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

(10) **DE 693 33 028 T2** 2004.04.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 672 116 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 028.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/06270**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 916 907.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/001533**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.07.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.01.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/01**
C12N 1/21, A61K 39/106

(30) Unionspriorität:
909382 **06.07.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass., US; AVANT Immunotherapeutics Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:
MEKALANOS, John J., Cambridge, US; BEATTIE, David, Boston, US; KILLEEN, Kevin, Milton, US; LU, Yichen, Wellesley, US

(74) Vertreter:
P.E. Meissner und Kollegen, 14199 Berlin

(54) Bezeichnung: **DELETIONSMUTANTEN ALS IMPFSTOFFE GEGEN CHOLERA**

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

[0001] Das Gebiet der Erfindung sind Vibrio cholerae-Impfstoffe. Nach mehr als 100 Jahren Forschung über Cholera, bleibt eine Notwendigkeit für einem wirksamen Cholera-Impfstoff. Es hat sechs Pandemien dieser Krankheit gegeben, die durch Stämme von V. cholerae verursacht wurden, die zum „klassischen" Biotyp gehören. Die ätiologischen Wirkstoffe der gegenwärtigen (siebenten) Pandemie gehören zum „El Tor"-Biotyp (Finkelstein, Crit. Rev. Microbiol 2: 553–623, 1973, Wachsmuth et al., The Lancet 337: 1097–1098, 1991). Vor kurzem hat sich die siebente Pandemie auf einen neuen Ort, dem von Südamerika ausgebreitet. Beginnend im Januar 1991, war eine Cholera-Epidemie mit mehr als 250.000 Fällen und über 2.000 Todesfällen in Peru, Ecuador, Kolumbien und Chile die Folge. Vor dieser Epidemie wurde geschätzt, dass über 200.000 Cholera-Fälle pro Jahr hauptsächlich in Indien, Bangladesh, Afrika und Westasien auftraten (Tacket et al., Cholera Vaccines. In Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis, R. W., Herausgeber, Butterworth-Heinemann, Boston, 1992).

[0002] Im November 1992 trat eine Antigen-verschiedene, Nicht-01-Form von V. cholerae in Indien und Bangladesh auf und verursachte innerhalb von acht Monaten schätzungsweise 500.000 Fälle und 6.000 Todesfälle. Das Pandemie-Potential dieses neuen Stamms, der als Serogruppe 0139 Synonym „Bengalen" bezeichnet wird, scheint gesichert und ist eine neue Ursache von Sorge überall in den Entwicklungsländern. Diese jüngsten Erfahrungen unterstreichen die Notwendigkeit für wirksame Cholera-Impfstoffe gegen die Krankheit, die sowohl von El Tor 01- als auch von Bengal 0139-Serotypen von V. cholerae verursacht wird.

[0003] Weil natürliche Infektion durch und Genesung von Cholera die Immunität induziert, die mindestens 3 Jahre dauert (Tacket et al., vorstehend; Levine et al., J. Infect. Dis. 143: 818-820, 1981; Cash et al., J. Infect. Dis. 130: 325–333, 1974), ist viel Bemühung unternommen worden, um abgeschwächte Cholera-Lebendimpfstoffe herzustellen, die bei oraler Verabreichung die Krankheit in ihren Immunisierungeigenschaften nachahmen würden, aber keine nachteiligen Symptome oder Reaktionen beim immunisierten Individuum verursachen würden (d. h. niedrige Reaktogenizität zeigen). Impfstoffe dieser Art schließen Deletionsmutationen ein, die das Gen inaktivieren, das die A-Untereinheit des Choleratoxins kodiert, ein Protein, welches für die meisten Fälle von Diarrhöe verantwortlich ist, die bei dieser Krankheit zu sehen ist (Mekalanos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 151–155, 1982; Mekalanos et al., Nature 306: 551–557, 1983; Kaper et al., Nature 308: 655–658, 1984; Kaper et al., Biotechnology 2: 345, 1984; Pierce et al., Infect. Immun. 55: 477–481, 1987; Taylor et al., Vaccine 6: 151–154, 1988; Levine et al., Infn. Immun. 56: 161–167, 1988; Herrington et al., J. Exper. Med. 168: 1487–1492, 1988; Levine et al., Lancet ii: 467–470, 1988; Kaper et al., Res. Microbiol. 141: 901–906, 1990; Pearson et al., Res. Microbiol. 141: 893–899, 1990). Siehe auch Mekalanos, US-Patente Nr. 5,098,998 und 4,882,278 und Kaper et al., US-Patent Nr. 4,935,364, die hier durch Bezugnahme aufgenommen sind. Während sowohl orale Ganzzell-Totimpfstoffe als auch mehrere abgeschwächte Cholera-Lebendimpfstoffe entwickelt worden sind, stellen die vielversprechendsten von diesen wenig Schutz gegen den El-Tor-Biotyp von V. cholerae und wahrscheinlich keinen Schutz gegen den Serotyp 0139 bereit. Die Hauptprobleme, die mit Cholera-Impfstoffen verbunden sind, sind Sicherheit, Stabilität und ihr Grad an Antigenität.

[0004] Hinsichtlich der Toxin-Gene von V. cholerae ist die genetische Verschiedenheit unter den toxigenen und nicht-toxigenen Stämmen von Chen et al. untersucht worden (1991, Epidemiol. Infect. 107: 225). Mekalanos (1983, Cell 35: 253) berichtet über die Duplikation und Amplifikation von V. cholerae-Toxin-Genen und Miller et al. (1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3471) diskutiert die transkriptionale Regulation der Toxin-Gene. Andere V. cholerae-Gene, deren Produkte eine Rolle bei der Pathogenität dieses Organismus spielen können, schließen die zusammen mit dem Toxin regulierten Pilusgene (Shaw et al., 1990, Infect. Immun. 58: 3042; Sharma et al., 1989, Vaccine 7: 451; Sun et al., 1990, J. Infect. Dis. 161: 1231; Hall et al., 1991, Infect. Immun. 59: 2508; Taylor et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2833) und das Gen ein, das den intestinalen Kolonalisationsfaktor kodiert (Taylor et al., 1988, Vaccine 6: 151).

[0005] Die Erfindung kennzeichnet in einem Gesichtspunkt nichttoxigene genetisch stabile Mutantenstämme von V. cholerae, welche als orale Lebendimpfstoffe zum Induzieren von immunologischem Schutz gegen Cholera nützlich sind. Die Mutantenstämme sind gentechnisch veränderte Mutanten, welchen die DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA-Untereinheit kodiert, und welchen auch alle funktionelle attRS1-Sequenzen fehlen. attRS1-Sequenzen bedeutet eine 17 Bassenpaarsequenz, die innerhalb des genetischen CTX-Elements enthalten ist, das zur Rekombination und Amplifikation des genetischen CTX-Elements erforderlich ist, oder genug von dieser Sequenz, um eine solche Rekombination und Amplifikation zu ermöglichen. Mutanten, welchen „alle funktionellen attRS1-Sequenzen fehlen" sind solche, welche sich im wesentlichen nicht wirksamer ortsspezifischer Rekombination mit attRS1-enthaltenden Trägem unterziehen können, weil die Wildtyp-attRS1-Sequenzen vollständig deletiert sind oder ausreichend deletiert oder mutiert sind, um solche Rekombination zu verhindern. Im Ergebnis sind solche V. cholerae-Stämme sicherer, weil sie nicht mit Wildtyp-attRS1-enthaltenden Trägem rekombinieren können, welche die ctxA-kodierende DNA einschließen.

[0006] Die Erfindung kennzeichnet auch in einem anderen Gesichtspunkt davon ein Verfahren zum Herstellen der vorstehend beschriebenen V. cholerae-Stämme. Das Verfahren schließt das Einbringen eines Plasmids

in Wildtyp-V. cholerae ein, welches ein Fragment der V. cholerae-DNA enthält, die eine Mutation in den ctxA- und attRS1-Sequenzen enthält. Das V. cholerae-DNA-Fragment ist in der Lage, mit Wildtyp-V. cholerae-DNA im Inneren des Organismus zu rekombinieren, um den Mutantenstamm zu erzeugen.

[0007] Obwohl irgendein V. cholerae-Serotyp verwendet werden kann, gehört in bevorzugten Ausführungsformen der Mutantenstamm von V. cholerae zum EI-Tor-Serotyp und stärker bevorzugt zum Inaba- oder Ogawa-Serotyp oder zum V. cholerae-Nicht-01-Serotyp, vorzugsweise 0139-„Bengal"-Serotyp. Vorzugsweise fehlen den Mutanten der gesamte CTX-Kern und alle attRS1-Sequenzen, und stärker bevorzugt ist der Mutantenstamm Peru-2, Bang-2, Bah-2 oder ein abgeschwächter Abkömmling des Bengal-Serotyps, wie Bengal-2 („Beng-2") oder Bengal-3 („Beng-3"), wie nachstehend beschrieben.

[0008] Unsere Mutantenstämme schließen gegebenenfalls zusätzliche Mutationen ein, die eingeführt werden, um die Sicherheit und/oder die Immunogenität des Impfstoffs zu verbessern. Solche zusätzlichen Mutationen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf die Inaktivierung von einen oder mehreren Genen, die in die DNA-Rekombination involviert sind, zum Beispiel das recA-Gen, das durch den Stamm kodiert wird, und die Einbringung von zusätzlichen Genen, welche in das V. cholerae-Chromosom, vorzugsweise in das V. cholerae-lacZ-Gen eingeführt werden. Bevorzugte zusätzliche Gene schließen ein Gen, das die B-Untereinheit von V. cholerae oder von jedem heterologen Antigen, wie der B-Untereinheit vom Shiga-artigen Toxin, kodiert, oder ein Gen ein, das das E. coli-CFA-Antigen oder ein antigenes HIV-Antigen kodiert. Heterologes Antigen bedeutet jedes Antigen, das normalerweise nicht durch V. cholerae exprimiert wird. Zum Beispiel kann das heterologe Antigen das Shigella-Lipopolysaccharid- (LPS-) Antigen, Shiga-Toxin, verschiedene CFA-Antigene von enterotoxigenen E. coli-Stämmen, Anthraxtoxin, Pseudomonaden-Endotoxin A, Antigenfragmente vom HIV-Kapsid, Pertussistoxin, Tetanustoxin; Antigene vom Herpesvirus, Rubellavirus, Influenzavirus, Mumpsvirus, Masemvirus, Poliomyelitisvirus; und immunogene Polypeptide von eukaryotischen Parasiten, die Malaria, Pneumocystis-carinii-Pneumonie und Toxoplasmose verursachen, können in einem V. cholerae-Lebendimpfstoff exprimiert werden. Vorzugsweise ist der Mutantenstamm mit werteren Mutationen Peru-14, Peru-3, Peru-4, Peru-5, Bang-3, Bang-5, Bah-3, Bah-4, Bah-5 oder ein abgeschwächter Abkömmling von Bengal.

[0009] Eine ctxA-Untereinheit bedeutet die A-Untereinheit des Choleratoxins, welche, wenn funktionell, für viele der Cholerasymptome (z. B. Übelkeit, Diarrhöe etc.) verantwortlich ist. Am meisten bevorzugt schließen die Stämme Deletion des gesamten sogenannten „genetischen Kernlements" ein, das nicht nur das ctxA/B einschließt, sondern auch eine Region, die als ICF (intestinaler Kolonisationsfaktor, wahrscheinlich ensprechend CEP „Kern-kodiertes Pilin") bekannt ist, und ZOT ein, nachstehend ausführlicher beschrieben.

[0010] In einem anderen Gesichtspunkt kennzeichnet die Erfindung einen nichttoxigenen genetisch stabilen Mutantenstamm von V. cholerae, welcher als oraler Lebendimpfstoff zum Induzieren eines immunologischen Schutzes gegen Cholera nützlich ist. Der Mutantenstamm ist eine gentechnisch veränderte Mutante, welcher DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA-Untereinheit kodiert. Der Stamm kann auch weichagarpenetrationsdefekt sein. Weichagarpenetrationsdefekt bedeutet das Fehlen der Fähigkeit, in ein Medium hoher Viskosität einzudringen, wenn in vitro durch Strömen auf und innerhalb von Agarmedium, welches zwischen 0,25 und 0,4% Agar beträgt, gemessen. Der bevorzugte Stamm kann auch filamentös sein, d. h. 25% oder mehr Zellen haben eine Länge von grösser als 15 nm unter Bedingungen logarithmischen Wachstums. In bevorzugten Ausführungsformen ist der Stamm auch ATT^-.

[0011] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst unser Impfstoff mindestens zwei verschiedene Stämme von V. cholerae, welche nichttoxigene genetisch stabile Mutanten sind, welchen DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA-Untereinheit kodiert, und die auch weichagarpenetrationsdefekt sind. Einer der beiden. Stämme stammt vorzugsweise vom Peru-Stamm ab und der andere stammt vom Bengal-Stamm ab. Jeder der Komponentenstämme kann ctx^-, att^- und $recA^-$ sein. In Abhängigkeit von der relevanten lokalen Epidemiologie können die Impfstoff-Stämmen in einer Einzeldosis zusammen oder vorzugsweise separat im Abstand von 7–28 Tagen verabreicht werden. Wenn nur einer der Serotypen eine Krankheitsgefahr darstellt, kann es bevorzugt sein, ein Impfstoffregime zu verabreichen, das nur einen Stamm umfasst.

[0012] Die Erfindung kennzeichnet auch in einem anderen Gesichtspunkt davon einen oralen Cholera-Totimpfstoff, der mindestens einen ersten und einen zweiten V. cholerae-Stamm umfasst, wobei mindestens zwei der Stämme verschiedene Serotypen sind und allen Stämmen im Gemisch DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA-Untereinheit kodiert. Der Impfstoff enthält auch die Choleratoxin-B-Untereinheit, die von mindestens einem der Serotypen produziert wird. Vorzugsweise ist einer der Serotypen im Impfstoff ein Ogawa-Serotyp und ist ein anderer der Serotypen ein Inaba-Serotyp. Am meisten bevorzugt umfasst der orale Totimpfstoff Bah-3 und entweder Peru-3 oder Bang-3 oder sowohl Peru-3 als auch Bang-3, wie nachstehend definiert. Jede der oralen Impfstoffkombinationen kann auch Zellen des Bengal-Serotyps einschließen, wie nachstehend definiert, einschließlich Bengal-2 und Bengal-3. Die Stämme können einzeln, zusammen oder in aufeinanderfolgenden Dosen im Abstand von 7–28 Tagen verabreicht werden.

[0013] Die Erfindung kennzeichnet auch in einem werteren Gesichtspunkt davon ein Verfahren zum Herstellen eines V. cholerae-Totimpfstoffs. Das Verfahren schließt das Wachsen mindestens eines ersten und eines zweiten V. cholerae-Stamms ein, wobei jeder Stamm im Gemisch DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA-Unter-

einheit kodiert. Die Stämme werden dann vom Wachstumsmedium gesammelt, und die Zellen werden abgetötet. Die Choleratoxin-B-Untereinheit, die durch mindestens einen der Stämme produziert wird, wird aus dem Medium erhalten, in welchem der Stamm -fortgepflanzt wurde, und wird zu den abgetöteten Zellen zugegeben. Das Gemisch aus abgetöteten Bakterien und Choleratoxin-B-Untereinheit wird dann in einem physiologisch verträglichen Träger suspendiert.

[0014] Mutanten, wie solche, die vorstehend beschrieben wurden, sind als Cholera-Impfstoffe nützlich und werden in ihren genetischen Eigenschaften verbessert, die mit früheren Impfstoffen verglichen werden.

[0015] Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung sind aus der folgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen davon ersichtlich.

[0016] Die Zeichnungen werden zuerst kurz beschrieben.

[0017] **Fig.** 1 ist ein schematisches Diagramm der genetischen CTX-Elemente der toxigenen V. cholerae-Stämme P27459-Sm, C6709-Sm und E7946-Sm. Die ausgefüllten Kästen stellen RS1-Sequenzen dar. Zwischen den RS1-Sequenzen befindet sich eine Region, die als leerer Kasten gezeigt ist (genannt die Kernregion), welche die ctxAB-Gene und Gene enthält, die zot, den intestinalen Kolonisationsfaktor (ICF) kodieren. An den Enden der RS1-Sequenzen sind ausgefüllte Kreise, die Kopien von Sequenzen darstellen, die mit 16 von 17 Basen mit der 17-Basenpaarsequenz attRS1 (CCTAGTGCGCATTATGT) [SEQ. ID. NR. 1] übereinstimmen. Obwohl die CTX-Elemente der drei Stämme in ihrer Struktur variieren, bezogen auf die Anzahl an Kopien der RS1- und Kernregionen, sollte festgestellt werden, dass diese Elemente in dieselbe chromosomale Stelle in allen El-Tor-Stämmen von V. cholerae insertiert werden.

[0018] **Fig.** 2(A) Restriktionskarte des Chromosoms, das die CTX-Region von Stamm C6709-Sm mit dem in **Fig.** 1 schematisch gezeigten CTX-Element enthält. Nicht gezeigt sind die Restriktionskarten der Stämme P27459-Sm und E7946-Sm, welche dieselben sind außer der Veränderung, die in den Stellen dieser Karte innerhalb der Kern- oder RS1-Sequenzen des CTX-Elements, wie in **Fig.** 1 schematisch gekennzeichnet, beobachtet wird. (B) Restriktionskarte der entsprechenden chromosomalen Region des Stamms Bang-1, Bah-1 und Peru-1.

[0019] **Fig.** 3. (A) Restriktionskarte des Plasmid pGP60, das ein insertiertes DNA-Fragment trägt, das dem Chromosom entspricht, das die CTX-Region vom Stamm P27459-Sm enthält, wobei das CTX-Element schematisch wie in **Fig.** 1 gezeigt ist. Unter diesem befindet sich ein Doppelpfeil, welcher die DNA kennzeichnet, welche in Plasmid pAR62 deletiert worden ist. (B) Die Restriktionskarte der CTX-Region von Stamm P27459-Sm ist gezeigt, einschließlich der Restriktionsstellen dieser Karte außerhalb der Region, die in das Plasmid pGP60 kloniert wurde. (C) Eine Veranschaulichung der rekombinatorischen Ereignisse (gestrichelte Linien) zwischen Plasmid pAR62 und dem Chromosom, das die Typ-2-Deletion erzeugte, welche in den elterlichen Stämmen C6709-Sm, P27459-Sm und E7946-Sm die Deletionsmutanten Peru-2, Bang-2 beziehungsweise Bah-2 entstehen ließ. (D) Restriktionskarte des Chromosoms der Stämme Peru-2, Bang-2 und Bah-2.

[0020] **Fig.** 4 ist eine graphische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pGP52.

[0021] **Fig.** 5 ist eine graphische Darstellung der Erzeugung von pJM84.1 und pJM84.2. Ein 0,6 kB-Fragment, das eine promotorlose B-Untereinheit kodiert, wurde durch PCR erzeugt. Diese DNA wurde in pCR100 ligiert und mit Spel/EcoRI gespalten. Das so erhaltene 0,6 kB-Restriktionsfragment wurde in EcoRI/Xbal-gespaltetene pVC100- und pRT41-Vektoren ligiert, wobei pJM1001 beziehungsweise pJM411 erhalten wurde. Jedes Plasmid wurde mit BamHI/EcoRI gespalten, mit Klenow behandelt, von XbaI-Verbindern flankiert und mit Xbal gespalten. Die gereinigten Fragmente wurden mit XbaI-gespaltetem pGP84 ligiert, wobei pJM84.1 und pJM84.2 erhalten wurden.

