



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 588 T2** 2007.04.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 686 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 588.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/05109**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 947 427.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/010496**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.08.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.04.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/31** (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

97114614 22.08.1997 EP

(73) Patentinhaber:

**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 80539 München, DE**

(74) Vertreter:

Weickmann & Weickmann, 81679 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:

**KAUFMANN, H., Stefan, D-13465 Berlin, DE; HESS,
Jürgen, D-10318 Berlin, DE**

(54) Bezeichnung: **TUBERKULOSE IMPFSTOFF**

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] Die vorliegende Erfindung betrifft neue rekombinante Vakzinen, welche eine protektive Immunität insbesondere gegen Tuberkulose bereitstellen. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung neue rekombinante Nukleinsäuremoleküle, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuremoleküle, Zellen transformiert mit den Nukleinsäuremolekülen und Polypeptide kodiert durch die Nukleinsäuremoleküle.

[0002] Tuberkulose (TB), welche durch *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird, bleibt ein signifikantes globales Problem. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der weltweiten Population mit *M. tuberculosis* infiziert ist (Kochi, 1991). In vielen Ländern war die einzige Maßnahme zur TB-Kontrolle eine Impfung mit *M. bovis* Bazillus Calmette-Gutirin (BCG). Die allgemeine Vakzineeffizienz von BCG gegen TB ist jedoch etwa 50 % mit extremen Variationen von 0 % bis 80 % zwischen verschiedenen Feldversuchen (Roche et al., 1995). Daher sollte BCG verbessert werden, z. B. durch Gentechnik, um eine Vakzine für eine bessere TB-Kontrolle bereitzustellen (Murray et al., 1996; Hess und Kaufmann, 1993). Das weitverbreitete Erscheinen mehrfach wirkstoffresistenter *M. tuberculosis*-Stämme unterstreicht zusätzlich den dringenden Bedarf für neue TB-Vakzinen (Grange, 1996).

[0003] *M. tuberculosis* gehört zu der Gruppe intrazellulärer Bakterien, welche innerhalb der phagosomalen Vakuolen ruhender Makrophagen replizieren, daher hängt ein Schutz gegen TB von T-zellvermittelter Immunität ab (Kaufmann, 1993). Mehrere Studien in Mäusen und Menschen haben jedoch gezeigt, dass *Mycobakterien* antigenspezifische Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II- (MHC Klasse II-) oder Klasse I-restringierte CD4- bzw. CD8-T-Zellen stimulieren (Kaufmann, 1993).

[0004] Die wichtige Rolle von MHC-Klasse-I-restringierten CD8-T-Zellen wurde überzeugend durch die Unfähigkeit β 2-Mikroglobulin-defizienter (β 2m-defizienter) Mäuse demonstriert, eine experimentelle *M. tuberculosis*-Infektion zu kontrollieren (Flynn et al., 1993). Weil diesen mutanten Mäusen die MHC-Klasse I fehlt, können sich keine funktionellen CD8-T-Zellen entwickeln. β 2m-defiziente Mäuse sind fähig, bestimmte infektiöse Dosen des BCG-Vakzinestamms im Gegensatz zu einer *M. tuberculosis*-Infektion zu kontrollieren (Flynn et al., 1993; Ladel et al., 1995). Außerdem verlängerte eine BCG-Impfung von β 2m-defizienten Mäusen das Überleben nach folgender *M. tuberculosis*-Infektion, während BCG-immunisierte C57BL/6 einer TB widerstanden (Flynn et al., 1993). Diese unterschiedliche CD8-T-Zellabhängigkeit zwischen *M. tuberculosis* und BCG kann wie folgt erklärt werden: *M. tuberculosis*-Antigene erreichen einen besseren Zugang zum Cytoplasma als Antigene von BCG, was zur einer deutlicheren MHC-Klasse-I-Präsentation führt (Hess und Kaufmann, 1993). Folglich wird eine wirksamere CD8-T-Zellantwort durch *M. tuberculosis* erzeugt. Diese Idee wurde kürzlich durch eine erhöhte MHC-Klasse-I-Präsentation eines irrelevanten Antigens (Ovalbumin) durch simultane *M. tuberculosis*-Infektion von antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) im Gegensatz zu einer BCG-Infektion (Mazzaccaro et al., 1996) gestützt.

