Antikörpern (TB23, TB71, TB72, TB68, TB78; Engers, u.a., Infec. Immun., 48: 603–605 (1985)) oder mit normalen menschlichen Sera gab dieses immunoreaktive Protein von 90 kD nicht zu erkennen. Dies bestätigt, dass pMBB51A für ein BCG-Antigen kodiert, welches sich von jenen unterscheidet, die zuvor in BCG identifiziert wurden, was dieses Antigen neuartig macht.

B. Bestimmung der Nukleotidsequenz von pMBB51A

[0046] Um dieses neuartige BCG-Antigen weiter zu charakterisieren, wurde das pMBB51A-DNA-Insert einer Nukleotidsequenzierung unterzogen. An dem BamHI-BamHI-Insert, das in pMBB51A getragen wurde, erfolgte eine Kartierung zusätzlicher Restriktionsenzymspaltstellen. Es wurde ermittelt, dass sich in dieser Sequenz mindestens eine einzige PstI-Stelle und drei SalI-Stellen befanden. Überlappende Fragmente, abgeleitet aus Einzel- und Doppelverdaus von SalI, BamHI und SalI, BamHI und PstI und aus PstI und SalI wurden zwecks Vorbereitung für die DNA-Sequenzanalyse in M13mp18- und M13mp19-Vektoren subkloniert. Daraufhin wurde die DNA-Sequenzierung mittels handelsüblicher Kits wie des Sequenase-Systems und des T7-Systems von Pharmacia durchgeführt. Von der bestimmten Sequenz abgeleitete Oligonukleotide wurden synthetisiert und als Primer verwendet, um die Sequenz mit den größeren Inserts zu vervollständigen. Während der Sequenzierung wurden mehrere Kompressionsbereiche angetroffen; diese wurden durch Verwendung von dITP in den Sequenzierungsreaktionen und durch Veränderung der Reaktionsbedingungen aufgelöst. Die vollständige Nukleotidsequenz der pMBB51A-Insert-DNA wurde durch Sequenzieren beider Stränge bestimmt, wobei sowohl dGTP als auch dITP benutzt wurden. Bestimmt wurde, dass die DNA-Sequenz des pMBB51A-Inserts eine Länge von 3.25 kb bei einem G/C-Gehalt von 67.1% besaß; diese Sequenz ist in **Fig.** 4 dargestellt.

[0047] Die Bestimmung der DNA-Sequenz des 3.25 kb-Inserts von Klon pMBB51A (**Fig.** 4) ermöglichte die Klärung der Aminosäuresequenz des 90 kD-BCG-Antigens. In **Fig.** 4 sind die Nukleotide von dem linken Ende der pMBB51A-Insert-DNA aus nummeriert.

[0048] Eine Untersuchung der pMBB51A-Insert-DNA-Sequenz auf mögliche OLR in allen drei Leserahmen ließ den längsten OLR mit 2286 bp, kodierend für ein Polypeptid aus 761 Aminosäuren, auf einem der Stränge erkennen. Über den anderen Strang wurde herausgefunden, dass er einen kleineren OLR mit 1047 bp aufwies, der in der Lage war, für ein Polypeptid aus 349 Aminosäuren zu kodieren. Der längste OLR, der für ein Protein mit einer Länge von 761 Aminosäuren kodierte, entsprach einer abgeleiteten Molekularmasse von 79 kD, die dem immunoreaktiven BCG-Protein mit einer auf Western-Blot erkannten apparenten Molekularmasse von 90 kD am Nächsten kam. Die für dieses Protein abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz in **Fig.** 4 angegeben.

[0049] Dieser OLR war auf der pMBB51-Insert-DNA so platziert, dass auf beiden Seiten lange Strecken flankierender DNA-Sequenzen vorhanden waren, die keine bedeutsamen OLR besaßen. Dies schloss die Expression dieses OLR anhand des pBR322-Tet-Genpromoters aus und ließ anstatt dessen vermuten, dass dieser OLR anhand seines eigenen Promoters in pMBB51A exprimiert wurde. Weiterhin gab dies Grund zu der Annahme, dass E. coli die M. bovis-BCG-Transkriptions- und Translations-Start- und Stopstellen in diesem Gen korrekt verwenden kann.

[0050] Unmittelbar oberhalb des OLR wurden Regulatorsequenzen identifiziert, die eine starke Übereinstimmung mit den –35, –10 und den Shine-Dalgarno-Sequenzen von E. coli aufwiesen (Rosenberg, u.a., Annul. Rev. Genet., 13: 319–353 (1979)). Außerdem war der Abstand zwischen diesen drei Regulatormotiven auch sehr gut konserviert. Obgleich die anderen sequenzierten mycobakteriellen Promoter (Dale, u.a., Molecular Biologe of the Mycobacteria, Kap. 8, 173–198 (1990)) in allen der drei Regionen, also in –35, –10 und SD, einige Unterschiede gegenüber den E. coli-Konsensussequenzen aufwiesen, zeigten die Regulatorelemente von pMBB51A-DNA einen Höchstgrad an Sequenzgleichheit mit E. coli in den –35 und SD-Sequenzelementen, und zwar mit einer einzigen Fehlübereinstimmung in jedem Element, und eine etwa 50%-ige Sequenzgleichheit in der Pribnow Box. Alle obengenannten Merkmale wiesen deutlich daraufhin, dass diese Region die Promoterregion für das in pMBB51A enthaltene mycobakterielle Gen ist. Der Umfang der Ähnlichkeit zwischen dieser BCG-Promotersequenz und einem typischen E. coli-Promoter ist bemerkenswert und erklärt die funktionelle Aktivität dieses Promoters, im Unterschied zu vielen anderen mycobakteriellen Promotern, in E. coli. Der Translationsinitiationskodon in diesem OLR war ATG an Position 508, während ein einzelner Translationsterminationskodon TGA an Position 2790 identifiziert wurde. Potentielle Transkriptionsterminationsstrukturen, fähig zur Bildung von Stamm- und Schleife-Konformationen, wurden in der Region 3' dieses OLR identifiziert. Somit repräsentierte der pMBB51A-OLR vielmehr ein monocistronisches Gen als ein Operon. Die Promoterregion des MBB51A-Gens kann die Genexpression sowohl in E. coli als auch in Mycobakterien steuern. Diese Promotersequenz ist nützlich zur Steuerung der Expression mycobakterieller Gene in E. coli. Zudem kann diese Promotersequenz auch verwendet werden, um homologe und/oder heterologe Gene in einem Mycobakterium zu exprimieren und so ein Schlüsselelement für die Entwicklung von Genexpressionssystemen in Mycobakterien bieten.

[0051] Um Informationen über die mögliche biologische Funktion des MBB51A-Proteins abzuleiten, wurde die Aminosäuresequenz dieses Proteins verwendet, um nach einer Homologie mit verfügbaren Sequenzen in der PIR-Proteindatenbank, Ausgabe 20 (Tabelle I) und einer Genebank-Nucleinsäuredatenbank (Tabelle II) zu suchen, wobei die Fast A-Programmfolge eingesetzt wurde, geschrieben von (Lipman and Pearson, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2 (1988)). Die MBB51A-Proteinsequenz wies eine Homologie mit einer Familie ionenbewegender ATPasen aus verschiedenen Organismen auf, vom Bakterium bis hin zum Säugetier. Die 13 besten Treffer aus einer Suche mit k-Tupel 2 sind in der oberen Tafel von Tabelle I dargestellt, und die 10 besten Treffer aus einer Suche mit k-Tupel 1 sind in der unteren Tafel aufgeführt. In jedem Fall zeigte das MBB51A-Protein maximale Homologie (75.9% Homologie bei einer 593 Aminosäuren-Überlappung mit 31.9% Gleichheit) mit einer K^+-transportierenden ATPase von S. faecalis (Solioz, u.a., 1987). Die nächstbeste Homologie wurde bei der β-Kette K^+-transportierender ATPase von E. coli beobachtet (Hesse, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 4746–4750/1984)) (68.8% Homologie bei einer 397 Aminosäuren-Überlappung mit 24.2% Gleichheit). Ein geringeres Ausmaß an Homologie wurde auch erkannt bei H^+, Ca^{2+} und Na^+-ATPasen aus verschiedenen Organismen. Somit zeigten die Ergebnisse aus der Homologiesuche an, dass MBB51A-Protein eine ionenbewegende ATPase von M. bovis-BCG und eng mit den anderen bakteriellen ionenbewegenden ATPasen verwandt ist. Dies ist der erste Bericht über die Klonung und Identifikation einer solchen ATPase in Mycobakterien. Die ionenbewegende BCG-ATPase zeigte Homologien zu anderen ionenbewegenden ATPasen, wobei die Größe überlappender Regionen in einem Bereich von 593 Aminosäuren im Fall von S. faecalis bis 82 Aminosäuren im Fall von L. donovani lag (Meade, u.a., Mol. Cell. Biol., 7, 3937–3946 (1987)), obwohl die meisten der Regionen mit Sequenzgleichheit oder -konservierung in der C-terminalen Hälfte des MBB51A-Proteins lokalisiert wurden. Weiterhin wurde herausgefunden, dass eine Region mit 30 Aminosäuren in der C-terminalen Hälfte des MBB51A-Proteins mit den meisten dieser ATPasen geteilt wird, was auf die funktionelle Wichtigkeit dieser Region hinwies. Die detaillierte Anordnung des MBB51A-Proteins mit den K^+-ATPasen von S. faecalis und E. coli zeigte weiterhin an, dass mehrere Reste zwischen den drei ATPasen konserviert wurden, einschließlich jener, die invariabel in allen ATPasen sind, vom Bakterium bis hin zum Menschen.