[0022] **Fig.** 6 ist eine graphische Darstellung der Insertion von ctxB in das Chromosom. Nichtreplikativer pJM84.1 wurde in Peru-2, Bang-2 oder Bah-2 durch homologe Rekombination integriert. Ampicillin-resistente rekombinante Kolonien wurden anschließend auf Medium ausgestrichen, welches Streptomycin ohne Ampicillin enthielt, wobei folglich der Selektonsdruck für Ampicillinresistenz verringert wurde. Die so erhaltenen Ampicillin-sensitiven Kolonien wurden isoliert und waren ausgewählt für die Ausschneidung von DNA, die von homologen recA-DNA-Sequenzen flankiert sind.

[0023] Wir erwägen die Verwendung von abgeschwächten Stämmen von V. cholerae, die entweder als orale Lebend- oder Totimpfstoffe verwendet werden können, um Individuen gegen Cholera und möglicherweise andere Krankheiten zu schützen.

Konstruktion von Impfstoffen

[0024] Abgeschwächte Abkömmlinge des V. cholerae-Stamms C6709-Sm, der 1991 aus einem Cholera-Patienten in Peru isoliert wurde, sind konstruiert worden, die als orale Cholera-Lebendimpfstoffe verwendet werden können. Die Abkömmlinge Peru-1 und Peru-2 tragen kleine Typ-1- (Kern-) beziehungsweise große Typ-2-Deletionen, welche die DNA entfernen, die das Choleratoxin kodiert, zusätzlich zu der DNA, die zot kodiert, einen intestinalen Kolonisationsfaktor (ICF), der ohne Bezug zum Choleratoxin ist. Weil übermäßige intestinale Kolonisation für widrige Nebenwirkungen verantwortlich sein kann, die in Menschen zu sehen sind,

denen ein früherer Prototyp von Cholera-Lebendimpfstoffen verabreicht wurde, macht die Deletion der Gene, die sowohl Choleratoxin als auch ICF in Peru-1 und Peru-2 kodieren, diese Stämme in geimpften Individuen weniger reaktogen, während sie ihre immunogenen und deshalb schützenden Eigenschaften behalten.

[0025] Die größere Typ-2-Deletion, die in Peru-2 vorliegt, entfernt auch eine insertionsartige Sequenz, RS1 genannt, welche in zwei oder mehr Kopien als Teil eines größeren DNA-Segments vorliegt, das das genetische CTX-Element genannt wird. Die RS1-Sequenz kodiert ein ortsspezifisches Rekombinationssystem, das sich mit einer hohen Häufigkeit duplizieren kann und Insertion des CTX-Elements in das V. cholerae-Chromosom an einer 17 Basenpaarzielstelle, attRS1 genannt, bewirken kann. Die Sequenzen, die fast identisch sind mit attRS1 (und anscheinend rekombinant genauso aktiv), kommen an den Enden der RS1-Sequenzen vor. Diese Sequenzen sind wie folgt:

attRS1 und flankierende chromosomale Sequenzen:

5'-TAAACCTAGAGACAAAATGTTCCTAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAAT-3' [SEQ. ID. NR. 2]

linke Seite von RS1 und chromosomaler Verbindungspunkt:

5'-TAAACCTAGAGACAAAATGTTCCTAGTGCGCATTATGTGGCGCGGCAT...RS1...-3' [SEQ. ID. NR. 3]

rechte Seite von RS1 und chromosomaler Verbindungspunkt:

5'-AAACCCTAGATTCCGCCGCCTTAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAAT-3' [SEQ. ID. NR. 4]

[0026] Die attRS1- und eine ähnliche Sequenz, die an den Enden von RS1 vorliegt, sind unterstrichen. Merke, dass die chromosomale Sequenz, die attRS1 flankiert, auf der linken und der rechten Seite von RS1 vorliegt, wobei die einzige Überlappung eine 17 Basenpaarsequenz, die mit attRS1 am linken Ende von RS1 identisch ist, und eine 18 Basenpaarsequenz ist, bei der 17/18 Basenpaare mit attRS1 übereinstimmen.

[0027] Gentechnisch veränderte abgeschwächte Cholera-Lebendimpfstoffe sind theoretisch nur sicher, wenn sie nicht umkehren oder anders die Fähigkeit, Choleratoxin zu produzieren, wiedergewinnen können. Stämme, welche eine einzige Kopie der attRS1-Sequenz tragen, können eine neue Kopie des CTX-Elements durch DNA-Transfer entweder durch P-Faktorkonjugation oder Bakteriophagentransduktion wirksam erwerben. Folglich können Deletionen, welche V. cholerae frei von RS1- und attRS1-Sequenzen machen, einen Impfstoffstamm am Wiedererwerben des genetischen CTX-Elements in der Natur durch sein eigenes ortsspezifisches Rekombinationssystem hindern. Eine solche Deletion liegt im Stamm Peru-2 und seinen Abkömmlingen vor.

[0028] Sechs Mutantenstämme von V. cholerae mit ähnlichen, aber nicht identischen Eigenschaften sind konstruiert worden. Vier Stämme, die dieselben beiden Arten von Deletionen tragen (Typ-1 und Typ-2) wie die Stämme Peru-1 und Peru-2, wurden in V. cholerae-Stämmen konstruiert, die von Patienten in Bangladesh (P27459-Sm) und Bahrain (E7946-Sm) isoliert wurden. Diese vier Abkömmlinge, Bang-1, Bang-2, Bah-1 und Bah-2, sind auch Gegenstand der Erfindung, weil sie in der Kolonisation und/oder anderen Eigenschaften (z. B. Serotyp) variieren, und sie sind deshalb möglicherweise geeigneter als die entsprechenden Peru-Stämme zur Verwendung als Impfstoffe in anderen Regionen der Welt.

[0029] Obwohl die kleinere Typ-1-Deletion, die in den drei Stämmen Peru-1, Bang-1 und Bah-1 vorliegt, nicht alle Kopien von RS1 entfernt, beeinflusst diese bestimmte Deletion die intestinalen Kolonisationseigenschaften von einigen dieser Stämme schwerer als die größere Deletion, die in Peru-2, in Bang-2 und in Bah-2 vorliegt.

Konstruktion von Typ-2-Deletionsmutationen

[0030] Eine Typ-2-Deletion entfernt alle Sequenzen, die dem genetischen CTX-Element entsprechen, das RS1-Sequenzen einschließt, und alle Kopien der attRS1-Sequenz (**Fig.** 1). Die Typ-2-Deletion wurde durch Rekombination zwischen dem Chromosom von V. cholerae und den Plasmidsequenzen konstruiert, die in das Plasmid pAR62 kloniert wurden, wie in **Fig.** 3 gezeigt. Das Plasmid pAR62 ist ein Abkömmling des Plasmids pGP60 und trägt eine Typ-2-Deletion, wobei das in **Fig.** 3 gezeigte HindIII-Fragment deletiert wurde. Das Plasmid pGP60 wurde konstruiert, indem zuerst eine Genbibliothek von Stamm P27459 erzeugt wurde, indem teilweise gespaltete 20–30 kB Sau3A-Fragmente in die BamHI-Stelle des Plasmids pLAFR2 insertiert wurde (Friedman et al., 1982, Gene 18: 289). Die Kolonien wurden unter Verwendung von Sonden, die von der ctx-Region abstammen (Mekalanos, 1983, Cell 35: 253), durch Hybridisierung abgesucht. Eine positive Kolonie wurde ausgewählt und das Plasmid, welches daraus isoliert wurde, wurde pGP60 genannt. Restriktions-

enzymanalyse dieses Plasmids bestätigte, dass es alle der CTX-Elementsequenzen und zusätzliche flankierende DNA enthielt. Das Plasmid pAR62 kodiert Tetracyclin-Resistenz. Dieses Plasmid wurde in einen Stamm von V. cholerae durch Konjugation oder Elektroporation eingebracht, gefolgt von Selektion auf Medium, das 3 µg/ml Tetracyclin enthielt. Ein solcher Plasmid tragender Stamm wurde dann durch Koloniehybridisierung mit der radioaktiven L-3-Sonde abgesucht, die hergestellt wurde, wie in Goldberg und Mekalanos (J. Bacteriol. 165: 723–731, 1986) beschrieben. Kolonien, die die in das Chromosom insertierte Typ-2-Deletion tragen, hybridisierten nicht an die L-3-Sonde und traten überraschenderweise mit einer hohen Häufigkeit auf (d. h. etwa 1% der abgesuchten Kolonien). Southernblot-Analyse wurde verwendet, um das Vorliegen der erwarteten Deletionen in diesen Stämmen zu bestätigen.

Konstruktion von Kern- (Typ-1-) Deletionen

[0031] Eine „Kerndeletion" entfernt nur Sequenzen, die dem Kern des CTX-Elements entsprechen, aber einer Kopie des RS1-Elements auf dem Chromosom hinterlässt (Goldberg et al., J. Bacteriol. 165: 723–731, 1986) (**Fig.** 2). Diese Deletionen treten spontan durch homologe Rekombination zwischen den RS1-Sequenzen auf, die sich auf der rechten Seite und der linken Seite der Kernregion befinden, wie in **Fig.** 2 gezeigt. Kolonien von V. cholerae, die Kerndeletionen enthalten, können auf zwei Arten und Weisen identifiziert werden. Erstens, wenn der Stamm einen selektierbaren Marker, wie eine genkodierende Kanamycin-Resistenz, die in der Kernregion insertiert ist, trägt, dann macht die Kerndeletion einen solchen Stamm sensitiv gegenüber Kanamycin (Goldberg et al., J. Bacteriol. 165: 723–731, 1986). Zweitens können Kolonien, die die Kerndeletion enthalten, auch durch Kolonie-Hybridisierung unter Verwendung einer radioaktiven CT-1-Sonde identifiziert werden, welche nicht an Stämme hybridisiert, die diese Deletion tragen (Goldberg et al., J. Bacteriol. 165: 723–731, 1986). Bei jedem Verfahren traten Kolonien, die diese Deletionen tragen, mit einer Häufigkeit von etwa 1 pro 1000 abgesuchten Kolonien auf. Analyse durch Southernblot-Hybridisierung wurde dann verwendet, um die erwarteten Deletionen in diesen Stämmen zu bestätigen.

[0032] Ein Assay für funktionelle attRS1-Sequenzen, der auf Integration des Plasmids pGP52 beruht Das Plasmid pGP52 ist ein Suizidplasmid, welches nur in der Lage ist, sich in Stämmen von E. coli, wie SM10?pir zu replizieren (Pearson et al., 1990, Res. Microbiol. 141: 893). Das Plasmid pGP52 wurde konstruiert, indem zuerst das Plasmid pGP7 (Mekalanos, 1983, Cell 35: 253) mit ClaI und SphI gespalteten wird. Dieses Plasmid enthält zwei RS1-Sequenzen (RS1 und RS2 genannt), die aus dem V. cholerae-Stamm E7946-Sm stammen. Ein Fragment von DNA, welche die RS1-Sequenzen enthielt, wurde in pBR322 kloniert, und das so erhaltene Plasmid wurde pGP20 genannt. Dieses Plasmid wurde dann mit EcoRV gespalten (welches innerhalb der RS1-Sequenzen spaltet). Als dieses Plasmid erneut ligiert wurde, wurde ein neues Plasmid, das pGP20R genannt wurde, erzeugt, das eine Hybridversion von RS2, RS2* genannt, enthielt, wobei die Hybrid-RS2-Sequenzen durch Kernsequenzen flankiert wurden. Ein SspI-SphI-Fragment von RS2 wurde dann in das Suizidplasmid pJM703.1 subkloniert, welches mit NruI und SphI gespaltet worden war. Das Plasmid pJM703.1 wird von Miller et al. beschrieben. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3471). Das so erhaltene Plasmid wurde pGP52 genannt. Ein Diagramm, das die Konstruktion von pGP52 darstellt, ist in **Fig.** 4 gezeigt.

[0033] Wenn pGP52 durch Konjugation in V. cholerae-Stämme, welche attRS1-Sequenzen enthalten, transferiert wird, integriert es sich in das V. cholerae-Chromosom mittels eines ortsspezifischen Rekombinationsereignisses zwischen der attRS1-Sequenz auf dem Chromosom und der attRS1-Sequenz, die auf dem Plasmid vorliegt. Integrationsereignisse wie diese können quantitativ bestimmt werden, indem die Anzahl der Kolonien bestimmt wird, die Ampicillinresistenz stabil beibehalten (d. h. sind nicht ausgewählt), weil Resistenz gegen Ampicillin durch pGP52 kodiert wird. Bestätigung der Integration kann in Southemblot-Hybridisierungsexperimenten erhalten werden. Wenn der zu testende V. cholerae-Stamm funktionelle attRS1-Sequenzen umfasst, dann wird Integration im Test beobachtet. Wenn der Stamm keine funktionellen attRS1-Sequenzen enthält, tritt keine Integration auf.

[0034] Um die Fähigkeit der verschiedenen Impfstoffkandidaten, als Rezipient für pGP52 zu dienen, zu beurteilen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Der Donor-E. coli-Stamm SM10□pir pGP52 wurde mit dem Rezipient-V. cholerae-Testimpfstoff-Stamm in 5 ml Luria-Brühe bei einer Konzentration von 10^7 Zellen von jedem Stamm pro Kultur gemischt. Das Gemisch wurde 5 Stunden lang bei 37°C inkubiert, zu welchem Zeitpunkt es in frischer Luria-Brühe, die 100 µg/ml Streptomycin enthielt, 1 : 100 verdünnt wurde. Der Zweck des Streptomycins ist, gegen den E. coli-Donorstamm auszuwählen, indem es ihn tötet. Folglich sind nur die streptomycinresistenten V. cholerae-Rezipientstämme in der Lage, zu wachsen.

[0035] Diese Kultur wurde inkubiert, bis die Wachstumrate der Zellen Sättigung erreichte. Die Kulturen wurden erneut verdünnt und werter inkubiert, bis sich jede Zelle in Abwesenheit jeder positiven Selektion für pGP52 insgesamt 20 mal repliziert hatte. Diese Kultur wurde dann verdünnt und auf zwei verschiedenen Medienzusammensetzungen ausplattiert, um die Anzahl an lebensfähigen Kolonien quantitativ zu bestimmen. Eines dieser Medien ist Luria-Brühe, welche keine Antibiotika enthielt. Die Anzahl an Kolonien, die auf diesen Platten erscheinen, stellt die Gesamtzahl der Zellen in der Kultur dar. Das andere Medium ist Luria-Brühe, wel-

che Ampicillin enthielt. Die Zahl der Kolonien, die auf diesen Platten erscheinen, stellt die Zahl der Integrationsereignisse dar, die nach Konjugation auftraten. Die Ergebnisse werden als Verhältnis von stabilen Integrationsereignissen/Gesamtzahl von lebensfähigen Zellen ausgedrückt und sind nachstehend in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Repräsentative Integrationsdaten von Peruimpfstoffstämmen

Stamm	stabile Integrationsereignisse/Gesamtzahl lebensfähiger Zellen
Peru-1	$5{,}2 \times 10^{-5}$
Peru-2	nicht nachweisbar ($< 5 \times 10^{-8}$)
Peru-3	nicht nachweisbar ($< 5 \times 10^{-8}$)
Peru-4	nicht nachweisbar ($< 5 \times 10^{-8}$)
Peru-5	nicht nachweisbar ($< 5 \times 10^{-8}$)

[0036] Bezogen auf diese Daten ist es offensichtlich, dass Stamm Peru-1, welcher zwei Kopien der attRS1-Sequenzen enthält, in der Lage ist, das Plasmid pGP52 in sein Chromosom mit einer Häufigkeit zu integrieren, die mindestens 1000-fach höher ist als irgendeiner der anderen getesteten Stämme, von denen allen alle attRS1-Sequenzen fehlen.

Serologische Charakterisierung von Impfstoffstämmen

[0037] Die Impfstoftstämme Peru-2, Bang-2 und Bah-2 wurden hinsichtlich ihrer serologischen und Kolonisationseigenschaften werter charakterisiert. Die in Tabelle 2 dargestellten Daten legen dar, dass jeder Abkömmling seinen erwarteten Serotyp behielt (d.h. den Serotyp von jedem der Mutanten betreffenden elterlichen Stamm), wenn frisch geerntete Bakterienzellen durch Objektträgeragglutination unter Verwendung von Difco V. cholerae-01- Inaba oder -Ogawa-Serum getestet wurde. Dieses Ergebnis zeigt an, dass diese Stämme noch immer LPS-Antigene exprimieren. Andere Tests legen dar, dass diese Mutantenstämme frei beweglich, prototroph sind, und noch immer Tcp-Pili exprimieren. Folglich exprimieren die Mutanten mehrere Eigenschaften, die wichtig sind für ihre Fähigkeit, als Lebendimpfstoffstämme nützlich zu sein.

Kolonisationseigenschaften der Impfstoffstämme und Kerndeletionsmutanten

[0038] Um die Kolonisationseigenschaften dieser Impfstoftstämme zu testen, wurde ein Mausintestinalkompetitionsassay verwendet, wie von Taylor et al. beschrieben. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2833–2837, 1987) von dem gezeigt worden ist, dass er mit den Kolonisationseigenschaften von Mutantenstämmen genau korreliert, wenn sie anschließend in menschlichen Freiwilligen getestet werden (Herrington et al., J. Exper. Med. 168: 1487-1492, 1988). Der Assay misst Unterschiede bezüglich der Kolonisation eines Mutantenstämms durch Vergleich seiner Fähigkeit, um Wachstum und Überleben zu konkurrieren, mit einem anderen eng verwandten oder isogenen Stamm. Bei diesem Assay wurden der Mutanten- und der Konkurrenzstamm in einem Verhältnis von ungefähr 1 : 1 gemischt, und dann wurden ungefähr eine Million Zellen dieses Gemisches in den Magen von 3–5 Tage alten Säuglings-CD-1-Mäusen eingebracht. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet, wurde der Darm seziert, homogenisiert, und auf bakteriologischen Medien ausplattiert, die Streptomycin enthielten, welches für beide Stämme selektiert. Kolonien, die nach Inkubation über Nacht wuchsen, werden dann auf zusätzliche Marker getestet, welche den Mutantenstamm vom Konkunenzstamm unterscheiden (d. h. Resistenz gegen Kanamycin oder Hybridisierung mit geeigneten radioaktiven DNA-Sonden; siehe Legende von Tabelle 3).

