



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 30 166 T2** 2006.12.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 049 488 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 39/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 30 166.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/27796**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 971 223.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/033872**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.11.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **15.06.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **01.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(30) Unionspriorität:

|                 |                   |           |
|-----------------|-------------------|-----------|
| <b>109952 P</b> | <b>25.11.1998</b> | <b>US</b> |
| <b>126794 P</b> | <b>30.03.1999</b> | <b>US</b> |

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**MCW Research Foundation, Inc., Milwaukee, Wis.,  
US; The Regents of the University of California,  
Oakland, Calif., US**

(72) Erfinder:

**FRANK, W., Dara, West Allis, WI 53219, US; YAHR,  
L., Timothy, Hanover, NH 03784, US; SAWA, Teiji,  
San Francisco, CA 94122, US; WIENER-KRONISH,  
Jeanine, San Francisco, CA 94116, US**

(74) Vertreter:

**LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN FÜR IMPFUNG MIT DEM PSEUDOMONAS AERUGINOSA V-ANTIGEN**

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****Hintergrund der Erfindung**

**[0001]** *Pseudomonas aeruginosa* ist ein opportunistisches bakterielles Pathogen, das bei schwer kranken Personen tödliche akute Lungenentzündungen verursachen kann (1). Die Fähigkeit des Bakteriums, das Lungenepithel zu schädigen, ist mit der Expression von Toxinen, die über einen Typ III-vermittelten Sekretions- und Translokationsmechanismus direkt in eukaryotische Zellen injiziert werden, in Verbindung gebracht worden (2, 3).

**[0002]** Die Proteine, die von dem *P. aeruginosa* Typ III-Sekretions- und Translokationsapparat codiert werden, weisen einen hohen Grad an Aminosäure-Identität mit Teilen des *Yersinia Yop-Regulons* auf (4-6). Von allen Typ III-Systemen, die in Gram-negativen Bakterien entdeckt worden sind, weist nur *P. aeruginosa* ein Homologes des *Yersinia V-Antigens* auf, PcrV (siehe (6) als Überblick über Typ III-Systeme). Zu dem Sekretions- und Translokationsapparat homologe Proteine werden sowohl von pflanzen- als auch von tierpathogenen Bakterien codiert. Diese Organismen umfassen Humanpathogene, wie z. B. *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, Enteropathogenes *E. coli*, *Chlamydia spp.*, und Pflanzenpathogene, wie z. B. *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* und *Ralstonia solanacearum*. Das V-Antigen wird jedoch nur von *P. aeruginosa* und *Yersinia* codiert.

**[0003]** Yahr et al. (J. Bacteriology, 1997, Seiten 7165–7168) beschreiben die Sequenz des PcrV-codierenden Operons und vergleichen die Sequenz mit dem LcrV-Protein. Die Aminosäuresequenz von PcrV ist somit bekannt, und ist unter der Hinterlegungsnummer AF010149 von GenBank verfügbar.

**[0004]** Anderson et al. (Infection and Immunity, 1996, Seiten 4580–4585) berichten, dass gereinigtes rekombinantes V-Antigen aus *Yersinia pestis* Mäuse gegen Lungen- und Beulenpest, verursacht durch F1-Kapsel-positive und -negative Stämme von *Yersinia pestis*, schützt.

**[0005]** US-A-5,599,665 offenbart ein genetisches Konstrukt, das einen Codierungsbereich für eine Exoenzym-S-Aktivität von *P. aeruginosa* enthält. Es wird offenbart, dass das Proteinprodukt des Konstrukts zum Modifizieren der Funktion des RAS-Proteins in Säuger-Karzinomen, als Impfstoff oder zur Diagnose einer *P. aeruginosa*-Infektion verwendet werden kann.

**Zusammenfassung der Erfindung**

**[0006]** Die vorliegende Erfindung ist ausgehend von unserer Beobachtung, dass das *Pseudomonas V-An-*

tigen zum Schützen von Tieren gegen eine tödliche Lungeninfektion verwendet werden kann, entwickelt worden.

**[0007]** Bei einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von PcrV-Antigen bei der Herstellung eines Medikaments oder Impfstoffs zur Verwendung bei der Hemmung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion. Bei einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung einer PcrV-Antigencodierenden DNS bei der Herstellung eines Medikaments oder Genimpfstoffs zur Verwendung bei der Hemmung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion.

**[0008]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Antigen als rekombinantes Protein exprimiert und zum Immunisieren von Risiko-Patienten verwendet.

**[0009]** Vorzugsweise wird der Patient vor der Infektion vollständig geschützt.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung eines humanen oder humanisierten PcrV-Antikörpers oder Antikörperfragments bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung oder Vorbeugung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion bereit, wobei (a) der Antikörper systemisch verabreicht wird und die *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion hemmt oder verhindert; oder (b) der Antikörper als therapeutischer Wirkstoff an die Lunge verabreicht wird.

**[0011]** Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung von Mitteln zum aktiven und passiven Immunisieren eines Patienten gegen eine *Pseudomonas*-Infektion.

**[0012]** Dem Fachmann werden nach dem Studium der Beschreibung, der Ansprüche und der Abbildungen weitere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung deutlich werden.

**Beschreibung der Abbildungen**

**[0013]** Fig. 1A und Fig. 1B zeigen ein gefärbtes Gel (Fig. 1A) und einen Western-Blot (Fig. 1B), die eine Phänotypanalyse von PA103ΔpcrV darstellen.

**[0014]** Fig. 2A und Fig. 2B zeigen ein Diagramm (Fig. 2A) und eine Serie von Balkendiagrammen (Fig. 2B), die das Überleben und die Lungenschädigung von parentalen und mutanten *P. aeruginosa*-Stämmen darstellen.

**[0015]** Fig. 3A und Fig. 3B zeigen ein Diagramm (Fig. 3A) und eine Serie von Balkendiagrammen (Fig. 3B), welche die Wirkung der Immunisierung auf das Überleben, die Lungenschädigung und die bak-

terielle Koloniebildung darstellen.

**[0016]** **Fig. 4** zeigt ein Diagramm, das die Anzahl der Tiere darstellt, die einen Angriff von  $5 \times 10^5$  CFU/Maus des Stamms PA103 nach passiver Verabreichung von polyklonalem IgG, das für PcrV, ExoU, PopD spezifisch ist, sowie von Kontroll-IgG aus einem nicht-immunisierten Tier, überleben.

**[0017]** **Fig. 5** zeigt ein Diagramm (**Fig. 5A**) und eine Serie von Balkendiagrammen (**Fig. 5B**), die das Überleben und den Schutz vor Lungenschädigung bei gleichzeitiger Verabreichung von IgG für verschiedene bakterielle Antigene und einem bakteriellen Angriff darstellt. Eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA; engl.: analysis of variance) ergab für Lungenschädigung  $p = 0,026$  und für Lungenödeme  $p < 0,0005$ .

#### Beschreibung der Erfindung

**[0018]** Wir offenbaren hier, dass PcrV eine neue regulatorische Wirkung auf die Expression der Typ III-sekretierten Produkte aufweist, an der Translokation von Typ III-Toxinen beteiligt ist, und dass es sich dabei um das erste Antigen handelt, das vor einer durch eine *P. aeruginosa*-Infektion verursachte Lungenschädigung schützt. Die Impfung gegen PcrV vor der Einflößung von anti-PcrV IgG in den Atemraum sicherte nicht nur das Überleben von angegriffenen Tieren, sondern verringerte auch die von den Bakterien verursachte Entzündung und Schädigung der Lunge.

**[0019]** Bei LcrV oder dem V-Antigen handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, das die Sekretion/Translokation der Yop-Effektorproteine reguliert und das bei der Pathogenese durch Veränderung der Cytokin-Antwort des Wirts auf eine *Yersinia*-Infektion eine extrazelluläre Rolle spielt (7–11). Bei dem einzigen bekannten Homologen dieses ernstzunehmenden pathogenen Faktors handelt es sich um ein extrazelluläres Protein, das von *P. aeruginosa* codiert wird, genannt PcrV.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung kann zum Mildern oder Hemmen einer *Pseudomonas*-Infektion durch Immunisierung eines Patienten mit einer wirksamen Menge des PcrV-Antigens verwendet werden. Unter einer „wirksamen Menge“ verstehen wir eine Menge an PcrV-Antigen, die eine Milderung oder Hemmung einer *Pseudomonas*-Infektion im Vergleich zu Kontrollsubjekten oder -tieren, die nicht mit dem Antigen behandelt worden sind, bewirkt.

**[0021]** Unter „Mildern“ verstehen wir eine Hemmung der Infektion um wenigstens fünfzig Prozent im Vergleich zu einem nicht-immunisierten Tier. Vorzugsweise wird die Infektion vollständig verhindert. Eine quantitative Beurteilung der Infektion würde vorzugs-

weise die Untersuchung der Menge an Bakterien im Blutstrom oder der Pleuraflüssigkeit und/oder die Untersuchung von Lungenschädigungs-Parametern umfassen. Beispielsweise würde die Abwesenheit von Bakterien im Blutstrom oder in der Pleuraflüssigkeit eine Verhinderung der Infektion anzeigen. Eine Verringerung der Lungenschädigungs-Parameter würde eine Milderung der Infektion anzeigen.