TABELLE I ERGEBNISSE DER SUCHE NACH HOMOLOGEN ZUR MBB51A-AMINOSÄURESEQUENZ IN DER PIR-PROTEINDATENBANK

k-Tupel: 2

LOCUS	KURZDEFINITION	initn	opt
> A29576	Kalium-transportierende ATPase - Streptococcus	547	792
> PWECBK	Kalium-transportierende ATPase, β-Kette - E. coli	314	270
> A25939	Protonen-transportierende ATPase - Neurospora	169	186
> A25823	Protonen-transportierende ATPase - Hefe	166	184
> PWRBFC	Kalzium-transportierende ATPase, schnell zuckende Skelettmuskelfaser	152	158
> PWRBSC	Kalzium-transportierende ATPase, langsam zuckende Skelettmuskelfaser	131	157
> A25344	Kalium-transportierende ATPase - Ratte	78	155
> RDEBHA	Quecksilberreduktase – Shigella flexneri-Plasmid	99	142
> RDPSHA	Quecksilberreduktase – (Transposon Tn501)	74	124
> RGPSHA	Quecksilberresistenz-Operon regulatorisch p	79	109
> A24639	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha	92	82
> A24414	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha	92	82
> 824862	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, beta	83	82

[0052] Die PIR-Proteindatenbank (2378611 Reste in 9124 Sequenzen) wurde mit dem FASTA-Programm durchsucht. Das Mittel des ursprünglichen Anfangsergebnisses betrug 27.2 bei einer Standardabweichung von 6.9. Anfangsergebnisse (initn) über 75.6 lagen um sechs Standardabweichungen über dem Durchschnitt, eine Signifikanzebene, die gewöhnlich biologische Verwandtschaft anzeigt. Die Optimierung (opt) verbessert im Allgemeinen das Anfangsergebnis hinsichtlich verwandter Proteine, und zwar durch Einbringen von Lücken in die Sequenz. Bei nicht verwandten Sequenzen verbessert die Optimierung das Ergebnis meist nicht.

k-Tupel: 1

> A29576	Kalium-transportierende ATPase - Streptococcus	744	792
> PWECBK	Kalium-transportierende ATPase, β-Kette - Esche	386	270
> A25939	Protonen-transportierende ATPase - Neurospora crassa	310	186
> A25823	Protonen-transportierende ATPase - Hefe (Saccharomyces)	317	184
> B24639	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha (+ 158	163	
> A24639	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha ch	175	160
> C24639	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha (II	192	159
> PWRBFC	Kalzium-transportierende ATPase, schnell zuckende Skelettmuskelfaser	240	158
> PWSHNA	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha skele.	214	158
> A24414	Natrium/Kalium-transportierende ATPase, alpha-Kette	214	158

TABELLE II ERGEBNISSE DER SUCHE NACH HOMOLOGEN ZUR MBB51A-AMINOSÄURESEQUENZ IN DER GENEBANK-NUCLEINSÄURESEQUENZDATENBANK

k-Tupel: 2					
LOCUS		KURZDEFINITION		initn	opt
	> STRATPK	S. faecalis-K^+-ATPase, vollständige CDS	537	800	
	> ECOKDPABC	E. coli-kdpABC-Operon, kodierend für Kdp-ATPase	314	270	
	> YSPPMAIA	S. pombe-H^+-ATPase, vollständige EDS		135	188
	> NEUATPASE	N. crassa-Plasmamembran-ATPase, vollständig	133	186	
	> NEUATPPM	Neurospora crassa-Plasmamembran-H^+-ATPase	131	186	
	> YSCPMAI	Hefe PMA1 für Plasmamembran-ATPase		166	184
	> M17889	Figur 2. N von L. donovani-ATPase und		166	170
	> M12898	Ca^{2+}-ATPase der Skelettmuskelfasern vom schnell zuckenden Typ beim Kaninchen		140	158
	> RABATPAC	Kaninchen, Ca + Mg abhängige Ca^{2+}-ATPase mRNA. co		142	157
	> NR1MER	Plasmid NR 1 Quesilberresistenz (mer) -Operon		100	143
k-Tupel: 1					
> STRATPK		S. faecalis-K^+-ATPase gen. vollständige EDS		744	800
> SYNCATPSB		Cyanabacterium Synechococcus 6301 DNA für AT	379	422	
> ECOKDPABC		E. coli-kdpABC-Operon, kodierend für Kdp-ATPase p	379	270	
> YSPPMAIA		S. pompe-H^+-ATPase gen. vollständige CDS	275	188	
> NEUATPASE		N. crassa-Plasmamembran-ATPase gen. vollständig	311	186	
> NEUATPPM		Neurospora crassa-Plasmamebran-H^+-ATPase	302	186	
> YSCPMAI		Hefe PMAI-Gen für Plasmamembran-ATPase	317	184	
> J04004		Leishmania donovani, Kationen-transportierende ATP	322	170	
> M17889		Figur 2. Nukleotidsequenz von L. donovani		306	170
> RATATPA2		Ratte, $Na^+.K^+$-ATPase alpha $^{(+)}$ isoform katalytisch	158	163	

[0053] Das KdpB-Protein von E. coli und möglicherweise die S. faecalis-K^+-ATPase gehören zu den E1E2-ATPasen, von denen bekannt ist, dass sie ein Aspartylphosphat-Intermediat bilden, und zwar mit zyklischer Transformation des Enzyms zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter Spezies. In Analogie zu anderen ATPasen wurde der phosporylierte Aspartatrest (D) (Furst, u.a., J. Biol. Chem., 260: 50–52 (1985)) an Position 443 in der MBB51A-ATPase identifiziert. Dieser Rest ist der erste einer Pentapeptidsequenz DKTGT, die in ATPasen – vom Bakterium bis hin zum Menschen – konserviert ist, und muss ein wesentliches Element der katalytischen Stelle bilden. In ähnlicher Weise wurde von Prolin (P) an Position 400 in der MBB51A-ATPase herausgefunden, dass es in anderen ATPasen eine unveränderliche Aminosäure darstellt, und es wird von Prolin angenommen, dass es sich in einer Membran-durchspannenden Domäne aufhält. Von solchen in die Membran eingelagerten Prolinresten wird vermutet, dass sie für die reversiblen konformativen Veränderungen benötigt werden, die für die Regulierung eines Transportkanals notwendig sind (Brandl, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83: 917–921 (1986)). Außerdem wurde für weitere Sequenzmotive, denen funktionelle Bedeutung in anderen ionenbewegenden ATPasen beigemessen wird, ebenfalls herausgefunden, dass sie in der MBB51A-ATPase konserviert werden. Zu diesen zählen Gly (G) (Farley und Faller, J. Biol. Chem., 260: 3899–3901 (1985)) an Position 521 und Ala (A) (Ohta, u.a., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83: 2071–2075 (1986)) an Position 646, welche in **Fig. 5** dargestellt sind.

[0054] Da die MBB51A-ATPase homolog zu Membran-assoziierten ATPasen war, wurde die Charakterisierung der Membran-assoziierten Helices im MBB51A-Protein mittels Computeralgorithmen vorgenommen. Unter Verwendung eines Hydropathieprofils (Rao, u.a., Biochem. Biophys. Acta., 869: 197–214 (1986)) wurden

sieben Transmembrandomänen in dem MBB51A-Protein identifiziert und sind nun in Tabelle III und Fig. 5 aufgeführt. Nahezu die gleichen Transmembrandomänen wurden außerdem durch den Plot des hydrophoben Moments identifiziert (Eisenberg, u.a., J. Mol. Biol., 179: 125–142 (1984)) und sind ebenfalls in Tabelle III und Fig. 5 dargestellt. Die Durchschnittsgröße einer Transmembrandomäne beläuft sich auf ungefähr 21 Reste, weil sich 21 Reste zu einer α-Helix mit annähernd der Dicke der apolaren Position einer Lipiddoppelschicht (32Å) winden. Allerdings ist diese Größe einer Transmembrandomäne innerhalb eines Bereichs, der ein paar Aminosäuren umfasst, flexibel, wie durch die funktionellen Eigenschaften eines gegebenen Membran-assoziierten Proteins bestimmt wird. Die Größe der im MBB51A-Protein identifizierten Transmembrandomänen liegt im Bereich von 20–37 Resten. Die ersten sechs Transmembrandomänen durchspannen die Membran nur einmal, wie sowohl das Hydropathieprofil als auch der Plot des hydrophoben Moments ergeben hat. Die siebte Transmembrandomäne kann die Membran zweimal durchqueren. Gemeinsam mit dem in der Membran eingelagerten Prolin (P) an Position 400 entsprechen diese Merkmale den Kanaltransportfunktionen ionenbewegender ATPasen und schließen eine reversible Veränderung bei der Konformation dieser Proteine ein. Ferner bestimmen solche Transmembrandomänen die intrazellulären und extrazellulären Domänen dieses Moleküls. S. Fig. 5.

Tabelle III

Transmembrandomäne in Fig. 5	Verfahren nach Eisenberg	Verfahren nach Rao & Argos
1	102 - 122	98 - 125
2	129 - 149	127 - 147
3	164 - 184	164 - 185
4	199 - 219	198 - 220
5	361 - 381	360 - 382
6	387 - 407	387 - 419
7	703 - 723	695 - 732

[0055] Das Hydropathieprofil des MBB51A-Proteins deckte sich beinahe mit jenem der S. faecalis-K^+-ATPase, obwohl die MBB51A-ATPase am N-Terminus 154 zusätzliche Aminosäuren aufweist, welche in S. faecalis nicht vorhanden waren. Dies hebt deutlich die starke evolutionäre Konservierung der breiten Domänenstruktur zwischen diesen beiden Proteinen hervor, was die Wahrscheinlichkeit vergrößert, dass die beiden Proteine über einen ähnlichen dreidimensionalen strukturellen Aufbau verfügen.

[0056] Beruhend auf dem Hydropathieprofil und auf Vorhersagen über die sekundäre Struktur wird in Fig. 5 ein schematisches Modell der MBB51A-ATPase präsentiert. Dieses Modell umfasst mindestens sieben Transmembrandomänen, welche die Membran einmal durchspannen und zusammen mit den jeweiligen Aminosäurepositionen in Fig. 5 angegeben sind. Darüber hinaus definiert dieses Modell extrazelluläre und intrazelluläre Domänen des MBB51A-Proteins. Ebenfalls veranschaulicht werden viele der Reste, deren funktionelle Bedeutung in anderen ionenbewegenden ATPasen dargelegt wurde und die auch in dem MB551A-Protein konserviert werden. Von diesen befindet sich Prolin (P) an Position 400 im Transmembranbereich, wohingegen Asparaginsäure (D) an 443, Glycin (G) an 521 und Alanin (A) an 646 dem Zytoplasma zugewandt sind.