[0039] Wie in Tabelle 3 gezeigt, zeigten Bang-2 und Bah-2 beide einen leichten intestinalen Kolonisationsdefekt, der eine ungefähr 4–13-fach bessere Genesung von den isogenen Konkurrenzstämme als die Mutantenstämme nach 24 Stunden Wachstum im Mäusedarm zur Folge hatte. Auch in Tabelle 3 gezeigt, sind Ergebnisse von Kompetitionsassays, die die Kerndeletionsmutantenstämme Peru-1, Bang-1 und Bah-1 einschließen. Wie die Typ-2-Deletionsstämme Bang-2 und Bah-2 weisen diese Kerndeletionsmutanten im Verhältnis zu ihren isogenen Konkurrenzstämmen einen Defekt der Kolonisation auf. Weil Kerndeletionen Sequenzen entfernen, die dem Kern des CTX-Elements entsprechen (**Fig.** 1 und 3), legen diese Daten nahe, dass der Kern des CTX-Elements einen „intestinalen Kolonisationsfaktor oder ICF" kodiert. Choleratoxin selbst ist kein ICF. Die Stämme SM44 und SM115, welche wegen einer Deletion in den ctx-Genen und Insertion eines Gens, das Kanamycinresistenz kodiert, einen Defekt in der Choleratoxinproduktion aufweisen, wie von Goldberg und Mekalanos beschrieben (J. Bacteriol. 165: 723–731, 1986), stechen ihre jeweiligen Mutationsstämme (Bang-1, Bang-2 und Bah-1, Bah-2) im intestinalen Kompetitionsassay aus. Folglich ist es ersichtlich, dass SM44 und SM115 ICF herstellen, auch wenn sie kein Choleratoxin produzieren, während es die Mutanten nicht tun. Weil außerdem die CTX-Kernregion die einzige DNA war, die sowohl in Kern- als auch Typ-2-Deletionen deletiert

ist, und Mutanten, die beide Arten von Deletionen tragen, einen ähnlichen Defekt der Kolonisation aufwiesen, kann auch gefolgert werden, dass ICF durch die Kernregion des CTX-Elements kodiert wird, wie in **Fig.** 1 gezeigt.

[0040] Vor kurzem ist festgestellt worden, dass ein neues Toxin, das ZOT genannt wird, durch die Kernregion kodiert wird (Baudry et al., 1992, Infect. Immun. 60: 428–434). Wir haben einen Beweis, dass Mutationen im ZOT-Gen nicht den Kolonisationsdefekt produzieren, der in den Typ-1- oder Typ-2-Deletionsmutanten beobachtet wird. Demgemäß wird ICF als eine von ZOT getrennte und verschiedene Eigenschaft bezeichnet. Die hier beschriebenen Impfstoffstämme, die Typ-1 oder Typ-2-Deletionen tragen, weisen einen Defekt im ICF auf.

[0041] Demgegenüber zeigte der Stamm Peru-2 im Verhältnis zu seinem Konkunenzstamm C6709-Sm keinen wesentlichen Defekt der intestinalen Kolonisation (Tabelle 2). Jedoch war die Gesamtzellenausbeute entweder von Stamm C6709-Sm oder Peru-2 in den Mäusen typischerweise 10–100-fach kleiner als von Stämmen SM44 oder SM115, was nahelegt, dass der Peru-Stamm C6709-Sm und sein Abkömmling Peru-2 schon einen undefinierten Kolonisationsdefekt tragen können. Da Deletion des Kernes des gesamten oder eines Teils des CTX-Elements keinen weiteren . Defekt der Kolonisation entweder von Stamm Peru-1 oder Peru-2 verursachte, kann gefolgert werden, dass der Stamm C6709-Sm einen teilweisen Defekt des ICF bereits aufweist, sogar wenn er DNA-Sequenzen trägt, die der CTX-Kernregion entsprechen. Deletion der gesamten CTX-Region, wie durch die Typ-2-Mutationen definiert, die in den Stämmen Peru-2, Bang-2 und Bah-2 vorliegen, stellt sicher, dass die Gene für ICF nicht reaktiviert und in den Impfstoffabkömmlingen funktionell werden können. Die Typ-2-Deletion von ICF-Genen verursacht offensichtlich einen leichten Kolonisationsdefekt. Solches kann als abgeschwächte Mutation bei der Cholera-Impfstoffentwicklung nützlich sein, weil Wildtyp-ICF für unerwünschte Toxizitätsmengen verantwortlich sein kann.

Tabelle 2. Eigenschaften der Mutantenstämme

Mutantenstämme	Elternstamm*	Serotyp	Typ der Deletion
Peru-2	C6709-Sm	Inaba	Typ-2
Bang-2	P27459-Sm	Ogawa	Typ-2
Bah-2	E7946-Sm	Inaba	Typ-2

*beachte, dass die Kennzeichnung „Sm“ hinter dem Stammnamen sich auf die Streptomycin-Resistenz bezieht. Dieses ist ein spontan selektierter Stamm, welcher resistent gegen 100 µg/ml Streptomycin ist und war das Ergebnis einer spontanen Punktmutation im Gen für ein ribosomales Protein. Dieser Resistenzmarker ist nicht mit einem Plasmid oder einem Transposon verbunden und ist deshalb nicht auf die Darmflora übertragbar. Weil sich alle Mutantenstämme von den angezeigten Elternstämmen ableiten, sind alle Mutantenstämme auch gegen Streptomycin resistent.

Tabelle 3

Säuglingsmauskolonisationskompetitionsassays[a]

Mutantenstamm	Konkurrenzstamm	Eingangsverhältnis Mutanten-/ Konkurrenzstamm	Ausgangsverhältnis Mutanten-/ Konkurrenzstamm
Bang-2	SM44[b]	0,61	0,16
Bah-2	SM115[c]	0,92	0,07
Peru-2	C6709-Sm[d]	0,74	0,65
Bang-1	SM44[b]	0,85	0,05
Bah-1	SM115[c]	0,61	0,04
Peru-1	C6709-Sm[d]	0,89	0,94

[a] die Säuglingsmauskolonisationskompetitionsassays wurden gemäß dem Verfahren durchgeführt, das von Taylor et al. beschrieben wurde (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:2833-2837, 1987). Das Verhältnis der Stämme wurde entweder durch Differentialsensitivität gegen Antibiotika oder durch Koloniehybridisierung mit geeigneten Sonden bestimmt, wie in den zusätzlichen nachstehenden Fußnoten beschrieben.

[b] Der Stamm SM44 ist von Goldberg und Mekalanos beschrieben worden (J. Bacteriol. 165:723-731, 1986) und ist ein kanamycinresistenter Abkömmling des Elternstamms P27459-Sm. Das Gen, das die Kanamycinresistenz in SM44 kodiert, wurde im *ctx*-Ort insertiert. Weil Bang-1 und Bang-2 Abkömmlinge von P27459-Sm waren, misst die

Konkurrenz mit SM44 Kolonisationsunterschiede, die eher der Wirkung der Typ-2-Deletion als dem Verlust von *ctx* zugeschrieben werden können. Die Stämme Bang-1 und Bang-2 waren sensitiv gegen Kanamycin und wurden von SM44 in diesen Kompetitionsassays unterschieden, indem Kolonien auf Resistenz gegen Kanamycin mit 30 µg/ml bewertet wurden.

[c] Der Stamm SM115 ist von Goldberg und Mekalanos beschrieben worden (J. Bacteriol. 165:723-731, 1986) und ist der kanamycinresistente Abkömmling des Elternstamms E7946-Sm. Das Gen, das die Kanamycinresistenz in SM115 kodiert, wurde im *ctx*-Ort insertiert. Weil Bah-1 und Bah-2 Abkömmlinge von P27459-Sm sind, misst die Konkurrenz mit SM115 Kolonisationsunterschiede, die eher der Wirkung der Typ-2-Deletion als dem Verlust von *ctx* zugeschrieben werden können. Die Stämme Bah-1 und Bah-2 waren sensitiv gegen Kanamycin und wurden von SM115 in diesen Kompetitionsassays unterschieden, indem Kolonien auf Resistenz gegen 30 µg/ml Kanamycin bewertet wurden.

[d] Der Stamm C6709-Sm ist der Elternstamm von Peru-1 und von Peru-2. Peru-2 trägt eine Typ-2-Deletion, während Peru-1 eine Kerndeletion trägt. Beide dieser Deletionen entfernen die *ctx*-Gene und folglich waren sowohl Peru-1 als auch Peru-2 in Koloniehybridisierungsblots negativ, wenn sie mit der CT-1-Sonde untersucht werden, beschrieben in Goldberg und Mekalanos (J. Bacteriol. 165:723-731, 1986), während Stamm C6709-Sm unter Verwendung derselben Sonde positiv war. Folglich wurden sowohl Peru-1 als auch Peru-2 von C6709-Sm in diesen Kompetitionsassays unterschieden, indem Kolonien auf Hybridisierung mit der CT-1-Sonde bewertet wurden.

[0042] Die beschriebenen Mutantenstämme können als Impfstoffkandidaten werter verbessert werden, indem weitere Mutationen innerhalb jedes Stamms erzeugt werden, die dazu dienen, die Sicherheit und die Immunogenität des Impfstoffs zu erhöhen.

[0043] Hinsichtlich der Sicherheit kann eine zweite Mutation in das recA-Gen eines der vorstehend beschriebenen Stämme eingebracht werden, wobei die Mutation dafür bestimmt ist, dieses recA-Gen zu inaktivieren. Derartige Doppelmutantenstämme weisen deshalb bei der Rekombination einen Defekt auf und sind nicht imstande, mit Wildtypstämmen von V. cholerae in der Umgebung zu rekombinieren. Folglich sind sie nicht in der Lage, Wildtyp-Toxin-Gene zu erwerben und das CTX-Element zu exprimieren. Die Immunogenität kann auch verbessert werden, indem wertere Mutationen in jeden Stamm eingeführt werden, welche diesem Stamm erlauben, Choleratoxin-verwandte Antigene (z. B. die B-Untereinheit des Choleratoxins) oder andere heterologe Antigene, z. B. die nichttoxische B-Untereinheit des Shiga-ähnlichen Toxins oder verschiedene CFA-Antigene enterotoxigener E. coli-Stämme, Shiga-Toxin, Anthraxtoxin, Pseudomonaden-Endotoxin A, Pertussistoxin, Tetanustoxin; Antigene vom Herpesvirus, Rubellavirus, Influenzavirus, Mumpsvirus, Masemvirus, Poliomyelitisvirus, Antigenfragmente vom HIV-Kapsid; und immunogene Polypeptide von eukaryotischen Parasiten, die Malaria, Pneumocystis-carinii-Pneumonie und Toxoplasmose verursachen, zu exprimieren (Karjalainen et al., 1989, Infect. Immun. 57: 1126; Perez-Casal et al., 1990, Infect. Immun. 58: 3594). Folglich kann auch eine Reihe mutierter Abkömmlinge in der Erfindung nützlich sein, wobei jeder wertere Eigenschaften einbringt, die die Stämme sicherer, genetisch stabiler und weitreichender immunogen machen. Die Konstruktion von solchen Abkömmlingen wird nachstehend beschrieben.

[0044] Es ist bekannt, dass die Choleratoxin-B-Untereinheit ein nicht toxisches, hoch immunogenes Molekül ist, das in der Lage ist, Choleratoxin-neutralisierende Antikörper zu induzieren. Um immunogenere Impfstoffstämme zu erzeugen, wurde eine neue Kopie des ctxB-Gens in die Impfstoffstämme eingeführt, die die vorstehend beschriebenen Typ-2-Deletionen enthalten (weil Typ-2-Deletionen die gesamte kodierende Sequenz für die Choleratoxin-B-Untereinheit entfernen). Dieses wurde in einer Reihe von Schritten erreicht, die nachstehend beschrieben sind.

[0045] Zuerst wurde eine promotorlose Kopie des ctxB-Gens unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konstruiert. Für die PCR wurde der stromabwärtige Primer so entworfen, dass die ctxB-kodierende Sequenz auf solch eine Art und Weise synthetisiert werden konnte, dass die attRS1-Stelle beseitigt wird, die gerade stromabwärts vom Stopcodon im ctxB-Gen liegt. Dieser Primer hatte die folgende Sequenz:

5'-GGGCTAAAGTTAAAAGACAAATATTTTCAGGC-3' SEQ. ID. NR. 5].

[0046] Der stromaufwärtige Primer wurde so entworfen, dass nur die letzten 24 carboxyterminalen Aminosäurereste der A2-Untereinheit durch das Reaktionsprodukt kodiert werden konnten. Dieser Primer hatte die folgende Sequenz:

5'-GGGTAGAAGTGAAACGGGGTTTACCG-3' [SEQ. ID. NR. 6].

[0047] Alle anderen Nukleotide in der DNA, die die A-Untereinheit kodiert, wurden von der Reaktion ausgeschlossen. Die DNA, die die carboxyterminalen Aminosäuren von CtxA2 kodiert, wurden im Endprodukt behalten, um translationale Kopplung der ctxB-Genexpression zu berücksichtigen. Weil die toxische Aktivität, die mit dem Choleratoxin verbunden ist, vom CtxA1-Polypeptid abstammt, wurden alle Sequenzen, die das A1-Polypeptid kodieren, von der PCR-Reaktion ausgeschlossen.

[0048] Die PCR wurde mit den ctxB-Primeren wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von V. cholerae-DNA vom Peru-Stamm, C6709-Sm, durchgeführt (**Fig.** 5). Das Reaktionsprodukt, ein 0,6 Kilobasenpaar-Fragment, wurde in das Plasmid pCR100 kloniert. Dieses Fragment wurde dann aus dem Plasmid als 0,6 Kilobasenpaar-Spel-EcoRI-Fragment herausgeschnitten und wurde in zwei einzelne Akzeptorplasmide, XbaI-EcoRI-gespaltenes pRT41 und in XbaI-EcoRI-gespaltenes pVC100, kloniert. Die so erhaltenen Plasmide, pJM411 und pJM1001, kodieren dann jeweils eine Kopie des ctxB-Gens unter der jeweiligen Kontrolle entweder des ctx-Promotors (ctxP) oder des htpG-Promotors (hptP) von V. cholerae. Diese Plasmide wurden dann auf den nichttoxigenen Stamm V. cholerae 0395-NT (Mekalanos et al., 1983, Nature 306: 551 und US-Patent Nr. 4,935,364) transferiert, wobei zwei neue Stämme erzeugt wurden, die 0395-NT pJM411 und 0395-NT pJM1001 benannt wurden. Die Menge der Cholera-B-Untereinheit, die durch jeden Stamm produziert wurde, wurde durch GMI ELISA gemessen. Der Stamm 0395-NT pJM411 produzierte 30 µg/ml, während der Stamm 0395-NT pJM1001 100 µg/ml in LB-Kulturüberstandsflüssigkeiten produzierte. Diese Ergebnisse legen dar, dass das PCR-Produkt ein funktionelles ctxB-Gen war, das eine antigene Cholera-B-Untereinheit kodiert, die in der Lage ist, an Gangliosid-GMI zu binden, und war deshalb dem ähnlich, das durch normalen Wildtyp V. cholerae abgesondert wurde.

[0049] Im nächsten Schritt wurden die EcoRI-BamHI-DNA-Fragmente, die die Promotor-ctxB-Konstrukte spezifizieren, in das recA-Suizidplasmid pGP84 subkloniert. Dieses Plasmid enthält eine chromosomale V. cholerae-DNA-Insertion, die der DNA entspricht, welche das recA-Gen von V. cholerae flankiert (d. h. eine interne Deletion von recA). Das Plasmid pGP84 ist ein Abkömmling des Suizidplasmids pJM703.1 (Miller et al., 1988, J. Bacteriol. 170: 2575) und kodiert die Sequenzen, die den flankierenden Regionen des recA-Gens von V, cholerae entsprechen (Goldberg et al., 1986, J. Bacteriol. 165: 715), die ein BglII-PvuII-Fragment auf der linken Seite und ein XbaI-EcoRI-Fragment auf der rechten Seite einschließen. Ein 1,3-kB-Fragment, das Kanamycinresistenz kodiert, wird zwischen diese beiden Fragmente gebracht. Das Plasmid pGP84 enthält auch ein NruI-BamHI-Fragment, das Sensitivität gegen Streptomycin kodiert. Dieses letztere Fragment leitet sich vom Plasmid pNO1523 ab (Dean, 1981, Gene 15: 99). Wenn pGP84 mit Xbal gespalten wird, wird das 1,3-kB-Fragment entfernt, und andere XbaI-Fragmente können in diese deletierte recA-Region insertiert werden.

[0050] Das Subclonieren wurde wie folgt erreicht: Jedes der beiden EcoRI-BamHI-Fragmente, die die Promotor-ctxB-Konstrukte spezifizieren, wurde durch das Hinzufügen von XbaI-Verknüpfungen modifiziert. Sie wurden einzeln mit Xbal-gespaltetem pGP84 ligiert, um zwei neue Plasmide pJM84.1 und pJM84.2 zu erzeugen, von denen jedes DNA enthält, die die htpP-ctxB- bzw. ctxP-ctxB-Konstrukte spezifiziert (**Fig.** 6).

[0051] Als nächstes wurden die Plasmide pJM84.1 und pJM84.2 in die V. cholerae-Stämme Peru-2, Bang-2 und Bah-2 transferiert und Ampicillin-resistente Kolonien wurden selektiert. Weil diese Plasmide nicht in der Lage waren, sich in V. cholerae zu replizieren, integrieren sie in das Wirtszellchromosom durch homologe Rekombination, wobei die in **Fig.** 6 gezeigte Struktur erzeugt wird. Beide Plasmide kodieren auch ein Gen für die Streptomycinsensitivität, welche positive Selektion gegen ein Plasmidintegrationsereignis in Stämmen erlaubt,

die Streptomycin-resistent sind (d. h. die Stämme Peru-2, Bang-2 und Bah-2). Wenn folglich die Stämme, die ein Plasmid haben, das in die chromosomale DNA integriert ist, auf Medium wachsen, das 2 mg/ml Streptomycin enthält, können die Kolonien, die zur Ampicillinsensitivität umgekehrt sind, isoliert werden. Die Stämme, die jetzt das integrierte Plasmid auf eine solche Art und Weise ausgekreuzt haben, so dass die recA-Deletionsmutation zusammen mit dem ctxB-Konstrukt zurückbleibt, wurden dann unter diesen letzteren Stämmen ausgewählt. Diese Stämmen wurden leicht als diejenigen identifiziert, die die folgenden Eigenschaften haben:

1. Sie waren Ampicillin-empfindlich.
2. Sie wurden in Gegenwart von 0,1 ml Methylmethansulfonat pro ml LB, ein charakteristischer Phänotyp von recA$^-$-Zellen, getötet.
3. Sie produzierten die Cholera-B-Untereinheit, wie durch GMI-ELISA gemessen.
4. Southernblot-Analyse unter Verwendung von recA- und ctxB-Sonden bestätigte, dass sie DNA-Fragmente enthielten, die mit dem Vorhandensein des ctxB-Konstrukts und der Deletion der geeeigneten recA-Sequenzen im Einklang stehen.

[0052] Bakterienstämme, die nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren isoliert wurden, sind wie folgt:

STAMM	GENOTYP
Peru-3	attRS1-Deletion, recA::htpP-ctxB, str
Peru-4	attRS1-Deletion, recA::ctxP-ctxB, str
Bang-3	attRS1-Deletion, recA::htpP-ctxB, str
Bah-3	attRS1-Deletion, recA::htpP-ctxB, str
Bah-4	attRS1-Deletion, recA::ctxP-ctxB, str

Konstruktion der lacZ-ctxB-Allele

[0053] Die innerhalb der vorstehend beschriebenen Impfstoffstämme enthaltene recA-Mutation macht die Stämme in der homologen Rekombination defizient. Um Kandidatenimpfstoffe zu produzieren, die noch immer in der Lage sind, homolog zu rekombinieren, wurde das ctxB-Gen in das lacZ-Gen von V. cholerae insertiert, wie nachstehend beschrieben.