**[0022]** Die Infektion könnte durch mehrere andere klinische Indikatoren quantitativ beurteilt werden, umfassend die Verringerung der Bakterienmenge im Sputum, im Blut oder in der Pleuraflüssigkeit, die Verringerung der Größe des Infiltrats, die Verbesserung der Sauerstoffanreicherung, die Verringerung der Zeitdauer der mechanischen Ventilation, die Verringerung von Fieber und die Verringerung der Anzahl der weißen Blutkörperchen.

**[0023]** Unter „PcrV-Antigen“ verstehen wir denjenigen Teil oder dasjenige Fragment des PcrV-Proteins, das zum Auslösen einer Immunantwort, die eine Infektion verhindert oder mildert, notwendig ist. Gegenwärtig verwenden wir das vollständige PcrV-Protein als Antigen zum Bewirken von Schutz. Ein Fachmann kann jedoch das schützende Epitop auf dem Molekül kartieren. Beispielsweise werden wir monoklonale Antikörper herstellen und sie auf Antikörper, die Zytotoxizität in Gewebekulturen verhindern, durchsieben. Antikörper, die Zytotoxizität in Gewebekulturen verhindern, werden in einem Modell der akuten Lungeninfektion auf den passiven Schutz gegen die Infektion geprüft. Monoklonale Antikörper erkennen im Allgemeinen einen kleinen Aminosäurebereich, und wenn die Aminosäuren zusammenhängend sind, kann das Epitop durch nur 6–9 Aminosäuren definiert werden. Um das Epitop zu definieren, werden monoklonale Antikörper, die gegen Infektion und Zytotoxizität schützen, auf die Bindung an zunehmend kleinere Formen von rekombinantem PcrV untersucht. (Unter „rekombinantem PcrV“ oder „rPcrV“ verstehen wir das von einem PcrV-Gen, das in einem nicht-nativen Wirt eingebracht worden ist, hergestellte Protein.) Dies sollte den Bereich lokalisieren. Anschließend werden wir zum Definieren des Epitops Aminosäureketten chemisch synthetisieren. Diese chemisch synthetisierten Epitope können an Trägermolekülen befestigt und zur Immunisierung verwendet werden, um zu ermitteln, ob ein Schutz erzielt wird. Wahlweise können wir auch verschiedene Klone von PcrV entwerfen, rekombinante Proteine herstellen und reinigen, und diese Antigene in Immunisierungs- und Angriffsexperimenten prüfen.

**[0024]** Auf der Grundlage von Kartierungsuntersuchungen mit PcrV sagen wir voraus, dass das Epitop zwischen den Aminosäuren 113 und 245 angeordnet ist.

**[0025]** Das PcrV-Antigen kann am Einfachsten

durch das von uns verwendete Verfahren erhalten werden, nämlich mittels eines von Novagen im Handel erhältlichen, pet16b genannten bakteriellen Expressionsplasmids. Zunächst wurde das pcrV-Gen aus dem *P. aeruginosa*-Chromosom als Teil eines Operons kloniert. Der Codierungsbereich wurde amplifiziert und in zwei verschiedene Vektoren eingeführt. Ein Vektor dient zur Expression von *P. aeruginosa*, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Es handelt sich dabei um einen Vektor von Herbert Schweizer (Literaturangabe 19), in welchen Vektor wir eine geeignete Promotersequenz eingeführt haben, so dass die PcrV-Expression koordiniert mit dem Rest des Einbringungs- und Intoxikationsapparats des Bakteriums reguliert wird. Das zweite Plasmid, pET16b, dient zu Expressions- und Reinigungszwecken von *E. coli*.

**[0026]** Der Vorteil dieses Systems ist, dass wir nicht über die Verunreinigung von *P. aeruginosa*-Proteinen besorgt sein müssen, dass das Protein in großer Menge hergestellt wird und dass ein einstufiges Reinigungsverfahren zur Verfügung steht. Dabei wird der PcrV-Codierungsbereich amplifiziert, um in-Frame mit einer Histidinmarkierung, die auf dem pET16b-Vektor bereitgestellt ist, kloniert zu werden. Die an den Aminoterminal von PcrV angefügten mehrfachen Histidinreste ermöglichen die Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Nickel-NTA-Säule. Somit handelt es sich bei einem bevorzugten PcrV-Antigen um eine rekombinante Version des natürlichen PcrV-Proteins.

**[0027]** Wahlweise werden humane oder humanisierte monoklonale oder polyklonale Antikörper für PcrV verabreicht, um eine Infektionen mit *P. aeruginosa* zu verhindern oder zu behandeln. Bei Patienten mit einem hohen Risiko für eine Infektion mit *P. aeruginosa* könnten die Antikörper zur Vorbeugung einer Infektion verabreicht werden. Zusätzlich können Antikörper nach Beginn einer Infektion verabreicht werden, um die Infektion zu behandeln. Dabei können die Antikörper allein oder in Kombination mit Antibiotika verabreicht werden. Die Verabreichung von Antikörpern in Verbindung mit Antibiotika kann eine Verabreichung mit kürzerer Dauer oder niedrigeren Dosen von Antibiotika ermöglichen und dadurch das Risiko des Entstehens von Antibiotika-resistenten Organismen verringern.

**[0028]** Wir ziehen wenigstens drei Arten von hypothetischen Patienten in Betracht: (1) eine gesunde Person mit dem Risiko einer ersten Verletzung oder Verbrennung (Feuerwehrmann, Militärpersonal, Polizei) würde mit dem Impfstoff durch ein Verfahren (entweder Injektion oder intranasal), das langanhaltenden Schutz verleiht, immunisiert werden. Nach der Einlieferung in das Krankenhaus aufgrund einer Verletzung würde ein Booster gegeben (intramuskuläre Injektion). (2) Ein Patient, der einer mechanischen Ventilation unterzogen wird. (3) Ein Patient mit

der genetischen Diagnose einer cystischen Fibrose.

**[0029]** Die Immunisierung kann systemisch oder intranasal durchgeführt werden: Vorzugsweise würde die Immunisierung dieser Personen bei gewöhnlichen Impfungen für andere Kinderkrankheiten beginnen. Wir sagen einen langanhaltenden Schutz mit Booster-Dosierungen vermutlich bei einem Alter von etwa 5 und 10 voraus.

**[0030]** DNS, die das PcrV-Protein codiert, oder das Komplement dieser DNS kann auch zur diagnostischen Erkennung einer *P. aeruginosa*-Infektion verwendet werden. Die DNS-Sequenz des PcrV-Antigens ist bei GenBank unter AF010149 erhältlich. Der Codierungsbereich für PcrV liegt bei den Nucleotiden 626–1510. Es kann auch die Verwendung eines Fragments dieses Codierungsbereichs oder des Komplements dieses Fragments gewählt werden. Eine erfolgreiche Sonde ist eine solche, die spezifisch an die PcrV-DNS, aber nicht an andere Bereiche, hybridisiert.

**[0031]** Vorzugsweise würde man eine Hybridisierungssonde mit wenigstens 40 zusammenhängenden Nucleotiden innerhalb der Antigen-Sequenz oder zwei Primer mit wenigstens 25 zusammenhängenden Nucleotiden innerhalb der Sequenz verwenden. Einem Fachmann ist es selbstverständlich, dass viele Standardverfahren der Nucleinsäure-Diagnostik geeignet wären, beispielsweise die Hybridisierung der einzelsträngigen Sonde aus 40 Nucleotiden an DNS oder RNS, die aus dem Sputum eines Patienten gewonnen wurde. Bei einem weiteren Beispiel würde das Sputum des Patienten als Quelle für bakterielle DNS oder RNS als Vorlage für die PCR- bzw. RT-PCR-Reaktion verwendet werden.

**[0032]** Man könnte auch eine *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion bei einer Person bestimmen, indem eine von der Person erhaltene Probe mit einem für PcrV spezifischen Antikörper kontaktiert wird und eine im Vergleich zu einer Kontrollprobe verstärkte Antikörperbindung mit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion der Person in Verbindung gebracht wird.

**[0033]** Wahlweise kann die PcrV-codierende DNS unter Verwendung von herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren als Gen-Impfstoff verwendet werden. Beispielsweise können in folgenden Literaturstellen Verfahren; die dem Fachmann bekannt sind, gefunden werden: Davis, N. L. et al., „DNA vaccine for hepatitis B: Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7213–7218, 1996; Barry, M. A. et al., „Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization," *Nature* 377: 632–635, 1995; Xiang, Z. Q. et al., „Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus," *Virology* 209 : 569–579, 1995. Unter einer „wirksamen

Menge" eines Gen-Impfstoffs verstehen wir eine Menge des Impfstoffs, die eine Milderung oder Beseitigung einer *Pseudomonas*-Infektion oder von Symptomen einer *Pseudomonas*-Infektion bewirkt.

**[0034]** Das Protein oder das Antigen könnte auch verwendet werden, um Antikörper bei Patienten diagnostisch festzustellen und somit den Infektionszustand des Patienten zu beurteilen. Vorzugsweise würde man eine Probe, die von einem Patienten mit Verdacht auf eine *Pseudomonas*-Infektion erhalten ist, mit dem PcrV-Protein oder dem Fragment davon in Kontakt bringen und die Protein/Antikörper-Bindung erfassen. Anschließend würde man eine verstärkte Antikörperbindung (im Vergleich zu einer Kontrollprobe) mit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion des Patienten in Verbindung bringen.

