



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 30 147 T2** 2007.01.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 169 465 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 30 147.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA99/01151**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 957 789.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/034498**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.12.1999**

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

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.01.2002**

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

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.01.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/87** (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 39/118 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

110855 P 04.12.1998 US

(73) Patentinhaber:

**University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, CA;
Sanofi Pasteur Ltd., Toronto, Ontario, CA**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MURDIN, D., Andrew, Newmarket, Ontario L3X
1V2, CA; BRUNHAM, C., Robert, Manitoba R3N
0Y4, CA**

(54) Bezeichnung: **ZWEI-SCHRITTE-VERFAHREN ZUR IMPFUNG GEGEN CHLAMYDIA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Immunologie und insbesondere auf einen Impfvorgang zum Schutz eines Wirtes gegen Krankheit, die durch eine Infektion mit einem Bakterium der Gattung Chlamydiaceae, insbesondere Chlamydia trachomatis, verursacht wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Chlamydia trachomatis ist eine Art der Gattung Chlamydiaceae, Ordnung Chlamydiales, C. trachomatis infiziert die Epithelien der Bindehaut und des Genitaltrakts, was ein Trachom verursacht sowie eine Vielfalt sexuell übertragbarer Krankheiten (STD = sexually transmitted disease), was entsprechend zu Blindheit oder Unfruchtbarkeit führen kann. Es gibt wenigstens 15 Serovare von C. trachomatis, von denen A, B und C Trachom hervorrufoende Wirkstoffe sind, wohingegen die Serovare D, E, F, G, H, I, J und K die häufigsten hervorrufoenden Wirkstoffe für STDs durch Chlamydia sind. Infektionen durch C. trachomatis sind in der ganzen Welt endemisch. Ein Trachom ist der häufigste Grund für vermeidbare Blindheit in Entwicklungsländern, und es wird geschätzt, dass 600 Millionen Menschen weltweit an Trachomen leiden, von denen 10 Millionen durch die Krankheit erblinden. Es wird geschätzt, dass in den Vereinigten Staaten 3 Millionen Fälle von STDs durch C. trachomatis verursacht werden.

[0003] Die Pathogenese eines Trachoms beinhaltet wiederholte Augeninfektionen und die Bildung einer zerstörerischen Überempfindlichkeitsreaktion auf Antigen(e) von Chlamydia (Lit. 1 bis 4 – In dieser Beschreibung wird in Klammern auf verschiedene Literatur Bezug genommen, um den Stand der Technik genauer zu beschreiben, den diese Erfindung betrifft. Vollständige Literaturangaben für jedes Zitat werden am Ende dieser Beschreibung gegeben.). Die verfügbaren Beweise stützen die Hypothese, dass sowohl sekretorische IgA als auch zellvermittelte Immunreaktionen wichtige Bestandteile eines Schutzes sind. Augeninfektion bei einem Primatenmodell ruft schnelle und ständige Produktion von IgA in Tränen hervor, wohingegen das Vorhandensein von IgG in Tränen vorübergehend ist entsprechend der Spitzenperiode der Bindehautentzündung (Lit. 5). Schützende Immunität nach experimenteller Augeninfektion bei einem subhumanen Primatenmodell ist homotypisch, und Widerstandsfähigkeit gegen Augenreizung korreliert mit dem Vorhandensein von Serovar-spezifischen Antikörpern in Tränen (Lit. 1, 2, 6). Tränen von infizierten Menschen neutralisierten die Infektiosität von homologen, aber nicht heterologen Trachom-Serovaren für die Augen von Nachtaffen (Lit. 7), wohingegen passive humorale Immunisierung mit Antitrachom-Antikörpern nicht schützend war (Lit. 8). Mehrere Beweisreihen kennzeichnen die Bedeutung zellvermittelter Reaktionen beim Schutz vor oder der Bekämpfung von Infektionen durch Chlamydia. Mäuse ohne B-Zellen können die Infektion zum Rückgang bringen, wohingegen nackte Mäuse ständig infiziert waren. Angenommener Transfer von wenigstens einigen Chlamydia-spezifischen T-Zelllinien oder -Klonen kann ständig infizierte nackte Mäuse heilen, und diese Anti-Chlamydia-Aktivität ist wahrscheinlich eine Funktion der Fähigkeit von T-Zellen, Interferon- γ zu sekretieren (Lit. 9 bis 16).

[0004] Versuche in der Vergangenheit, Ganzzellenimpfstoffe gegen Trachome zu entwickeln, haben die Krankheit durch Sensibilisierung von Impfingen sogar potenziert (Lit. 1, 2). Es wurde bestimmt, dass Sensibilisierung auf ein 57 kD Stressreaktionsprotein (SRP) (HSP60) ausgelöst wurde, das in allen Serovaren von C. trachomatis vorhanden ist. Dem 57 kD SRP wiederholtes Ausgesetztsein kann eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion zur Folge haben, was die chronische Entzündung verursacht, die für gewöhnlich mit Infektionen durch Chlamydia verbunden ist. Somit wäre eine immunogene Herstellung, die geeignet ist, eine starke und andauernde neutralisierende Antikörperreaktion in der Schleimhaut und eine starke Zell-Immunreaktion einzuleiten, ohne den Wirt zu sensibilisieren, nützlich (Lit. 17).

[0005] Ein sehr vielversprechendes Kandidaten-Antigen für die Entwicklung eines Impfstoffes ist das Hauptmembranprotein (MOMP = major outer membrane proteins) von Chlamydia (Lit. 18 bis 20). Andere Oberflächenproteine und das Oberflächen-Lipopolysaccharid sind ebenfalls immunogen, aber von den Antikörpern, die diese hervorrufen, wurde herausgefunden, dass sie nicht schützend sind (Lit. 21, 33). Das MOMP, welches das überwiegende Oberflächenprotein ist, ist ein integrales Membranprotein mit einer Masse von ungefähr 40 kDa, welches, mit Ausnahme von vier variablen Bereichen (VDs = variable domains), die mit I, II, III und IV gekennzeichnet sind, in hohem Maße gegen Serovare geschützt ist. Die Sequenzen aller vier VDs wurden für fünfzehn Serovare bestimmt (Lit. 23, 24). Antikörper, welche geeignet sind, die Infektiosität durch Chlamydia zu neutralisieren, erkennen das MOMP (Lit. 25, 26, 27, 28). Epitope, an welche sich die neutralisierenden monoklonalen Antikörper binden, wurden für mehrere Serovare zugeordnet (Lit. 21, 22, 29, 30, 31, 32, 33) und stellen bedeutende Ziele für die Entwicklung synthetischer oder Untereinheiten-Impfstoffe dar. Die Bindungs-

orte sind benachbarte Sequenzen von sechs bis acht Aminosäuren, die in den VDs I oder II und IV, abhängig von den Serovaren, angeordnet sind. Untereinheiten-Immunogene (z. B. isoliertes MOMP oder synthetische Peptide) mit MOMP-Epitopen können Antikörper hervorrufen, die geeignet sind, intakte Chlamydiae zu erkennen (Lit. 25). Jedoch sind herkömmlich verabreichte Immunogene schlechte Inducer von Schleimhaut-Immunität. Es wäre nützlich, Chlamydia-Antigene derart zu formulieren, dass ihre Immunogenität verbessert wird und sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunreaktionen ausgelöst werden.

[0006] Immunstimulierende Komplexe (ISCOMs) sind käfigähnliche Strukturen, die aus einer Mischung von Saponinen (oder Saponin-Derivaten), Cholesterin und ungesättigten Fettsäuren gebildet sind. Die Bestandteile von ISCOMs werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten, und folglich können Proteine, welche normalerweise hydrophob sind (wie beispielsweise MOMP) oder welche behandelt wurden, um hydrophobe Reste nach außen zu stellen oder hinzuzufügen, wirksam in die ISCOMs, wenn sich diese bilden, eingebaut werden (Lit. 34, 35, 36).