[0054] Das Plasmid pCG698, welches das lacZ-Gen von V. cholerae kodiert, enthält eine einzigartige HpaI-Stelle mitten in der lacZ-kodierenden Sequenz. Das Plasmid pCG698 wurde wie folgt konstruiert: Das ?-Galaktosidase-Gen von V. cholerae wurde aus einer Bibliothek von chromosomalen DNA-Fragmenten von Stamm E7946 kloniert, wie beschrieben (Mekalanos, 1983, Cell 35: 253). Es wurde festgestellt, dass es ?-Galaktosidase exprimiert, und Restriktionsenzymkartierung folgend, wurde festgestellt, dass es eine 6 kB-Insertion enthält, die 2 HpaI-Stellen im lacZ-Gen enthält, welche jeweils durch 2,1 kB DNA getrennt waren. Dieses Plasmid wurde mit HpaI linearisiert, und XbaI-Verknüpfungen wurden mit den Enden ligiert. Ein EcoRI-BamHI-Fragment, das das ctxP-ctxB-Konstrukt enthält, wurde aus pJM411 entfernt, wie vorstehend beschrieben, die Enden wurden durch Hinzufügen von XbaI-Verknüpfungen modifiziert, und das Fragment wurde in das ähnlich modifizierte pCG698 ligiert. Das so erhaltene Plasmid pJM6891 enthielt nun das ctxP-ctxB-Konstrukt, das in die Mitte des lacZ-Gens insertiert wurde. Dieses Plasmid wurde in die V.

[0055] cholerae-Stämme Peru-2, Bang-2 und Bah-2 transferiert, und jeder so erhaltene Stamm wurde auf Wachstum in Gegenwart von X-Gal abgesucht. Die weißen Kolonien, die ein inaktiviertes lacZ-Gen enthalten, wurden ausgewählt und gereinigt. Stämme, die eine in das Wirtszellchromosom integrierte Kopie der lacZ::ctxP-ctxB-Sequenzen enthielten, wurden durch Kurieren der Bakterien von pJM6891 durch Wachstum bei Fehlen von Ampicillin erhalten. Das Vorhandensein der geeigneten Sequenzen wurde durch Southernblot-Analyse bestätigt, und die Fähigkeit dieser Bakterien, die Choleratoxin-B-Untereinheit zu produzieren, wurde durch GMI-ELISA bestätigt. Die nach diesem Verfahren isolierten Bakterienstämme sind wie folgt:

STAMM	GENOTYP
Peru-5	attRS1-Deletion, lacZ::ctxP-ctxB, str
Bang-5	attRS1-Deletion, lacZ::ctxP-ctxB, str
Bah-5	attRS1-Deletion, lacZ::ctxP-ctxB, str

[0056] Um einige dieser Träger-Choleraimstoffkandidaten hinsichtlich der Mauskolonisation zu charakterisieren, wurden Mäuse mit den nachstehend aufgeführten Stämmen infiziert. Der Stamm TCP2, ein Abkömmling von 0395-N1, welcher eine TcpA-Deletion enthält und den Dann von menschlichen Freiwilligen nicht kolonisiert, diente als Kontrolle. Fünf Mäuse wurden für jeden Stamm verwendet. Bei 24 Stunden Postinfektion wurde der obere Darm jeder Maus entfernt, homogenisiert und unter Verwendung eines einfachen Ausplattierassays auf die Anzahl der vorhandenen V. cholerae geprüft. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle dargestellt. Im Wesentlichen wurden keine TCP2-Bakterien in den Därmen der mit TCP2 infizierten Mäuse nachgewiesen, und folglich stellen die nachstehend gegebenen Werte die Anzahl der Bakterien jedes Stamms dar,

der den Mäusedarm oberhalb eines Hintergrundspiegels von null kolonisierte.

Stamm	CFU pro Maus[a]	Genotyp/Konstrukt[b]		
Peru-3	$9{,}4 \times 10^5$	*attRS1*-Deletion	#2	*rec*A::*htp*G-*ctx*B
Peru-2	$2{,}5 \times 10^6$	*attRS1*-Deletion	#2	
Peru-4	$6{,}0 \times 10^6$	*attRS1*-Deletion	#2	*rec*A::*ctx*-*ctx*B
Peru-5	$6{,}6 \times 10^6$	*attRS1*-Deletion	#2	*lacZ*::*ctx*-*ctx*B
Bang-2	$9{,}9 \times 10^6$	*attRS1*-Deletion	#2	
Bang-3	$2{,}7 \times 10^7$	*attRS1*-Deletion	#2	*rec*A::*htp*G-*ctx*B

[a] koloniebildende Einheiten [colony forming units], wiedergewonnen pro Maus (Durchschnitt von fünf Mäusen)

[b] das Konstrukt *attRS1*-Deletion #2 ist eine Typ-2-Deletion, die mit dem Plasmid pAR62 konstruiert wurde, beschrieben in Figur 3.

[0057] Das Konstrukt recA::htpG-ctxB ist eine Deletion des recA-Gens und Insertion des Gens der Choleratoxin-B-Untereinheit unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors, der vom htpG von V. cholerae abstammt.
[0058] Das Konstrukt recA::htpG-ctxB ist eine Deletion des recA-Gens und Insertion des Gens der Choleratoxin-B-Untereinheit unter der Kontrolle des Choleratoxinpromotors, der vom ctx-Gen des hypertoxigenen Stamms 569B von V. cholerae abstammt.
[0059] Das Konstrukt lacZ::ctx-ctxB ist eine Insertion im lacZ-Gen von V. cholerae, das aus dem Gen der Choleratoxin-B-Untereinheit unter der Kontrolle des Choleratoxinpromotors besteht, der vom ctx-Gen des hypertoxigenen Stamms 569B von V. cholerae abstammt.
[0060] Die Ergebnisse legen nahe, dass das Vorhandensein des recA::htpP-ctxB-Allels dazu dient, die Fähigkeit der Peru-abgeleiteten Stämme, den Darm zu kolonisieren (vergleiche zum Beispiel Peru-3 mit Peru-2), zu verringern. Jedoch war die Wirkung dieses Konstrukts auf die Kolonalisation des Bang-abgeleiteten Stamms weniger ausgeprägt (vergleiche Bang-3 mit Bang-2). Allgemein hatte die Einbringung der Konstrukte, worin ctxB unter der Kontrolle seines eigenen Promotors stand, weniger Wirkung auf die Kolonalisation, als die Konstrukte, worin es unter die Kontrolle des Hitzeschockpromotors gestellt wurde. Es sollte festgestellt werden, dass die Stämme Peru-2, Peru-3 und Bang-3 in ihren Kolonalisationseigenschaften über einen 28-fachen Bereich variieren. Es liegt gut innerhalb des Fachgebiets, den vorstehend beschriebenen Protokollen zu folgen, um wertere Impfstoffkandidaten zu isolieren, die sogar noch weiter in ihren Kolonalisationseigenschaften variieren.
[0061] In der Zusammenfassung zeigen die Daten die Ausführbarkeit des Verwendens von Gentechnikverfahren, um neue ctx-enthaltende V. cholerae-Stämme zu erzeugen, wobei die Expression des ctxB-Gens unter die Kontrolle von einem von zwei V. cholerae-Promotoren gestellt ist (ctxP und htpP). Die veränderten Gene können in das V. cholerae-Chromosom in die Zielgene, wie recA oder lacZ rekombiniert werden, um Stämme zu erzeugen, welche große Mengen der Choleratoxin-B-Untereinheit stabil exprimieren (zum Beispiel die Stämme Peru-3, Peru-4 und Peru-5).

Isolisierung von spontanen weichagarpenetrationsdefekten Stämmen von V. cholerae

[0062] Mutanten von V. cholerae, welche weichagarpenetrationsdefekt sind, können bei der Produktion von Impfstoffen nützlich sein. Das rationale für das Verwenden dieser Mutanten ist wie folgt. Man stellt sich vor, dass die Schleimschicht des Darms viskos ist und die Mutanten, die weichagarpenetrationsdefekt sind, einen Defekt bei der Penetration dieses Schleims aufweisen könnten. Obwohl diese Mutanten einen Defekt bei der Penetration durch den Schleim aufweisen, können diese Mutanten den Peyer-Plaques noch immer ein Antigen präsentieren, welche nicht durch ein Schleimgel bedeckt sind und welche Antigenabtastende Zellen einschließen, die für die IgA-Antikörperproduktion spezifisch sind. Im Ergebnis wird vorausgesagt, dass penetrationsdefekte Mutanten geringe Reaktogenizität haben, aber hoch antigen sind, und diese Eigenschaften sind für einen Lebendimpfstoff wünschenswert. Obwohl nicht-freibewegliche Mutanten eine Kategorie von Mutanten sind, die weichagarpenetrationsdefekt sind, können andere Typen von Mutationen im Ergebnis auch einen weichagarpenetrationsdefekten Phänotyp haben (d. h. ein Strömphänotyp) und können für Impfstoffe nützlich sein. In Übereinstimmung mit dieser Denkmethode, können vollständig nicht-freibewegliche Mutanten, d. h. Mutanten, die nicht imstande sind, in agarfreiem Medium zu strömen, nützliche Kandidatenimpfstoffe sein.
[0063] Um derartige Mutanten zu erhalten, kann Weichagar verwendet werden, um die Fähigkeit von Bakte-

rien zu beurteilen, in ein Medium hoher Viskosität einzudringen (Weichagarmedium, welches 0,25–0,4% Agar ist), wie nachstehend beschrieben. Ein derartiger weichagarpenetrationsdefekter Impfstoff mit einem hohen therapeutischen Wert ist Peru-14.

[0064] Peru-14 ist weichagarpenetrationsdefekt, und zusätzlich sind über 50% der Peru-14-Zellen filamentös, wobei sie ein spiral-ähnliches Aussehen und eine Zelllänge von größer als 5 normale Zellenlängen haben (25 nm, im Vergleich zur Wildtypzelllänge von 5 nm).

[0065] Peru-14 wurde als weichagarpenetrationsdefekter Abkömmling des dreifach-deletierten Peru-Stamms (Peru-3) (ctxA$^-$, att$^-$ und recA$^-$) isoliert, der frei von Nebenwirkungen war, aber noch immer die Fähigkeit behielt, Impfstoffe zu kolonisieren, wie nachstehend gezeigt (Tabelle 7).

[0066] Obwohl Peru-14 isoliert wurde, beruhend auf der vorstehend aufgeführten Theorie, kann diese Theorie der Funktion oder kann nicht, die Wirksamkeit von Peru-14 als Impfstoff genau und vollständig erklären. Die Verwendungsfähigkeit von Peru-14 als wirksamer Impfstoff hängt nicht von der Korrektheit dieser Theorie ab.

Tabelle 7
Ergebnis der Immunisierung mit frisch geerntetem Peru-14-Choleraimpfstoff

Dauer der Dosis (cfu) Tage	Freiwilliger #	Symptome	Stuhlgang	Exkretion (Tage)/Peak
2 x 10^6	28	Blähungen	erzeugt	3/3
	29	Krämpfe	erzeugt	14/2
	30	keine	erzeugt	—
	33	keine	erzeugt	4/4
	34	keine	336g*	4/1
	35	keine	erzeugt	3/3
9 x 10^8	25	keine	erzeugt	25/1
	26	Blähungen	erzeugt	3/1
	27	Kopfschmerzen	erzeugt	2/2
	31	Übelkeit, Appetitlosigkeit	erzeugt	7/4
	32	keine	erzeugt	5/3
	36	Krämpfe	63g+	33/1

* Freiwilliger hatte schmerzfreien halbfesten Stuhl bei 72 Stunden nach Immunisierung. Stuhl war für Peru-14 kultur-negativ.

\+ Freiwilliger hatte zwei kleine flüssige Stuhle bei 48 Stunden nach Immunisierung. Stuhle waren für Peru-14 kultur-negativ.

[0067] Spezifisch wurde der weichagarpenetrationsdefekte Stamm Peru-14 wie folgt produziert. Peru-3 wurde über Nacht bei 30°C in LB-Brühe, die 100 µg Streptomycinsulfat enthielt, wachsen gelassen. Die Kultur wurde auf ungefähr 2000 cfu/ml verdünnt, und 0,1 ml wurde auf LB-Platten, die 100 µg Streptomycin enthielten, plattiert. Nach dem Inkubieren der Platten über Nacht bei 30°C wurden ungefähr 1000 Kolonien mit dem Zahnstocher in Weichagarplatten gesammelt (LB-Brühe + 0,45% Bacto-Agar) und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die mit dem Zahnstocher gesammelte Impfkultur wurde nur 1–2 mm in die Oberfläche der Weichagarplatte insertiert. Von den 1000 ausgewählten Kolonien schienen 25 nichtpenetrierend zu sein. Die nichtpenetrierenden Isolate erscheinen als Kolonien mit einem Durchmesser von ungefähr 2 mm, während die penetrierenden Isolate auf und innerhalb des Agars mit einem Durchmesser von größer als 5 mm strömen. Diese Kolonien wurden zusammen mit einem bekannten nichtpenetrierenden, nicht-freibeweglichen Cholera-Stamm und dem ursprünglichen Peru-3-Stamm erneut in Weichagar noch einmal gesammelt. Eine der 25 Kolonien war nicht-weichagarpenetrierend (wenn sie mit den Kontrollen verglichen wurde). Diese Kolonie, als Peru-14 bezeichnet, war mit Agglutinationsseren noch immer Inaba-positiv und produzierte dieselbe Menge des B-Untereinheit-Toxins wie Peru-3, wenn im B-Untereinheit-ELISA getestet. Die vorstehend beschriebenen Verfahren können zum Isolieren von weichagarpenetrationsdefekten Mutanten eines V. cholerae-Stamms verwendet werden. Nichtumkehrbare penetrationsdefekte Mutanten, wie solche, die eine genetische Deletion beherbergen, können unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Bengal-Stämme

[0068] Es ist vor kurzem entdeckt worden, dass ein hoch ungewöhnlicher virulenter Nicht-01-Stamm für eine Cholera-Epidemie auf dem indischen Subkontinent verantwortlich war. Überlebende von früheren 01-Serogruppe-Epidemien sind immunologisch nicht gegen diesen Stamm geschützt.
[0069] Dieser Stamm ist in der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD hinterliegt worden. Bengal kann, wie vorstehend beschrieben, für die anderen Stämme, z. B. durch eine oder mehrere der folgenden Mutationen abgeschwächt werden: ctx^-, att^- oder $recA^-$ oder ein weichagardefekter Phänotyp, Bengal-2 („Beng-2") und Bengal-3 („Beng-3"), sind genetisch äquivalent zu Peru-2 und Peru-3. Solch ein abgeschwächter Bengal-Stamm kann mit einer der oben beschriebenen abgeschwächten Peru-Stämme kombiniert werden, um einen Doppel- oder Multicholerastamm-Impfstoff bereitzustellen.

Testen von Peru-3 und Peru-5 am Menschen

[0070] Untersuchungen der Wirksamkeit von Peru-3 und Peru-5 am Menschen wurden wie folgt durchgeführt.
[0071] Blutproben wurden von Freiwilligen vor der Immunisierung und bei 7, 14, 21 und 28 Tagen nach Immunisierung gezogen. Die V. cholerae-Antikörper in ihrem Blutstrom wurden gemessen, und die Mengen sind in Tabelle 4 gezeigt. Die Immunogenität der Impfstoffprototypen Peru-3 und Peru-5 wurden bei Untersuchungen mit menschlichen Freiwilligen bewertet. Freiwillige nahmen frisch geerntetes Peru-3 oder Peru-5 bei 3 verschiedenen Dosen in 100 ml 10% Natriumbicarbonat ein. Es wurde auch gezeigt, dass Peru-3 und Peru-5 Antitoxinantikörper induzieren (Tabelle 5). Außerdem wurde gezeigt, dass Peru-3 und Peru-5 Freiwillige vor der Herausforderung mit dem Wildtyp-E1-Tor-V. cholerae (Stamm N16961, Tabelle 6) schützen. Wir stellen fest, dass insbesondere Peru-3 eine starke Immunantwort hervorruft (Tabellen 4 und 5) und in Untersuchungen mit Menschen Schutz vor Cholera bietet (Tabelle 6).

Tabelle 4 Cholera-Titer nach Immunisierung mit Peru-3 oder Peru-5 (Juli 1992)

Stamm (cfu)	Freiwilliger	vorher	7	14	21	28	Peak
Peru-3 ($4x10^6$)	1	50	1600	6400	6400	6400	6400
	2	<100	50	100	50	100	100
	5	<100	1600	6400	400	400	6400
Peru-3 ($1x10^8$)	7	<100	400	1600	400	400	1600
	12	<100	400	800	400	200	800
	13	<100	3200	6400	3200	1600	6400
Peru-5 ($2x10^6$)	11	<100	1600	6400	3200	6400	6400
	14	<100	200	6400	3200	1600	6400
	15	<100	800	6400	1600	3200	6400

[0072] Wärme-aktivierte Serumproben wurden fortlaufend in Mikrotitervertiefungen verdünnt, mit V. cholerae in der logarithmischen Wachstumsphase (Endkonzentration von 5×10^7) und Meerschweinchen-Komplement (Endkonzentration von 11%) gemischt und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert.
[0073] Brain-Heart-Infusionsbrühe wurde dann zu den Platten zugegeben und 2,75 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Werte in der Tabelle stellen die reziproken Titer dar, bei welchen Antikörper-vermittelte Tötung von V. cholerae 50% oder mehr betrug.

Tabelle 5
Cholera-Antitoxintiter nach Immunisierung mit Peru-3 oder Peru-5 (Juli 1992)

Stamm (cfu)	Freiwilliger	0,2	7	14	21	28	Peak-Zunahme (fach)
Peru-3 ($4x10^6$)	1	8	8	32	32	32	4
	2	<2	<2	<2	<2	<2	keine
	5	2	64	64	2	256	14
Peru-3 ($4x10^8$)	7	2	2	4	4	4	2
	12	<2	2	4	4	4	4
	13	<2	<2	<2	<2	<2	keine
Peru-5 ($2x10^6$)	11	4	4	4	4	4	keine
	14	2	2	2	2	2	keine
	15	8	8	8	8	8	keine

[0074] Serumproben wurden fortlaufend in vorbehandelte, Gangliosid/Choleratoxin-B-Untereinheit beschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verdünnt, und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an 3× Waschen mit PBS wurde Ziege-anti-Mensch-Antikörperalkalische Phosphatase-Konjugat (1/1000) zugegeben und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an 3× Waschen mit PBS wurden 2 mg/ml PNPP zu jeder Vertiefung zugegeben und 15 Minuten lang inkubiert. Die Umsetzung wurde mit 0,1 M K_2PO_4 gestoppt und die O.D. bei 405 nm abgelesen. Die Werte in der Tabelle stellen die reziproken Titer und die Zunahme von Tag 2, verglichen mit dem Peak-Titer, dar.