**[0035]** Man könnte den PcrV-Antikörper oder die Antikörperfragmente auch therapeutisch verwenden. Sobald der Antikörper für die Verwendung am Menschen sicher ist, könnte man: (a) ihn systemisch verabreichen, und (b) ihn in die Lunge verabreichen, entweder als eine vorbeugende Behandlung oder als Therapie. Um den PcrV-Antikörper am Menschen anzuwenden, wird der Antikörper vorzugsweise „humanisiert“. Sobald der monoklonale Antikörper erhalten ist, werden im Allgemeinen die variablen Bereiche mit leichten und schweren Ketten kloniert. Die klonierten Fragmente werden dann in das Rückgrat eines humanen Antikörpers (konstante Bereiche) eingefügt. Somit können wir, zusätzlich zu der Bereitstellung der Bindungsspezifität, die Antikörperklasse (IgG, IgA usw.) kontrollieren.

**[0036]** Zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung kann der PcrV-Antikörper ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein. Die Antikörper können human oder humanisiert sein, insbesondere für therapeutische Anwendungen. Es können auch Antikörperfragmente oder -derivate, wie z. B. als ein Fab, F(ab')<sub>2</sub> oder Fv, verwendet werden. Einkettige Antikörper, wie z. B. von Huston et al. (Int. Rev. Immunol. 10: 195–217, 1993) beschrieben, können bei den hier beschriebenen Verfahren ebenfalls Verwendung finden. Unter einer „wirksamen Menge“ des PcrV-Antikörpers oder Antikörperfragments verstehen wir eine Menge, die zum Mildern oder Beseitigen einer *Pseudomonas*-Infektion oder von Infektionssymptomen ausreicht.

**[0037]** Zusätzlich zu PcrV-Antikörpern und Antikörperfragmenten können Kleinmolekül-Peptidomimetika oder Nichtpeptid-Mimetika zum Nachahmen der Wirkung der PcrV-Antikörper beim Hemmen oder Modulieren einer *Pseudomonas*-Infektion, vermutlich durch Eingreifen in die Wirkung von PcrV, entworfen werden. Verfahren zum Entwerfen solcher Kleinmolekül-Mimetika sind gut bekannt (siehe beispielsweise Ripka und Rich, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:

441–452, 1998; Huang et al., Biopolymers 43: 367–382, 1997; al-Obeidi et al., Mol. Biotechnol. 9: 205–223, 1998). Kleinmolekül-Inhibitoren, die auf der Grundlage des PcrV-Antikörpers entworfen sind, können nach ihrer Fähigkeit zum Eingreifen in die PcrV/PcrV-Antikörper Bindungswechselwirkung durchsiebt werden. Kleinmolekül-Kandidaten mit einer Aktivität bei einem solchen Test können durch Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind und die beispielsweise in vitro-Screening-Tests umfassen, optimiert und durch in vivo-Tests der Hemmung oder Modulation einer *Pseudomonas*-Infektion durch eines der hier beschriebenen Verfahren, oder wie im Stand der Technik bekannt, weiter verfeinert werden. Solche Kleinmolekül-Inhibitoren der PcrV-Wirkung sollten bei der Hemmung oder Modulation einer *Pseudomonas*-Infektion von Nutzen sein.

**[0038]** Das PcrV-Protein kann auch zum Erkennen eines PcrV-Rezeptors, der in den Wirtszellen vorhanden sein kann, insbesondere in Zellen des Menschen, besonders in Epithelzellen oder Makrophagen des Menschen, verwendet werden. Das Erkennen eines PcrV-Rezeptors ermöglicht das Durchsieben von Kleinmolekül-Datenbanken, beispielsweise von kombinatorischen Bibliotheken, nach Kandidaten, die bei der PcrV-Bindung eingreifen. Solche Moleküle können auch bei einem Verfahren zur Hemmung oder Modulieren einer *Pseudomonas*-Infektion von Nutzen sein.

**[0039]** Bei unseren ersten Versuchen zur Rezeptorerkennung wird es sich um die Verwendung von PcrV bei Pull-Down-Experimenten sein. PcrV wird mit Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert und an eine Säulenmatrix für die Affinitätschromatographie von solubilisierten Zellextrakten angebracht werden. Proteine, die spezifisch an PcrV binden, werden eluiert und zur Identifikation einer aminoterminalen Sequenzierung unterzogen werden. Bei parallelen Experimenten wird PcrV einer Hefe-Zweihybrid-Analyse unterzogen. Dabei wird PcrV in-Frame mit dem DNS-Bindungsereich von Gal4 fusioniert. Sobald der Klon erhalten ist, wird er in einen geeigneten Hefe-Wirtstamm eingebracht. Der Hefestamm, der das Gal4PcrV-Konstrukt enthält, wird mit einer HeLa-Zell-cDNS-Bank, die in-Frame mit dem Gal4-Aktivierungsbereich kloniert ist, transformiert. Doppelt-Transformierte, welche die Fähigkeit zur Verwendung von Histidin und zur Herstellung von  $\beta$ -Galactosidase (Proteine, die mit PcrV wechselwirken) komplementieren, werden genetisch und auf der Ebene der Nucleotid-Sequenzierung analysiert werden. Falls es sich bei dem Rezeptor um ein zelluläres Glycolipid handelt, werden wir ein Overlay-Verfahren verwenden, wobei Glycolipide durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt und dann mit radiomarkierten Bakterien sondiert werden. Die Bindung an spezifische Komponenten wird durch Autoradiographie überwacht. Auf ähnliche Weise werden Epithel-

und Makrophagen-Proteine durch SDS-PAGE abgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit radiomarkierten Bakterien oder mit markiertem PcrV belegt werden. Auch dabei werden die Proteinkomponenten, an welche die Bakterien binden, anschließend durch Autoradiographie identifiziert werden.

**[0040]** Von *Pseudomonas*-Arten ist bekannt, dass sie ein breites Spektrum von Wirten im Tierreich und sogar im Pflanzenreich infizieren. Ein Fachmann wird erkennen, dass die hier beschriebenen Zusammensetzungen und Verfahren zum Hemmen oder Modulieren von Krankheitszuständen oder Leiden, die von einer Infektion mit *Pseudomonas*-Arten verursacht sind, bei einem breiten Bereich von Organismen von Nutzen sein können. Die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung werden hier im Besonderen für die Anwendung bei *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben, es liegt jedoch ohne weiteres im Können des Fachmanns, die hier gelehrteten Verfahren auf andere Arten anzuwenden.

### Beispiele

#### 1. Rolle von PcrV bei der Zytotoxizität

**[0041]** Zum Bestimmen der Rolle von PcrV bei der Typ III-vermittelten Regulation/Sekretion haben wir ein nichtpolares Allel von PcrV konstruiert und das Konstrukt zum Ersetzen des Wildtyp-Allels im *P. aeruginosa*-Stamm PA103 verwendet, einem Stamm, der in vitro hoch zytotoxisch ist (3) und in vivo eine Lungenepithel-Schädigung verursacht (12, 13). Die Zytotoxizität und die Lungenschädigung werden durch die Produktion eines spezifischen Zytotoxins, ExoU, verursacht (3).

**[0042]** PA103ΔpcrV wurde durch Expressieren mehrerer extrazellulärer Produkte, die von dem *P. aeruginosa* Typ III-System sekretiert werden und die das ExoU-Zytotoxin (3), PcrV (5) und ein für die Translokation von Toxinen benötigtes Protein, PopD (14), umfassen, charakterisiert. Eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von konzentrierten Kulturüberständen zeigte, dass der parentale Stamm, PA103, durch das Wachstum in einem Medium, das einen Calciumchelator, nämlich Nitrilotriessigsäure (NTA), enthält, zur Produktion und Sekretion der Typ III-Proteine angeregt wird ([Fig. 1](#)). Als ein PcrV-codierender Expressionsklon in dem nativen Stamm in trans bereitgestellt wurde, war die extrazelluläre Proteinproduktion als Antwort auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von NTA normal. PA103ΔpcrV zeigt einen Calcium-unabhängigen Phänotyp; die extrazelluläre Proteinproduktion wird sowohl bei Vorhandensein als auch bei Abwesenheit von NTA stark angeregt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Sekretionssystem vollständig funktional aber unreguliert ist. Dieser unregulierte Phänotyp steht im Gegensatz zu dem Calcium-unabhängigen Phäno-

typ, der für einen LcrV-defekten Stamm, der kein extrazelluläres Yops produziert, bei 37 °C unabhängig von dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von Calcium wächst und eine nur eine teilweise Anregung des Yops zeigt, beschrieben wird (7). Das Komplementieren von PA103ΔpcrV mit einem Wildtyp-PcrV-exprimierenden Klon stellte die normale Regulation der extrazellulären Proteinproduktion als Antwort auf eine NTA-Anregung wieder her.

**[0043]** Um den Beitrag von PcrV bei der Pathogenese von *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurden zwei Infektionsmodelle verwendet. Bei einem in vitro-Modell wurden der parentale Stamm und mehrere mutante Derivatstämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit, bei einem CHO-Zellen-Infektionstest Zytotoxizität zu verursachen, verglichen (3). Bei diesem Experiment umfassten die Negativkontrollen PA103popD::Ω, von dem bereits früher gezeigt worden ist, dass es bei der Translokation von Typ III-Virulenzdeterminanten unwirksam ist (14), und PA103ΔexoZ, das wegen des Fehlens von ExoU-Produktion nicht-zytotoxisch ist (3, 15).