[0007] *C. trachomatis* infiziert normalerweise die Schleimhautflächen des Auges und des Genitaltrakts. Lokale Antikörper und lokale Zell-Immunreaktionen sind ein bedeutender Bestandteil des Schutzes gegen Schleimhautinfektionen. Folglich wäre es für einen Chlamydia-Impfstoff nützlich, eine Schleimhaut-Immunreaktion einschließlich sowohl Zell- als auch Antikörperbestandteilen hervorzurufen.

[0008] DNA-Immunisierung ist ein Ansatz zum Erzeugen schützender Immunität gegen Infektionskrankheiten (Lit. 37). Anders als protein- oder peptidbasierte Untereinheiten-Impfstoffe bietet DNA-Immunisierung schützende Immunität durch Expression fremder Proteine durch Wirtszellen, wodurch somit die Darreichung von Antigen an das Immunsystem auf eine ähnliche Weise zu jener, die während Infektion mit Viren oder intrazellulären Krankheitserregern auftritt, ermöglicht wird (Lit. 38). Obwohl beträchtliches Interesse durch diese Technik erzeugt wurde, wurde eine erfolgreiche Immunität am zuverlässigsten durch DNA-Immunisierung gegen Viruskrankheiten ausgelöst (Lit. 39). Ergebnisse mit nicht-viralen Krankheitserregern waren unterschiedlicher, was die Unterschiede in der Art der Krankheitserreger, bei den gewählten immunisierenden Antigenen und bei den Wegen der Immunisierung widerspiegeln kann (Lit. 40). Die weitere Entwicklung der DNA-Impfung wird davon abhängen, die zu Grunde liegenden immuologischen Mechanismen aufzuklären und die Anwendung auf andere Infektionskrankheiten auszuweiten, für die bestehende Strategien für Impfstoffentwicklung versagt haben.

[0009] Die Verwendung abgeschwächter Bakterien, insbesondere *S. typhimurium*, wurde kürzlich für das Einschleusen von Plasmid-DNA für genetische Immunisierung berichtet (Lit. 41, 42). Diese Art des Einschleusens bietet den zusätzlichen Vorteil des Einschleusens der DNA in Zelltypen, die eine spezifische Immunreaktion hervorrufen, wie beispielsweise eine Schleimhaut-Immunreaktion. Diese Art von Impfung bietet ebenfalls die Vorteile, sicher, da viele sichere abgeschwächte Stämme von *Salmonella* leicht verfügbar sind, und kostengünstig zu sein.

[0010] In EP 0192033 B1 und dem U.S. Patent 5,770,714 wird das Bereitstellen eines DNA-Konstrukts für die in vitro-Expression von *Chlamydia trachomatis* MOMP-Polypeptiden mit den folgenden operativ verbundenen Elementen beschrieben:

einem Transkriptionspromotor,

einem DNA-Molekül, welches für ein *C. trachomatis* MOMP-Polypeptid kodiert mit einem MOMP-Polynukleotid von wenigstens 27 Basenpaaren Länge aus einer Sequenz, die in Anhang A dazu bereitgestellt wird, und einem Transkriptionsterminator, wobei wenigstens eins der transkriptionsregulierenden Elemente nicht von *Chlamydia trachomatis* stammt.

[0011] Es gibt im Stand der Technik weder eine Offenbarung noch einen Vorschlag, DNA-Immunisierung mit solchen Konstrukten zu bewirken.

[0012] In der Parallelanmeldung U.S. Patentanmeldung Nr. 08/893,381, angemeldet am 11. Juli 1996 (WO 98/02546), übertragen auf die University of Manitoba, wird eine immunogene Zusammensetzung zur in vivo-Verabreichung an einen Wirt für das Erzeugen in dem Wirt einer schützenden Immunreaktion gegen ein Hauptmembranprotein (MOMP = major outer membrane proteins) eines Stamms von *Chlamydia* mit einem nicht-replizierenden Vektor mit einer Nukleotidsequenz beschrieben, die für ein MOMP oder MOMP-Fragment kodiert, das eine MOMP-spezifische Immunreaktion erzeugt, und eine Promotorsequenz, die wirksam mit der Nukleotidsequenz verbunden ist zur Expression des MOMP oder MOMP-Fragments in den Wirt; sowie ein pharmazeutisch zulässiger Träger dafür.

[0013] In der Parallelanmeldung U.S. Patentanmeldung Nr. 08/713,236, angemeldet am 16. September 1996 (WO 98/10789), übertragen auf Connaught Laboratories Limited, wird eine immunogene Zusammensetzung beschrieben, welche das Hauptmembranprotein (MOMP = major outer membrane proteins) eines Stamms von Chlamydia, welcher Chlamydia trachomatis sein kann, und einen immunstimulierenden Komplex (ISCOM) aufweist.

[0014] Hayes L. J. et al (1991), Journal of General Microbiology 137: 1557-1564, beschreibt das Testen rekombinanter Chlamydia-LamB-Fusionsproteine in dem Mausmodellsystem von Chlamydia-Salpingitis. Die wöchentlichen immunogenen Fusionen wurden durch Expression in E. coli oder Salmonella typhimurium erzeugt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung eines abgeschwächten Bakteriums vor, welches einen Plasmidvektor beherbergt, der ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein MOMP (major outer membrane protein; Hauptmembranprotein) eines Chlamydia-Stammes oder eines Fragments desselben kodiert, das eine MOMP-spezifische Immunreaktion und einen eukaryotischen Promotor erzeugt, der wirksam mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist, um das MOMP oder das Fragment desselben in einem Wirt zu exprimieren, aber nicht in den abgeschwächten Bakterien, bei der Herstellung eines Medikaments für die Immunisierung eines Wirts gegen Infektionen, die durch einen Chlamydia-Stamm verursacht werden.

[0016] Die Erfindung sieht ebenfalls einen abgeschwächten Stamm eines Bakteriums vor, welcher einen Plasmidvektor beherbergt, der ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein MOMP (major outer membrane protein; Hauptmembranprotein) eines Chlamydia-Stammes oder eines Fragments desselben kodiert, das eine MOMP-spezifische Immunreaktion und einen eukaryotischen Promotor erzeugt, der wirksam mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist, um das MOMP oder das Fragment desselben in einen Wirt zu exprimieren, aber nicht in die abgeschwächten Bakterien.

[0017] Der Chlamydia-Stamm kann ein Stamm von Chlamydia pneumoniae oder Chlamydia trachomatis sein.

[0018] Der eukaryotische Promotor ist vorzugsweise ein Zytomegalievirus-Promotor.

[0019] Ein bevorzugter Plasmidvektor ist pcDNA3/MOMP wie in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0020] Das abgeschwächte Bakterium kann ein abgeschwächter Stamm von Salmonella oder Shigella sein, vorzugsweise ein abgeschwächter Stamm von Salmonella typhimurium.

[0021] Die Immunisierung wird vorzugsweise bewirkt durch:
zuerst Verabreichen einer immunwirksamen Menge des abgeschwächten Bakteriums an den Wirt und anschließend Verabreichen einer immunwirksamen Menge des MOMP oder eines Fragments desselben an den Wirt, welches eine MOMP-spezifische Immunreaktion erzeugt, um eine Chlamydia-spezifische schützende Immunreaktion in dem Wirt zu erhalten.

[0022] Der erste Verabreichungsschritt wird als intranasale Verabreichung durchgeführt und der zweite Verabreichungsschritt wird als intramuskuläre Verabreichung durchgeführt.