[0057] Um zu bestimmen, ob das Gen, das für die ionenbewegende MBB51A-ATPase kodiert, in anderen mycobakteriellen Stämmen vorhanden ist, seien sie mit BCG verwandt oder nicht, wie der virulente Stamm M. tuberculosis-H37Rv und andere nicht-tuberkulöse, nicht-pathogene Mycobakterien wie M. vaccae und M. smegmatis, wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung mit genomischer DNA von den obigen Spezies durchgeführt, wobei als Sonde BCG-Insert-DNA von pMBB51A zum Einsatz kam. Wie in **Fig.** 6 veranschaulicht, war mit der pMBB51A-Insert-DNA hybridisierbare DNA auch in M. tuberuclosis-H37Rv-DNA vorhanden, jedoch nicht in M. smegmatis und M. vaccae. Dies zeigte an, dass das M. tuberuclosis-H37Rv-Homolog des pMBB51A-Gens einen ähnlichen genetischen Aufbau besitzt, wie bei M. bovis-BCG-DNA vorgefunden, und auf einem 3.25 kb-BamHI-Fragment präsent ist.

[0058] Die Verfügbarkeit neuartiger Mycobacterium bovis-BCG- und/oder Mycobacterium tuberculosis-H37Rv-Antigene eröffnet die Möglichkeit, an grundlegende biochemische, immunologische, diagnostische und therapeutische Fragen über Tuberkulose und Mycobacterium tuberculosis heranzugehen, die noch unbeantwortet sind. Beispielsweise können Mycobacterium tuberculosis spezifische, antigene Determinanten eingesetzt werden, um einfache und zielgerichtete seroepidemiologische Versuche zur Durchsuchung menschlicher Populationen zu entwickeln. Derartige serologische Versuche sind hochspezifisch aufgrund der Verwendung antigener Determinanten, die durch die obig erläuterten Herangehensweisen bestimmt sind und von de-

nen bekannt ist, dass sie spezifisch für Mycobacterium tuberculosis-H37Rv sind. Solche serologischen Versuche sind nützlich zur Frühdiagnose von Tuberkulose, womit sie eine frühzeitige Behandlung gestatten und die Übertragung der Krankheit von infizierten Individuen an andere eingrenzen.

[0059] Eine Resistenz gegenüber Tuberkulose wird durch zellvermittelte Immunität verliehen. Die hier identifizierten Antigene können weiterhin benutzt werden, um zu bestimmen, welche Segmente dieser Antigene von Mycobacterium tuberculosis spezifischen T-Zellen erkannt werden. Eine Mischung aus Peptiden, die durch Helfer-T-Zellen erkannt wird, liefert ein spezifisches Hauttestantigen zur Verwendung bei der Feststellung des immunologischen Status von Patienten und deren Kontakten. Eine Mischung aus solchen Peptiden ist außerdem bei der raschen Beurteilung der immunologischen Effizienz von Kandidatenvakzinen nützlich. Zusätzlich können Peptide, die durch Mycobacterium tuberculosis spezifische T-Zellen erkannt werden, Komponenten eines Vakzins gegen die Krankheit sein.

[0060] Die Kenntnis der vollständigen Nukleotidsequenz von pMBB51A-DNA-Insert bietet eine reichhaltige Quelle von Sequenzinformationen, die sich nutzen lassen, um geeignete Primer für die PCR-Amplifikation mycobakterieller genomischer DNA-Fragmente zu entwerten. Die ionenbewegende ATPase von BCG weist Bereiche mit stark konservierten Sequenzen auf (z.B. für die ATP-Bindungsstelle), von denen angenommen wird, dass sie bei allen mycobakteriellen Spezies die gleichen sind, und Sequenzdivergenzbereiche (z.B. für die N-terminale Region), welche sich bei verschiedenen mycobakteriellen Spezies unterscheiden. Auf Grundlage dieses Wissens können Primer entweder anhand der konservierten Regionen oder anhand der divergierenden Regionen gestaltet werden, um zu identifizieren, ob in einer gegebenen Probe die Ziel-DNA mycobakteriell ist oder nicht, und um im Fall mycobakterieller DNA zu ermitteln, zu welcher mycobakteriellen Spezies die DNA gehört.

[0061] Solche Amplifikationsschemen sind zweckmäßig zur Entwicklung hochsensibler und spezifischer diagnostischer Verfahren für Mycobakterien, die auf PCR-Amplifikation beruhen. Die Beobachtung, dass das 3.25kb-pMBB51A-DNA-Insert in Mycobacterium tuberculosis-H37Rv und Mycobacterium bovis-BCG vorhanden ist und nicht in den avirulenten Mycobacterium vaccae und Mycobacterium smegmatis, die einen Einfluss auf andere Aspekte der biologischen Unterschiede zwischen diesen Spezies haben, manifestiert sich in Bezug auf Virulenz, Wachstumscharakteristiken und Metabolismus.

[0062] Rekombinante Vakzine lassen sich auch dadurch konstruieren, dass die DNA, die für die Gesamtheit oder einen Teil der erfindungsgemäßen Membran-assoziierten Polypeptide kodiert, in ein geeignetes Vakzinvehikel eingegliedert wird. Beispielsweise kann die Gesamtheit oder ein Teil der DNA, die für das 79 kD-Mycobakterium bovis-BCG-Protein oder einen Abschnitt des Proteins kodiert, in ein Vakzinvehikel eingegliedert werden, das in der Lage ist, die besagte DNA zu exprimieren. Ein solches Vakzinvehikel könnte ein Virus, z.B. Vaccinia-Virus, etc. sein oder ein Bakterium, z.B. Mycobakterium, Salmonella, Vibrio, Bacillus, Yersinia, Bordetella, etc., damit ein Vakzin hergestellt wird, welches Individuen, denen es verabreicht wird, eine langanhaltende Immunität verleihen kann.

[0063] Ein besonderes Merkmal der ionenbewegenden 79 kD-BCG-ATPase besteht dann, dass diese ein Membran-gebundenes Antigen darstellt. Deshalb ist sie einsetzbar, um fremde DNA-Sequenzen, die für maßgebliche antigene Epitope (B-Zellen-Epitope oder T-Zellen-Epitope) kodieren, mit diesem Gen oder einem Abschnitt dieses Gens in einer Weise zu verkoppeln, die bewirkt, dass das fremde Epitop als Immunogen verwendet wird. Solche Verkoppelungen können in extrazelluläre oder intrazelluläre Domänen des MBB51A-Proteins oder in eine Kombination aus beiden Domäntypen eingebaut werden. Das Einbauen immunogener Fremdepitope in MBB51A-DNA wird durch gängige Verfahren mit rekombinanter DNA erreicht, welche Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind. Einige dieser Verfahren umfassen den Gebrauch von unique Cloning-Sites, In-Vitro-Mutagenese und/oder mit PCR verwandte Techniken. Eines dieser geeigneten Verfahren beinhaltet die Verwendung einer unique NdeI-Site an Position 1090 in der MBB51-DNA, wo fremde DNA eingefügt werden kann. Das Grafting von Epitopen auf der Zelloberfläche induziert eine schnelle Antikörperreaktion aufgrund dessen, dass das Epitop auf der bakteriellen Zelle gut exponiert ist, was wiederum zur direkten Aktivierung von B-Zellen führt. Außerdem induziert die intrazelluläre Lokalisierung eines Epitops ein 8-Zellen-Gedächtnis und eine sehr brauchbare T-Zellen-Reaktion. Zu den Beispielen für maßgebliche Epitope, von denen bekannt ist, dass sie an der Immunreaktion auf verschiedene Pathogene beteiligt sind, zählen Epitope von E. coli-LT-Toxin, das Maul- und Klauenseuchevirus, HIV, Choleratoxin, etc.

[0064] So ist das 79 kD-Antigen nutzbringend bei der Gestaltung rekombinanter Vakzine gegen verschiedene Pathogene. Zu diesen Vakzinen gehören ein rekombinantes Vakzinvehikel, das in der Lage ist, die Gesamtheit oder einen Teil des 79 kD-Membran-assoziierten Proteins von Mycobakterien zu exprimieren, worin Fremde-

pitope eingebaut sind, so dass die Fremdepitope auf der äußeren Oberfläche und/oder auf der inneren Seite der Zellmembran exprimiert werden, wodurch den Fremdepitopen Immunogenität verliehen wird. Das für diesen Zweck verwendete Vakzinvehikel kann ein kultivierbares Mycobakterium wie z.B. BCG sein. Bei diesen Anwendungen kann das ionenbewegende BCG-ATPase-Gen auf einem mycobakteriellen Shuttle-Vektor transportiert werden, oder alternativ dazu kann die fremde DNA, die für antigene Epitope der immunogenen Polypeptide kodiert, in das mycobakterielle Genom mittels homologer Rekombination in dem ionenbewegenden ATPase-Gen oder mittels Random-Integration eingefügt werden. Ein solcher Prozess ergibt stabile rekombinante mycobakterielle Stämme, die auf ihrer Oberfläche und/oder im Cytoplasma maßgebliche antigene Sequenzen exprimieren können, die beispielsweise dazu in der Lage sind, Schutz gegen eine Vielzahl infektiöser Pathogene zu bieten. Das Targeting rekombinanter Antigene zu der Zellwand ist nicht nur aufgrund der hohen Immunogenität mycobakterieller Zellwänder attraktiv, sondern auch aufgrund von Belangen hinsichtlich der Einführung eines Lebendvakzins in Populationen mit hoher Prävalenz von HIV-Seropositivität. Überdies kann auf Grundlage des MBB51A-Proteins eine nicht lebendes, aber immunogenes rekombinantes Zelloberflächen-Untereinheit-Vakzin entwickelt werden, um eine nützliche Alternative zu Lebendvakzinen zur Verfügung zu stellen. Alternativ könnten andere bakterielle, virale oder einzellige Vakzinvehikel transformiert werden, um diese rekombinanten Vakzine zu erzeugen. Zu den Beispielen für potentielle Vakzinvehikel gehören Vaccinia-Virus, Pocken-Viren, Salmonella, Yerisinia, Vibrio, Bordetella, Bacillus, etc.

[0065] Ferner könnten bei einer solchen Herangehensweise multivalente rekombinante Vakzine entworfen werden, welche die simultane Expression multipler protektiver Epitope/Antigene verschiedener Pathogene gestatten.