**[0044]** Nach einer Infektion von 3 Stunden waren die CHO-Zellen nicht fähig, Trypan-Blau auszuschließen, wobei der Wildtyp und der ΔpcrV-Stamm mit einem PcrV-exprimierenden Plasmidkonstrukt komplementiert waren. Als die CHO-Zellen mit den Negativkontrollstämmen oder mit PA103ΔpcrV infiziert wurden, trat keine Färbung auf (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für die Zytotoxizität eine PcrV-Expression erforderlich ist. Gereinigtes rekombinantes PcrV war nicht-zytotoxisch, wenn es Gewebezellkulturen exogen zugegeben wurde. Da die Sekretion der für die Translokation erforderlichen Typ III-Proteine durch die Deletion von pcrV nicht beeinträchtigt wird ([Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#)), scheint PA103ΔpcrV bei der ExoU-Translokation unwirksam zu sein.

**[0045]** [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen ein gefärbtes Gel ([Fig. 1A](#)) bzw. einen Western-Blot ([Fig. 1B](#)), die eine Phänotypanalyse von PA103ΔpcrV darstellen. Das Parentale und die ΔpcrV-Derivate, mit und ohne ein PcrV-exprimierendes Plasmid in trans, wurden bei Abwesenheit oder Anwesenheit des Auslösers von Typ III-Sekretion von *P. aeruginosa*, Nitrilotriessigsäure (NTA), wachsen gelassen. Das extrazelluläre Proteinprofil ([Fig. 1A](#)) wurde auf einem mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (10 %) analysiert. Die Wanderung der *P. aeruginosa*-codierten Typ III-Proteine ist links angezeigt, während die Wanderung der Molekulargewichtsmarker rechts angezeigt ist. [Fig. 1B](#) zeigt einen Western-Blot eines Duplikatgels, wobei für ExoU, PcrV und PopD spezifische Antikörper und <sup>125</sup>I-Protein A zum Nachweisen von gebundenem IgG verwendet wurden.

**[0046]** Der Wildtyp und mutante *P. aeruginosa*



sa-Stämme wurden in einem Modell der akuten Lungeninfektion unter Verwendung von niedrigen und hohen Angriffsdosen der Bakterien geprüft. Überlebensmessungen zeigten, dass PcrV und PopD zum Auslösen einer tödlichen Infektion erforderlich waren (**Fig. 2A**). Bei Experimenten mit drei unabhängigen Messungen der Lungenschädigung (der Fluss von markiertem Albumin aus dem Luftraum der Lunge in den Blutstrom, der Fluss von markiertem Albumin aus dem Luftraum der Lunge in die Pleuraflüssigkeit und das Nass/Trocken-Verhältnis, das Lungenödem erfasst) waren die Grade der von PA103ΔpcrV, dem Vektorkontroll-Stamm (PA103ΔpcrVpUCP18) und von PA103popD::Ω verursachten Schädigung nicht von nicht-infizierten Kontrolltieren verschieden (**Fig. 2B**). Die Komplementation von PA103ΔpcrV mit pcrV in trans stellte das Niveau der Lungenschädigung auf die bei dem parentalen Stamm, PA103, gemessenen wieder her. In Summe zeigen diese Ergebnisse, dass bei dem Modell der akuten Lungeninfektion die Expression von PcrV für die Virulenz von *P. aeruginosa* erforderlich ist, und dass ein Teil der Funktion von PcrV mit der Fähigkeit zur Translokation von Typ III-Effektorproteinen in eukaryotische Zellen zusammenzuhängen scheint.

**[0047]** **Fig. 2A** und **Fig. 2B** sind ein Diagramm (**Fig. 2A**) bzw. eine Serie von Balkendiagrammen, die das Überleben und die Lungenschädigung bei nativen und mutanten *P. aeruginosa*-Stämmen zeigen. Bei **Fig. 2A** wurden Mäuse einem Angriff von  $5 \times 10^5$  cfu von jedem der gezeigten Stämme ausgesetzt, und das Überleben wurde über einen Zeitraum von einer Woche überwacht. Bei **Fig. 2B** wurde die Lungenschädigung über den Fluss von markiertem Albumin von dem Luftraum der Lunge in das Blut (Schädigung des Lungenepithels), in die Pleuraflüssigkeit (Pleuraflüssigkeit), oder durch Messung des Nass/Trocken-Verhältnisses (Lungenödem) bewertet. Es wurden zwei Bakterieninfektions-Dosen verwendet, wie durch die dunklen und die gestreiften Balken gekennzeichnet sind. Signifikante Unterschiede (\* $p < 0,001$ ) zwischen Kontroll- und Testgruppen wurden durch Einweg-Varianzanalyse und Dunnett-Mehrfach-Vergleichstests bestimmt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: PA103, parental Wildtyp-Stamm; ΔpcrV, PA103ΔpcrV; ΔpcrVpUCPpcrV, PA103ΔpcrV, komplementiert mit einem PcrV-exprimierenden Plasmid; ΔpcrVpUCP, PA103ΔpcrV mit einem Kontrollvektor; popD::Ω, PA103popD::Ω, ein nicht zur Translokation fähiger Stamm.

## 2. Immunisierung mit PcrV

**[0048]** Um zu bestimmen, ob eine Immunisierung mit PcrV Tiere vor einer tödlichen Lungeninfektion schützt, wurden rekombinante PcrV (rPcrV) oder ExoU (rExoU) als Histidin-markierte Fusionsproteine gereinigt und als Antigene verwendet. Es wurden

Mäuse wurden immunisiert und anschließend über ihre Atemräume einem Angriff mit einer tödlichen Dosis des Stamms PA103 ausgesetzt. Wurde das Überleben festgestellt, hatten beide Impfstoffe die Mäuse geschützt (**Fig. 3A**). Wurde eine Lungenschädigung festgestellt, wiesen nur mit PcrV geimpfte Tiere eine wesentlich geringere Epithelschädigung und Lungenödem auf (**Fig. 3B**). Mit dem PcrV-Impfstoff immunisierte Tiere wiesen auch wesentlich weniger Bakterien in ihren Lungen auf, was darauf hinweist, dass eine Blockade des Pseudomonas V-Antigens das schnelle Entfernen der Bakterien aus der Lunge erleichtert und so die Tiere vor einer schweren Epithelschädigung schützt (**Fig. 3B**).

**[0049]** **Fig. 3A** und **Fig. 3B** zeigen ein Diagramm (**Fig. 3A**) bzw. eine Serie von Balkendiagrammen (**Fig. 3B**), welche die Wirkung der Immunisierung auf das Überleben, die Lungenschädigung und die Bakterienkoloniebildung darstellen. Bei **Fig. 3A** wurden Mäuse wie angegeben immunisiert (PcrV,  $n = 10$ ; ExoU,  $n = 5$ ; Kontrolle,  $n = 10$ ) und einem Angriff mit  $5 \times 10^5$  CFU/Tier des Stamms PA103 ausgesetzt. Der prozentuelle Anteil der überlebenden Tiere wurde über einen Zeitraum von einer Woche ermittelt;  $p < 0,05$  gemäß einem Mantel-Cox-log-Rangtest. **Fig. 3B** zeigt die Bewertungen der Lungenschädigung und der Bakterienkoloniebildung bei geimpften Tieren 4 Stunden nach der Einflößung von PA103. Lungenepithelschädigung, Lungenödem und bakterielle Belastung; PcrV,  $n = 9$ ; ExoU,  $n = 4$ ; und Kontrolle,  $n = 8$ . Die letzte Anzahl der Bakterien in der Lunge ist als die Zahl auf der y-Achse  $\times 10^4$  CFU angegeben. Signifikante Unterschiede (\*) für die Lungenschädigung ( $p < 0,01$ ), Lungenödem ( $p < 0,05$ ) und Bakterienanzahlen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Dunnett-Mehrfach-Vergleichstest bestimmt. Eine Einweg-Varianzanalyse ergab für die Lungenschädigung  $p = 0,0005$ ; für Lungenödem  $p = 0,0437$ ; und für die bakterielle Belastung  $p = 0,0075$ .

**[0050]** Um zu bestimmen, ob ein therapeutischer Eingriff möglich ist, wurden Mäuse mit präimmunem Kaninchen-IgG oder Kaninchen IgG, spezifisch für rPcrV, rExoU oder rPopD, eine Stunde vor einer Einflößung von PA103 in den Atemraum mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  CFU/Maus passiv immunisiert. Antikörper gegen rPcrV stellten einen vollständigen Schutz gegen eine tödliche Infektion bereit (**Fig. 4**). Anti-rExoU IgG sicherte das Überleben teilweise, was von der Verabreichung von Kontroll-IgG wesentlich verschieden war, obwohl alle überlebende Tiere während des Versuchs schwer erkrankt zu sein schienen. Durch eine passive Übertragung von Antikörpern auf ein anderes der Typ III-Translokationsproteine, PopD, wurde das Überleben nicht verbessert. Wir schließen aus diesen Ergebnissen, dass Antikörper gegen PcrV bei dem Modell der akuten Lungeninfektion stark schützend wirken, und dass PcrV der Bakterienoberfläche exponiert werden kann, oder

in einer löslichen Form, die für Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen verfügbar ist.