[0023] Die Erfindung erstreckt sich auf einen derartigen abgeschwächten Stamm eines Bakteriums, wenn dieser als Immunogen verwendet wird, und auf die Verwendung eines derartigen Stamms bei der Herstellung eines Immunogens zur Verabreichung an einen Wirt.

[0024] Die vorliegende Erfindung ermöglicht somit eine neue Immunisierungsstrategie, um einen Schutz gegen eine Krankheit zu bieten, die durch Infektion durch Mitglieder der Chlamydia-Familie, insbesondere Chlamydia trachomatis, verursacht wird und dabei verwendete Materialien. Die hier vorgesehene Immunisierungsstrategie führt zu einer stärkeren schützenden Immunreaktion als andere Strategien.

[0025] Das Verfahren zum Immunisieren eines Wirts gegen eine Krankheit, die durch eine Infektion mit Chlamydia verursacht wird, weist zuerst Verabreichen einer immunwirksamen Menge eines abgeschwächten Bakteriums wie zuvor beschrieben auf und anschließend Verabreichen einer immunwirksamen Menge des MOMP oder eines Fragments desselben an den Wirt, welche eine MOMP-spezifische Immunreaktion erzeugt, um eine Chlamydia-spezifische Immunreaktion in dem Wirt zu erhalten.

[0026] Der Verabreichungsschritt kann an Schleimhautflächen bewirkt werden, wie zum Beispiel durch intranasale Verabreichung oder zuerst durch intranasale Verabreichung von DNA gefolgt von intramuskulärer Verabreichung des Chlamydia-Proteins.

[0027] Die Immunreaktion, welche in dem Wirt erhalten wird, beinhaltet vorzugsweise das Erzeugen eines Chlamydia-spezifischen Schutzes gegen direkte Chlamydia-Reizung und verbesserte Immunogenität mit größeren DTH- (DTH = delayed-type hypersensitivity; verzögerte Überempfindlichkeit) Reaktionen und höheren IgG₂ und IgG₁-Antikörperreaktionen, als mit anderen Immunisierungsverfahren erhalten werden kann.

[0028] Die vorliegende Erfindung ermöglicht ebenfalls ein weiteres Verfahren zum Immunisieren eines Wirts gegen Infektion, die durch einen Chlamydia-Stamm verursacht wird, welches Verabreichen an den Wirt einer immunwirksamen Menge eines abgeschwächten Bakteriums wie zuvor beschrieben, welches eine MOMP-spezifische Immunreaktion erzeugt, aufweist. Alle hier unter Bezug auf die vorbereitende Verabreichung in dem hier beschriebenen Prime-Boost-Immunisierungsprotokoll beschriebenen Verfahren finden ebenfalls auf dieses weitere Verfahren der Immunisierung Anwendung.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGSFIGUREN

[0029] Fig. 1 mit Abbildungen A, B, C, D, E und F zeigt die Schutzergebnisse des Verabreichens der MOMP-DNA entweder intramuskulär (Abbildungen A, B und C) oder intranasal (Abbildungen D, E und F).

[0030] Fig. 2 mit Abbildungen A, B und C zeigt die Schutzergebnisse von Mäusen, die mit Salmonella, transfigiert mit MOMP-DNA (pcDNA3), immunisiert wurden.

[0031] Fig. 3 mit Abbildungen A, B und C zeigt die Schutzergebnisse von Mäusen, die mit Salmonella, transfigiert mit pcDNA3, dann mit in ISCOM eingebettetem MOMP intramuskulär geboostet, immunisiert wurden.

[0032] Fig. 4 mit Abbildungen A, B und C zeigt die DTH-Reaktion (Abbildung A) und die IgG_{2a}- (Abbildung B) und IgG₁- (Abbildung C) Antikörperreaktionen von Mäusen, die intranasal mit der durch Salmonella eingeschleusten DNA (pcDNA3) geprimt wurden und dann intramuskulär mit dem MOMP-ISCOM-Protein geboostet wurden. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von log₁₀-Titern des Antikörpers dar. * stellt p<0,05 dar, im Vergleich zur natürlichen Gruppe und zur Gruppe, die nur mit 10⁸ CFU pMOMP-Salmonella immunisiert ist.

[0033] Fig. 5 zeigt die Elemente und Konstruktion von Plasmid pcDNA3/MOMP, ungefähr 64 kb groß.

ALLGEMEINE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Immunisierung, welche ein Hauptmembranprotein (MOMP = major outer membrane proteins) eines Stamms von Chlamydia oder ein immunogenes Fragment davon aufweisen, wirksam verbunden mit einem eukaryotischen Expressionselement, eingeschleust durch abgeschwächte Salmonella, und eine anschließende Verabreichung wenigstens eines Proteins oder Fragments derselben des gleichen Proteins von Chlamydia. Das MOMP-Protein kann zur Verabreichung an den Wirt in einem ISCOM formuliert sein. Das MOMP-Protein kann rekombinant oder von einer Chlamydia-Herstellung isoliert erzeugt werden.

[0035] Um die vorliegende Erfindung darzustellen, wurde Plasmid-DNA konstruiert, welche das MOMP-Gen und MOMP-Genfragmente von dem C. trachomatis Maus-Pneumonitis (MoPn)-Stamm, welcher ein natürlicher Maus-Krankheitserreger ist, enthält, was ermöglicht, dass Versuche an Mäusen durchgeführt werden. Erstinfektion bei dem Modell löst starke schützende Immunität gegen Neuinfektion aus. Für Humanimmunisierung wird ein menschlicher Krankheitserreger-Stamm verwendet, wie zum Beispiel Serovar C von C. trachomatis.

[0036] Jeder geeignete Plasmidvektor kann für das MOMP-Gen oder -Fragment verwendet werden, wie beispielsweise pcDNA3, ein eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen, San Diego, CA, USA) mit einem geeigneten Promotor, wie beispielsweise ein Zytomegalievirus-Promotor. Das MOMP-Gen oder MOMP-Genfragment kann in den Vektor auf jede geeignete Weise eingesetzt werden. Das Gen oder die Genfragmente können aus Chlamydia trachomatis genomischer DNA durch PCR unter Verwendung geeigneter Primer amplifiziert werden und das PCR-Produkt in den Vektor geklont werden. Das MOMP-Gen tragende Plasmid kann, zum Beispiel durch Elektroporation, in E. coli zur Replikation darin übertragen werden. Ein MOMP tragendes Plasmid, pcDNA3/MOMP, von ungefähr 64 kb Größe ist in Fig. 5 dargestellt. Plasmide können aus E. coli auf jede geeignete Weise extrahiert werden.

[0037] Das Plasmid, welches das MOMP-Gen oder MOMP-Genfragment enthält, kann verwendet werden, um ein abgeschwächtes Salmonella-Bakterium gemäß Standardprotokollen wie beispielsweise Elektroporation zu transformieren (Lit. 43).

[0038] Wie oben beschrieben, kann die erste (Priming-) Immunisierung durch Verabreichung eines abgeschwächten bakteriellen Vektors, wie beispielsweise Salmonella, bewirkt werden, wobei die transfizierte DNA nicht in dem bakteriellen Vektor exprimiert wird. Die Expression der primären DNA wird bewirkt, wenn der bakterielle Vektor die DNA in die geeigneten Wirtszellen, wie beispielsweise Makrophagen oder dendritische Zellen, freigesetzt hat. Nach Aufnahme des bakteriellen Vektors durch die Wirtszellen sterben die auxotrophen Bakterien nach ein paar Teilungsrunden aufgrund ihrer Unfähigkeit, die essentiellen Nährstoffe, wie beispielsweise Aminosäuren oder Nukleotide, zu synthetisieren, ab. Die Plasmid-DNA wird dann in das Zytoplasma der infizierten Wirtszellen und in das in die Wirtszelle exprimierte kodierte Gen freigesetzt.