[0005] Sekretierte Proteine von *M. tuberculosis* umfassen eine wertvolle Quelle von Antigenen für eine MHC-Klasse-I-Präsentation. Kürzlich rief eine DNA-Vakzine, welche das sekretierte Antigen Ag85A kodierte, MHC-Klasse-I-restringierte CD8-T-Zellantworten in Mäusen hervor, welche zur Verteidigung gegen TB (Huygen et al., 1996) beitragen können. In allgemein sammeln sich Beweise, dass eine Immunisierung mit sekretierten Proteinantigenen von *M. tuberculosis* einen gewissen Schutz gegen TB in Meerschweinchen und Mäusen induziert (Horwitz et al., 1995; Andersen, 1994). Ein wichtiges Ziel hin zu der Entwicklung verbesserter TB-Vakzinen basierend auf BCG ist deshalb die Verbesserung der Zugänglichkeit sekretierter BCG-spezifischer Antigene zum Cytoplasma infizierter APC. Eine nachfolgende Übergabe von Peptiden, welche von diesen sekretierten Proteinen abgeleitet sind, in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg kann die schon existierende BCG-spezifische Immunantwort zur Verhütung einer TB potenzieren.

[0006] Das phagolysosomale Entweichen von *L. monocytogenes* stellt einen einzigartigen Mechanismus zum Erleichtern einer MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation listerialer Antigene dar (Berche et al., 1987; Portnoy et al., 1988). Listeriolysin (Hly), ein porenbildendes sulfhydrylaktiviertes Cytolysin, ist essentiell für die Freisetzung von *L. monocytogenes*-Mikroorganismen aus phagolysosomalen Vakuolen in das Cytosol von Wirtszellen (Gaillard et al., 1987; Portnoy et al., 1988). Diese Escape-Funktion wurde kürzlich auf *Bacillus subtilis* und auf attenuierte *Salmonella* ssp.-Stämme übertragen (Bielecki et al., 1991; Gentshev et al., 1995; Hess und Kaufmann, 1997). Hly-Expression durch einen asporogenen *B. subtilis*-Mutantenstamm oder in *Salmonella* ssp. führt zu bakteriellem Entweichen aus dem Phagolysosom in das Cytosol von J774-makrophagenähnlichen Zellen (Bielecki et al., 1991; Gentshev et al., 1995; Hess und Kaufmann, 1997).

[0007] Daher kann der Transfer von lysosomalen Escape-Funktionen auf heterologe Mikroorganismen eine

erhöhte Toxizität der resultierenden rekombinanten Mikroorganismen verursachen. Aus diesem Grund wurde die Verwendung dieser lysosomalen Escape-Funktionen für die Herstellung rekombinanter Lebendvakzinen nicht einfach in Betracht gezogen.

[0008] Erfindungsgemäß wurden rekombinante BCG-Stämme konstruiert, welche hämolytisch aktives Hly sekretieren und welche eine verbesserte Effizienz einer MHC-Klasse-I-restringierten Immunantwort und überraschenderweise eine gleiche oder sogar niedrigere Cytotoxizität in Vergleich mit den unmodifizierten nativen BCG-Stämmen zeigen. Daher sind diese rekombinanten Organismen vielversprechende Vakzinekandidaten gegen TB.

[0009] Ein erster erfindungsgemäßer Aspekt ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül kodierend ein Fusionspolypeptid umfassend (a) wenigstens eine Domäne eines Mycobacterium-Polypeptids, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht.

[0010] Eine spezifische Ausführungsform dieses ersten Aspekts ist das Nukleinsäuremolekül in SEQ ID No. 1. Dieses Nukleinsäuremolekül umfasst eine signalpeptidkodierende Sequenz (Nukleotid 1–120), eine Sequenz kodierend eine immunogene Domäne (Nukleotid 121–153), eine peptidlinkerkodierende Sequenz (Nukleotid 154–210), eine Sequenz kodierend eine phagolysosomale Domäne (Nukleotid 211–1722), eine weitere peptidlinkerkodierende Sequenz (Nukleotid 1723–1800) und eine Sequenz kodierend ein zufälliges Peptid (Nukleotid 1801–1870). Die korrespondierende Aminosäuresequenz ist in SEQ ID No. 2 gezeigt.