**[0051]** **Fig. 4** zeigt ein Diagramm mit der Anzahl der Tiere, die einen Angriff mit  $5 \times 10^5$  CFU/Maus des Stamms PA103 überlebten. Die Tiere wurden mit 100 µg Immun-IgG oder Kontroll-IgG aus einem nicht-immunisierten Kaninchen vorbehandelt (rPcrV, Präimmun-Serum).  $N = 10$  für jede Gruppe;  $*p < 0,05$  gegenüber einer Kontrollgruppe für eine Behandlung mit anti-PcrV und anti-ExoU IgG-Präparaten gemäß einem Mantel-Cox-log-Rangtest.

**[0052]** Wenn PcrV für eine Neutralisierung zugänglich ist, sollte die gleichzeitige Verabreichung von anti-rPcrV IgG mit dem Bakterien-Inokulum gegen eine Lungenschädigung und Letalität vollständig schützen. IgG-Präparate wurden mit dem Inokulum (10-fach höhere Dosis als bei dem tödlichen Inokulum) vor der Einflößung der Bakterien in die Lungen gemischt, anschließend wurde das Überleben bestimmt. Bei dieser extremen Infektion war nur anti-rPcrV IgG schützend (**Fig. 5A**). Die Lungenschädigung wurde bei Tieren, die mit der normalen tödlichen Dosis von  $5 \times 10^5$  Bakterien infiziert waren, gemessen. Der Abfluss von markiertem Albumin aus dem Luftraum der Lunge war nach gleichzeitiger Verabreichung von anti-rPcrV IgG nur um 3 % höher als bei nicht-infizierten Kontrollen (**Fig. 5B**). Wenn anti-PcrV in dem Inokulum eingeschlossen war, war der verringerte Abfluss von markiertem Protein aus der Lunge in die Pleuraflüssigkeit der gleiche, wie bei den nicht-infizierten Kontrollen. Sonderbarerweise wurden durch das Nass/Trocken-Verhältnis erfasste Lungenödeme durch die Zugabe sowohl von anti-rPcrV als auch von anti-rPopD wesentlich verringert (**Fig. 5B**). Daher war die gleichzeitige Verabreichung von anti-rPcrV IgG mit den Bakterien beim Normalisieren aller Parameter der Lungenschädigung sogar noch wirkungsvoller als die Impfung. Diese Ergebnisse bestätigen die Zugänglichkeit von PcrV für eine Antikörper-vermittelte Neutralisierung und belegen eine klinisch bedeutsame Verringerung der Lungenschädigung; Antikörper gegen PcrV können als therapeutische Wirkstoffe bei der Behandlung von schwerer, durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachter nosokomialer Lungenentzündung dienen.

**[0053]** **Fig. 5** zeigt ein Diagramm (**Fig. 5A**) und eine Serie von Balkendiagrammen, die das Überleben und den Schutz vor Lungenschädigung bei gleichzeitiger Verabreichung von IgG und einem Bakterienangriff darstellen. IgG (5 µg) wurde entweder mit  $5 \times 10^6$  (für Überlebens-tests,  $n = 10$  pro Gruppe) oder mit  $5 \times 10^5$  (für die Lungenschädigungs-Messung,  $n = 4$  bis 6 Tiere pro Gruppe) *P. aeruginosa*, Stamm PA103, gemischt. Dieses Gemisch wurde in die Lungen eingebläst, anschließend wurde das Überleben (**Fig. 5A**) bzw. die Lungenschädigung (**Fig. 5B**) bestimmt. Für das Überleben betrug  $*p < 0,05$  gegenüber Kon-

troll-IgG für anti-PcrV gemäß einem Mantel-Cox-log-Rangtest; für Lungenepithelschädigung und Lungenödeme betrug  $*p < 0,05$  gegenüber Kontroll-IgG für anti-PcrV gemäß einem Dunnett-Mehrfach-Vergleichstest. Eine Einweg-Varianzanalyse ergab für Lungenschädigung  $p = 0,026$  und für Lungenödeme  $p < 0,0005$ .

**[0054]** Bei akuten *P. aeruginosa*-Infektionen kann die Nettowirkung der Typ III-vermittelten Intoxikation die Ausbreitung des Bakteriums über das Epithel hinaus fördern, wodurch eine Infektion der Pleuraflüssigkeit, der Milz, der Leber und der Blutbahn verursacht wird. Blutinfektionen mit *P. aeruginosa*, entweder durch akute, mit künstlicher Beatmung verbundene Lungenentzündung oder durch Brandwundeninfektionen, kann trotz aggressiver Behandlung mit Antibiotika zu einer Mortalitätsrate von 40–80 % führen (16). PcrV muss eine Komponente des Typ III-Translokationskomplexes von *P. aeruginosa* sein, da Mutanten, die zur Produktion dieses Proteins nicht fähig sind, CHO-Zellen nicht intoxinieren und keine Lungenepithelschädigung verursachen können, obwohl sie die Typ III-Effektoren und Proteine, die für die Translokation erforderlich sind, produzieren und sekretieren können.

**[0055]** Im Gegensatz zu PopD, das für die Translokation ebenfalls erforderlich ist, ist PcrV für eine Antikörper-vermittelte Neutralisierung zugänglich, was darauf hinweist, dass Antikörper bei akuten Infektionen nützliche therapeutische Wirkstoffe sein können.

### 3. Verfahren bei den Beispielen 1 und 2

**[0056]** Konstruktion einer nicht-polaren Insertion in PcrV und Komplementierung. Ein 5,0-kb EcoRI-NsiI-Restriktionsfragment, das pcrGVHpopBD und flankierende Sequenzen codiert, wurde in den Vektor zum allelen Ersatz pNOT19 kloniert (17). Zwei NotI-Positionen (eine innerhalb von pcrG und eine innerhalb von popB) wurden unter Verwendung des Sculptor Mutagenese-Systems (Amersham) aus den insertierten Sequenzen entfernt. Ein internes SstI-Restriktionsfragment wurde aus pcrV entfernt, um so eine in-Frame-Deletion der Reste 17–221 (pNOTΔpcrV) zu erhalten. Um die Integration des Plasmids zu gewährleisten, wurde ein Tetracyclinresistenz (Tc<sup>R</sup>)-codierendes Gen in die HindIII-Position des Vektors kloniert (pNOTΩΔpcrV). Die MOB-Kassette (17) wurde als ein NotI-Fragment hinzugefügt. Die Auswahl von Merodiploiden, die Auflösung der Plasmidsequenzen und die Bestätigung des allelen Ersatzes wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (18). Zur Konstruktion eines Klons zum Komplementieren der pcrV-Deletion wurde ein Shuttle-Plasmid (pUCP, 19) verwendet. Die Codierungssequenz für PcrV wurde amplifiziert und hinter die Kontrolle des ExoS-Promoterbereichs kloniert (20). Die Transkription von ExoS wird durch die Operonen, welche



die Typ III-Sekretion und Translokation bei *P. aeruginosa* kontrollieren, in koordinierter Weise reguliert (2). Die Nucleotidsequenz wurde für jedes DNS-Konstrukt unter Beteiligung von ortsspezifischer Mutagenese, PCR-Amplifikation oder in-Frame-Deletion bestätigt.

**[0057]** SDS-PAGE und Western-Blot Analyse der sekretierten Produkte. *P. aeruginosa* wurde unter für die Expression der Typ III-sekretierten Produkte induzierenden (+NTA) oder nicht-induzierenden (-NTA) Bedingungen wachsen gelassen (18). Die Kulturen wurden auf der Grundlage von Messungen der optischen Dichte bei 540 nm geerntet, anschließend wurden die Überstandsfractionen durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 55 % aufkonzentriert. Jede Bahn eines SDS-Polyacrylamid-Gels (11 %) wurde mit 3 µl eines 20-fach konzentrierten Überstands beladen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Ein identisches Gel wurde einer wie bereits früher beschriebenen (3–5) Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Gemischs aus Kaninchen-Antisera, das ExoU, PopD und PcrV spezifisch erkennt, unterzogen. Zum Identifizieren von gebundenem IgG wurde mit <sup>125</sup>I markiertes Protein A als Sekundärreagens verwendet.

**[0058]** Infektionsmodelle und Bestimmung der Lungenschädigung. Bei einem zur Messung der Zytotoxizität und Typ III-Translokation ausgelegten in vitro-Infektionsmodell wurden Chinesischer Hamster-Ovarienzellen (CHO) verwendet (21). Zunächst wurde ein Bakterien-Inokulum in einem Gewebekulturbedium ohne Serum hergestellt. CHO-Zellen, die in einem Serum-enthaltenden Medium vermehrt wurden, wurden gewaschen und mit verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen mit einem Infektionsvielfachen von 5:1 infiziert. Die Kulturen wurden unter Gewebekultur-Bedingungen 3 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), gewaschen und mit Trypan-Blau gefärbt. Die Durchlässigkeit für den Farbstoff wurde aus Phasenkontrast-Photographien bestimmt. Die Infektion mit dem parentalen Stamm PA103, der ExoU exprimiert, führt nach 3 Stunden Inkubation bei etwa 80 % der Monoschicht zu einer Färbung mit Trypan-Blau, und nach 4–5 Stunden Inkubation zu einer vollständigen Zerstörung der Monoschicht. Die Infektion bei Mäusen und die Bewertung der Lungenschädigung wurde wie bereits beschrieben (16) durchgeführt. Dabei wurden männliche, 8–12 Wochen alte pathogenfreie BALB/c-Mäuse von den Simonsen Laboratories (Gilroy, CA) erworben und eingesperrt gehalten. Die Mäuse wurden durch Inhalation von Metofan (Methoxyfluran, Pitman-Moore, Mundelein, IL) kurz anästhesiert und in Rückenlage in einem Winkel von etwa 30 ° platziert. Unter Verwendung einer modifizierten Tierfütterungsnadel der Dicke 24 (Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, NY), die über den Oropharynx in die Trachea eingeführt wurde, wurden fünfzig Mikroliter des Bakterien-Inokulums langsam in den lin-