Äquivalente

[0066] Fachleute auf diesem Gebiet werden viele Äquivalente zu den speziellen Materialien und Komponenten, die hierin spezifisch beschrieben sind, erkennen oder in der Lage sein, diese unter bloßem Einsatz von Routineversuchen herauszufinden. Es ist beabsichtigt, dass die Tragweite der folgenden Ansprüche derartige Äquivalente umfasst.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Munshi, Anil Kapoor, Archana

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Membran-assoziierte Immunogene der Mycobakterien

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Richard F. Trecartin
(B) STRAßE: 4 Embarcadero Center, Suite 3400
(C) STADT: San Francisco
(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
(E) LAND: USA
(F) PLZ: 94111

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: PCT/US/93/
(B) ANMELDEDATUM: 28. Juni 1993
(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Trecartin, Richard F
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31,801
(C) REFERENZ-/AKTENNUMMER: FP-57004/RFT

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

(A) TELEFON: (415) 781-1989
(B) TELEFAX: (415) 398-3249

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 3250 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) ORT: 508..2790

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID Nr. 1

```
GGATCCCGCG GTCATCGATC GGGTCAAACA CCGCCTCGAC GGGTTCACGC TGGCGCCGCT
    60

GTCCACCGCC GCGGGAGGTG GTGGCCGGCA GCCACGCATC TACTACGGCA CCATCCTGAC
   120

CGGTGACCAA TACCTTCACT GCGAGCGCAC CCGCAACCGG CTGCACCACG AACTCGGCGG
   180

TATGGCCGTC GAAATGGAAG GCGGTGCGGT GGCGCAAATC TGCGCGTCCT TCGATATCCC
   240

ATGGCTGGTC ATTCGCGCGC TCTCCGATCT CGCCGGAGCC GATTCGGGGG TGGACTTCAA
   300

TCGGTTTGTC GGCGAGGTGG CGGCCAGTTC GGCCCGCGTT CTGCTGCGCT TGCTGCCGG
   360

GTTGACGGCC TGTTGAAGAC GACTATCCGC CGGTGCGTTC ACCGCGTCAG GCGGCTTCGG
   420

TGAGGTGAGT AATTTGGTCA TTAACTTGGT CATGCCGCCG CCGATGTTGA GCGGAGGCCA
   480

CAGGTCGGCC GGAAGTGAGG AGCCACG ATG ACG GCG GCC GTG ACC GGT GAA
    531
                                Met Thr Ala Ala Val Thr Gly Glu
                                  1               5

CAC CAC GCG AGT GTG CAG CGG ATA CAA CTC AGA ATC AGC GGG ATG TCG
    579
His His Ala Ser Val Gln Arg Ile Gln Leu Arg Ile Ser Gly Met Ser
     10                  15                  20

TGC TCT GCG TGC GCC CAC CGT GTG GAA TCG ACC CTC AAC AAG CTG CCG
    627
Cys Ser Ala Cys Ala His Arg Val Glu Ser Thr Leu Asn Lys Leu Pro
 25                  30                  35                  40

GGG GTT CGG GCA GCT GTG AAC TTC GGC ACC CGG GTG GCA ACC ATC GAC
    675
Gly Val Arg Ala Ala Val Asn Phe Gly Thr Arg Val Ala Thr Ile Asp
                 45                  50                  55

ACC AGC GAG GCG GTC GAC GCT GCC GCG CTG TGC CAG GCG GTC CGC CGC
    723
Thr Ser Glu Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Cys Gln Ala Val Arg Arg
             60                  65                  70

GCG GGC TAT CAG GCC GAT CTG TGC ACG GAT GAC GGT CGG AGC GCG AGT
    771
Ala Gly Tyr Gln Ala Asp Leu Cys Thr Asp Asp Gly Arg Ser Ala Ser
         75                  80                  85
```

```
GAT CCG GAC GCC GAC CAC GCT CGA CAG CTG CTG ATC CGG CTA GCG ATC
    819
Asp Pro Asp Ala Asp His Ala Arg Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ala Ile
     90                  95                 100

GCC GCC GTG CTG TTT GTG CCC GTG GCC GAT CTG TCG GTG ATG TTT GGG
    867
Ala Ala Val Leu Phe Val Pro Val Ala Asp Leu Ser Val Met Phe Gly
105                 110                 115                 120

GTC GTG CCT GCC ACG CGC TTC ACC GGC TGG CAG TGG GTG CTA AGC GCG
    915
Val Val Pro Ala Thr Arg Phe Thr Gly Trp Gln Trp Val Leu Ser Ala
                125                 130                 135

CTG GCA CTG CCG GTC GTG ACC TGG GCG GCG TGG CCG TTT CAC CGC GTT
    963
Leu Ala Leu Pro Val Val Thr Trp Ala Ala Trp Pro Phe His Arg Val
        140                 145                 150

GCG ATG CGC AAC GCC CGC CAC CAC GCC GCC TCC ATG GAG ACG CTA ATC
   1011
Ala Met Arg Asn Ala Arg His His Ala Ala Ser Met Glu Thr Leu Ile
        155                 160                 165

TCG GTC GGT ATC ACG GCC GCC ACG ATC TGG TCG CTG TAC ACC GTC TTC
   1059
Ser Val Gly Ile Thr Ala Ala Thr Ile Trp Ser Leu Tyr Thr Val Phe
    170                 175                 180

GGC AAT CAC TCG CCC ATC GAG CGC AGC GGC ATA TGG CAG GCG CTG CTG
   1107
Gly Asn His Ser Pro Ile Glu Arg Ser Gly Ile Trp Gln Ala Leu Leu
185                 190                 195                 200

GGA AGC GAT GCT ATT TAT TTC GAG GTC GCG GCG GGT GTC ACG GTG TTC
   1155
Gly Ser Asp Ala Ile Tyr Phe Glu Val Ala Ala Gly Val Thr Val Phe
                205                 210                 215

GTG CTG GTG GGG CGG TAT TTC GAG GCG CGC GCC AAG TCG CAG GCG GGC
   1203
Val Leu Val Gly Arg Tyr Phe Glu Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly
            220                 225                 230

AGT GCG CTG AGA GCC TTG GCG GCG CTG AGC GCC AAG GAA GTA GCC GTC
   1251
Ser Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val
        235                 240                 245

CTG CTA CCG GAT GGG TCG GAG ATG GTC ATC CCG GCC GAC GAA CTC AAA
   1299
Leu Leu Pro Asp Gly Ser Glu Met Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys
    250                 255                 260
```

```
GAA CAG CAG CGC TTC GTG GTG CGT CCA GGG CAG ATA GTT GCC GCC GAC
   1347
Glu Gln Gln Arg Phe Val Val Arg Pro Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp
265                 270                 275                 280

GGC CTC GCC GTC GAC GGG TCC GCT GCG GTC GAC ATG AGC GCG ATG ACC
   1395
Gly Leu Ala Val Asp Gly Ser Ala Ala Val Asp Met Ser Ala Met Thr
                285                 290                 295

GGC GAG GCC AAA CCG ACC CGG GTG CGT CCG GGG GGG CAG GTC ATC GGC
   1443
Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly
            300                 305                 310

GGC ACC ACA GTG CTT GAC GGC CGG CTG ATC GTG GAG GCG GCC GCG GTG
   1491
Gly Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val
        315                 320                 325

GGC GCC GAC ACC CAG TTC GCC GGA ATG GTC CGC CTC GTT GAG CAA GCG
   1539
Gly Ala Asp Thr Gln Phe Ala Gly Met Val Arg Leu Val Glu Gln Ala
    330                 335                 340

CAG GCG CAA AAG GCC GAC GCA CAG CGA CTA GCC GAC CGG ATC TCC TCG
   1587
Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln Arg Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser
345                 350                 355                 360

GTG TTT GTT CCC GCT GTG TTG GTT ATC GCG GCA CTA ACC GCA GCC GGA
   1635
Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val Ile Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly
                365                 370                 375

TGG CTA ATC GCC GGG GGA CAA CCC GAC CGT GCC GTC TCG GCC GCA CTC
   1683
Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu
            380                 385                 390

GCC GTG CTT GTC ATC GCC TGC CCG TGT GCC CTG GGG CTG GCG ACT CCG
   1731
Ala Val Leu Val Ile Ala Cys Pro Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro
        395                 400                 405

ACC GCG ATG ATG GTG GCC TCT GGT CGC GGT GCC CAG CTC GGA ATA TTT
   1779
Thr Ala Met Met Val Ala Ser Gly Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe
    410                 415                 420

CTG AAG GGC TAC AAA TCG TTG GAG GCC ACC CGC GCG GTG GAC ACC GTC
   1827
Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu Ala Thr Arg Ala Val Asp Thr Val
425                 430                 435                 440
```

```
GTC TTC GAC AAG ACC GGC ACC CTG ACG ACG GGC CGG CTG CAG GTC AGT
   1875
Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr Gly Arg Leu Gln Val Ser
        445                 450                 455

GCG GTG ACC GCG GCA CCG GGC TGG GAG GCC GAC CAG GTG CTC GCC TTG
   1923
Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu
            460                 465                 470

GCC GCG ACC GTG GAA GCC GCG TCC GAG CAC TCG GTG GCG CTC GCG ATC
   1971
Ala Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile
        475                 480                 485

GCC GCG GCA ACG ACT CGG CGA GAC GCG GTC ACC GAC TTT CGC GCC ATA
   2019
Ala Ala Ala Thr Thr Arg Arg Asp Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile
    490                 495                 500

CCC GGC CGC GGC GTC AGC GGC ACC GTG TCC GGG CGG GCG GTA CGG GTG
   2067
Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr Val Ser Gly Arg Ala Val Arg Val
505                 510                 515                 520

GGC AAA CCG TCA TGG ATC GGG TCC TCG TCG TGC CAC CCC AAC ATG CGC
   2115
Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ser Cys His Pro Asn Met Arg
                525                 530                 535

GCG GCC CGG CGC CAC GCC GAA TCG CTG GGT GAG ACG GCC GTA TTC GTC
   2163
Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val
            540                 545                 550

GAG GTC GAC GGC GAA CCA TGC GGG GTC ATC GCG GTC GCC GAC GCC GTC
   2211
Glu Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val
        555                 560                 565

AAG GAC TCG GCG CGA GAC GCC GTG GCC GCC CTG GCC GAT CGT GGT CTG
   2259
Lys Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu
    570                 575                 580

CGC ACC ATG CTG TTG ACC GGT GAC AAT CCC GAA TCG GCG GCG GCC GTG
   2307
Arg Thr Met Leu Leu Thr Gly Asp Asn Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val
585                 590                 595                 600

GCT ACT CGC GTC GGC ATC GAC GAG GTG ATC GCC GAC ATC CTG CCG GAA
   2355
Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu Val Ile Ala Asp Ile Leu Pro Glu
                605                 610                 615
```

```
GGC AAG GTC GAT GTC ATC GAG CAG CTA CGC GAC CGC GGA CAT GTC GTC
   2403
Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val
            620                 625                 630

GCC ATG GTC GGT GAC GGC ATC AAC GAC GGA CCC GCA CTG GCC CGT GCC
   2451
Ala Met Val Gly Asp Gly Ile Asn Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala
        635                 640                 645

GAT CTA GGC ATG GCC ATC GGG CGC GGC ACG GAC GTC GCG ATC GGT GCC
   2499
Asp Leu Gly Met Ala Ile Gly Arg Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala
    650                 655                 660

GCC GAC ATC ATC TTG GTC CGC GAC CAC CTC GAC GTT GTA CCC CTT GCG
   2547
Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp His Leu Asp Val Val Pro Leu Ala
665                 670                 675                 680

CTT GAC CTG GCA AGG GCC ACG ATG CGC ACC GTC AAA CTC AAC ATG GTC
   2595
Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr Met Arg Thr Val Lys Leu Asn Met Val
                685                 690                 695

TGG GCA TTC GGA TAC AAC ATC GCC GCG ATT CCC GTC GCC GCT GCC GGA
   2643
Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly
            700                 705                 710

CTG CTC AAC CCC CTG GTG GCC GGT GCG GCC ATG GCG TTC TCA TCG TTC
   2691
Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly Ala Ala Met Ala Phe Ser Ser Phe
        715                 720                 725

TTC GTG GTC TCA AAC AGC TTG CGG TTG CGC AAA TTT GGG CGA TAC CCG
   2739
Phe Val Val Ser Asn Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro
    730                 735                 740

CTA GGC TGC GGA ACC GTC GGT GGG CCA CAA ATG ACC GCG CCG TCG TCC
   2787
Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly Pro Gln Met Thr Ala Pro Ser Ser
745                 750                 755                 760

GCG TGATGCGTTG TCGGGCAACA CGATATCGGG CTCAGCGGCG ACCGCATCCG
   2840
Ala

GTCTCGGCCG AGGACCAGAG GCGCTTCGCC ACACCATGAT TGCCAGGACC GCGCCGATCA
  2900

CCACCGGCAG ATGAGTCAAA ATCCGCGTGG TGCTGACCGC GCCGGACAGC GCATCCACAA
  2960
```

```
TCACATAGCC GGTCAGTATG GCGACGAACG CCGTCAGAAC ACCGGCCAGG CCGGCGGCGG
  3020

CGCTCGGCCA TAGCGCCGCG CCCACCATGA TCACACCGAG CGCAATCGAC CACGACGTGA
  3080

CTCGTTGAGC AAGTGGGTGC CGGCACCCGT CGGGTGCTGA TGGGTCAGGC CGACGTCTAG
  3140

GCCAAACCCC TGCACGGTGC CCAGGGCGAT CTGCGCGATG CCCACGCACA GCAACGCCCA
  3200

ACGTCGCCAG GTCATCGGTG AATGTTGCCG CCGCGGCGCC CGGCGGATCC
   3250
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 761 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```
Met Thr Ala Ala Val Thr Gly Glu His His Ala Ser Val Gln Arg Ile
  1               5                  10                  15

Gln Leu Arg Ile Ser Gly Met Ser Cys Ser Ala Cys Ala His Arg Val
             20                  25                  30

Glu Ser Thr Leu Asn Lys Leu Pro Gly Val Arg Ala Ala Val Asn Phe
         35                  40                  45

Gly Thr Arg Val Ala Thr Ile Asp Thr Ser Glu Ala Val Asp Ala Ala
     50                  55                  60

Ala Leu Cys Gln Ala Val Arg Arg Ala Gly Tyr Gln Ala Asp Leu Cys
 65                  70                  75                  80

Thr Asp Asp Gly Arg Ser Ala Ser Asp Pro Asp Ala Asp His Ala Arg
                 85                  90                  95

Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ala Ile Ala Ala Val Leu Phe Val Pro Val
            100                 105                 110

Ala Asp Leu Ser Val Met Phe Gly Val Val Pro Ala Thr Arg Phe Thr
        115                 120                 125

Gly Trp Gln Trp Val Leu Ser Ala Leu Ala Leu Pro Val Val Thr Trp
    130                 135                 140

Ala Ala Trp Pro Phe His Arg Val Ala Met Arg Asn Ala Arg His His
145                 150                 155                 160
```