[0011] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält wenigstens eine immunogene Domäne von einem Polypeptid, welches von einem Organismus der Gattung Mycobacterium abgeleitet ist, vorzugsweise von Mycobacterium tuberculosis oder von Mycobacterium bovis. Diese Domäne hat eine Länge von wenigstens 6, vorzugsweise von wenigstens 8 Aminosäuren. Die immunogene Domäne ist vorzugsweise ein Anteil eines nativen Mycobacterium-Polypeptids. Jedoch ist eine modifizierte immunogene Domäne, welche von einer nativen immunogenen Domäne durch Substituieren, Deletieren und/oder Hinzufügen von einer oder mehreren Aminosäuren abgeleitet ist, ebenso innerhalb des erfindungsgemäßen Umfangs.

[0012] Die immunogene Domäne ist fähig, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen. Diese Immunantwort kann eine B-zellvermittelte Immunantwort sein. Vorzugsweise ist die immunogene Domäne jedoch fähig zum Hervorrufen einer T-zellvermittelten Immunantwort, stärker bevorzugt einer MHC-Klasse-I-restringierten CD8-T-Zellantwort.

[0013] Die Domäne fähig zum Hervorrufen einer Immunantwort ist vorzugsweise ausgewählt aus immunogenen Peptiden oder Polypeptiden von M. bovis oder M. tuberculosis oder aus immunogenen Fragmenten davon. Spezifische Beispiele für geeignete Antigene sind Ag85B (p30) von M. tuberculosis (Harth et al., 1996), Ag85B (α -antigen) von M. bovis BCG (Matsuo et al., 1988), Ag85A von M. tuberculosis (Huygen et al., 1996) und ESAT-6 von M. tuberculosis (Sorensen et al., 1996, Harboe et al., 1996 und Andersen et al., 1995). Stärker bevorzugt ist die immunogene Domäne von dem Antigen Ag85B abgeleitet. Am meisten bevorzugt umfasst die immunogene Domäne die Sequenz von Aminosäure 41 bis Aminosäure 51 in SEQ ID No. 2.

[0014] Das erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuremolekül umfasst weiterhin eine phagolysosomale Escape-Domäne, d. h. eine Polypeptiddomäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht. Vorzugsweise ist die phagolysosomale Escape-Domäne von einem Organismus der Gattung Listeria abgeleitet. Stärker bevorzugt ist die phagolysosomale Escape-Domäne von dem Organismus L. monocytogenes abgeleitet. Am meisten bevorzugt ist die phagolysosomale Domäne kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus: (a) der Nukleotidsequenz von Nukleotid 211–1722 wie in SEQ ID No. 1 gezeigt, (b) einer Nukleotidsequenz, welche für dieselbe Aminosäuresequenz wie die Sequenz von (a) kodiert, und (c) einer Nukleotidsequenz hybridisierend unter stringenten Bedingungen mit der Sequenz von (a) oder (b).

[0015] Abgesehen von der Nukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 1 umfasst die vorliegende Erfindung ebenso Nukleinsäuresequenzen, welche damit hybridisieren. In der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Hybridisierung" wie in Sambrook et al. definiert verwendet (Molecular Cloning. A laboratory manual [Molekulares Klonen. Ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101–1.104). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Hybridisierung" verwendet, wenn ein positives Hybridisierungssignal noch nach Waschen für eine Stunde mit 1 X SSC und 0,1 % SDS bei 55°C beobachtet werden

kann, vorzugsweise bei 62°C und stärker bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1 Stunde in 0,2 X SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und stärker bevorzugt bei 68°C. Eine Sequenz, welche mit einer Nukleotidsequenz wie SEQ ID No. 1 unter derartigen Waschbedingungen hybridisiert, ist eine Nukleotidsequenz, welche eine phagolysosomale Escape-Domäne kodiert und welche erfindungsgemäß bevorzugt ist.

[0016] Vorzugsweise enthält das rekombinante Nukleinsäuremolekül, welches ein Fusionspolypeptid kodiert, eine signalpeptidkodierende Sequenz. Stärker bevorzugt ist die Signalsequenz eine Signalsequenz, welche in Mycobakterien aktiv ist, vorzugsweise in *M. bovis*, z. B. eine native *M. bovis*-Signalsequenz. Ein bevorzugtes Beispiel einer geeigneten Signalsequenz ist die Nukleotidsequenz kodierend das Ag85B-Signalpeptid, welche in SEQ ID No. 1 von Nukleotid 1 bis 120 dargestellt ist.