[0039] Die Boost-Immunisierung kann ein Chlamydia-Protein sein, das in einem immunstimulierenden Komplex (ISCOM) eingebettet ist, oder ein rekombinant erzeugtes Chlamydia-Protein. Das Chlamydia-Protein kann ebenfalls ein isoliertes natürliches Chlamydia-Protein sein, welches aus einem Chlamydia-Extrakt extrahiert ist.

[0040] Einem Durchschnittsfachmann wird offensichtlich sein, dass verschiedene Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in den Gebieten der Impfung und der Behandlung von Infektionen durch Chlamydia Anwendung finden können. Eine weitere nicht-begrenzende Beschreibung solcher Verwendungen wird nachstehend aufgezeigt.

BEISPIELE

[0041] Die obenstehende Offenbarung beschreibt im Allgemeinen die vorliegende Erfindung. Ein umfassenderes Verständnis kann unter Bezugnahme auf die folgenden spezifischen Beispiele erhalten werden. Diese Beispiele werden einzig zu Darstellungszwecken beschrieben und sind nicht dazu gedacht, den Schutzbereich der Erfindung zu begrenzen. Änderungen der Form und Ersetzungen durch Äquivalente werden je nach Umständen in Erwägung zu ziehen. Obwohl spezifische Begriffe hierin verwendet wurden, werden derartige Begriffe als beschreibend verstanden und bezwecken keine Einschränkung.

Beispiel 1:

[0042] Dieses Beispiel zeigt die Herstellung eines Plasmidvektors, welcher das MOMP-Gen enthält.

[0043] Ein pMOMP wurde wie in der vorgenannten US-Patentanmeldung Nr. 08/893,381 (WO 98/02546) beschrieben hergestellt. Kurz gesagt, wurde das MOMP-Gen aus genomischer DNA des Chlamydia trachomatis Maus-Pneumonitis (MoPn)-Stamms durch PCR (polymerase chain reaction) mit einem 5'-Primer (GGGGATC-CGCCACCATGCTGCCTGTGGG-GAATCCT) (SEQ ID Nr:1), welcher eine BamH1-Stelle, eine ribosomale Bindungsstelle, ein Start-Kodon und die N-terminale Sequenz des reifen MOMP von MoPn enthält, sowie einen 3'-Primer (GGGGCTCGAGCTATTAACGGAAGTGAAGC) (SEQ ID Nr:2), welcher die C-terminale Sequenz des MoPn MOMP, eine Xho1-Stelle und ein Stopp-Kodon enthält, amplifiziert. Die DNA-Sequenz der MOMP-Leitpeptid-Gensequenz wurde ausgeschlossen. Nach Verdauung mit BamH1 und Xho1 wurde das PCR-Produkt in den pcDNA3 eukaryotischen II-wählbaren Expressionsvektor (Invitrogen, San Diego) geklont mit Transkription unter Kontrolle des humanen Zytomegalievirus-Hauptübergangsproduktfrühverstärkungsbereichs (CMV-Promotor). Das MOMP-Gen kodierende Plasmid wurde durch Elektroporation in E. coli DH5αF übertragen, welche zuvor in LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, gezogen wurde. Die Plasmide wurden extrahiert durch ein Wizard™ Plus Maxiprep DNA-Reinigungssystem (Promega, Madison). Die Sequenz des rekombinanten MOMP-Gens wurde durch PCR-Direktsequenzanalyse wie beschrieben (Lit. 44) überprüft. Gereinigte Plasmid-DNA wurde in Salzlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die DNA-Konzentration wurde durch ein DU-62 Spektrophotometer (Beckman, Fullerton, CA) bei 260 nm bestimmt, und die Größe des Plasmids wurde mit DNA-Standards in Ethidiumbromidgefärbtem Agarosegel verglichen.

[0044] Das MOMP-Gen, welches das Plasmid pcDNA3/MOMP enthält, und seine wesentlichen Elemente sind in [Fig. 5](#) dargestellt.

Beispiel 2:

[0045] Dieses Beispiel zeigt die DNA-Immunisierung von Mäusen.

[0046] Ein Modell von Maus-Pneumonia, herbeigeführt durch den *C. trachomatis* Maus-Pneumonitis (MoPn)-Stamm, wurde verwendet (Lit. 45). Anders als die meisten Stämme von *C. trachomatis*, welche darauf beschränkt sind, Infektionen und Krankheit beim Menschen zu erzeugen, ist MoPn ein natürlicher Maus-Krankheitserreger. Es wurde zuvor aufgezeigt, dass Erstinfektion in diesem Modell starke Schutzimmunität gegen Neuinfektion hervorruft. Zusätzlich ist das Beseitigen der Infektion verbunden mit CD4 Th1 Lymphocytreaktionen und hängt von einer Präsentation des MHC-Klasse II Antigens (Lit. 45) ab.

[0047] Drei unterschiedliche Konzentrationen von MOMP-DNA wurden verglichen, welche entweder intramuskulär oder intranasal (**Fig. 1**) verabreicht wurden. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Lieferung nackter MOMP-DNA über die Schleimhaut schützend ist und dies offenbar mehr als intramuskulär gelieferte MOMP-DNA. Die intranasale Lieferung von MOMP-DNA wurde in zahlreichen Versuchen bewertet, um deren Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, rief die Lieferung von MOMP-DNA über die Schleimhaut schützende Immunreaktionen hervor, aber die Größenordnung des schützenden Index war in hohem Maße variabel, wobei er in unterschiedlichen Versuchen im Bereich von 0,5 bis 4,1 \log_{10} Schutz lag. Die Grundlage für solche Schwankungen kann auf der begrenzten Immunogenität von nackter DNA-Impfung beruhen, da das Reizen geimpfter Tiere mit einem höheren Inokulum von MoPn den schützenden Index merklich reduzierte. Nackte DNA, die auf einer Schleimhautfläche angewendet wurde, kann ebenfalls ein sehr unterschiedliches Schicksal haben, wobei ein Teil durch extrazelluläre Nukleasen degradiert und ein Teil von den Körperzellen aufgenommen werden kann.

Beispiel 3:

[0048] Dieses Beispiel zeigt das Einschleusen von DNA mit abgeschwächter Salmonella.

[0049] *Salmonella typhimurium*-Stamm 22-4 wird in Lit. 46 beschrieben. Ein solcher Stamm wurde mit pcDNA3/MOMP und pcDNA3 durch Elektroporation transfiziert. Abgeschwächte Stämme von *Salmonella*, mit Plasmid-DNA transfiziert, wurden für 16 bis 25 Stunden bei 37°C gezüchtet, ohne Schütteln in Luria(LB)-Medium mit 100µg/ml Ampicillin. Bakterien wurden durch Zentrifugieren gesammelt und in PBS resuspendiert. Unterschiedliche Konzentrationen an *Salmonella* wurden mit PBS verdünnt und das gleiche Volumen von 10% Natriumbicarbonat wurde unmittelbar vor Immunisierung hinzugefügt. Gruppen von 5 bis 10 weiblichen Balb/c-Mäusen, 6 bis 8 Wochen alt, wurden für 5 bis 6 Stunden vor Immunisierung ohne Wasser gelassen. Ungefähr 10^5 bis 10^{10} CFU der Bakterien in 100 µl wurden durch Zufuhrnadeln zugeführt (Ejay International Inc.). Vier Inokulationen in zweiwöchigen Intervallen wurden verabreicht.