ken Lungenflügel eingeflößt. Bei der Messung für die Bestimmung der Lungenschädigung wurden dem Instillat 0,5 µCi <sup>131</sup>I-markiertes Humanserumalbumin (Merck-Frosst, Quebec, Canada), 0,05 µg wasserfreies Evans-Blau in ml Ringer-Lactat mit 5 % Mäusealbumin zugesetzt. Nach 4 Stunden Infektion wurden die Mäuse anästhesiert, dann wurde über einen Halschlagader-Stich Blut entnommen und eine mediane Sternotomie durchgeführt. Es wurden die Lungen, die Pleuraflüssigkeit, die Tracheen, die Oropharynx, die Mägen und die Lebern entnommen, anschließend wurde die Radioaktivität gemessen. Der prozentuelle Anteil an radioaktivem Albumin, das die durch Einflößen behandelte Lunge verlassen hatte und in den Kreislauf oder die Pleuraflüssigkeit eingetreten war, wurde durch Multiplikation der in den terminalen Blutproben (pro ml) gemessenen Zählrate mit dem Blutvolumen (Körpergewicht × 0,07) berechnet. Das Nass/Trocken-Verhältnis der Lungen wurde bestimmt, indem den Lungen 1 ml Wasser zugesetzt und das Gemisch homogenisiert wurde. Die Homogenisate wurden in vorgewogene Aluminiumtiegel platziert und in einem Ofen bei 80 °C über einen Zeitraum von drei Tagen bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Ferner wurden Lungen-Homogenisate sequenziell verdünnt und zur quantitativen Bestimmung der Bakterien auf Schafsblood-Agar ausplattiert.

**[0059]** Herstellung von Kaninchen-Antiserum gegen PcrV, PopD und ExoU. rPcrV, rPopD und rExoU wurden als Histidin-markierte Fusionsproteine in pET16b hergestellt und mittels Nickelchromatographie gereinigt, wie bereits früher beschrieben (22). Es wurde Kaninchen wurde 300 µg rekombinantes Protein, das in vollständigem Freund-Adjuvans emulgiert war, intradermal injiziert (10 Stellen), mit Antigen in unvollständigem Freund-Adjuvans geboostet, und periodisch in Abständen von 7 Tagen Blut entnommen. Zur passiven Immunisierung wurde die IgG-Fraktion unter Verwendung von Protein A-Säulenchromatographie (Pierce Chemicals, Rockford, IL) isoliert. 1 Stunde vor einem Angriff mit 5 × 10<sup>5</sup> CFU des Stamms PA103 wurde Mäusen 100 µg IgG injiziert (intraperitoneale Injektion). Zur aktiven Immunisierung mit rPcrV und rExoU wurde das Endotoxin durch Extraktion mit 1 %-igem Triton X-114 aus den Proteinpräparaten entfernt (23). Nach den Extraktionen wurde das Triton X-114 durch Sephacryl S-200 Chromatographie entfernt. Alle Impfstoff-Präparate enthielten weniger als 1 ng Endotoxin pro 40 µg an rekombinantes Protein, wie durch Verwendung eines Limulus-Amöbenzellenlysat-Tests (BioWhittaker, Walkersville, MD) bestimmt wurde. 10 µg des rekombinanten Proteins in vollständigem Freund-Adjuvans wurden BALB/c-Mäusen subkutan injiziert. Am Tag 30 wurden die Mäuse mit zusätzlichen 10 µg des Antigens in unvollständigem Freund-Adjuvans geboostet. Am Tag 51 wurden die Mäuse einem Angriff durch Einflößen von *P. aeruginosa* in ihre linke Lunge ausgesetzt.

## 4. Synthese von monoklonalen Antikörpern

**[0060]** Mäuse wurden mit 10 µg gereinigtem, LPS-freiem, rekombinantem PcrV in vollständigem Freund-Adjuvans immunisiert und zwei Wochen später mit der gleichen Dosis des in unvollständigem Freund-Adjuvans dispergierten Antigens geboostet. Es wurden subkutane Immunisierungen durchgeführt. Eine Woche nach Gabe der Booster-Dosen von PcrV in unvollständigem Freund-Adjuvans wurde den Mäusen die Milzen entnommen.

**[0061]** Eine einzelne Milz wurde in 5 ml Gewebekulturmedium ohne Serum platziert, in Stücke geschnitten und behutsam homogenisiert. Es wurde erlaubt, dass sich große Gewebestücke von dem Homogenisat und dem Überstand absetzen, die Einzelzell-Suspension wurde entfernt und einer Zentrifugation über 10 Minuten bei 1200 Upm unterworfen. Die pelletierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten in 10 ml einer Lösung zum Lysieren von roten Blutkörperchen resuspendiert und anschließend mit 10 ml fetalem Rinderserum unterlegt. Das Material wurde 8 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 30 ml Medium suspendiert.

**[0062]** Milzzellen und Myelomzellen (P3x63Ag8.653) wurden durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 1200 Upm geerntet, anschließend wurde jedes Pellet getrennt in 10 ml Gewebekulturmedium suspendiert.  $10^8$  Milzzellen und  $2 \times 10^7$  Myelomzellen wurden gemischt und durch 6 Minuten Zentrifugieren bei 1200 Upm zusammen pelletiert. Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt, dann wurde 1 ml 35 %-iges Polyethylenglycol (PEG) zugesetzt. Die Zellen wurden in dieser Lösung behutsam suspendiert und 3 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Bei einigen Experimenten wurde das Zentrifugieren unterlassen.

**[0063]** Genau 8 Minuten nach dem Zusetzen von PEG wurden 25 ml Medium zugesetzt und die Zellen behutsam resuspendiert. Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 1200 Upm wurde das Zellpellet zu einer Dichte von  $1 \times 10^6$  pro ml in 30 % konditioniertem Medium und 70 % vollständigem Medium (mit Serum) suspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet und in 200 ml von 30 % konditioniertem Medium und 70 % vollständigem Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) suspendiert.

**[0064]** Zu zehn Platten mit 96 Vertiefungen wurden etwa 0,2 ml dieser Zellsuspension pro Vertiefung gegeben (12 ml pro Platte mit 96 Vertiefungen). Die Dichte der verbleibenden Zellen wurde auf  $2,5 \times 10^5$  pro ml eingestellt, dann wurden die Zellen in dem Format mit 96 Vertiefungen ausplattiert. Die Platten

wurden durch Mikroskopie auf einzelne Kolonien abgesucht, anschließend wurden die Überstände durch einen enzymverbundenen Immunosorbens-Test unter Verwendung von PcrV als Antigen auf ihre Antikörperproduktion geprüft. Klone, die gegen PcrV reaktive Antikörper produzierten, wurden in größeren Kulturschalen weitergezüchtet und anschließend isotypiert.

**[0065]** Die Antikörper-Bindung wurde durch einen enzymverbundenen Immunosorbens-Test unter Verwendung von PcrV als Antigen (Histidin-markiertes Protein), das an die Vertiefungen beschichtet war, geprüft. Monoklonale Antikörper wurden auch in Western-Blot-Reaktionen unter Verwendung eines *P. aeruginosa*-Überstands, der natives PcrV ohne die Histidin-Markierung enthielt, geprüft.

## 4. Literaturangaben

1. Wiener-Kronish, J. P., Sawa, T., Kurahashi, K., Ohara, M. und Cropper, M. A., „Pulmonary edema associated with bacterial pneumonia," *Pulmonary Edema* (Herausgeber: Matthay, M. A. und Ingbar, D. H.), Seiten 247–267 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998).
2. Frank, D. W., „The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*," *Mol. Microbiol.* 26: 621–629 (1997).
3. Finck-Barbancon, V. et al., „ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury," *Mol. Microbiol.* 25: 547–557 (1997).
4. Yahr, T. L., Goranson, J. und Frank, D. W., „Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway," *Mol. Microbiol.* 22: 991–1003 (1996).
5. Yahr, T. L., Mende-Mueller, L. M., Friese, M. B. und Frank, D. W., „Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon," *J. Bacteriol.* 179: 7165–7168 (1997).
6. Hueck, C. J., „Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379–433 (1998).
7. Skrzypek, E. und Straley, S. C., „Differential effects of deletion in *IcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low- $\text{Ca}^{2+}$  response, and virulence of *Yersinia pestis*," *J. Bacteriol.* 177: 2530–2542 (1995).
8. Nakajima, R. und Brubaker, R. R., „Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha," *Infect. Immun.* 61: 23–31 (1993).
9. Nakajima, R., Motin, V. L. und Brubaker, R. R., „Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization," *Infect. Immun.* 63: 3021–3029 (1995).
10. Nedialkov, Y. A., Motin, V. L. und Brubaker, R. R., „Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide:

amplification of interleukin-10," *Infect. Immun.* 63: 1196–1203 (1997).

A. 11. Nilles, M. L., Fields, K. und Straley, S. C., „The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG," *J. Bacteriol.* 180: 3410–3420 (1998).