[0017] Weiterhin ist es bevorzugt, dass ein Peptidlinker zwischen der immunogenen Domäne und der phagolysosomalen Escape-Domäne vorgesehen wird. Vorzugsweise hat der Peptidlinker eine Länge von 5 bis 50 Aminosäuren. Stärker bevorzugt eine Sequenz kodierend einen Linker wie in SEQ ID No. 1 von Nukleotid 154 zu 210 gezeigt oder eine dazu korrespondierende Sequenz, was die Degeneration des genetischen Codes betrifft.

[0018] Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand betrifft einen rekombinanten Vektor umfassend wenigstens ein Kopie eines Nukleinsäuremoleküls wie oben definiert. Vorzugsweise ist der rekombinante Vektor ein prokaryotischer Vektor, d. h. ein Vektor, welcher Elemente zur Replikation oder/und genomischen Integration in prokaryotische Zellen enthält. Vorzugsweise trägt der rekombinante Vektor das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül operativ verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz. Die Expressionskontrollsequenz ist vorzugsweise eine Expressionskontrollsequenz, welche in Mycobakterien aktiv ist, insbesondere in *M. bovis*. Der Vektor kann ein extrachromosomaler Vektor oder ein Vektor sein, welcher zu einer Integration in das Chromosom geeignet ist. Beispiele derartiger Vektoren sind dem Fachmann bekannt und zum Beispiel in Sambrook et al., supra, angegeben.

[0019] Noch ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist eine Zelle, welche ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor wie oben definiert umfasst. Vorzugsweise ist die Zelle prokaryotisch, insbesondere eine Mycobacterium-Zelle. Weiterhin ist es bevorzugt, dass die Zelle fähig zum Exprimieren des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls ist.

[0020] In einem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt wird eine rekombinante Mycobacterium-bovis-Zelle bereitgestellt, welche wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül umfasst kodierend ein Fusionspolypeptid umfassend (a) wenigstens eine Domäne, welche fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht. Diesem Aspekt gemäß ist die immunogene Domäne nicht auf Mycobacterium-Antigene beschränkt und kann ausgewählt sein aus Autoantigenen, Tumorantigenen und Pathogenantigenen wie zum Beispiel Virusantigenen, Parasitenantigenen, bakteriellen Antigenen im Allgemeinen und immunogenen Fragmenten davon. Spezifische Beispiele für geeignete Tumorantigene sind menschliche Tumorantigene wie zum Beispiel das p53-Tumorsuppressor-Genprodukt (Houbiers et al., 1993) und Melanozytendifferenzierungsantigene, z. B. Melan-A/MART-1 und gp100 (van Elsas et al., 1996). Spezifische Beispiele für geeignete Virusantigene sind menschliche Tumovirusantigene wie zum Beispiel menschliche Papillomavirusantigene, z. B. Antigene E6 und E7 (Bosch et al., 1991), Influenzavirusantigene, z. B. Influenzavirus-Nukleoprotein (Matsui et al., 1995; Fu et al., 1997) oder retrovirale Antigene wie zum Beispiel HIV-Antigene, z. B. die HIV-1-Antigene p17, p24, RT und Env (Harrer et al., 1996; Haas et al., 1996). Spezifische Beispiele für geeignete Parasitenantigene sind Plasmodiumantigene wie zum Beispiel das Leberstadium-Antigen (liver stage antigen LSA-1), Circumsporozoitenprotein (CS oder allelische Varianten cp26 oder cp29), Thrombospondin-verwandtes anonymes Protein (thrombospondin related anonymous protein TRAP), threonin- und asparaginreiches Sporozoitenprotein (sporozoite threonine und asparagine rich protein STARP) von Plasmodium falciparum (Aidoo et al., 1995) und Toxoplasma-Antigene wie zum Beispiel p30 von Toxoplasma gondii (Khan et al., 1991; Bulow und Boothroyd, 1991). Spezifische Beispiele für geeignete bakterielle Antigene sind Legionella-Antigene wie zum Beispiel das Hauptsächliche Sekretorische Protein (Major secretory protein) von Legionella pneumophila (Blander und Horwitz, 1991).

[0021] Die erfindungsgemäße Zelle ist vorzugsweise fähig zum Sekretieren des Fusionspolypeptids, welches durch das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kodiert ist, und fähig zu seiner Bereitstellung in einer Form, welche für eine MHC-Klasse-1-restringierte Antigenerkennung geeignet ist.