[0050] Wie in **Fig. 2** dargestellt, hatten Mäuse, die mit *Salmonella* immunisiert wurden, die mit MOMP-DNA transfiziert war, Teilschutz gegen Lungenreizung mit MoPn. Immunisierung an einer Schleimhautfläche (dem Darm) bietet Schutz gegen Reizungsinfektion an einer entfernten Schleimhautfläche (der Lunge).

Beispiel 4:

[0051] Dieses Beispiel stellt einen DNA-Prime- und Protein-Boost-Immunisierungsplan bei Mäusen dar.

[0052] MOMP-DNA transfizierte *Salmonella*, hergestellt wie in Beispiel 3 beschrieben, verabreicht zu 10^8 cfu, wurde verglichen mit MOMP-DNA transfizierter *Salmonella*, verabreicht zu 10^6 cfu, bei Gruppen von Balb/c-Mäusen, die viermal in zweiwöchigen Intervallen oral immunisiert wurden. Mit 10^6 cfu immunisierte Mäuse bekamen einen einzelnen Protein-Boost intramuskulär mit 1µg MoPn MOMP, eingebettet in ISCOM (14) zum Zeitpunkt der vierten Immunisierung. Das ISCOM-Präparat wurde wie in der vorgenannten US-Patentanmeldung Nr. 08/718,236 (WO98/10789) hergestellt. Die Mäuse wurden mit 5000 IFU MoPn EB intranasal zwei Wochen nach der letzten Immunisierung gereizt. Die gereizten Mäuse wurden an Tag 10 nach Infektion getötet. Das Körpergewicht wurde nach der Infektion täglich gemessen, bis die Mäuse getötet wurden (**Fig. 3**, Abbildung A). Diese Mäuse waren wesentlich besser geschützt als Mäuse, denen 10^8 cfu *Salmonella* ohne einen Protein-Boost, wie in Beispiel 3 beschrieben, gegeben wurde. Das Chlamydia EB-Wachstum in den Lungen an Tag 10 nach Infektion wurde durch quantitative Gewebekultur analysiert (**Fig. 3**, Abbildung B und C). In **Fig. 3**, Abbildung B, stellen die Daten den Mittelwert \pm SEM von \log_{10} IFU pro Lunge von 5 bis 6 Mäusen dar, und Abbildung C stellt die bei einzelnen Mäusen beobachteten Ergebnisse dar. Mit DNA geprimte, mit Protein geboostete Mäuse zeigten ebenfalls verbesserte Immunogenität mit größeren DTH-Reaktionen (**Fig. 4**, Abbildung A) und höheren Serum IgG₂ und IgG₁-Antikörperreaktionen (**Fig. 4**, Abbildungen B und C). Sera wurden von immunisierten Mäusen 2 Wochen nach der letzten Immunisierung gesammelt. MoPn-spezifische Antikörper IgG_{2a} (Abbildung B) und IgG₁- (Abbildung C) Antikörper wurden mit ELISA getestet.

Beispiel 5:

[0053] In diesem Beispiel wird das Messen von MoPn-spezifischer DTH (delayed-type hypersensitivity; verzögerte Überempfindlichkeit) beschrieben.

[0054] Um die DTH zu bewerten, wurden 25µl mit ultraviolettem (UV-) Licht getöteter MoPn EBs (2×10^5 IFU) in einem SPG-Puffer in den rechten hinteren Fußballen von Mäusen injiziert und das gleiche Volumen von SPG-Puffer wurde in den linken hinteren Fußballen als Kontrolle injiziert. Die Fußballenschwellung wurde 48 Stunden und 72 Stunden nach Infektion unter Verwendung eines Skalenesschiebers gemessen. Der Unterschied zwischen der Dicke der beiden Fußballen wurde als Maß der DTH-Reaktion verwendet.

Tabelle 1 Intranasale (IN) Immunisierung mit MOMP-DNA bewirkt schützende Immunität gegen Chlamydia trachomatis MoPn-Lungeninfektion

Versuch Nummer	LOG10 IFU/LUNGE		SCHÜTZEND Index	REIZUNG Inokulum (IFU)
	PcDNA3-IN	pMOMP-IN		
2	4,93 ±0,68 (N=7)	3,65 ± 0,94 (N=6)	1,28	1000
3	6,1 ±0,32 (N=4)	3,0 ±1,15 (N=4)	4,1	5000
4	4,4 ±0,32 (N=7)	3,9 ±0,13 (N=7)	0,5	5000 X 2
7	5,39±0,3 (N=8)	3,8 ±0,63 (N=8)	1,59	5000

LITERATURANGABEN

1. Grayston, J.T. und S.-P. Wang. 1975. New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause, J. Infect. Dis., 132: 87-104.
2. Grayston, J.T., S.-P. Wang, L.-J. Yeh, und C.-C. Kuo. 1985. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. Rev. Infect. Dis. 7:717-
3. Taylor, H.R., et al. 1982. Animal Model of Trachema. II. The importance of repeated infection. Invest. Ophthalmol. Visual. Sci. 23:507-515.
4. Taylor, H.R., et al. 1981. An Animal Model for Cicatrizing Trachoma. Invest. Ophthalmol. Sci. 21:422-433.
5. Caldwell, H.D., et al. 1987. Tear and serum antibody response to chlamydia trachomatis antigens during acute chlamydial conjunctivitis in monkeys as determined by immunoblotting. Infect. Immun. 55:93-98.
6. Wang, S.-P., et al., 1985. Immunotyping of Chlamydia trachomatis with monoclonal antibodies. J. Infect. Dis. 152:791-800.
7. Nichols, R.L., et al.. 1973. Immunity to chlamydial infections of the eye. VI. Homologous neutralization of trachoma infectivity for the owl monkey conjunctivae by eye secretions from humans with trachoma. J. Infect. Dis. 127:429-432.
8. Orenstein, N.S., et al., 1973. Immunity to chlamydial infections of the eye V. Passive transfer of antitrachoma antibodies to owl monkeys. Infect. Immun. 7:600-603.
9. Ramsey, KH, et al., (März 1991) Resolution of Chlamydia Genital Infection with Antigen-Specific T-Lympho-

cyte Lines. *Infect. and Immun.* 59:925-931.