., Pittet, J.-F. 12. Kudoh, I., Wiener-Kronish, J. P., Hashimoto, Sund Frank, D. W., „Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury," *Am. J. Physiol.* 267: L551–L556 (1994).

13. Apodaca, G. et al., „Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing," *Infect. Immun.* 63: 1541–1551 (1995).

T. 14. Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. und Frank, D. W., „ExoY, a novel adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck (1998).

T. L. 15. Finck-Barbancon, V., Yahr, und Frank, D. W., „Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytoxin," *J. Bacteriol.*, im Druck (1998).

16. Sawa, T., Corry, D. B., Cropper, M. A., OK. hara, M., Kurahashi, und Wiener-Kronish, J. P., „IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia," *J. Immunol.* 159: 2858–2866 (1997).

17. Schweizer, H. P., „Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable *Bacillus subtilis* sacB marker," *Mol. Microbiol.* 6: 1195–1204 (1992).

18. Frank, D. W., Nair, G. und Schweizer, H. P., „Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus," *Infect. Immun.* 62: 554–563 (1994).

19. Schweizer, H. P., „*Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19," *Gene* 97: 109–112 (1991).

M. 20. Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. und Frank, D. W., „Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene," *J. Bacteriol.* 177: 1169–1178 (1995).

T. 21. Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. und Frank, D. W., „Regulation of ExoS production by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions," *Infect. Immun.*, eingereicht.

T. 22. Yahr, T. L., Barbieri, J. und Frank, D. W., „Genetic relationship between the 53- and 49 kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Bacteriol.* 178: 1412–1419 (1996).

Y. 23. Aidi, und Pabst, M. J., „Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114," *J. Immunol. Methods* 132: 191–195 (1990).

## Patentansprüche

1. Verwendung von PcrV-Antigen bei der Herstellung eines Medikaments oder Impfstoffs zur Verwendung bei der Hemmung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem PcrV-Antigen um rekombinantes PcrV-Protein handelt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem PcrV-Antigen um ein Fragment des PcrV-Proteins handelt, wobei das Fragment fähig ist, eine auf das V-Antigen spezifische Immunantwort auszulösen.
4. Verwendung einer DNS, die PcrV-Antigen codiert, bei der Herstellung eines Medikaments oder eines Gen-Impfstoffs zur Verwendung bei der Hemmung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die DNS das gesamte PcrV-Protein codiert.
6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die DNS ein Fragment des PcrV-Proteins codiert, wobei das Fragment fähig ist, eine auf das V-Antigen spezifische Immunantwort auszulösen.
7. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Hemmung bei einem Humanpatienten stattfindet.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3 bei der Behandlung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion bei einem *Pseudomonas aeruginosa*-infizierten Patienten.
9. Verwendung eines humanisierten oder humanen PcrV-Antikörpers oder Antikörperfragments davon bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung oder Vorbeugung einer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion, wobei
  - (a) der Antikörper systemisch verabreicht wird und eine *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion hemmt oder verhindert; oder
  - (b) der Antikörper als ein Arzneimittel an die Lungen verabreicht wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