[0022] Die rekombinante Mycobacterium-bovis-Zelle, welche erfindungsgemäß bereitgestellt wird, kann we-

nigstens ein weiteres rekombinantes, z. B. heterologes Nukleinsäuremolekül enthalten, welches ein Peptid oder Polypeptid kodiert, welches fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen. Das weitere immunogene Peptid oder Polypeptid kann ausgewählt sein aus Mycobacterium-Antigenen oder, in einem breiteren Sinn, aus Autoantigenen, Tumorantigenen, Pathogenantigenen und immunogenen Fragmente davon. Das Nukleinsäuremolekül, welches für das weitere Peptid oder Polypeptid kodiert, kann auf demselben Vektor wie das Fusionsgen gelegen sein. Jedoch kann es zum Beispiel ebenso auf einem anderen Plasmid unabhängig vom Fusionsgen gelegen sein, oder es kann chromosomal integriert sein.

[0023] Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine erfindungsgemäße Mycobacterium-Zelle eine intrazelluläre Persistenz in infizierten Zellen hat, z. B. Makrophagen, wobei die Persistenz gleich oder kleiner ist als die intrazelluläre Persistenz einer korrespondierenden nativen Mycobacterium-Zelle, welche das rekombinante Nukleinsäuremolekül nicht enthält.

[0024] Noch ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein rekombinantes Fusionspolypeptid kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül wie oben definiert. Das erfindungsgemäße Fusionspolypeptid verleiht einer Zelle die Fähigkeit einer verbesserten MHC-Klasse-I-restringierten Antigenerkennung.

[0025] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenso auf eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend als ein aktives Mittel eine Zelle oder ein Fusionspolypeptid wie oben definiert, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch akzeptablen Verdünnern, Trägern und Hilfsstoffen. Vorzugsweise ist die Zusammensetzung eine Lebendvakzine geeignet zur Verabreichung an einen Säuger, vorzugsweise einen Menschen. Der tatsächlich gewählte Impfweg hängt von der Wahl des Impfvektors ab. Eine Verabreichung kann mit einer einzelnen Dosis oder wiederholt in Intervallen durchgeführt werden. Die geeignete Dosierung hängt von verschiedenen Parametern ab, wie zum Beispiel dem Vakzinevektor selbst oder dem Verabreichungsweg. Eine Verabreichung auf eine mukosale Oberfläche (z. B. Okular, intranasal, oral, gastrisch, intestinal, rektal, vaginal oder den urinären Trakt) oder über den parenteralen Weg (z. B. subkutan, intradermal, intramuskulär, intravenös oder interperitoneal) kann gewählt werden.

[0026] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten bakteriellen Zelle wie oben definiert. Gemäß dem ersten Aspekt umfasst das Verfahren die Schritte (i) Inserieren eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls in eine bakterielle Zelle, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Fusionspolypeptid kodiert umfassend (a) wenigstens eine Domäne eines Mycobacterium-Polypeptids, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht, und (ii) Kultivieren der Zelle erhalten gemäß (i) unter geeigneten Bedingungen. Vorzugsweise wird eine Zelle erhalten, welche fähig ist, das Nukleinsäuremolekül zu exprimieren. Vorzugsweise ist die Zelle eine M. bovis-Zelle.

[0027] Gemäß dem zweiten Aspekt umfasst dieses Verfahren die Schritte (i) Inserieren eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls in eine Mycobacterium-bovis-Zelle, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Fusionspolypeptid kodiert umfassend (a) wenigstens eine Domäne von einem Polypeptid, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht, und (ii) Kultivieren der Zelle erhalten gemäß (i) unter geeigneten Bedingungen.

[0028] Falls gewünscht, umfasst das erfindungsgemäße Verfahren Inserieren von wenigstens einem weiteren rekombinanten Nukleinsäuremolekül in die Mycobacterium-bovis-Zelle, wobei das weitere rekombinante Nukleinsäuremolekül ein Peptid oder Polypeptid kodiert, welches fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen.

[0029] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Lebendvakzine umfassend Formulieren der rekombinanten Zelle in einer pharmazeutisch wirksamen Menge mit pharmazeutisch akzeptablen Verdünnern, Trägern und/oder Hilfsstoffen.

[0030] Die Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Figuren und Sequenzlisten erläutert.

[0031] **Fig. 1:** zeigt Plasmidkarten für eine Hly-Sekretion durch rekombinante BCG-Stämme.