10. Magee, DM, et al., (1995). Role of CD8 T Cells in Primary Chlamydia Infection. *Infect. Immun.* Feb. 1995. 63:516-521.
11. Su, H. and Caldwell HD., (1995) CD4+ T Cells Play a Significant Role in Adoptive Immunity to Chlamydia trachomatis Infection of the Mouse Genital Tract, *Infect. Immun.* Sept. 1995, 63: 3302-3308.
12. Beatty, PR., and Stephens RS. (1994) CD8+ T Lymphocyte-Mediated Lysis of Chlamydia-Infected L Cells Using an Endogenous Antigen Pathway., *Journal of Immun.* 1994, 153:4588.
13. Starnbach, MN., Bevan, MJ. und Lampe, MF. (1994), Protective Cytotoxic T. Lymphocytes are Induced During Marine Infection with Chlamydia trachomatis, *Journal of Immun.* 1994, 153:5183.
14. Starnbach, MN., Bevan, MJ. und Lampe, MF., (1995), Marine Cytotoxic T. Lymphocytes Induced Following Chlamydia trachomatis Intraperitoneal or Genital Tract Infection Respond to Cells Infected with Multiple Serovars., *Infect. & Immun.* Sept. 1995, 63:3527-3530.
15. Igietseme, JU. (1996), Molecular mechanism of T-cell control of Chlamydia in mice: role of nitric oxide in vivo. *Immunology* 1996, 88:1-5.
16. Igietseme. JU, (1996), The Molecular mechanism of T-cell control of Chlamydia in mice; role of nitric oxide. *Immunology* 1996, 87:1-8.
17. Ward, M.E. 1992. Chlamydial vaccines – future trends. *J. Infection* 25, Supp. 1:11-26.
18. Caldwell, HD., et al., (1981). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* 31:1161-1176.
19. Bavoil, P., Ohlin, A. und Schachter, J., (1984) Role of Disulfide Bonding in Outer Membrane Structure and Permeability in Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.*, 44: 479-485.
20. Campos, M., et al., (1995) A Chlamydia Major Outer Membrane Protein Extract as a Trachoma Vaccine Candidate., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:1477-1491.
21. Zhang Y.-X., et al., (1989). Protective monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis serovar- and serogroup-specific major outer membrane protein determinants. *Infect. Immun.* 57:636-638.
22. Zhang, Y.-X. et al., 1987. Protective monoclonal antibodies recognise epitopes located on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *J. Immunol.* 138:575-581.
23. Department of Health and Human Services, (1989) Nucleotide and amino acid sequences of the four variable domains of the major outer membrane proteins of Chlamydia trachomatis. Report Nos: PAT-AP-PL-7-324664. National Technical Information Services, Springfield, VA.
24. Yuan, Y., et al. (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia trachomatis serovars. *Infect. Immun.* 57:104-1049.
25. Su, H. und Caldwell, H.D. 1992. Immunogenicity of a chimeric peptide corresponding to T-helper and B-cell epitopes of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein, *J. Exp. Med.* 175:227-235.
26. Su. H., N.G. Watkins, Y.-X. Zhang und H.D. Caldwell (1990). Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect. Immun.* 58:1017-1025.
27. Peeling, R., LW. McClean und R.C. Brunham. (1984). In vitro neutralization of Chlamydia trachomatis with monoclonal antibody to an epitope on the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 46:484-488.
28. Lucero, M.E. und C.-C. Kuo. (1985). Neutralization of Chlamydia trachomatis cell culture infection by serovar specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 50:595-597.
29. Baehr. W., et al. (1988) Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4000-4004.
30. Stephens, R.S., et al. (1988) High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *J. Exp. Med.* 167:817-831.
31. Conlan, J.W., I.N. Clarke und M.E. Ward. (1988). Epitope mapping with solidphase peptides: Identification of type-, subspecies-, species-, and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Mol. Microbiol.* 2:673-679.
32. Conlan, J.W., et al., (1990). Isolation of recombinant fragments of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis: their potential as subunit vaccines. *J. Gen. Microbiol.* 136:2013-2020.
33. Morrison, E.P., D.S. Manning und H.D. Caldwell. (1992), Immunology of Chlamydia trachomatis infections. S. 57-84 In T.C. Quinn (Hrsg.) Sexually transmitted diseases. Raven Press Ltd., NY.
34. Kersten, G.F.A. und Crommelin, D.J.A. (1995). Liposomes and ISCOMs as vaccine formulations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1241 (1995) 117-138.
35. Morein, B., et al. (1990) The iscom – a modern approach to vaccines seminars in Virology, Bd. 1, 1990: S. 49-55.
36. Mowat & Reid, 1992. Preparation of Immune Stimulating Complexes (ISCOMs) as Adjuvants, *Current Protocols in Immunology* 1992. Supplement 4: 2.11.1. bis 2.11.12.
37. M.A. Liu et al. 1995. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 772.
38. W.M. McDonnell und F.K. Askari 1996. *N. Engl. J. Med.* 334:42.
39. J.B. Ulmer et al. 1993. *Science* 259:1745.

40. M. Sedegah et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:9866.
41. A. Darji et al. 1997. Cell 91:765-775.
42. D.R. Sizemore, 1997. Vaccine 15:804-807.
43. D. O'Callaghan und A. Charbit. 1990. Mol. Gen. Genet. 223:156-158.
44. R. Brunham et al. 1994. J. Clin. Invest. 94:458-463.
45. R.P. Morrison et al. 1995. Infect. Immun. 63:4661.
46. K.Y. Leung et al., 1991. PNAS 88(24):1147-4.

Patentansprüche

1. Verwendung eines abgeschwächten Bakteriums, welches einen Plasmidvektor beherbergt, der ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein MOMP (major outer membrane Protein; Hauptmembranprotein) eines Chlamydia-Stammes oder eines Fragments desselben kodiert, das eine MOMP-spezifische Immunreaktion und einen eukaryotischen Promotor erzeugt, der wirksam mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist, um das MOMP oder das Fragment desselben in einen Wirt zu exprimieren, aber nicht in die abgeschwächten Bakterien, bei der Herstellung eines Medikaments für die Immunisierung eines Wirts gegen Infektionen, die durch einen Chlamydia-Stamm verursacht werden.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Chlamydia-Stamm ein Stamm von Chlamydia pneumoniae oder Chlamydia trachomatis ist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der eukaryotische Promotor ein Zytomegalievirus-Promotor ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei der Plasmidvektor pcDNA3/MOMP wie in [Fig. 5](#) dargestellt ist.
5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das abgeschwächte Bakterium ein abgeschwächter Stamm von Salmonella, vorzugsweise ein abgeschwächter Stamm von Salmonella typhimurium ist.
6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Immunisierung bewirkt wird durch: zuerst Verabreichen einer immunwirksamen Menge des abgeschwächten Bakteriums an den Wirt, und anschließend Verabreichen einer immunwirksamen Menge des MOMP's oder eines Fragments desselben an den Wirt, welches eine MOMP-spezifische Immunreaktion erzeugt, um eine Chlamydia-spezifische schützende Immunreaktion in dem Wirt zu erhalten.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei der erste Verabreichungsschritt durch intranasale Verabreichung durchgeführt wird und der zweite Verabreichungsschritt durch intramuskuläre Verabreichung durchgeführt wird.
8. Abgeschwächter Stamm eines Bakteriums, welcher einen Plasmidvektor beherbergt, der ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein MOMP (major outer membrane protein; Hauptmembranprotein) eines Chlamydia-Stammes oder eines Fragments desselben kodiert, das eine MOMP-spezifische Immunreaktion und einen eukaryotischen Promotor erzeugt, der wirksam mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist, um das MOMP oder das Fragment desselben in einen Wirt zu exprimieren, aber nicht in die abgeschwächten Bakterien.
9. Abgeschwächter Stamm gemäß Anspruch 8, wobei der Chlamydia-Stamm ein Stamm von Chlamydia pneumoniae oder Chlamydia trachomatis ist.
10. Abgeschwächter Stamm gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei der eukaryotische Promotor ein Zytomegalievirus-Promotor ist.
11. Abgeschwächter Stamm gemäß Anspruch 10, wobei der Plasmidvektor pcDNA3/MOMP wie in [Fig. 5](#) dargestellt ist.
12. Abgeschwächter Stamm gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei das abgeschwächte Bakterium ein abgeschwächter Stamm von Salmonella, vorzugsweise ein abgeschwächter Stamm von Salmonella typhimurium ist.