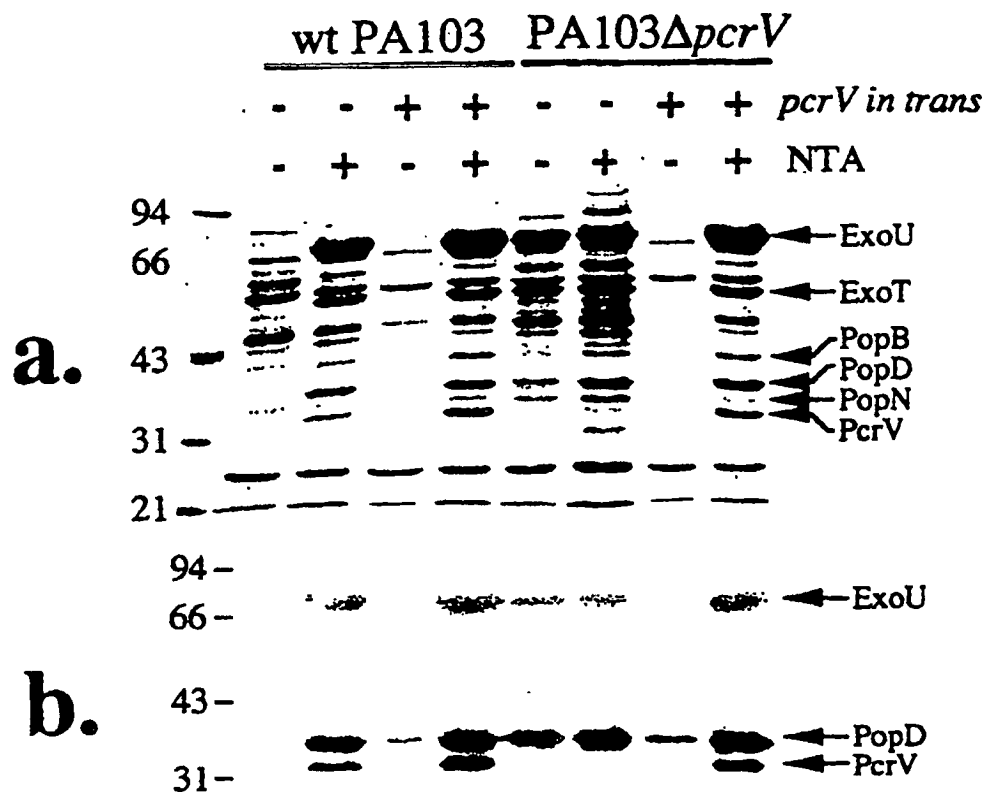


FIG. 1

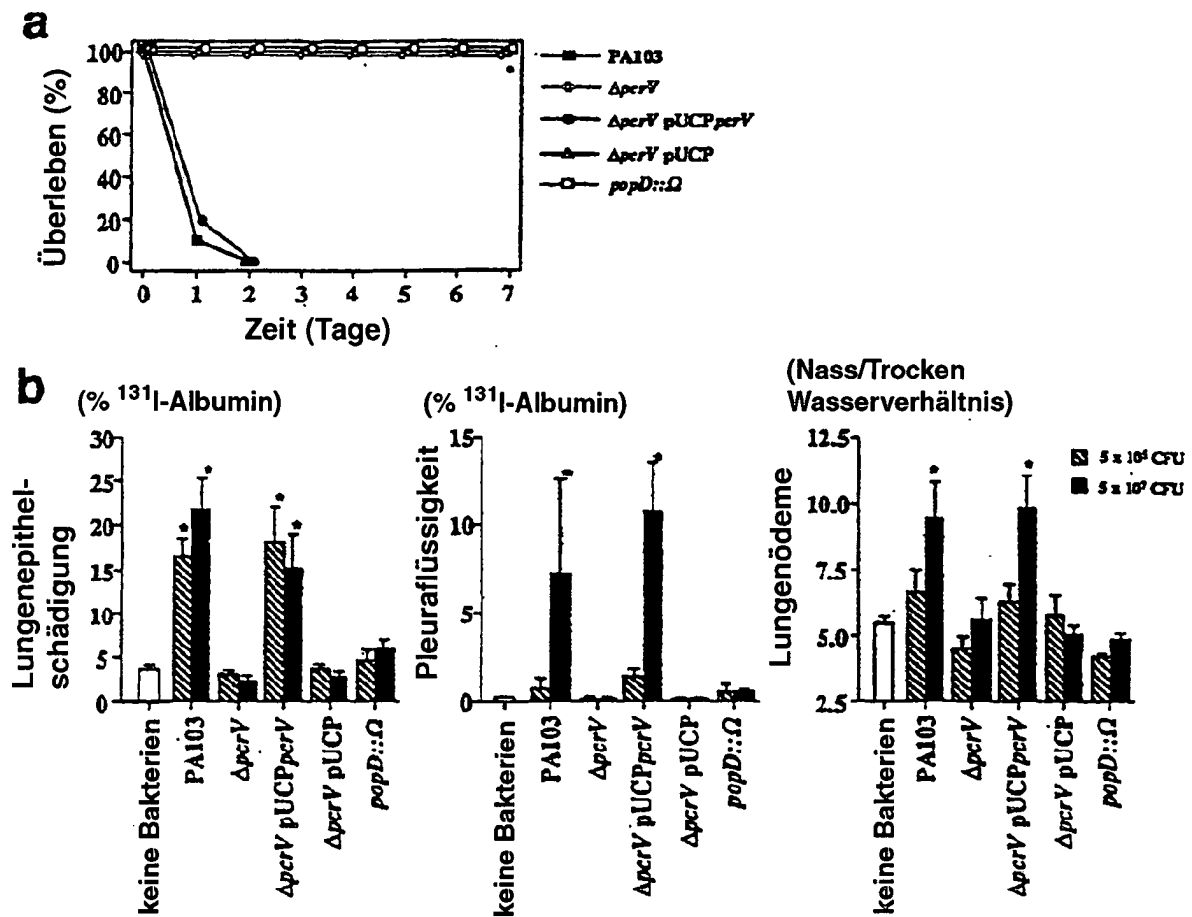


FIG. 2



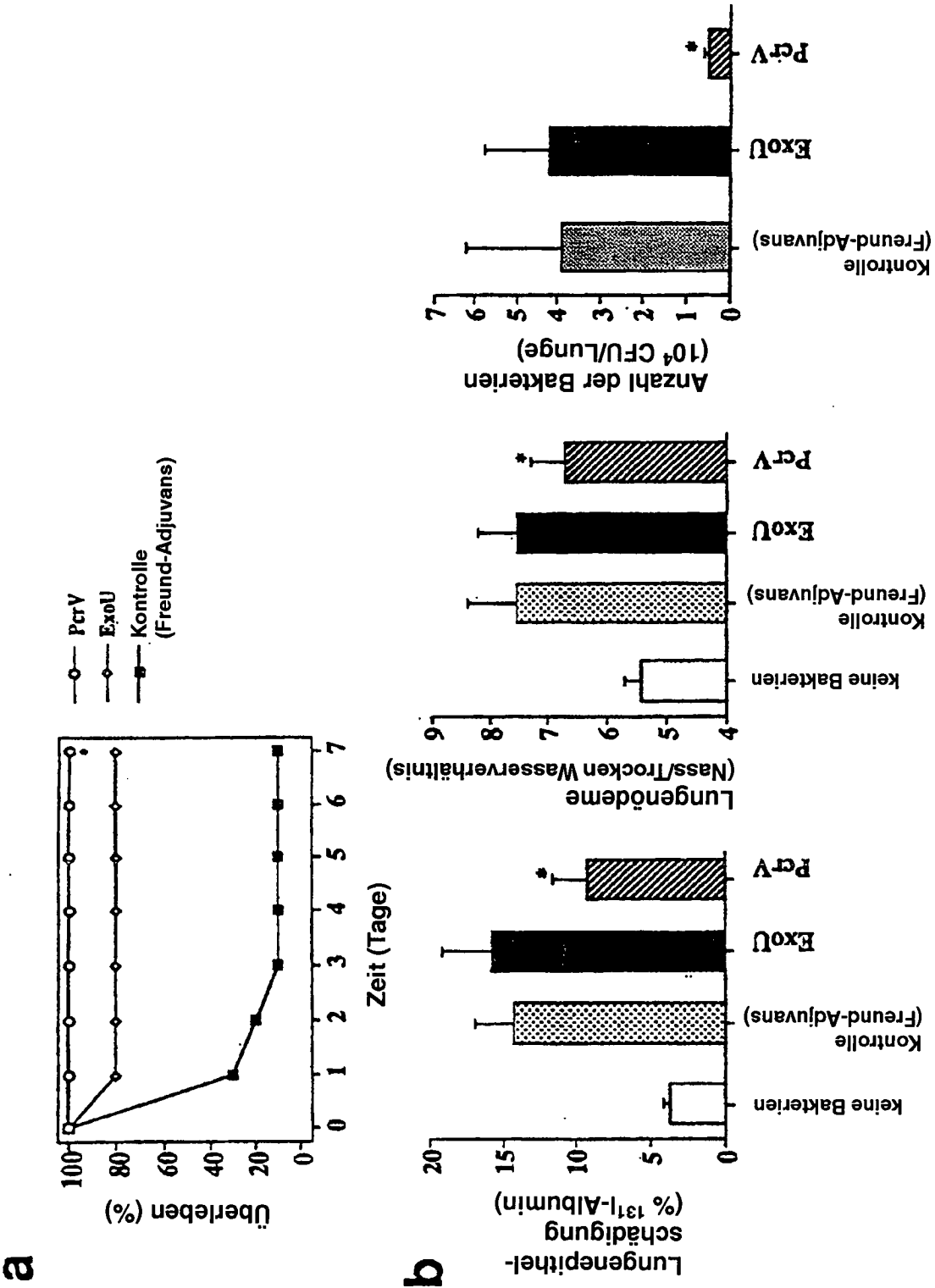


FIG. 3

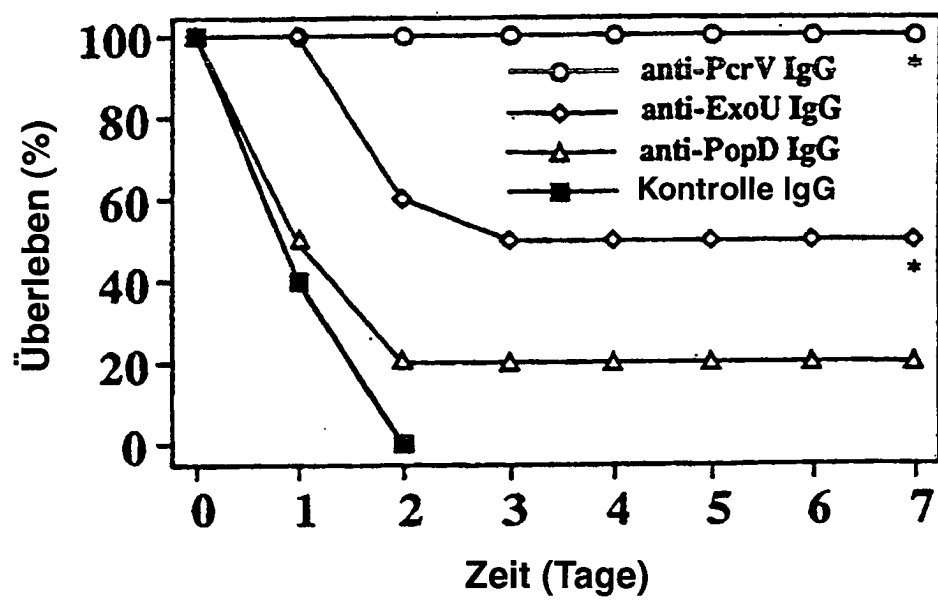


FIG. 4

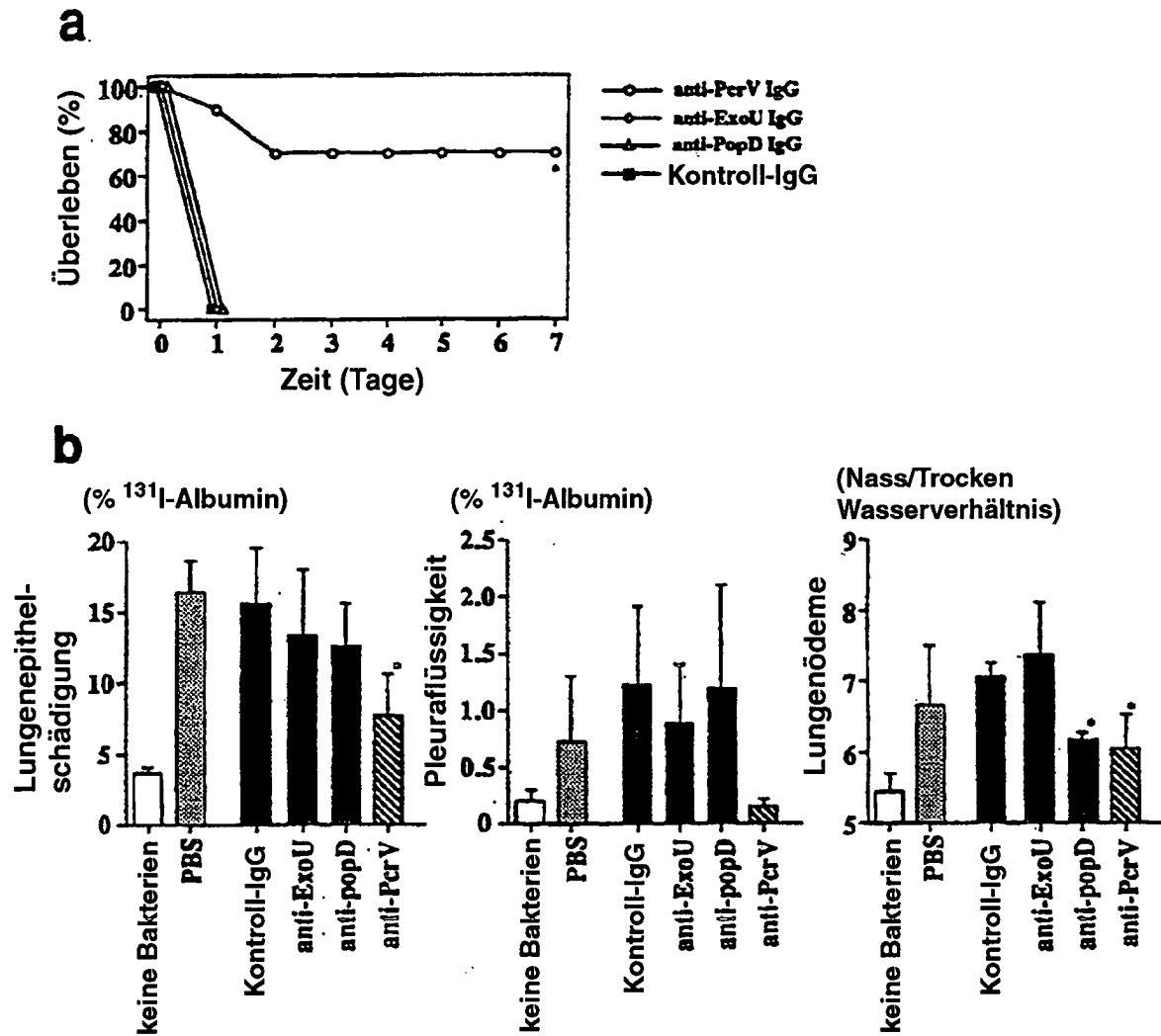


FIG. 5