Tabelle 6
Ergebnis für Freiwillige, die mit 2 × 10^6 cfu Vibrio cholerae- (N16961) Wildtyporganismen herausgefordert wurden (November 1992)

Nummer der Versuchsperson	vorhergehende Impfung	anfängliche Dosis	Symptome	Diarrhöe (Gramm)	Beginn der Symptome
1	Peru-3	6 log.	keine	erzeugt	
2	Peru-3*	6 log.	müde, Gluckern	534	18-48 Stunden
5	Peru-3	6 log.	keine	3	
7	Peru-3	8 log.	keine	23	36 Stunden
11	Peru-5	6 log.	keine	erzeugt	
12	Peru-3	8 log.	keine	erzeugt	
14	Peru-5	6 log.	keine	erzeugt	
15	Peru-5	6 log.	keine	erzeugt	

22	Kontrolle	Temp.: 100,7°F, Kopfschmerzen, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Gluckern, Krämpfe	1443	24 Stunden
23	Kontrolle	keine	769	24 Stunden
24	Kontrolle	Temp.: 99,6°F, Kopfschmerzen, Unbehagen, Gluckern, Krämpfe	904+	40 Stunden

* kolonisierte nicht oder serokonvertierte anschließend nach der Impfung

\+ zwei flüssige Stuhle wegen Dringlichkeit nicht gewogen

Konstruktion von V. cholerae-Impfstoffen, die heterologe Antigene exprimieren

[0075] Die vorstehend beschriebenen Verfahren können von jedem Fachmann zur Konstruktion von Abkömmlingen von Peru-2, Bang-2, Bah-2, Peru-14 und verwandten Stämmen, welche in der Lage sind, eine breite Vielzahl von fremden oder heterologen Antigenen, z. B. Antigene, die normalerweise nicht in V. cholerae exprimiert werden, zu exprimieren, angewendet werden. Es würde erwartet werden, dass derartige Abkömmlinge, wenn sie als Lebendimpfstoffe verwendet werden, eine starke Immunantwort gegen sowohl V. cholerae-Antigene als auch das fremde Antigen, das er kodiert, zu induzieren. Sowohl systemische als auch lokale Immunantworten werden wahrscheinlich induziert, weil die Schutzimpfung mit anderen Prototyp-V. cholerae-Impfstoffen die Induktion von zirkulierenden IgG- und lokalen IgA-Antikörpern zur Folge hat, die sowohl für Ganzzellantigene (z. B: LPS) als auch ebenso für einzelne Proteine, wie der Choleratoxin-B-Untereinheit, spezifisch sind (Herrington et al., 1988, J. Exp. Med. 168: 1487–1492). Es würde erwartet werden, dass ein fremdes Antigen, das durch V. cholerae exprimiert wurde, eine Immunantwort hervorruft, die ähnlich der der einzelnen Choleraproteine ist.

[0076] Die Verfahren, die für die Einbringung von heterologen Antigenen in V. cholerae nützlich sind, sind solchen ähnlich, die für die Wiedereinbringung des ctxB-Gens in die Impfstoffstämme Peru-3, Peru-4, Peru-14, Peru-5, Bang-3, Bah-3 und Bah-4 vorstehend beschrieben sind. Praktisch jedes heterologe Antigen kann unter Verwendung dieser Verfahren in V. cholerae insertiert werden.

[0077] Dasselbe Protokoll, das verwendet wird, um ctxB-enthaltende Stämme unter einem neuen Promotor zu konstruieren, kann verwendet werden, um Abkömmlinge von Peru-2, Bang-2 und Bah-2 zu konstruieren, welche in der Lage sind, praktisch jedes heterologe Antigen oder Antigene zu exprimieren, die normalerweise entweder durch Bakterium, Viren oder Parasiten kodiert werden. Die in der Erfindung beschriebenen Verfahren lehren deshalb die Erzeugung eines mehrwertigen V. cholerae-Impfstoff„trägerstamms", welcher manipuliert werden kann, um andere Antigene zu kodieren und zu exprimieren und Menschen verabreicht werden kann, um sie nicht nur gegen Cholera, sondern auch andere Krankheitserreger zu immunisieren.

V. cholerae/enterotoxigene E. coli-Impfstoffe

[0078] Es ist dargelegt worden, dass Vibrio cholerae-Impfstoffe, welche Antikörper gegen das Choleratoxin (CT) hervorrufen, geimpften Menschen Kreuzschutz gegen Stämme von hitzelabilem Toxin-produzierenden enterotoxigenen E. coli (ETEC) (Svennerholm, J. Infect Dis., 149: 884–893, 1984) verleiht. Die geimpften Individuen waren jedoch noch immer für hitzestabiles Toxin(ST)-produzierende Stämme von ETEC anfällig. Ein abgeschwächter Stamm von Vibrio cholerae, Peru-3, kann als Impfstoffvektor verwendet werden, der von ETEC-abstammende fremde Gene beherbergt, welche. die Hauptuntereinheit der Kolonisationsfaktor-Antigen CFA/IV-Fibrien und ein genetisches Toxoid von ST kodieren. Ein derartiger Impfstoffvektor ruft hervor i) anti-fimbriale Antikörper, die die Bindung von pathogenen ETEC-Stämmen an das menschliche Darmepithelgewebe verhindern, und ii) anti-ST-Antikörper, die die Diarrhöe-Wirkungen von ST unwirksam machen. Das Ergebnis ist ein oral verabreichter abgeschwächter Einzeldosis-V. cholerae-Vektor-ETEC-Lebendimpfstoffs.

[0079] Der abgeschwächte V. cholerae-Vektor-ETEC-Impfstoff kann einen oder mehrere der folgenden Vorteile haben: i) er kann für Langzeitlagerung lyophilisiert werden, ii) er erfordert keine Kühlkette, iii) er wird oral verabreicht, iv) er erfordert nur eine Einzeldosis, v) er ist kosteneffektiv, und vi) er schützt gegen die meisten ETEC-Stämme.

[0080] Ein oraler Einzeldosis-Lebendimpfstoff, der sich gegen die Darmpathogene, V. cholerae und enterotoxigene E. coli (ETEC) richtet, wird durch gentechnische Veränderung von Sequenzen, die Antigene von E. coli kodieren, in die V. cholerae-Impfstoffstämme hergestellt. Bei der Konstruktion derartiger Impfstoffstämme, ist es wünschenswert, sowohl die Kolonisation als auch die Toxinproduktion zu neutralisieren. Dieses kann erreicht werden, indem ein abgeschwächter Stamm von V. cholerae, Peru-3, wie vorstehend beschrieben, modifiziert wird.

[0081] Der Peru-3-Stamm exprimiert bereits die Choleratoxin-B-Untereinheit, welche mit der hitzelabilen ETEC-Toxin-B-Untereinheit fast identisch ist, und ruft Kreuzschutzantikörper hervor. Der Stamm kann modifiziert sein, um fimbriale Antigene von ETEC und ein chimäres Protein, das aus der Oligomerisierungsdomäne der Choleratoxin-A-Untereinheit und einer Mutantenform des hitzestabilen ETEC-Toxins besteht, zu exprimieren. Auf diese Art und Weise kann die Induktion der Immunität sowohl gegen V. cholerae als auch E. coli erreicht werden.

[0082] Die Erzeugung des V. cholerae/ETEC-Impfstoffstamms wird durch Verwendung von in der Mikrobiologie und molekularen Biologie herkömmlichen Verfahren erreicht. Die Fähigkeit des Stamms, Tiere zu kolonisieren und eine Immunantwort zu induzieren, kann in einem etablierten Modell der Darminfektion von Kaninchen analysiert werden.

Klonieren und Expression von fimbrialen Antigenen

[0083] Die Fähigkeit von ETEC, das Darmepithel von Menschen zu kolonisieren, wird durch serologisch verschiedene Fimbriae vermittelt, die als Kolonisationsfaktorantigene (CFAs) und mutmaßliche Kolonisationsfaktoren (PCFs) bekannt sind. Die CFA/4-Fimbriae sind der Hauptkolonisationsfaktor, der in ungefähr einem Viertel bis einem Drittel aller klinischen ETEC-Isolate identifiziert wurde. Das Gen, welches die Hauptuntereinheit eines Prototypmitgliedes der Gruppe (CS6) kodiert, ist von anderen kloniert und sequenziert worden.

[0084] Das klonierte CS6-Gen, das auf einem Plasmid mit hoher Kopienanzahl getragen wurde, wurde über Elektrotransformation in Peru-3 eingebracht und durch Kultur in Luria-Bertani-Brühe, die 50 µg/ml Ampicillin enthielt, erhalten. Vollständige Zelllysate von Peru-3, das die CS6-Sequenzen enthielt, wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting unter Verwendung von polyklonalem anti-CS6-Kaninchenserum auf Proteinantigenexpression analysiert. Die Immunoblots wurden unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat und BCIP entwickelt. Die Expression des CS6-Gens wurde als Produktion eines 17-kDa-Proteins nachgewiesen. Folglich kann das CS6-Antigen in Peru-3 für die Formulierung eines Impfstoffs exprimiert werden.

[0085] Um den Kandidatenimpfstoffstamm zu erzeugen, ist es jedoch wünschenswert, das CS6-Gen in Abwesenheit von antibiotischer Selektion erhalten zu haben und es von einem Promotor exprimiert zu haben, der durch V. cholerae aktiv transkribiert wird. Zu diesem Zweck kann die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet werden, um das CS6-Gen spezifisch zu amplifizieren, das auf einem Plasmid getragen wird, und um einzigartige Restriktionsendonuclease-Stellen an seinen Termini für das nachfolgende Klonieren in einen Ampicillin-resistenten, Streptomycin-sensitiven „Suizid"-Vektor zu erzeugen, welcher die Integration in das Chromosom von V. cholerae erlaubt. Spezifisch kann PCR-erzeugte CS6-DNA, die mit einer 5'-PacI-Stelle und einer 3'-NotI-Stelle flankiert war, mit pJM6891-DNA ligiert werden, welche mit PacI und NotI gespaltet worden ist, wobei das CS6-Gen unter die Kontrolle des Choleratoxinpromotors gestellt wird. Das Ligierungsgemisch kann durch Elektrotransformation in den E. coli-Stamm SM10pir eingebracht werden, welcher ein spezifisches trans-Aktivator-Protein, bekannt als pi, bereitstellt, das von pJM6891 für die Replikation erforderlich ist. Wenn jedoch pJM6891 und seine Abkömmlinge in V. cholerae (welchem das pi-Protein fehlt) eingebracht werden, erfordert die Selektion für die Resistenz gegen 50 µg/ml Ampicillin, dass das Plasmid in das Chromosom integriert. Die Stelle der Integration wird durch die Gegenwart der V. cholerae-lacZ-DNA-Sequenzen, die CS6 flankieren, welche mit den Sequenzen im V. cholerae-Chromosom identisch sind und homologe Rekombination auftreten lassen. Die so erhaltenen Nachkommen sind Ampicillinresistent und beherbergen eine integrierte Kopie des Plasmids und CS6-Sequenzen, die durch wiederholte DNA-Sequenzen des lacZ-Gens umgeben sind.

[0086] Die Wiederholungen können aufgelöst werden, um die Vektorsequenzen zu entfernen (einschließlich der Ampicillinresistenzdeterminanten), wobei das CS6-Gen unter der Kontrolle des Toxinpromotors gelassen wird. Dieses wird durchgeführt, indem der Stamm in Gegenwart von 2 mg/ml Streptomycin gezüchtet wird und nach dem Streptomycinresistenz-Allel, das Peru-3 ursprünglich ist, und gegen das Streptomycinsensitivitätsallel ausgewählt wird, das durch das Plasmid eingebracht wird. Nach Wachstum über Nacht in Gegenwart von Streptomycin wird die Kultur für Einzelkolonien auf LB-Agar ausplattiert, der 100 µg/ml Streptomycin enthielt, und auf Sensitivität auf 50 µg/ml Ampicillin bewertet. Isolate, die Streptomycin-resistent und Ampicillin-resistent

sind, werden durch Southernblots der chromosomalen DNA analysiert, um zu bestimmen, ob die erwarteten Integrations- und Exzisionsereignisse aufgetreten sind.

[0087] Diese Isolate können auf die Antigenproduktionsmenge unter Verwendung von Immunoblotting-Verfahren analysiert werden. Die Produktion des fimbrialen CS6-Antigens kann unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bewertet werden, von denen bekannt ist, dass sie die Transkription des Choleratoxinpromotors beeinflussen. Der Wirkung des pH-Werts des Mediums (6,5 gegenüber 8,0), der Temperatur (30°C gegenüber 37°C), der NaCl-Konzentration (50 bis 500 mM) und der Aminosäurekonzentration (0 bis 25 mM) auf die Menge der CS6-Expression kann bestimmt werden.

[0088] Der Kandidatenimpfstoffstamm Peru-3/CS6 kann dann in einem Kaninchenmodell verwendet werden, um Sicherheit und Immunogenität zu zeigen. Weil die menschlichen klinischen Isolate von ETEC, die CFA-Antigene produzieren, gegenüber Labortieren typischerweise nicht pathogen sind, kann ein anderer Peru-3-Abkömmling, der das fimbriale AF/R1-Antigen des E. coli-Stamms RDEC-1 exprimiert, konstruiert werden, um Sicherheit und Immunogenität darzulegen. Dieses Antigen vermittelt das Haften an das Darmepithel, wobei eine Diarrhöe-Erkrankung bei Kaninchen verursacht wird. Das Gen, das AF/R1 kodiert, das auf dem Plasmid pW1 getragen wird, kann durch PCR amplifiziert werden, in pJM6891 kloniert werden und auf dieselbe Art und Weise wie für CS6 in das Chromosom integriert werden. Die Menge der AF/R1-Expression kann durch Immunoblotting bewertet werden. Während dieses keine Impfstoffkandidaten für Menschen produziert, kann es als Modell zum Darlegen der Expression des heterologen Antigens durch modifizierte Peru-3-Stämme und der Induktion des Schutzes vor der Herausforderung durch einen heterologen Organismus dienen.

[0089] Das klonierte AF/R1-Gen, das auf einem Plasmid mit hoher Kopienanzahl getragen wurde, wurde auch über Elektrotransformation in Peru-3 eingebracht und durch Kultur in Luria-Bertani-Brühe, die 50 µg/ml Ampicillin enthielt, erhalten. Vollständige Zelllysate von Peru-3, die die AF/R1-Sequenzen enthielten, wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting unter Verwendung von polyklonalem anti-AF/R1-Kaninchenserum auf Proteinantigenexpression analysiert. Die Immunoblots wurden unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat und BCIP entwickelt. Die Expression des AF/R1-Gens wurde als Produktion eines ungefähr 18-kDa-Proteins nachgewiesen. Folglich kann das AF/R1-Antigen in Peru-3 für die Formulierung eines Impfstoffs exprimiert werden.

[0090] Unter Verwendung ähnlicher Strategien kann ein Impfstoffstamm, der schützende Antigene von Shigella, wie Lipopolysaccharid (LPS) und Plasmid-abgeleitetes invasives Protein exprimiert, hergestellt werden, um sich gegen infektiöse Diarrhöe zu schützen, die durch infektiöse Spezies von Shigella, wie S. sonnei verursacht wird.

[0091] In S. sonnei gibt es nur einen Serotyp von LPS und er ist die Primärantigendeterminante beim Schutz gegen diese Bakterien. Die Einbringung eines Plasmidklons, der das LPS-Operon kodiert, in E. coli hat Expression von LPS zur Folge und ist ausreichend, um E. coli die Fähigkeit zu verleihen, durch anti-S. sonnei-LPS-Antikörper agglutiniert zu werden. Dasselbe Plasmid, das in den Peru-3-Deletionsmutantenstamm eingebracht wird, macht ihn agglutinierbar. Weitere Analyse des Operons zeigte an, dass ein 12 Kilobasen-EcoR1/BamH1-Fragment dieses Plasmids, in pBR322 subkloniert, immer noch den Agglutinationsphänotyp verleiht. Dieses Fragment kann dann in das Chromosom am lacZ-Gen von V. cholerae eingebracht werden, wie vorstehend beschrieben.

Konstruktion und Sicherheit von ST-CTA2-Fusionen.

[0092] ETEC verursacht Diarrhöe durch Kolonisation und Produktion von zwei verschiedenen Toxinen. Das hitzelabile Toxin (LT) ist in Sequenz, Struktur und biologischer Wirkung mit dem Choleratoxin (CT) fast identisch. Deshalb ist die Produktion von CT durch Peru-3-Abkömmlinge ausreichend, um Antikörper zu induzieren, die in der Lage sind, beide Toxine zu neutralisieren. Jedoch kann die Immunisierung mit CT keinen Schutz vor dem hitzestabilen-ETEC-Toxin (ST) verleihen, welches ein sehr kleines Polypeptid (19 Aminosäuren) ist, das durch viele klinische Isolate produziert wird, von denen einige kein LT produzieren. Folglich ist ein kritisches Element beim Kandidaten-Cholera/ETEC-Impfstoff das Einbringen von ST-Sequenzen in Peru-3, um Antikörper zu diesem Toxin zu induzieren.

[0093] Mehrere gut definierte Abkömmlinge von ST sind erzeugt worden, die ohne Toxinaktivität (SToxoide) sind. Diese Abkömmlinge sind typischerweise Fragmente des Toxins oder der Substitutionsmutationen in Cysteinresten, die die drei Disulfidbindungen des Proteins erzeugen. Ein SToxoid, das aus dem gesamten reifen Polypeptid mit Cystein-gegen-Alanin-Mutationen in den Resten 5 und 10 besteht, kann konstruiert werden, um toxische Aktivität zu minimieren oder zu beseitigen. Das Gen, das dieses SToxoid kodiert, kann vollständig aus komplementären Oligonukleotiden bestehen, die mit einem DNA-Synthesizer produziert werden. Das synthetische Gen kann durch einzigartige Restriktionsendonucleasestellen für das nachfolgende Subklonieren in Plasmidvektoren flankiert werden.

[0094] Die Größe von ST (19 Aminosäuren) macht es zu einem dem Wesen nach schlechten Immunogen. Wenn intakte ST oder sogar kleine Peptidfragmente chemisch oder genetisch an andere größere Proteine (ei-

nem Träger) gekuppelt werden, wird ST ein viel besseres Immunogen und kann neutralisierende Antikörper induzieren. Der hauptsächlich verwendete Träger war die B-Untereinheit von LT oder CT. Weil fremde Proteine, die mit der Choleratoxin-A2-Untereinheit fusioniert sind (die Domäne der enzymatischen Untereinheit, welche dem A-Fragment erlaubt, mit dem B-Untereinheit-Pentamer zu oligomerisieren), an das Pentamer binden und holotoxinähnliche Komplexe erzeugen können, werden/sind diese chimären Komplexe i) durch V. cholerae abgesondert, ii) in der Lage, den Gangliosidrezeptor zu binden, und iii) immunreaktiv.