13. Abgeschwächter Stamm gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12 zur Verwendung als Immunogen.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

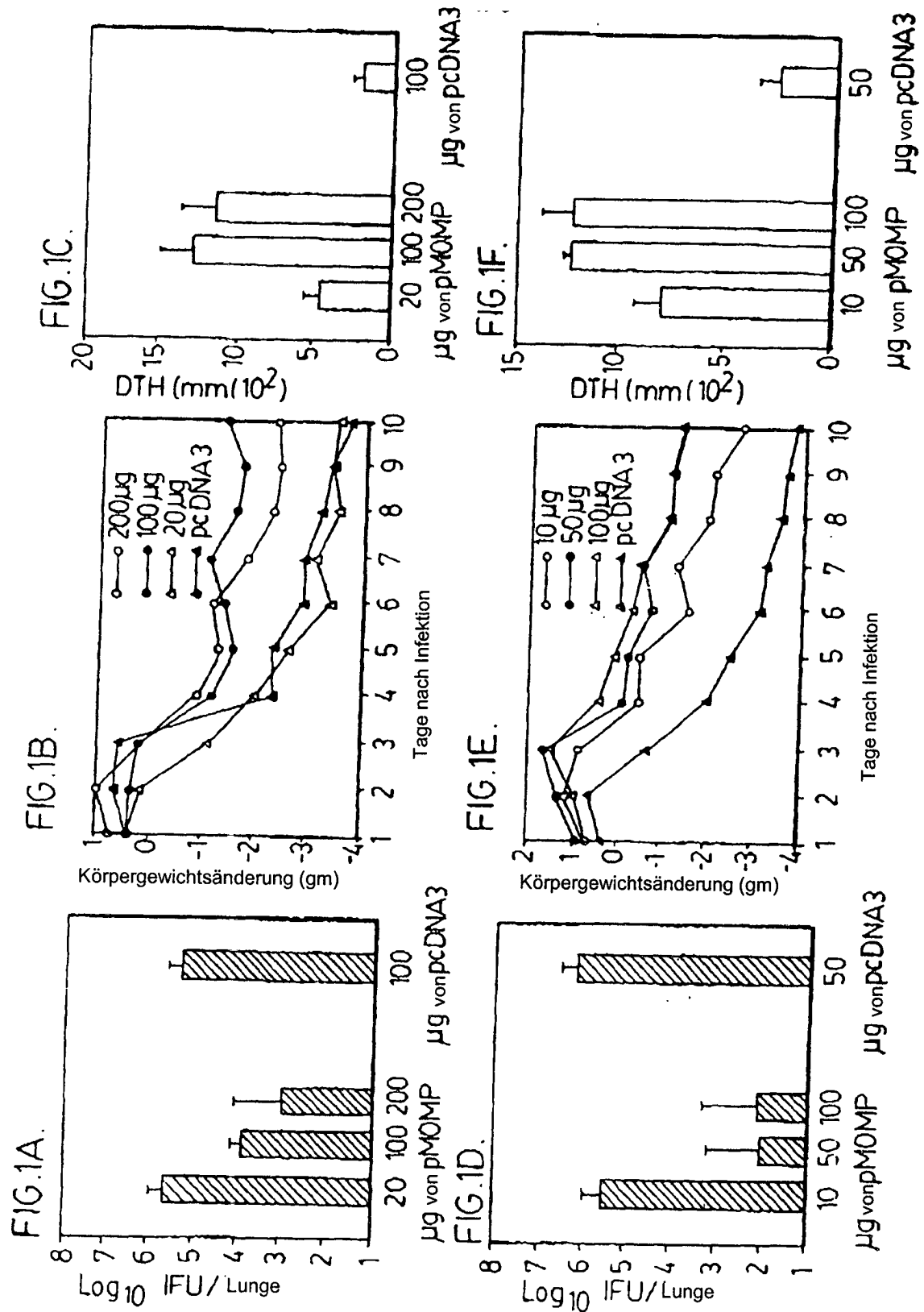


FIG.2A.

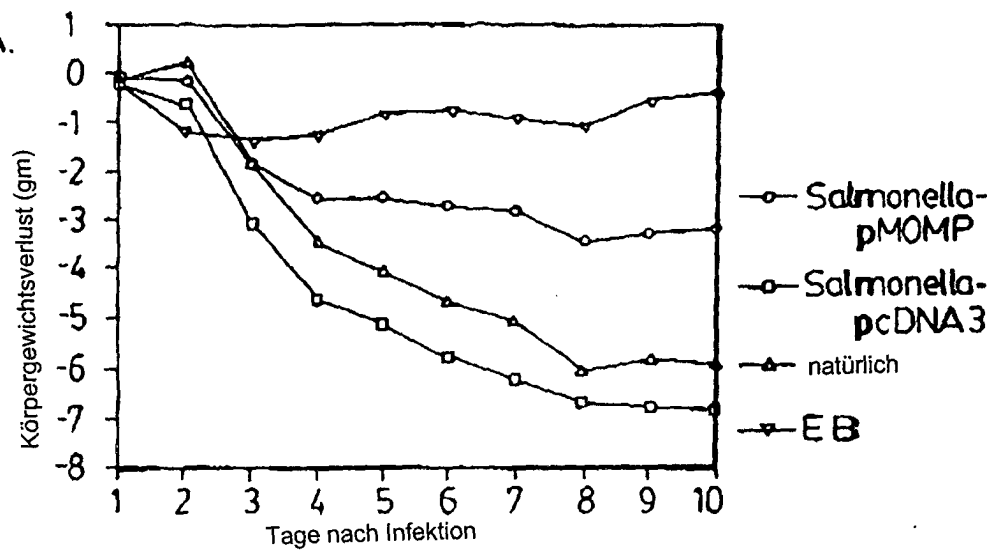


FIG.2B.

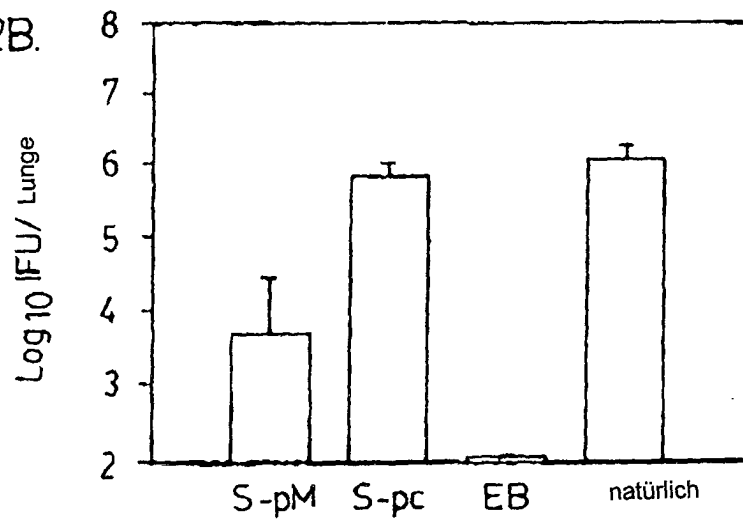


FIG.2C.

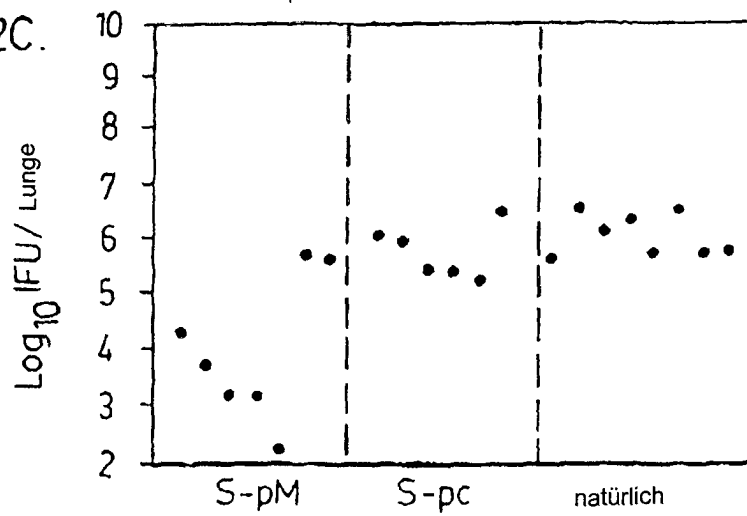


FIG. 3A.