Ala Ala Ser Met Glu Thr Leu Ile Ser Val Gly Ile Thr Ala Ala Thr
165 170 175

Ile Trp Ser Leu Tyr Thr Val Phe Gly Asn His Ser Pro Ile Glu Arg
180 185 190

Ser Gly Ile Trp Gln Ala Leu Leu Gly Ser Asp Ala Ile Tyr Phe Glu
195 200 205

Val Ala Ala Gly Val Thr Val Phe Val Leu Val Gly Arg Tyr Phe Glu
210 215 220

Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly Ser Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala
225 230 235 240

Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val Leu Leu Pro Asp Gly Ser Glu Met
245 250 255

Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys Glu Gln Gln Arg Phe Val Val Arg
260 265 270

Pro Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp Gly Leu Ala Val Asp Gly Ser Ala
275 280 285

Ala Val Asp Met Ser Ala Met Thr Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val
290 295 300

Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly Gly Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg
305 310 315 320

Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val Gly Ala Asp Thr Gln Phe Ala Gly
325 330 335

Met Val Arg Leu Val Glu Gln Ala Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln
340 345 350

Arg Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val
355 360 365

Ile Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro
370 375 380

Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu Ala Val Leu Val Ile Ala Cys Pro
385 390 395 400

Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala Met Met Val Ala Ser Gly
405 410 415

Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu
420 425 430

Ala Thr Arg Ala Val Asp Thr Val Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu
435 440 445

Thr Thr Gly Arg Leu Gln Val Ser Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp
450 455 460

```
Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu Ala Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser
465                 470                 475                 480

Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Thr Thr Arg Arg Asp
                485                 490                 495

Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr
            500                 505                 510

Val Ser Gly Arg Ala Val Arg Val Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser
        515                 520                 525

Ser Ser Cys His Pro Asn Met Arg Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser
    530                 535                 540

Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val Glu Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly
545                 550                 555                 560

Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val Lys Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val
                565                 570                 575

Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu Arg Thr Met Leu Leu Thr Gly Asp
            580                 585                 590

Asn Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu
        595                 600                 605

Val Ile Ala Asp Ile Leu Pro Glu Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln
    610                 615                 620

Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val Ala Met Val Gly Asp Gly Ile Asn
625                 630                 635                 640

Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala Asp Leu Gly Met Ala Ile Gly Arg
                645                 650                 655

Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp
            660                 665                 670

His Leu Asp Val Val Pro Leu Ala Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr Met
        675                 680                 685

Arg Thr Val Lys Leu Asn Met Val Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala
    690                 695                 700

Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly
705                 710                 715                 720

Ala Ala Met Ala Phe Ser Ser Phe Phe Val Val Ser Asn Ser Leu Arg
                725                 730                 735

Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly
            740                 745                 750

Pro Gln Met Thr Ala Pro Ser Ser Ala
        755                 760
```

Patentansprüche

1. Isolierte Nucleinsäure, bestehend aus einer Sequenz, die für ein immunogenes, Membran-assoziiertes Protein von M. tuberculosis oder M. bovis kodiert, worin das Protein:
(a) die Sequenz von Seq.-ID Nr. 2 oder das entsprechende Homolog von Seq.-ID Nr. 2 in M. tuberculosis aufweist; und
(b) eine ionenbewegende 79-kD-ATPase ist
und worin die Nucleinsäure durch Isolieren von DNA aus dem Mycobakterium erhältlich ist, die an eine DNA-Sonde mit der Komplementärsequenz zu jener, die in Seq.-ID Nr. 1 gezeigt ist, unter Bedingungen hybridisiert, unter denen die Sonde an einzelne 3,25-kb-BamHI-Fragmente von M.-bovis-BCG- und M. tuberculosis-H37Rv-DNA hybridisiert, jedoch nicht mit BamHI-verdauter DNA aus entweder M. smegmatis oder M. vac-

cae hybridisiert.

2. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 1, worin die Nucleinsäure für ein immunogenes, Membran-assoziiertes Protein von M. tuberculosis kodiert.

3. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 1, worin die Nucleinsäure für ein immunogenes, Membran-assoziiertes Protein von M. tuberculosis mit der in Seq.-ID Nr. 2 gezeigten Sequenz kodiert.

4. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 3, bestehend aus der in Seq.-ID Nr. 1 gezeigten Kodiersequenz.

5. Replizierbarer Vektor, umfassend Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

6. Wirtszelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 5 transformiert ist.

7. Isoliertes Polypeptid von M. tuberculosis oder M. bovis, worin das Polypeptid:
(a) ein immunogenes, Membran-assoziiertes Protein mit der Sequenz von Seq.-ID Nr. 2 oder dem entsprechenden Homolog von Seq.-ID Nr. 2 in M. tuberculosis ist;
(b) eine ionenbewegende 79-kD-ATPase ist; und
(c) dafür von Nucleinsäure kodiert wird, die durch Isolieren von DNA aus M. tuberculosis oder M. bovis erhältlich ist, die mit einer DNA-Sonde mit der Komplementärsequenz zu jener, die in Seq.-ID Nr. 1 gezeigt ist, unter Bedingungen hybridisiert, unter denen die Sonde an einzelne 3,25-kb-BamHI-Fragmente von M.-bovis-BCG- und M. tuberculosis-H37Rv-DNA hybridisiert, jedoch nicht mit BamHI-verdauter DNA aus entweder M. smegmatis oder M. vaccae hybridisiert.

8. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 7, worin das Polypeptid ein M.-tuberculosis-Polypeptid ist.

9. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 7, worin das Polypeptid ein M.-bovis-Polypeptid mit der in Seq.-ID Nr. 2 gezeigten Sequenz ist.