[0095] Das synthetische Gen, das SToxoid kodiert, kann Im-Rahmen mit dem 5'-Ende des Gens fusioniert werden, das CT A2 kodiert, wobei ein SToxoid-A2-Chimär hergestellt wird. Das Genfusionskonstrukt kann in das Peru-3-Chromosom integriert werden, wie vorstehend beschrieben. Wenn dieses Protein mit der CT-B-Untereinheit co-exprimiert wird, kann es holotoxin-ähnliche Komplexe erzeugen, die sowohl ohne biologische ST als auch CT-Aktivität sind und in der Lage sind, die Gangliosidrezeptoren zu binden. Stämme, die das chimäre SToxoid-A2-Protein exprimieren, können unter Verwendung von anti-ST-Antiserum durch Immunoblots analysiert werden, wenn die Substitutionsmutationen ein Antigen-verwandtes Protein zur Folge haben. Die SToxoide können auch auf Toxizität im Säuglingsmaus-Assay verglichen werden.

[0096] Der Säuglingsmaus-Assay wird wie folgt durchgeführt. 2–3 Tage alten Mäusen werden intragastral Proteinextrakte injiziert, die sich von diesen Impfstoffstämmen (oder gereinigtem ST als Kontrolle) ableiten, 3–4 Stunden nach Injektion getötet und auf erhöhtes Darm-zu-Körpergewicht-Verhältnis untersucht. Kandidaten-SToxoid-A2-Chimäre, die die niedrigste Toxizität darlegen, können dann auf Immunogenität in Kaninchen analysiert werden.

Sicherheit, Immunogenität und Wirksamkeit von Peru-3/AF/RI.

[0097] Die anfängliche Testung des Peru-3, das AF/R1 exprimiert, kann in Kaninchen durchgeführt werden. Bakterien können Neuseeland-Weißkaninchen in Dosen von 2×10^2, 2×10^4, 2×10^6 und 2×10^8 oral verabreicht werden. Stuhlproben können gesammelt werden und auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Streptomycin gezüchtet werden, um Kolonisation und Ausbreitung der Bakterien aufzuzählen. Blut kann vor Verabreichung des Impfstoffs sowie 7, 14, 21 und 28 Tage im Anschluss an die Verabreichung abgenommen werden. Seren können präpariert werden und unter Verwendung von gereinigtem AF/R1, das an Mikrotiterplatten gebunden ist, über einen Enzym-Immunassay (enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)) auf das Vorhandensein von Antikörpern, die für das Protein AF/R1 spezifisch sind, und die Fähigkeit, RDEC-1-Bakterien zu agglutinieren, analysiert werden.

[0098] Tiere, die den Peru-3/AF/R1-Stamm erhalten haben, können anschließend mit einem pathogenen Stamm von RDEC-1 herausgefordert werden. Eine Herausforderungsdosis von 2×10^6 Organismen kann immunisierten und nativen Kaninchen oral verabreicht werden und Stuhlproben auf Diarrhöe beobachtet werden (definiert als loser, nasser Stuhl, der den rektalen Bereich beschmutzt, und loser Stuhl auf dem Käfigboden). Diarrhöe tritt typischerweise innerhalb von 3–4 Tage in den nicht-immunen Tieren auf. Um Kolonisation zu prüfen, werden rektale Abstrichproben auf Laktose-MacConkey-Agarplatten gezüchtet, und Laktose-positive Kolonien werden als positive Reaktion mit anti-RDEC-1-Antikörpern in einem Objektträgeragglutinationstest gezählt. Schutz kann sowohl als Hemmung der Diarrhöe als auch als bakterielle Kolonisation nach Tag vier definiert werden.

Sicherheit und Immunogenität von Peru-3/CS6 und von Peru-3/SToxoid.

[0099] Die anfängliche Testung der Peru-3-Stämme, die CS6 und Stoxoid-A2 exprimieren, kann durchgeführt werden, wie vorstehend beschrieben. Seren können präpariert werden und unter Verwendung von gereinigtem CS6 oder Gangliosid, das an Mikrotiterplatten gebunden ist, über einen Enzym-Immunassay (enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)) auf das Vorhandensein von Antikörpern, die entweder für das CS6- oder das chimäre Stoxoid-A2-Protein spezifisch sind, analysiert werden. Die anti-CS6-Seren können auch auf das Vorhandensein von Antikörpern analysiert werden, die in der Lage sind, Komplement zu fixieren und CS6-produzierende E. coli zu lysieren. In diesem Assay werden Bakterien, die CS6 tragen, mit Serum und Meerschweinchen-Komplement gemischt, wird LB-Brühe zugegeben und die Bakterien werden auf LB-Agar ausplattiert. Die bakterizide Aktivität hat eine Abnahme der Zählung wiedergewonnener lebensfähiger Zellen zur Folge. Schließlich können die Anti-SToxoid-A2-Seren auf Antikörper getestet werden, die in der Lage sind, die ST-Aktivität im Säuglingsmaus-Toxizitätsassay zu neutralisieren.

Konstruktion von abgeschwächtem Vibrio cholera, das HIV-1-Antigen als rekombinantes Cholera-Holotoxoid exprimiert

[0100] Ein Versuch, der ähnlich zu dem ist, der vorstehend beschrieben ist, kann verwendet werden, um einen V. cholerae-Impfstoffstamm zu konstruieren, der Antigene des menschlichen Immunschwächevirus (hu-

man immuodeficiency virus (HIV)) exprimiert.

[0101] Ein Cholera-Pendelplasmid, welches eine Bakterientranskriptionseinheit enthält, die den Promotor des Hitzeschockproteins, htp, einschließt, und das Cholera CT-B-Gen wurde konstruiert. Die Transkriptionseinheit wird durch die DNA-Sequenzen flankiert, die sich vom recA-Ort von Cholera ableitet, so dass das CT-B-Gen und sein Promotor in das Cholera-Chromosom durch homologe Rekombination zwischen der DNA-Sequenz, die sowohl im recA-Ort des Cholera-Genoms als auch auf dem Plasmid vorhanden ist, integriert werden können. Das Pendelplasmid enthält auch ein Gen, das Ampicillinresistenz kodiert, und ein Gen, das Streptomycinsensitivität kodiert, als Auswahlmarker.

[0102] Das HIV-1-Hüllprotein kann als Teil des rekombinanten V. cholerae-Holotoxoids exprimiert werden, das durch die Bakterien in Form eines „Sandwich"-Fusionsproteins abgesondert wird, in welchem dem HIV-Antigen die Signalsequenzen des CT-A-Polypeptids vorangehen und die CT-A2-Domäne folgt. Die Signalsequenzen des CT-A und seiner stromaufwärts gelegenen nichttranslatierten Region sind für die Expression und Sekretion des HIV-1-Antigens in den Bakterien erforderlich. Die CT-A2-Domäne, die mit dem Antigen HIV-1 fusioniert ist, ist für das Fusionsprotein zum Zusammenzubauen mit den CT-B-Proteinen erforderlich, um ein rekombinantes Cholera-Holotoxoid zu erzeugen. Das vorstehend beschriebene Plasmid kann modifiziert werden, so dass ein PCR-Fragment, das die Shine-Dalgano- (SD-) Sequenzen und die Signalsequenzen des CT-A-Gens enthält, und eine einzigartige Restriktionsendonuclease-Pmel-Stelle zum Insertieren des HIV-1-Antigens in seine PacI-Stelle insertiert wird. Das Plasmid kann werter modifiziert werden, so dass ein zweites PCR-Fragment, das sowohl die CT-A2-Domäne als auch das CT-B-Gen enthält, das CT-B-Gen ersetzt. Die Orientierung der DNA-Insertion und der Verbindungspunkt des PCR-Fragments können durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

[0103] Das in dieser Untersuchung verwendete HIV-1-Antigen ist ein Teil des HIV-1-Hüllglycoproteins, das die Wirkstoff-neutralisierende Domäne (PND) enthält. Vorhergehende Untersuchungen legen dar, dass eine Gruppe von synthetischen Peptiden, die sich vom PND ableiten, neutralisierende Antikörper in Tieren hervorrufen können. Ein DNA-Fragment, das sich vom HIV-LAI-Hüll-Gen ableitet, das das PND einschließt, aber ohne die Signalsequenzen und die ersten 120 Aminosäuren, wird in die PmeI-Stelle des vorstehend beschriebenen Plasmids kloniert, welches sowohl die CT-A2-Domäne als auch das CT-B-Gen enthält. Die Im-Rahmen-Fusion des HIV-1-Antigens und des CT-A-Signalpeptids und die CT-A2-Domäne können durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

[0104] Um einen genetisch abgeschwächten Cholera-Stamm zu konstruieren, der das HIV-1-Antigen trägt, wird Peru-2 als elterlicher Stamm verwendet. Das Plasmid, das HIV-Sequenzen enthält, kann durch Verbinden in den Peru-2-Stamm eingebracht werden. Ein rekombinanter Stamm von V. Cholerae, welcher Deletionen von ctx- und recA-Orten enthält und ein nichttoxisches rekombinantes Fusionsprotein des HIV-1-Antigens exprimiert, wurde produziert und Peru101 genannt. Southernblot-Analyse kann verwendet werden, um zu bestätigen, dass Peru101 die DNA für das HIV-1-Antigen enthält, und Westernblot-Analyse kann verwendet werden, um die Expression des HIV-A2-Fusionsproteins durch die rekombinanten Bakterien darzulegen. Ein ELISA unter Verwendung sowohl von anti-CT-B als auch von anti-HIV-Antikörpern kann testen, ob das rekombinante Cholera-Holotoxoid durch die Bakterien abgesondert wird.

Präklinische Bewertung von Immunogenität und schützender Wirksamkeit der oralen HIV 1-Impfstoffe unter Verwendung des SHIV-Modells in Primaten

[0105] Um die Immunogenität von rekombinantem V. cholerae-Peru101 als prophylaktischen oralen HIV-1-Impfstoff zu testen, kann jedem von sechs erwachsenen weiblichen Rhesusaffen (Macaca mulatta) 2×10^6 CFU frisch präparierter Lebendbakterien in 30 ml Bicarbonatwasser gegeben werden. Zwei zusätzlichen Tieren in derselben Alters- und Geschlechtsgruppe können die gleiche Dosis von Peru 2 als Kontrolle gegeben werden. Die Stuhlproben der Tiere können zwei Tage nach der Impfung analysiert werden, um die Vermehrung von Vibrio cholera in den Därmen durch Bestimmung der koloniebildenden Einheit [colony forming unit] auf LB-Streptomycinplatten nachzuweisen. Die Vagina-, Rektum-, Speichel- und Serum-Antikörper, die IgA und IgG einschließen, die spezifisch gegen HIV1 und CT-B sind, können zweiwöchentlich nach der Impfung untersucht werden. Die T-Zellen-Proliferation des Wirtstieres und CTL-Antworten, die gegen das Eingangs-HIV1-Antigen spezifisch sind, können auch untersucht werden. Ein oder mehrere Verstärkungen durch orale oder durch intramuskuläre und intravenöse Injektion des gereinigten HIV-1-Antigens können in Abhängigkeit vom Wert der anfänglichen Immunantworten der geimpften Tiere erforderlich sein.

[0106] Wenn Peru101 in der Lage ist, die Tiere zu stimulieren, um anti-HIV-Antikörper oder Zell-vermittelte HIV1-spezifische Immunantworten zu erzeugen, kann die Wirksamkeit von Peru101 als HIV1-Impfstoff durch Herausfordern der Tiere mit SHIV-LAI-Lebendstämmen durch vaginale Infusion getestet werden. Die beiden Peru 2 Tiere (die Affen, die den Peru2-Stamm erhielten) und zwei der sechs Peru101-Tiere (die Affen, die Peru101 erhielten), können durch eine Dosis von 2× VI-AID_{50} herausgefordert werden. Zwei der anderen Peru101-Tiere erhalten 10× VI-AID_{50} und der Rest der Peru101-Affen erhält ein Maximum einer Dosis von 50×

VI-AID_{50}. Die Proben mit dem peripheren Blut können alle zwei Wochen nach der Infektion gesammelt werden, um durch Nachweisen des Virenantigens in gezüchteten PBMC zu bestimmen, ob das Tier infiziert wurde. Wenn der Impfstoff prophylaktische Wirkung auf die Tiere gegen die Herausforderung durch das SHIV hat, das das HIV1-Hüll-Gen trägt, kann SHIV-Eli, welches eine heterologe HIV1-Hülle enthält, verwendet werden, um die Tiere erneut herauszufordern.

Verwendung der Lebendimpfstoffstämme

[0107] Die V. cholerae-Mutantenstämme Peru-1, Peru-2, Bang-1, Bang-2, Bah-1, Bah-2, Bengal-2, Bengal-3, Peru-14 und die vorstehend beschriebenen zusätzlichen Mutanten sind nützlich als Quellen immunologischen Schutzes gegen Cholera und andere verwandte toxigene Krankheiten, wenn sie als Lebendimpfstoffe verwendet werden. Andere derartige Krankheiten schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf solche, die durch enterotoxigenes E. coli und andere Bakterien induziert werden, die Toxine produzieren, welche mit der Cholera-B-Untereinheit immunologisch kreuz-neutralisierbar sind.

[0108] Wenn sie in den Darm eines Versuchstieres oder Menschen geimpft werden, sollten Mutantenstämme von V. cholerae eine starke immunologische Antwort gegen alle Bakterienkomponenten stimulieren und induzieren, die durch diese Stämme entwickelt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Ogawa- und Inaba 01-LPS-Antigene, Flagella-Antigene, die Antigendomänen der Tcp-pili und die Außenmembranproteine. Bezogen auf veröffentlichte Untersuchungen mit anderen Prototyp-Cholera-Impfstoffen, werden sowohl IgA- als auch IgG-Klassen von Antikörpern, die gegen diese Bakterienkomponenten gerichtet sind, im geimpften Tier oder Menschen synthetisiert und dienen dazu, das Tier oder den Menschen gegen nachfolgende Herausforderung mit virulenten Stämmen von V. cholerae zu schützen.

Dosierung

[0109] Bestimmung der geeigneten Dosierung und Verabreichung dieser Impfstoffe wird im Wesentlichen durchgeführt, wie von Herrington et al., (1988, J. Exper. Med. 168: 1487–1492) beschrieben. Allgemein liegen derartige Dosierungen zwischen, sind aber nicht beschränkt auf 10^5–10^9 lebensfähige Bakterien pro Dosis.

Wachstum der Impfstoffstämme

[0110] Die als Impfstoff zu verwendenden Bakterien können in einem V. cholerae-Standardlabormedium wachsen gelassen werden. Die Zellen können geerntet werden und dann in einer Formulierung lyophilisiert werden, die die Lebensfähigkeit bewahrt (z. B. sterile Magermilch oder Kochsalzlösung, die 5 mM $CaCl_2$ und 10% Gewicht pro Volumen Glycerin enthält).

Verabreichung

[0111] Die Verabreichung des Impfstoffs schließt das Kombinieren der Inhalte von zwei Hüllen oder Fläschchen ein, eines enthält den lyophilisierten Impfstoffstamm oder eine Kombination von Stämmen, das andere enthält Wasser und ausreichenden Natriumbicarbonat- oder Ausweichpuffer, so dass die Magensäure neutralisiert wird (ungefähr 2 Gramm). Der Impfstoff kann dann durch das zu impfende Individuum geschluckt werden. In einer anderen Ausführungsform kann der lyophilisierte Impfstoff in Tabletten eingebracht werden, welche mit einem Säure-resistenten darmlöslichen Überzug" beschichtet sind. Solch eine Form des Impfstoffs kann dem zu impfenden Individuum in einer oder mehreren (bis zu drei) Dosen verabreicht werden, die einige Tage bis mehrere Wochen auseinanderliegen. Wenn der Impfstoff als „Verstärker" impfstoff verwendet wird, kann er auch vorher geimpften Individuen in einer oder mehreren Dosen (bis zu drei) verabreicht werden, die einige Tage bis mehrere Wochen auseinanderliegen. Wenn zwei oder mehr Stämme zu verabreichen sind, können sie zusammen oder in Einzeldosen, die 7–28 Tage auseinanderliegen, bereitgestellt werden.

Verbesserte orale Cholera-Totimpfstoffe

[0112] Das Präparat von verbesserten oralen Cholera-Totimpfstoffen kann von den vorstehend beschriebenen Stämmen hergestellt werden. Der experimentelle Choleraimpfstoff, der zur Zeit verfügbar ist, besteht aus ungefähr 10^{11} Formalin- und Hitze-getöteten V. cholerae-Zellen, die mit gereinigter Choleratoxin-B-Untereinheit gemischt werden (Black et al., Infect. Immun. 55: 1116, 1987). Die vier Stämme, die bei der Produktion der Bakterienkomponente dieses Impfstoffs verwendet werden, produzieren aktives Choleratoxin, welches, vor der Verabreichung an das zu impfende Individuum vollständig inaktiviert werden muss. Die vorstehend beschriebenen neuen Stämmen stellen einen Impfstoff bereit, der in beträchtlichem Ausmaß aus jedem der nachstehend gegebenen Gründe verbessert wurde, verglichen mit dem Impfstoff von Black et al. (vorstehend).

[0113] (1) Weil die Stämme, die sich von Peru-2, Bang-2 und Bah-2 ableiten und diese einschließen, nur die nichttoxische B-Untereinheit des Choleratoxins und nicht die toxische A-Untereinheit produzieren, erfordern die Kulturen dieser Stämmen nur milde Inaktivierung vor der Verabreichung an ein zu impfendes Individuum, wobei folglich die schwerwiegenderen denaturierenden Behandlungen, wie Formalin oder Hitze, vermieden werden. Die Vorteile der milderen Behandlung sind, dass die Antigene einen größeren Grad ihrer nativen Konfiguration behalten und sie im Ergebnis immunogener sind. Milde Inaktivierungsverfahren, die chemisches Inaktivieren der bakteriellen Proteine vermeiden, schließen Behandlung der Organismen in der Mikrowelle, Behandlung mit einer anderen Strahlungsquelle oder einem milden organischen Lösungsmittel oder Detergenz ein, oder die Zellen können durch mechanische Verfahren, wie Behandlung mit Ultraschall oder Verwendung einer French Press, lysiert werden.

[0114] (2). In den Stämmen Peru-3, Bang-3 und Bah-3 ist das ctxB-Gen unter die Kontrolle des htp-Promotors gestellt worden. Im Ergebnis synthetisieren diese Stämme große Mengen der Choleratoxin-B-Untereinheit (mehr als 10 µg/ml Kultur) in einem Standardlabormedium, wie LB. Dieses erleichtert Reinigung von großen Mengen der Cholera-B-Untereinheit, und folglich stellen diese Stämmen einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen Stämmen bereit, welche die B-Untereinheit nur in kleinen Mengen unter stringenten Wachstumsbedingungen produzieren.