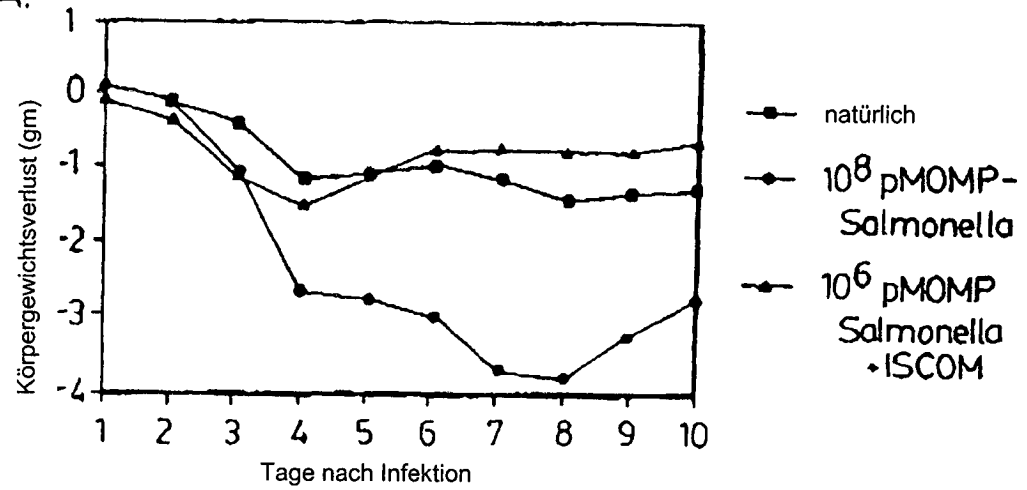


FIG. 3B.

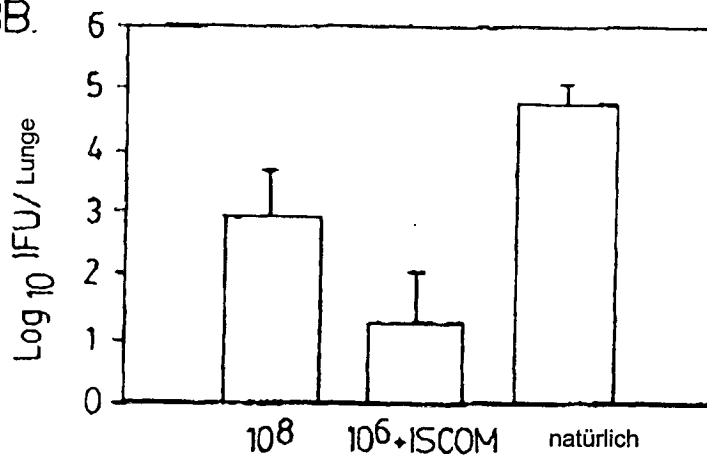
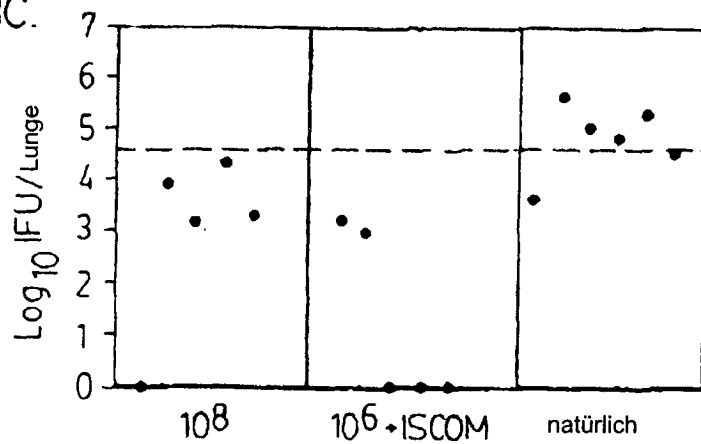


FIG. 3C.



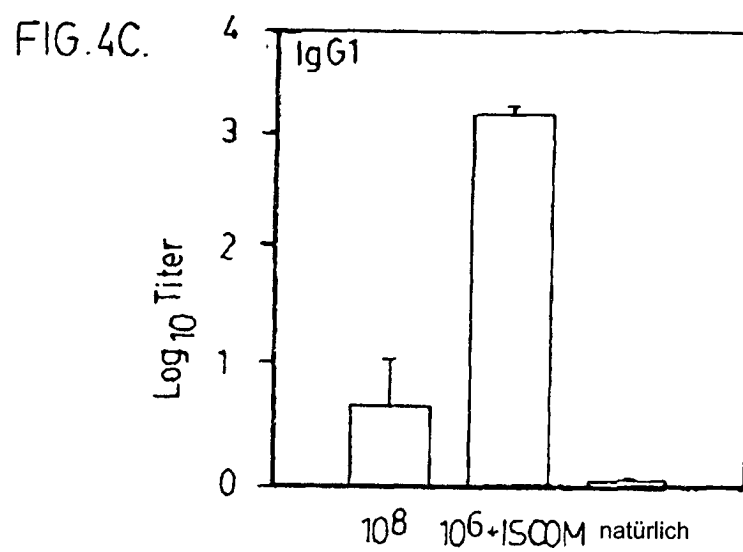
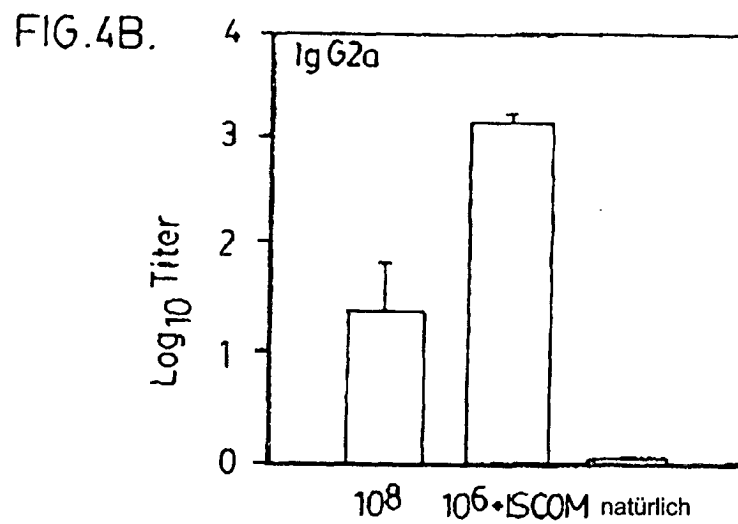
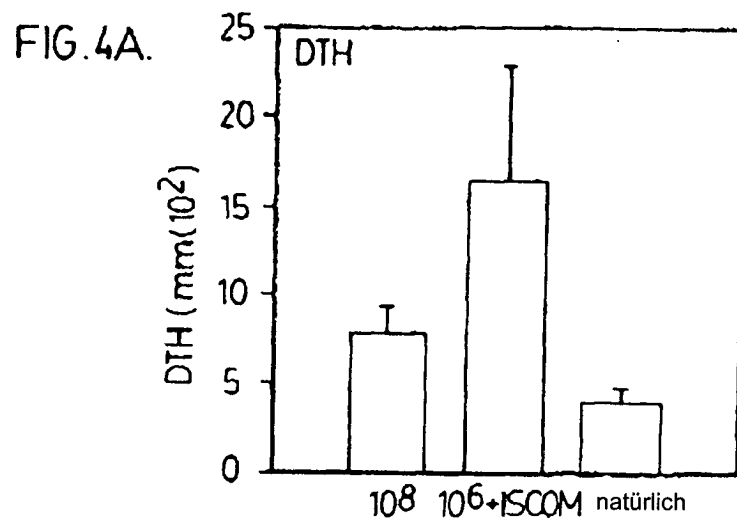


FIG.5.