10. Polypeptid nach Anspruch 7, umfassend zumindest eine extrazelluläre Domäne des Membran-assoziierten Polypeptids.

11. Polypeptid nach Anspruch 7, umfassend zumindest eine intrazelluläre Domäne des Membran-assoziierten Polypeptids.

12. Polypeptid nach Anspruch 7, umfassend zumindest eine Transmembrandomäne des Membran-assoziierten Polypeptids.

13. Vakzine, umfassend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12.

14. Vakzine, umfassend eine exprimierbare Nucleinsäure, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12 kodiert, in einem rekombinanten Vakzinenvehikel, das in der Lage ist, die DNA zu exprimieren, worin das Vakzinenvehikel ein Virus oder ein Bakterium umfasst.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

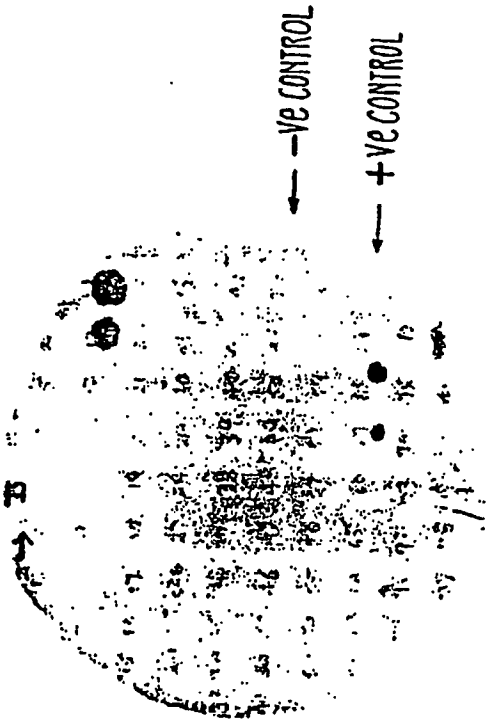

Fig. 1B

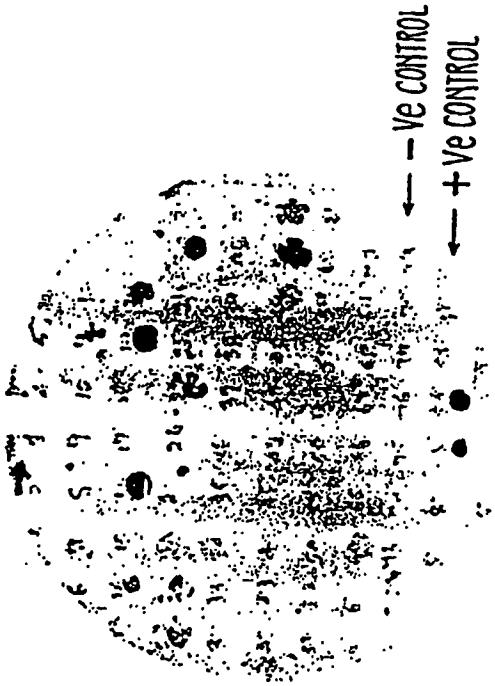

Fig. 1A

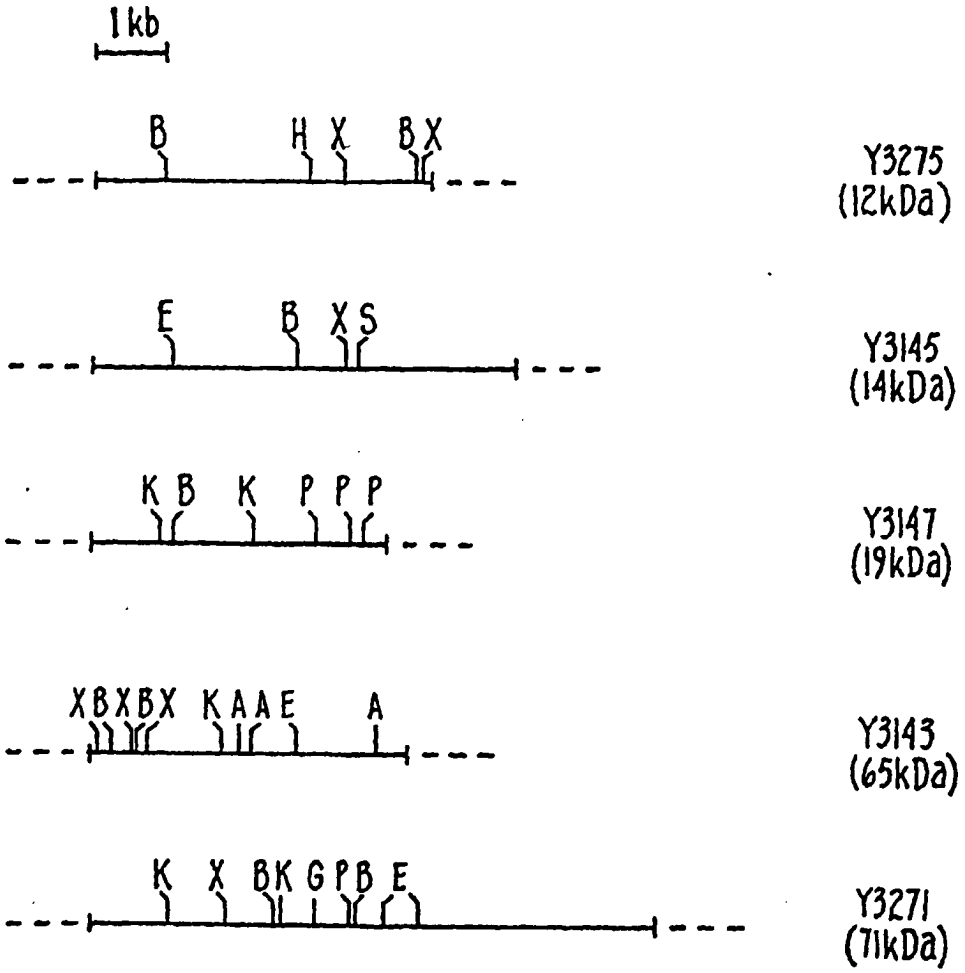
1kb
B H X B X
Y3275
(12kDa)
E B X S
Y3145
(14kDa)
K B K P P P
Y3147
(19kDa)
X B X B X K A A E A
Y3143
(65kDa)
K X B K G P B E
Y3271
(71kDa)

Fig. 2A

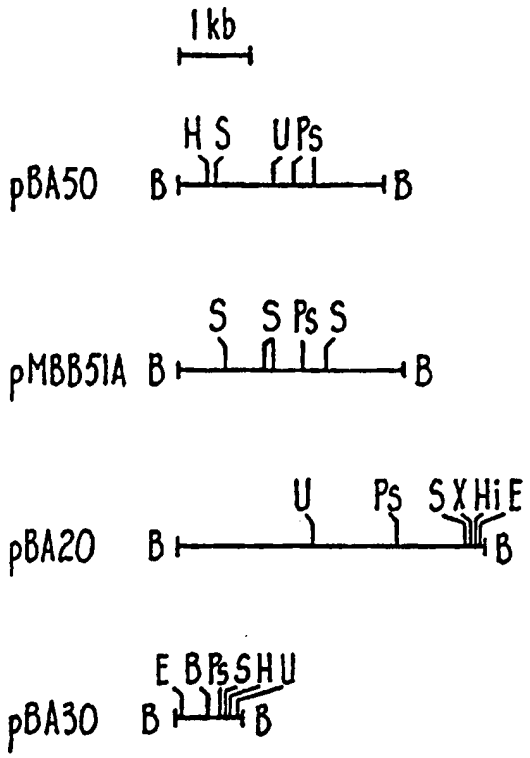
1kb
H S U Ps
pBA50 B B
S S Ps S
pMBB51A B B
U Ps S X Hi E
pBA20 B B
E B Ps S H U
pBA30 B B