[0115] (3) Bei der Produktion von bestehenden Cholera-Totimpfstoffen wird ein getrennter Bakterienstamm verwendet, um die B-Toxinuntereinheit von dem Stamm zu produzieren, der als Ganzzellantigen verwendet wird. Während der Produktion der B-Untereinheit ist es deshalb erforderlich, unter Verwendung biochemischer Verfahren die B-Untereinheit von der toxischen A-Untereinheit entfernt zu reinigen. Derartige Reinigung zieht die Gefahr nach sich, dass kleine Mengen der A-Untereinheit die Produktion der B-Untereinheit kontaminieren können. Bei Verwenden der vorstehend beschriebenen Stämme ist es möglich, ein Ganzzellantigen-Präparat von derselben Kultur zu erzeugen, die verwendet wurde, um das B-Untereinheit-Präparat zu erhalten. Im ersten Fall ist die Reinigung der B-Untereinheit nun nicht notwendig, weil der Stamm die A-Untereinheit nicht produziert, wobei folglich der Zeitraum und beträchtliche Kosten verringert werden, die bei der Produktion des Impfstoffs eingeschlossen sind. Zweitens gibt es keine Gefahr, bei den Produktionen eine kontaminierende A-Untereinheit zu haben, weil die Bakterien das Gen für diese Untereinheit einfach nicht kodieren und sie deshalb nicht produzieren können. Das Ganzzell-Präparat kann deshalb als Impfstoff mit minimaler Gefahr für das zu impfende Individuum verwendet werden.

[0116] (4) Einige unserer Bakterienstämme sind Abkömmlinge von V. cholerae des El-Tor-Biotyps und insbesondere sind sie im Fall von Peru-2, Peru-3 und Peru-4 Abkömmlinge eines Isolats (C6709-Sm), welches tatsächlich das verursachende Mittel der gegenwärtigen Epidemie in Latein-Amerika ist. Wenn es Antigene gibt, die zu diesem bestimmten elterlichen Stamm einzigartig sind, können die vorstehend beschriebenen Impfstoff-Abkömmlinge allgemein einen besseren Schutz gegen die El-Tor-Krankheit in Latein-Amerika und vielleicht in anderen Bereichen in der Welt bereitstellen.

Herstellung von verbesserten oralen Cholera-Totimpfstoffen

[0117] Ein verbesserter oraler Cholera-Totimpfstoff kann wie folgt hergestellt werden. Mindestens zwei Stämme, vorzugsweise ausgewählt aus dem Ogawa-Serotyp (z. B. Bah-3), dem Inaba-Serotyp (z. B. Peru-3, Peru-14 oder Bang-3) und dem Bengal-Serotyp (z. B. Bengal-2 oder Bengal-3), können in getrennten Kulturen wachsen gelassen werden. Der Fachmann weiß, wie die Bedingungen, Medien, usw. einzustellen sind, um das Zellenwachstum bei 37°C zu maximieren. Zum Beispiel können Kulturen, die unter einem hohen Grad an Belüftung in einem Medium, wie CYE (Mekalanos et al., 1977, Infect. Immun. 16: 789) oder Glukose enthaltendes Minimalmedium, d. h. AGM4 (van de Walle et al., 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 389), gewachsen sind, verwendet werden. Wenn das Wachstum der Bakterien Sättigung erreicht hat, können vollständige Zellen aus dem Medium durch Zentrifugation wiedergewonnen werden, während die Proteine (einschließlich der B-Untereinheit), die innerhalb des Überstands enthalten sind, durch Ultrazentrifugation oder durch Präzipitation erhalten werden. Die Zellen können unter Verwendung der Verfahren von Black et al. (Infect. Immun. 55: 1116, 1987) oder durch mildere Verfahren (z. B. Behandeln mit einer Mikrowelle, Bestrahlung unter Verwendung von ?-, ?- oder ?-Strahlen), Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder Aceton, inaktiviert werden, oder sie können durch Behandlung entweder mit einem Detergenz oder durch mechanische Verfahren, wie Behandlung mit Ulfraschall oder unter Verwendung einer French Press lysiert werden. Die inaktivierten Zellen können dann mit dem filtrierten, konzentrierten Überstand kombiniert werden, der die Bakterienproteine enthält (einschließlich der Untereinheit B), und das Gemisch kann in einer pharmazeutisch verträglichen Lösung suspendiert werden, die für orale Verabreichung geeignet ist (z. B. sterile Kochsalzlösung oder 2% Natriumbicarbonat).

Verabreichung

[0118] Der Impfstoff kann dem zu impfenden Individuum als orale Kochsalzlösung verabreicht werden, welche von dem zu impfenden Individuum mehrere Minuten, nachdem das zu impfende Individuum 2 Gramm Natriumbicarbonat eingenommen hat, geschluckt wird. In einer anderen Ausführungsform kann das Präparat lyophilisiert und zu Tabletten gepresst werden, welche dann vor Verabreichung an das zu impfende Individuum mit einem säureresistenten „darmlöslichen Überzug" überzogen werden. Die Tabletten können auch mit Polymeren mikroverkapselt werden, um die Aufnahme des Präparats durch das Darmschleimhautgewebe zu erleichtern.

Dosierung

[0119] Eine Impfstoff-Einzeldosis sollte ungefähr 10" Zellen und ungefähr 100–5000 µg Cholera-B-Untereinheit enthalten. Es wird erwartet, dass das zu impfende Individuum ungefähr zwei oder mehr getrennte Dosen des Impfstoffs benötigt, die ungefähr zwei oder mehr Wochen auseinanderliegend verabreicht werden.

Hinterlegung

[0120] Unter den Bedingungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen im Sinne des Patentverfahrens sind die V. cholerae-Stämme C6709-Sm, P27459-Sm, E7946-Sm, Bengal-2, Bengal-3, MQ10 und Peru-14 bei der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Maryland, USA, hinterlegt worden, wo den Hinterlegungen die ATCC-Accessionsmummern ATCC 55331 (C6709-Sm); ATCC 55333 (P27459-Sm); ATCC 55332 (E7946-Sm); ATCC 55436 (0139, Bengal-2); ATCC 55437 (0139, Bengal-3); und ATCC 55438 (0139, MQ10) gegeben wurden. Peru-14 wurde bei der ATCC am 30. Juni 1993 hinterlegt.

Sequenzverzeichnis

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Mekalanos, John J.

(ii) ÜBERSCHRIFT DER ERFINDUNG: Deletionsmutanten als Impfstoffe gegen Cholera

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Fish & Richardson

(B) STRASSE: 225 Franklin Street

(C) STADT: Boston

(D) STAAT: Massachusetts

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 02110-2804

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: 3,5" Diskette, 1,44 MB

(B) COMPUTER: IBM PS/2 Modell 50Z oder 55SX

(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS (Version 5.0)

(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.1)

(vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:

(A) AKTENZEICHEN:

(B) EINREICHUNGSDATUM:

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

(A) AKTENZEICHEN:

(B) EINREICHUNGSDATUM:

(viii) ANWALTS-/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: Freeman, John W.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 29.066

(C) AKTEN-/REGISTER-ZEICHEN: 00742/007001

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: (617) 542-5070

(B) TELEFAX: (617) 542-8906

(C) TELEX: 200154

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 17

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

CCTAGTGCGC ATTATGT 17

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 52

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

TAAACCTAGA GACAAAATGT TCCTAGTGCG CATTATGTAT GTTATGTTAA AT 52

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 48

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3:

TAAACCTAGA GACAAAATGT TCCTAGTGCG CATTATGTGG CGCGGCAT 48

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 50

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4:

AAACCCTAGA TTCCGCCGCC TTAGTGCGCA TTATGTATGT TATGTTAAAT 50

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5:

GGGCTAAAGT TAAAAGACAA ATATTTTCAG GC 32

(2) INFORMATION ZU SEQENZ-IDENTIFIKATIONSNUMMER 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 26

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6:

GGGTAGAAGT GAAACGGGGT TTACCG 26

Patentansprüche

1. Nichttoxinogener, genetisch stabiler Mutantenstamm von V Cholera, wobei der genannte Stamm eine gentechnisch veränderte Deletionsmutante ist, der es an DNA fehlt, die eine funktionelle ctxA Untereinheit kodiert, so dass der genannte Stamm nicht die Cholerasymptome wie Übelkeit und Diarrhö induziert, wobei es dar genannten Mutante ferner an funktionellen attRS1 Sequenzen fehlt, wobei eine funktionelle attRS1 Sequenz eine 17 Basenpaarsequenz ist, die in dem ctx genetischen Element enthalten und zur Rekombination und Amplifikation des ctx genetischen Elements erforderlich ist, oder genug von dieser Sequenz, um eine solche Rekombination und Amplifikation zu ermöglichen, und wobei die Abwesenheit funktioneller attRS1 Sequenzen zu einer wenigstens 1000fach geringeren attRS1-vermittelten ortsspezifischen Rekombination relativ zu einem Mutterstamm mit zwei funktionellen attRS1 Sequenzen führt.

2. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 1, wobei der genannte Stamm von einem Mutterstamm abstammt, der zur El-Tor-Serogruppe gehört.

3. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 2, wobei der genannte Stamm von einem Mutterstamm abstammt, der zum Inaba- oder Ogawa-Serotyp gehört.

4. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 1, wobei der genannte Stamm von der Nicht-01-Serogruppe abstammt.

5. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 4, wobei der genannte Stamm von der Bengal-Serogruppe kommt.

6. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 4 oder 5, wobei der genannte Stamm Bengal-2 (ATCC 55438) oder Bengal-3 (ATCC 55437) ist.

7. V-Cholera-Stamm nach einem der vorherigen Ansprüche, bei es dem genannten Stamm an ctx Kernsequenzen fehlt und alle attRS1 Sequenzen vollständig deletiert sind.

8. V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei dem genannten Stamm ferner ein recA-Gen fehlt, so dass 0,1 ml Methylmethansulfonat pro ml Luria-Bouillon für den genannten Stamm tödlich sind.

9. V-Cholera-Stamm nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der genannte Stamm ferner eine B-Untereinheit von Choleratoxin kodiert.

10. V-Cholera-Stamm nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der genannte Stamm ferner ein Antigen kodiert, das normalerweise nicht in V Cholera exprimiert ist.

11. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 10, wobei das genannte Antigen ein Shiga-artiges Toxin oder E. coli CFA Antigen ist.

12. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 10 oder 11, wobei die DNA-Sequenz, die das genannte Antigen ko-

diert, in das lacZ Gen von V Cholera eingesetzt ist.

13. V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei der genannte Stamm Bengal-2 (ATCC 55436) oder Bengal-3 (ATCC 55437) ist.

14. Verfahren zur Herstellung eines genetisch stabilen Mutantenstamms von V Cholera nach Anspruch 1, umfassend das Einleiten eines Plasmids in Wildtyp V Cholera, wobei das Plasmid ein Fragment von V-Cholera-DNA umfasst, das sich mit Wildtyp V-Cholera-DNA rekombinieren kann, wobei das Fragment mutierte ctxA und attRS1 Sequenzen hat, so dass im Anschluss an eine Rekombination mit Wildtyp V-Cholera-DNA das genannte Fragment nicht die Cholerasymptome wie Übelkeit und Diarrhö induziert und keine funktionelle attRS1 Sequenz wie in Anspruch 1 definiert bereitstellt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der genannte V-Cholera-Stamm Bengal-2 (ATCC 55436) oder Bengal-3 (ATCC 55437) ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, wobei es dem genannten Mutantenstamm an ctx Kernsequenzen und allen attRS1 Sequenzen fehlt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei dem genannten Mutantenstamm ferner ein recA Gen fehlt, so dass 0,1 ml Methylmethansulfonat pro ml Luria-Bouillon für den genannten Stamm tödlich sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei der genannte Mutantenstamm ferner ein Antigen kodiert, dass normalerweise nicht in V Cholera exprimiert ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei das genannte Verfahren ferner das Einleiten eines Fragments der DNA, die ein Antigen kodiert, in das lacZ Gen des genannten Mutantenstamms umfasst.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der genannte Mutantenstamm Bengal-7 (ATCC 55436) oder Bengal-3 (ATCC 55437) ist.

21. V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der genannte Stamm eine weichagarpenetrationsdefekte Mutante ist.

22. V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 21, wobei der genannte Stamm att- ist.

23. V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 13, 21 oder 22, wobei wenigstens 25% der Zellen des genannten Stammmes filamentöse Strukturen von 15 nM oder mehr unter Bedingungen von stationärem Phasenwachstum bilden können.

24. V-Cholera-Stamm nach Anspruch 10, wobei das genannte Antigen ein Shigella-Lipopolysaccharid-Antigen; ein HIV-Antigen; ein Anthraxtoxin; ein Pseudomonadenendotoxin A; ein Antigenfragment vom HIV-Kapsid; ein Perfussistoxin; Tetnustoxin; ein Antigen vom Herpesvirus, Rubellavirus; influenzavirus, Mumpsvirus, Masernvirus oder Poliomyelitisvirus oder ein immunogenes Polypeptid von einem eukaryoten Parasiten ist, der Malaria, Pneumocystiscarinii-Pneuomonie oder Toxoplasmose z verursacht.

25. Impfstoff, umfassend wenigstens zwei verschiedene Stamme von V Cholera nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 21 bis 29, wobei einer der genannten Stämme aus Peru stammt und der andere aus Bengalen stammt.

26. Impfstoff nach Anspruch 25, wobei jeder der genannten Stämme ctx-, att- und recA- ist.

27. Impfstoff, umfassend einen V-Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 21 bis 25.

28. V. Cholera-Stamm nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 21 bis 25 zur Verwendung als Medikament.

29. Verwendung eines V-Cholera-Stamms nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 21 bis 25 zur Herstellung eines Impfstoffs zur Behandlung von Cholera.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

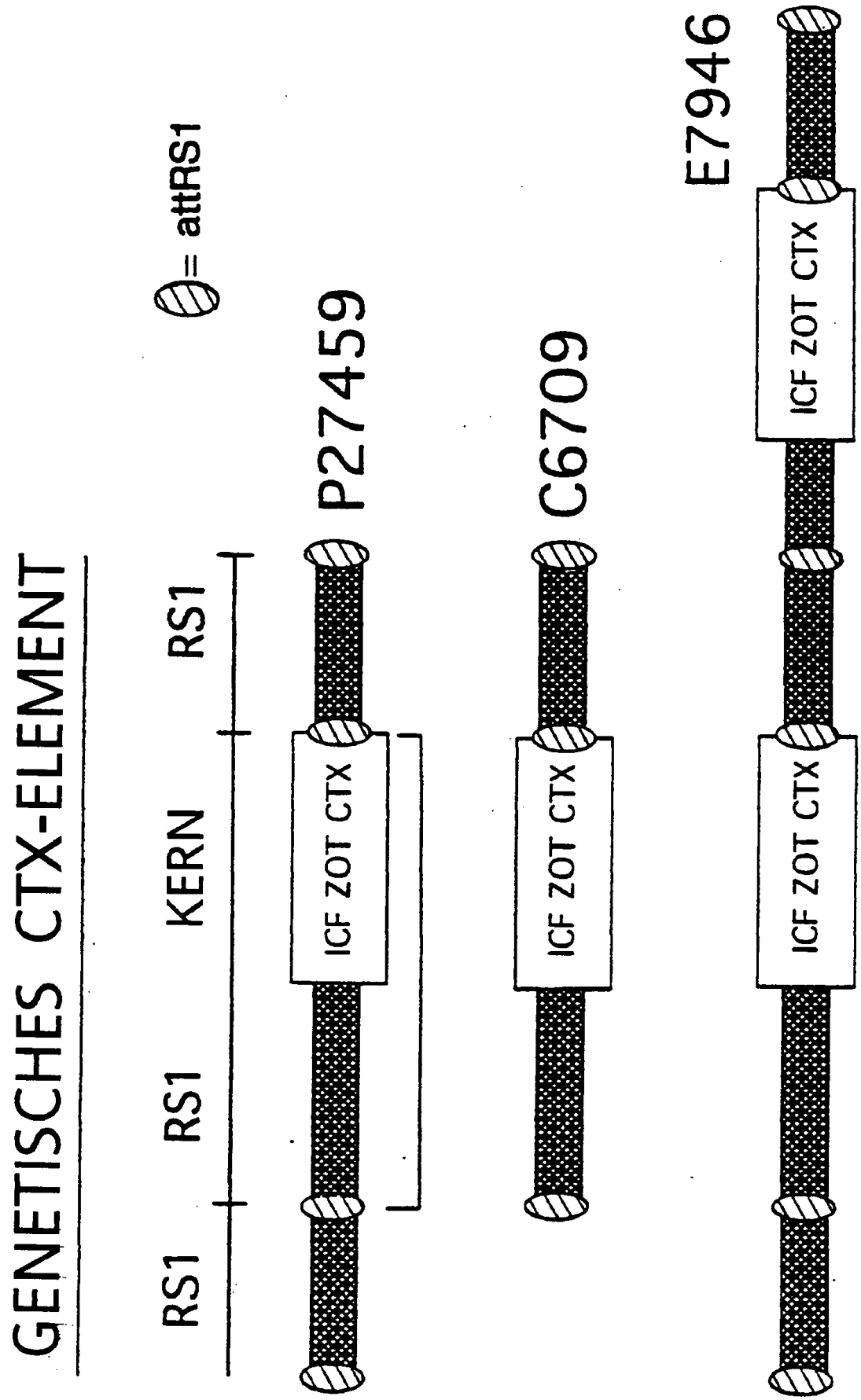


FIG. 1

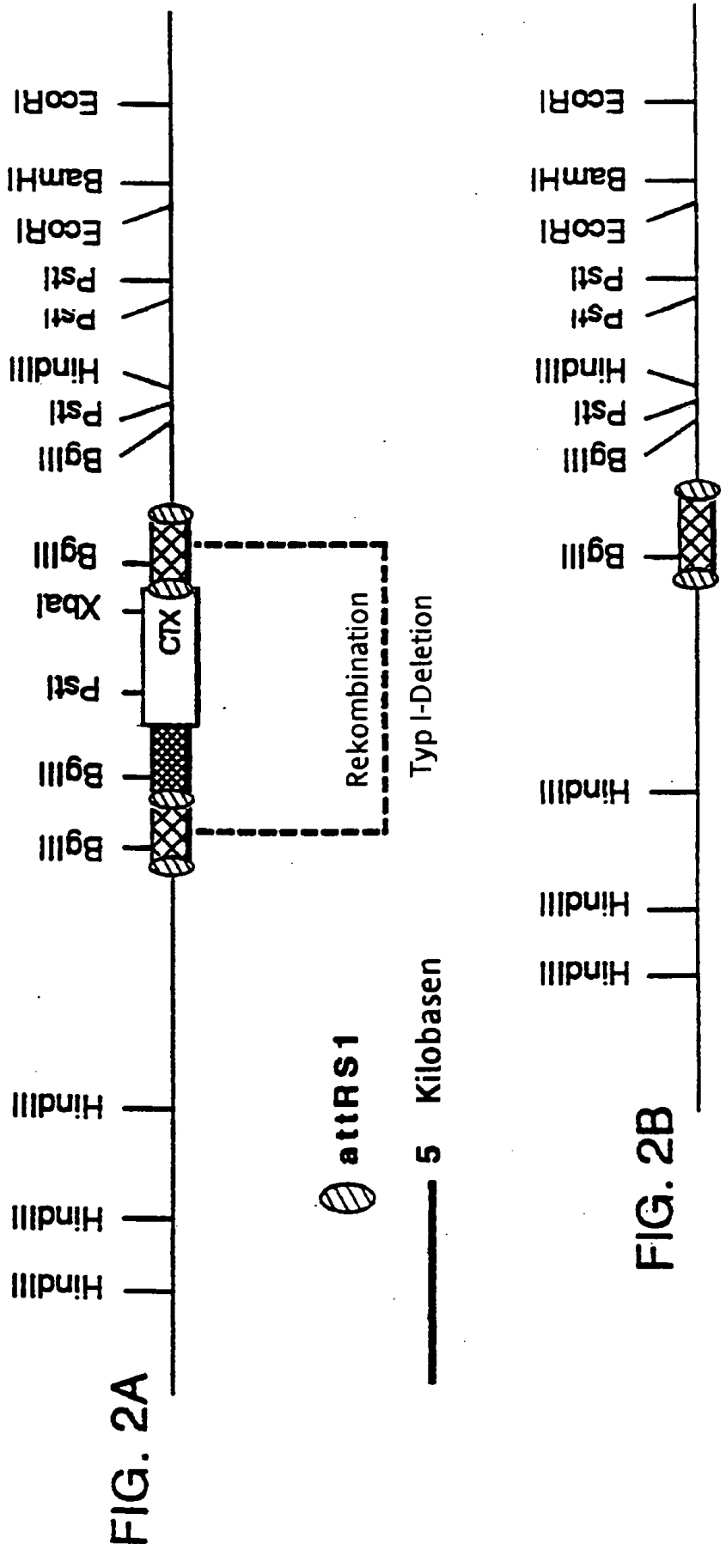

EcoRI
BamHI
EcoRI
PstI
PstI
HindIII
PstI
BglII
BglII
XbaI
CTX
PstI
BglII
BglII
HindIII
HindIII
HindIII
attRS1
5 Kilobasen
Rekombination
Typ I-Deletion
EcoRI
BamHI
EcoRI
PstI
PstI
HindIII
PstI
BglII
BglII
HindIII
HindIII
HindIII