Fig. 2B

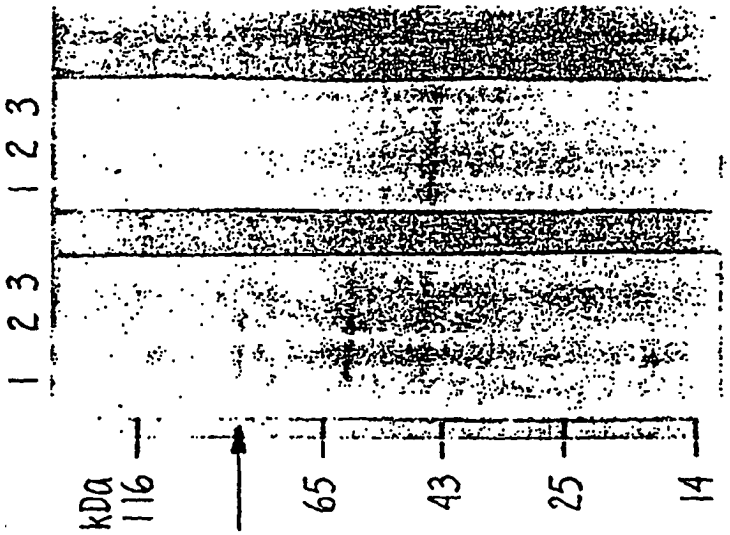

Fig. 3C

Fig. 3B

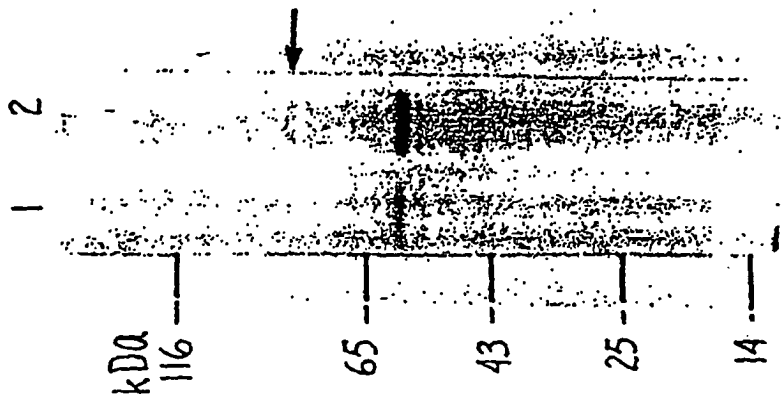

Fig. 3A

Fig. 4A

```
                                                                                  80
GGATCCCGCGGTCATCGATCGGGTCAAACACCGCCTCGACGGGTTCACGCTGGCGCCGCTGTCCACCGCCGCGGGAGGTG
GTGGCCGGCAGCCACGCATCTACTACGGCACCATCCTGACCGGTGACCAATACCTTCACTGCGAGCGCACCCGCAACCGG
CTGCACCACGAACTCGGCGGTATGGCCGTCGAAATGGAAGGCGGTGCGGTGGCGCAAATCTGCGCGTCCTTCGATATCCC
ATGGCTGGTCATTCGCGCGCTCTCCGATCTCGCCGGAGCCGATTCGGGGGTGGACTTCAATCGGTTTGTCGGCGAGGTGG

                                                  -35                  -10        480
CGGCCAGTTCGGCCCGCGTTCTGCTGCGCTTGCTGCCGGTGTTGACGGCCTGTTGAAGACGACTATCCGCCGGTGCGTTC

ACCGCGTCAGGCGGCTTCGGTGAGGTGAGTAATTTGGTCATTAACTTGGTCATGCCGCCGCCGATGTTGAGCGGAGGCCA

                    S/D      508
CAGGTCGGCCGGAAGTGAGGAGCCACG ATG ACG GCG GCC GTG ACC GGT GAA CAC CAC GCG AGT GTG
                             MET Thr Ala Ala Val Thr Gly Glu His His Ala Ser Val
                               1
   550                                                                  600
CAG CGG ATA CAA CTC AGA ATC AGC GGG ATG TCG TGC TCT GCG TGC GCC CAC CGT GTG GAA
Gln Arg Ile Gln Leu Arg Ile Ser Gly MET Ser Cys Ser Ala Cys Ala His Arg Val Glu
                         20
                                                        650
TCG ACC CTC AAC AAG CTG CCG GGG GTT CGG GCA GCT GTG AAC TTC GGC ACC CGG GTG GCA
Ser Thr Leu Asn Lys Leu Pro Gly Val Arg Ala Ala Val Asn Phe Gly Thr Arg Val Ala
                         40
                                                 700
ACC ATC GAC ACC AGC GAG GCG GTC GAC GCT GCC GCG CTG TGC CAG GCG GTC CGC CGC GCG
Thr Ile Asp Thr Ser Glu Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Cys Gln Ala Val Arg Arg Ala
                         60
                             750
GGC TAT CAG GCC GAT CTG TGC ACG GAT GAC GGT CGG AGC GCG AGT GAT CCG GAC GCC GAC
Gly Tyr Gln Ala Asp Leu Cys Thr Asp Asp Gly Arg Ser Ala Ser Asp Pro Asp Ala Asp
                         80
                800
CAC GCT CGA CAG CTG CTG ATC CGG CTA GCG ATC GCC GCC GTG CTG TTT GTG CCC GTG GCC
His Ala Arg Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ala Ile Ala Ala Val Leu Phe Val Pro Val Ala
                        100
```

Fig. 4B

```
 850                                                                                  900
GAT CTG TCG GTG ATG TTT GGG GTC GTG CCT GCC ACG CGC TTC ACC GGC TGG CAG TGG GTG
Asp Leu Ser Val MET Phe Gly Val Val Pro Ala Thr Arg Phe Thr Gly Trp Gln Trp Val
                        120
                                                                 950
CTA AGC GCG CTG GCA CTG CCG GTC GTG ACC TGG GCG GCG TGG CCG TTT CAC CGC GTT GCG
Leu Ser Ala Leu Ala Leu Pro Val Val Thr Trp Ala Ala Trp Pro Phe His Arg Val Ala
                        140
                                                1000
ATG CGC AAC GCC CGC CAC CAC GCC GCC TCC ATG GAG ACG CTA ATC TCG GTC GGT ATC ACG
MET Arg Asn Ala Arg His His Ala Ala Ser MET Glu Thr Leu Ile Ser Val Gly Ile Thr
                        160
                            1050
GCC GCC ACG ATC TGG TCG CTG TAC ACC GTC TTC GGC AAT CAC TCG CCC ATC GAG CGC AGC
Ala Ala Thr Ile Trp Ser Leu Tyr Thr Val Phe Gly Asn His Ser Pro Ile Glu Arg Ser
                1100    180
GGC ATA TGG CAG GCG CTG CTG GGA AGC GAT GCT ATT TAT TTC GAG GTC GCG GCG GGT GTC
Gly Ile Trp Gln Ala Leu Leu Gly Ser Asp Ala Ile Tyr Phe Glu Val Ala Ala Gly Val
                        200
 1150                                                                        1200
ACG GTG TTC GTG CTG GTG GGG CGG TAT TTC GAG GCG CGC GCC AAG TCG CAG GCG GGC AGT
Thr Val Phe Val Leu Val Gly Arg Tyr Phe Glu Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly Ser
                        220
                                                                1250
GCG CTG AGA GCC TTG GCG GCG CTG AGC GCC AAG GAA GTA GCC GTC CTG CTA CCG GAT GGG
Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val Leu Leu Pro Asp Gly
                        240
                                                1300
TCG GAG ATG GTC ATC CCG GCC GAC GAA CTC AAA GAA CAG CAG CGC TTC GTG GTG CGT CCA
Ser Glu MET Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys Glu Gln Gln Arg Phe Val Val Arg Pro
                        260
                            1350
GGG CAG ATA GTT GCC GCC GAC GGC CTC GCC GTC GAC GGG TCC GCT GCG GTC GAC ATG AGC
Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp Gly Leu Ala Val Asp Gly Ser Ala Ala Val Asp MET Ser
                        280
```

```
                1400
GCG ATG ACC GGC GAG GCC AAA CCG ACC CGG GTG CGT CCG GGG GGG CAG GTC ATC GGC GGC
Ala MET Thr Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly Gly
                        300
 1450                                                                1500
ACC ACA GTG CTT GAC GGC CGG CTG ATC GTG GAG GCG GCC GCG GTG GGC GCC GAC ACC CAG
Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val Gly Ala Asp Thr Gln
                        320
                                                        1550
TTC GCC GGA ATG GTC CGC CTC GTT GAG CAA GCG CAG GCG CAA AAG GCC GAC GCA CAG CGA
Phe Ala Gly MET Val Arg Leu Val Glu Gln Ala Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln Arg
                        340
                                                1600
CTA GCC GAC CGG ATC TCC TCG GTG TTT GTT CCC GCT GTG TTG GTT ATC GCG GCA CTA ACC
Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val Ile Ala Ala Leu Thr
                        360
                            1650
GCA GCC GGA TGG CTA ATC GCC GGG GGA CAA CCC GAC CGT GCC GTC TCG GCC GCA CTC GCC
Ala Ala Gly Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu Ala
                        380
                1700
GTG CTT GTC ATC GCC TGC CCG TGT GCC CTG GGG CTG GCG ACT CCG ACC GCG ATG ATG GTG
Val Leu Val Ile Ala Cys Pro Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala MET MET Val
                        400
 1750                                                                1800
GCC TCT GGT CGC GGT GCC CAG CTC GGA ATA TTT CTG AAG GGC TAC AAA TCG TTG GAG GCC
Ala Ser Gly Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu Ala
                        420
                                                        1850
ACC CGC GCG GTG GAC ACC GTC GTC TTC GAC AAG ACC GGC ACC CTG ACG ACG GGC CGG CTG
Thr Arg Ala Val Asp Thr Val Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr Gly Arg Leu
                        440
                                                1900
CAG GTC AGT GCG GTG ACC GCG GCA CCG GGC TGG GAG GCC GAC CAG GTG CTC GCC TTG GCC
Gln Val Ser Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu Ala
                        460
```

Fig.4C

```
                                1950
GCG ACC GTG GAA GCC GCG TCC GAG CAC TCG GTG GCG CTC GCG ATC GCC GCG GCA ACG ACT
Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Thr Thr
                        480
                2000
CGG CGA GAC GCG GTC ACC GAC TTT CGC GCC ATA CCC GGC CGC GGC GTC AGC GGC ACC GTG
Arg Arg Asp Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr Val
                        500
 2050                                                                  2100
TCC GGG CGG GCG GTA CGG GTG GGC AAA CCG TCA TGG ATC GGG TCC TCG TCG TGC CAC CCC
Ser Gly Arg Ala Val Arg Val Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ser Cys His Pro
                        520
                                                        2150
AAC ATG CGC GCG GCC CGG CGC CAC GCC GAA TCG CTG GGT GAG ACG GCC GTA TTC GTC GAG
Asn MET Arg Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val Glu
                        540
                                            2200
GTC GAC GGC GAA CCA TGC GGG GTC ATC GCG GTC GCC GAC GCC GTC AAG GAC TCG GCG CGA
Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val Lys Asp Ser Ala Arg
                        560
                            2250
GAC GCC GTG GCC GCC CTG GCC GAT CGT GGT CTG CGC ACC ATG CTG TTG ACC GGT GAC AAT
Asp Ala Val Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu Arg Thr MET Leu Leu Thr Gly Asp Asn
                        580
                2300
CCC GAA TCG GCG GCG GCC GTG GCT ACT CGC GTC GGC ATC GAC GAG GTG ATC GCC GAC ATC
Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu Val Ile Ala Asp Ile
                        600
 2350                                                                  2400
CTG CCG GAA GGC AAG GTC GAT GTC ATC GAG CAG CTA CGC GAC CGC GGA CAT GTC GTC GCC
Leu Pro Glu Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val Ala
                        620
                                                        2450
ATG GTC GGT GAC GGC ATC AAC GAC GGA CCC GCA CTG GCC CGT GCC GAT CTA GGC ATG GCC
MET Val Gly Asp Gly Ile Asn Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala Asp Leu Gly MET Ala
                        640
```

Fig.4D

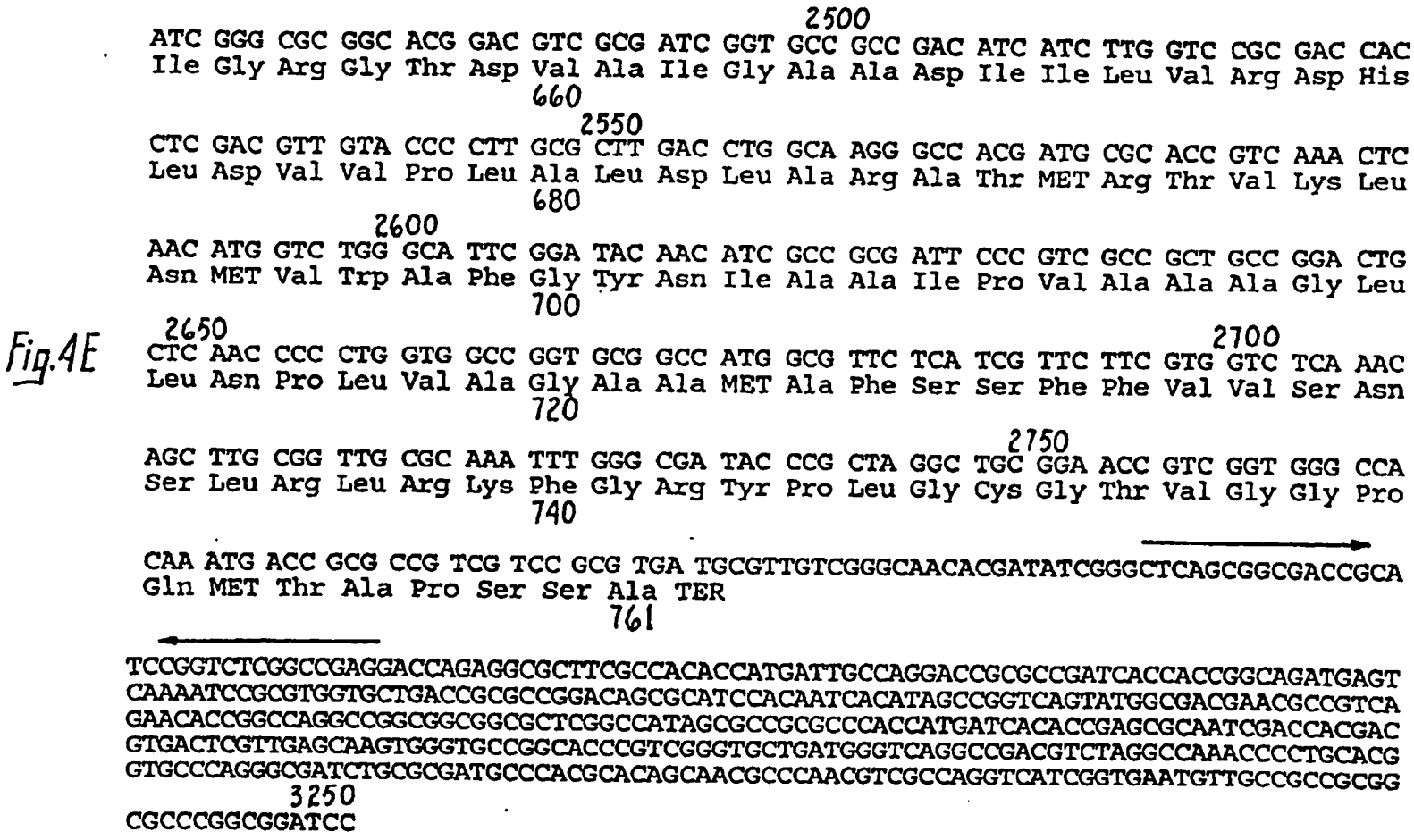
2500
ATC GGG CGC GGC ACG GAC GTC GCG ATC GGT GCC GCC GAC ATC ATC TTG GTC CGC GAC CAC
Ile Gly Arg Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp His
660
2550
CTC GAC GTT GTA CCC CTT GCG CTT GAC CTG GCA AGG GCC ACG ATG CGC ACC GTC AAA CTC
Leu Asp Val Val Pro Leu Ala Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr MET Arg Thr Val Lys Leu
680
2600
AAC ATG GTC TGG GCA TTC GGA TAC AAC ATC GCC GCG ATT CCC GTC GCC GCT GCC GGA CTG
Asn MET Val Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly Leu
700
2650
CTC AAC CCC CTG GTG GCC GGT GCG GCC ATG GCG TTC TCA TCG TTC TTC GTG GTC TCA AAC
Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly Ala Ala MET Ala Phe Ser Ser Phe Phe Val Val Ser Asn
720
2700
AGC TTG CGG TTG CGC AAA TTT GGG CGA TAC CCG CTA GGC TGC GGA ACC GTC GGT GGG CCA
Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly Pro
740
2750
CAA ATG ACC GCG CCG TCG TCC GCG TGA TGCGTTGTCGGGCAACACGATATCGGGCTCAGCGGCGACCGCA
Gln MET Thr Ala Pro Ser Ser Ala TER
761
TCCGGTCTCGGCCGAGGACCAGAGGCGCTTCGCCACACCATGATTGCCAGGACCGCGCCGATCACCACCGGCAGATGAGT
CAAAATCCGCGTGGTGCTGACCGCGCCGGACAGCGCATCCACAATCACATAGCCGGTCAGTATGGCGACGAACGCCGTCA
GAACACCGGCCAGGCCGGCGGCGGCGCTCGGCCATAGCGCCGCGCCCACCATGATCACACCGAGCGCAATCGACCACGAC
GTGACTCGTTGAGCAAGTGGGTGCCGGCACCCGTCGGGTGCTGATGGGTCAGGCCGACGTCTAGGCCAAACCCCTGCACG
GTGCCCAGGGCGATCTGCGCGATGCCCACGCACAGCAACGCCCAACGTCGCCAGGTCATCGGTGAATGTTGCCGCCGCGG
3250
CGCCCGGCGGATCC

Fig.4E

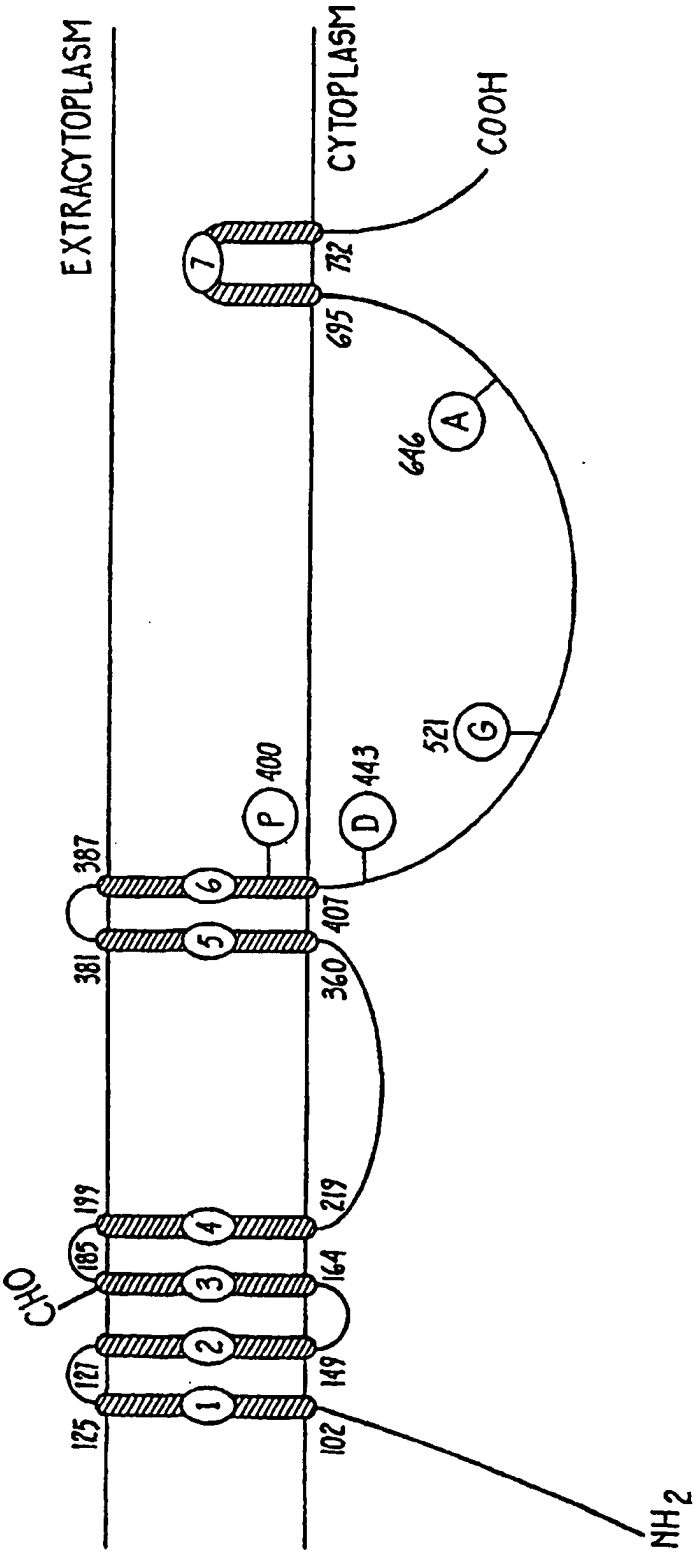
EXTRACYTOPLASM
CYTOPLASM
COOH
732
695
646
A
521
G
443
D
400
P
387
407
381
360
199
219
185
164
CHO
127
149
125
102
NH2
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 5

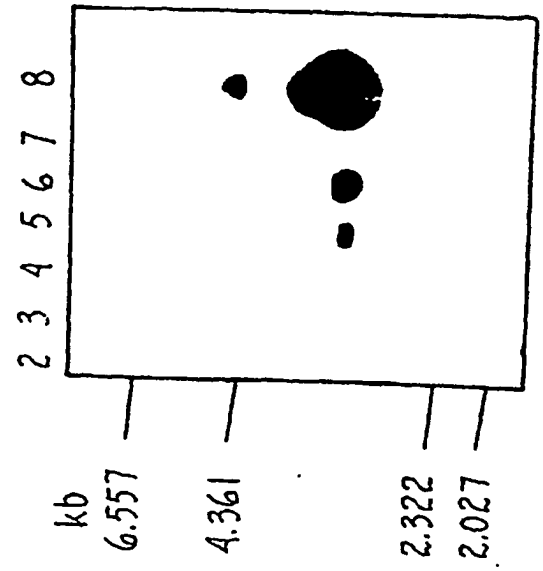
2 3 4 5 6 7 8
kb
6.557
4.361
2.322
2.027

Fig. 6B

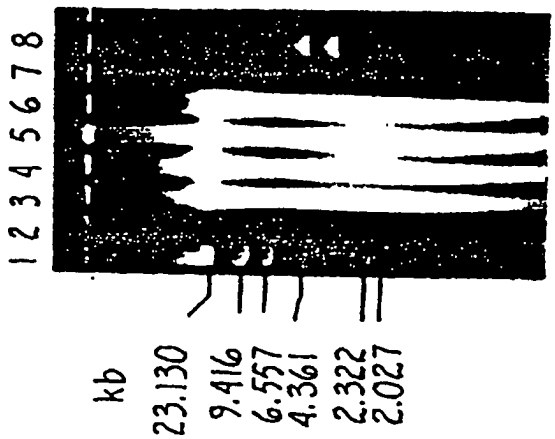
1 2 3 4 5 6 7 8
kb
23.130
9.416
6.557
4.361
2.322
2.027

Fig. 6A