FIG. 2A

FIG. 2B

= attRS1-Stellen

FIG. 3A

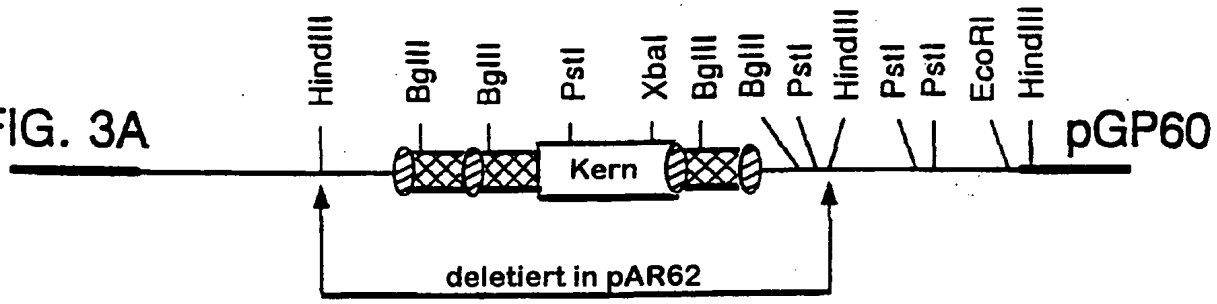


FIG. 3B

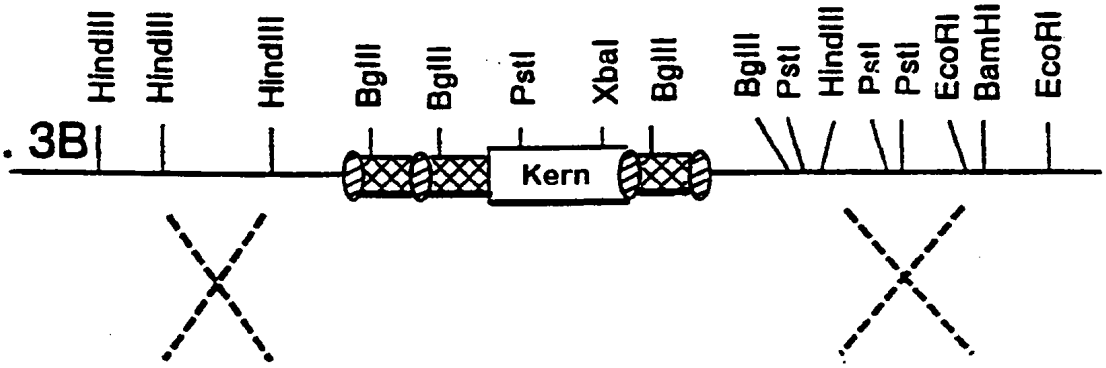


FIG. 3C

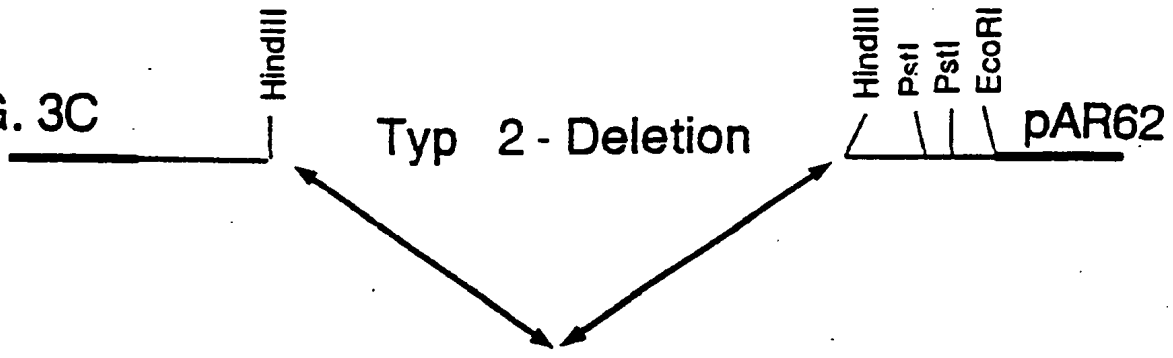
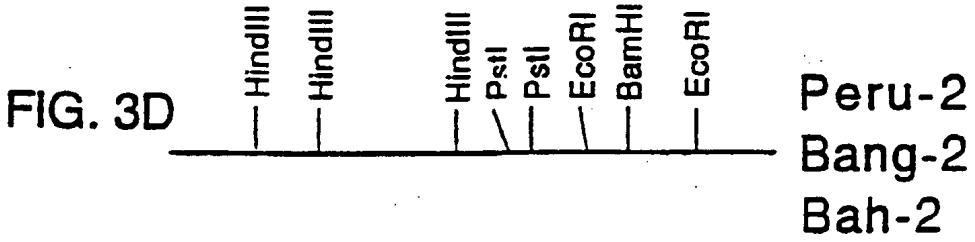


FIG. 3D



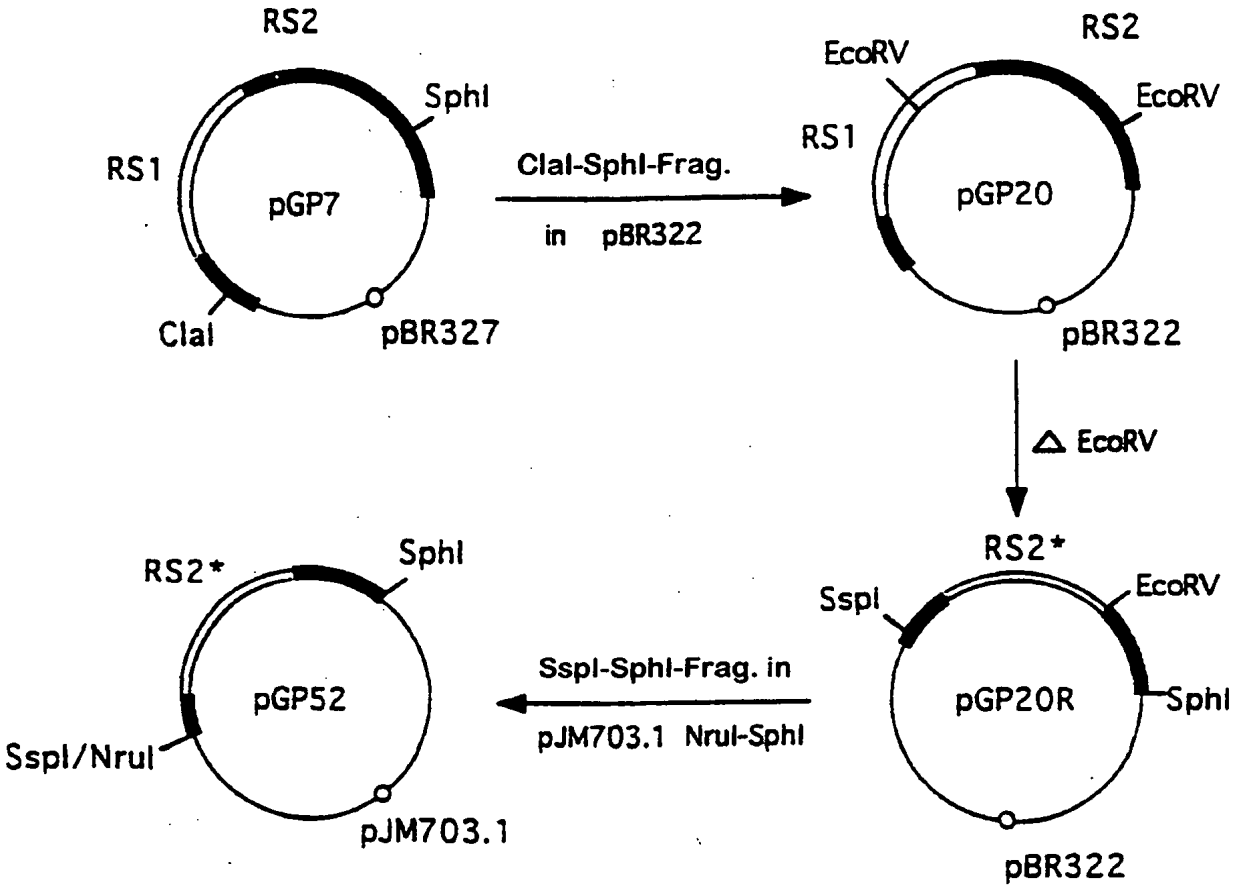

RS2
SphI
RS1
pGP7
ClaI
pBR327
ClaI-SphI-Frag.
in pBR322
EcoRV
RS2
EcoRV
RS1
pGP20
pBR322
Δ EcoRV
RS2*
EcoRV
SspI
pGP20R
SphI
pBR322
SspI-SphI-Frag. in
pJM703.1 NruI-SphI
RS2*
SphI
pGP52
SspI/NruI
pJM703.1

FIG. 4

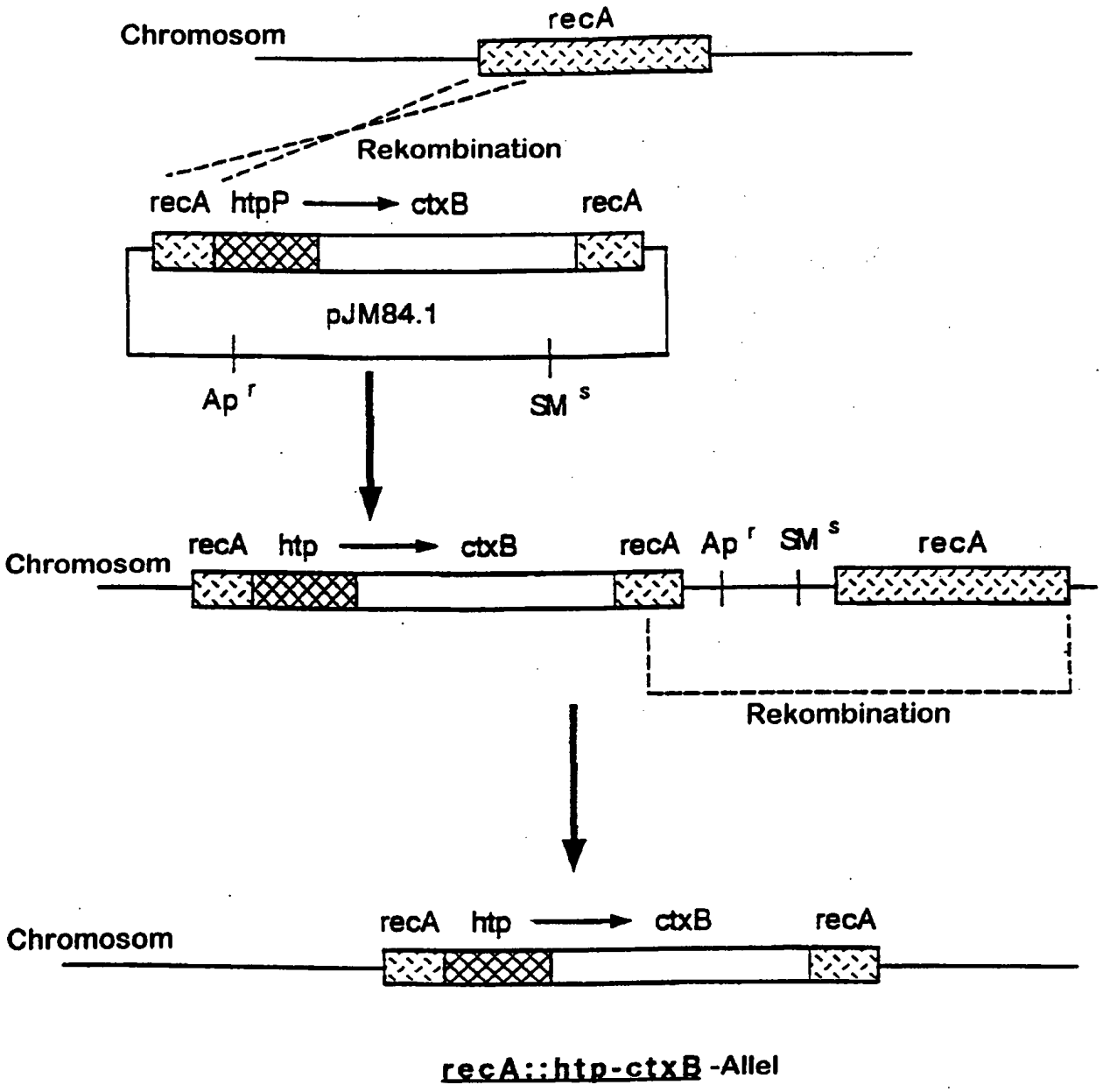

Chromosom
recA
Rekombination
recA htpP ctxB recA
pJM84.1
Ap r
SM s
Chromosom
recA htp ctxB recA Ap r SM s recA
Rekombination
Chromosom
recA htp ctxB recA
recA::htp-ctxB -Allel

FIG. 5

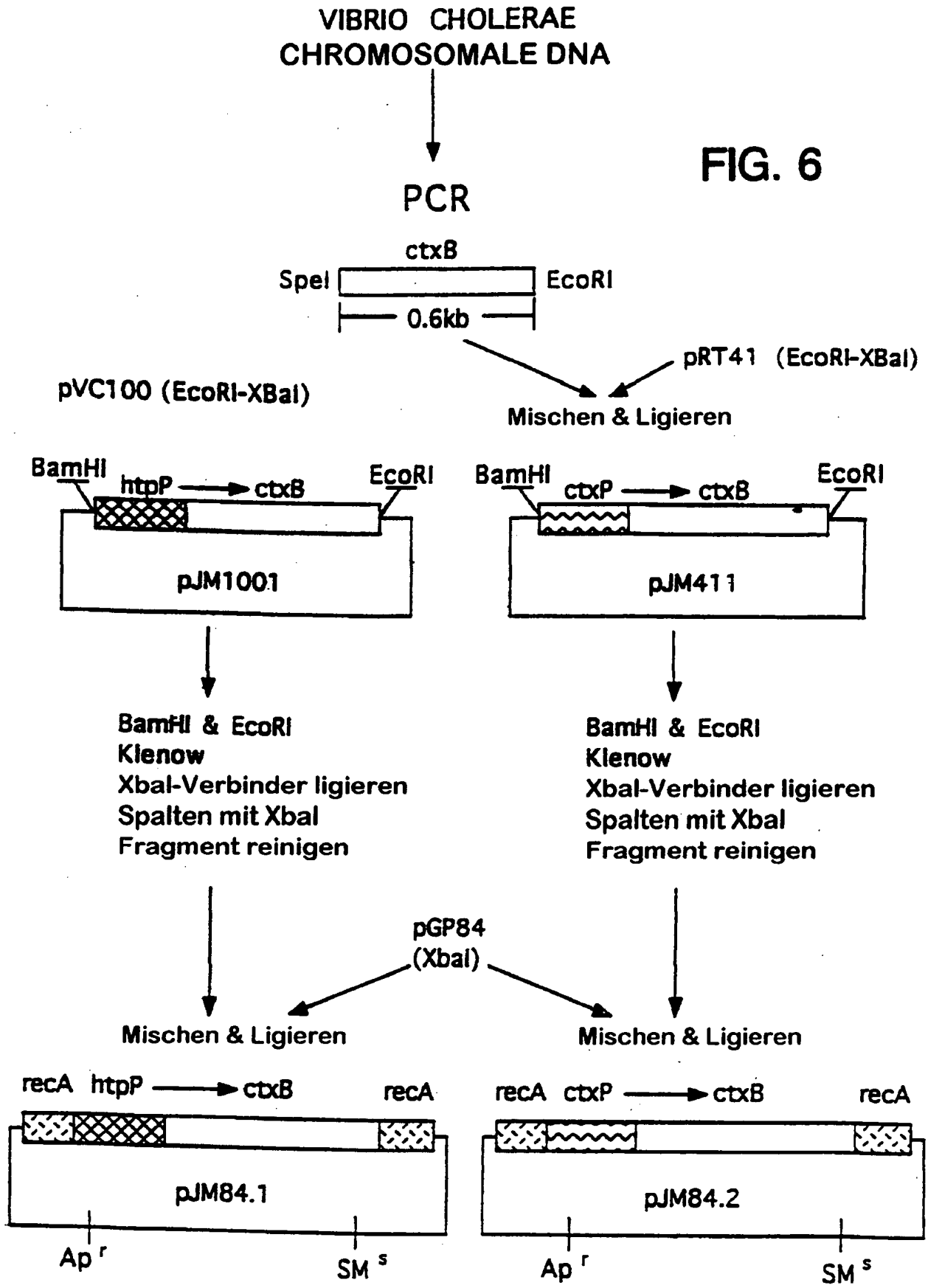

VIBRIO CHOLERAE
CHROMOSOMALE DNA
PCR
ctxB
SpeI
EcoRI
0.6kb
pRT41 (EcoRI-XBal)
pVC100 (EcoRI-XBal)
Mischen & Ligieren
BamHI
htpP
ctxB
EcoRI
pJM1001
BamHI
ctxP
ctxB
EcoRI
pJM411
BamHI & EcoRI
Klenow
Xbal-Verbinder ligieren
Spalten mit Xbal
Fragment reinigen
BamHI & EcoRI
Klenow
Xbal-Verbinder ligieren
Spalten mit Xbal
Fragment reinigen
pGP84
(Xbal)
Mischen & Ligieren
Mischen & Ligieren
recA htpP ctxB recA
pJM84.1
Ap r
SM s
recA ctxP ctxB recA
pJM84.2
Ap r
SM s

FIG. 6