A. Extrachromosomale Hly-Expression durch das Escherichia-coli-Mycobakterien-Shuttleplasmid pAT261:Hly. Insertion des pILH-1-abgeleiteten 1,7 kb Pst I-Fragments, welches die DNA-Sequenz des reifen Hly-Proteins kodiert. Abkürzungen: Mrep, mycobakterielles Replikon; Erep, E. coli Replikationsur-

sprung; kan, Kanamycinresistenzgen; hsp, Promotor des Wärmeschockproteins (heat shock protein).
 B. Chromosomaler integrativer Shuttlevektor pMV306:Hly für eine Hly-Expression durch Mycobakterien. Das inserierte DNA-Restriktionsfragment (Xba I – Sal I), welches den hsp60-Promotor einschließt, ist von Plasmid pAT261:Hly abgeleitet. Abkürzungen: attP, Bindungsstelle des Mycobakteriophagen L5 (attachment site of mycobacteriophage L5); MCS, mehrfache Klonierungsstelle (multiple cloning site); int, Integrase des Mycobakteriophagen L5.

[0032] Fig. 2: zeigt die Aminosäuresequenz der Hly-Fusion, welche durch BCG pAT261:Hly oder BCG pMV306:Hly exprimiert wird. Die Aminosäuresequenz, welche zu dem hly-genspezifischen offenen Leseraster korrespondiert, ist abgeleitet von der DNA-Sequenz der Mycobakterien-Expressionsplasmide pAT261:Hly oder pMV306:Hly. Das Hly-Fusionsprotein besteht aus den folgenden verschiedenen Polypeptidsequenzen: BCG-spezifisches Ag85B einschließlich Signalpeptid, unterstrichene Aminosäuresequenz im Einzelbuchstabencode (früher genannt α -Antigen; Matsuo et al., 1988); E. coli pHly152-spezifisches HlyA, kursive Buchstaben (Hess et al., 1986); reifes Hly, fette Buchstaben (Domann und Chakraborty, 1989); zufällige Aminosäuresequenz, normale Buchstaben. Die verwendeten Restriktionsstellen (Pst I und Nsi I) für korrespondierende Genfusionen werden unter der Aminosäuresequenz gezeigt.

[0033] Fig. 3: zeigt die Analyse der Hly-Expression durch rekombinantes BCG. Detektion des Hly-Fusionsproteins in Lysaten (L) oder Überständen (supernatants, S) von BCG-, BCG pAT261:Hly- oder BCG pMV306:Hly-Stämmen durch Immunfärbung. Kulturlysate und angereicherte Überstände der verschiedenen mycobakteriellen Stämme wurden durch SDS/10 Polyacrylamidgel getrennt und auf Hybond-PVDF-Membran übertragen. Der primäre Antikörper, welcher als chemilumineszente Immunfärbung des 62 kDa Hly-hybriden Proteins verwendet wurde, war anti-Hly mAb H14-3 (Nato et al, 1991).

[0034] Fig. 4: zeigt das intrazelluläre Wachstum und Cytotoxizität eines rekombinanten BCG-Stamms.

A. Überleben von Wildtyp-BCG- (■), BCG pAT261:Hly- (Δ) und BCG pMV306:Hly-Stämmen (◆) in menschlichen makrophagenähnlichen Zellen THP-1.

B. Überleben von Wildtyp-BCG- (■), BCG pAT261:Hly- (Δ) und BCG pMV306:Hly-Stämmen (◆) in J774A.1-makrophagenähnlichen Zellen der Maus. 3 h nach Infektion wurden r-BCG-spezifische CFU in Lysaten von infizierten Zellen bestimmt und wurden von Tag 0 bis Tag 15 überwacht. Die Daten werden als Mittel \pm SD (n=3) gezeigt.

C. Überstände und Zelllysate von J774A.1 wurden auf LDH-Aktivität nach BCG- oder r-BCG-Infektion getestet. J774A.1 (□), BCG (◇), BCG pMV306:Hly (◆), BCG pAT261:Hly (Δ) oder L. monocytogenes EGD (■).

[0035] Angezeigt ist der kumulative Prozentwert der gesamten LDH-Aktivität, welche im Überstand detektiert wurde (Mittel \pm SD). Dies ist ein repräsentatives von drei Experimenten. Der Prozentwert der in den Überstand freigesetzten LDH wurde als Maß für den Zelltod bestimmt.

SEQ ID No. 1: zeigt die Nukleotidsequenz eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls.

SEQ ID No. 2: zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz des Nukleinsäuremoleküls von SEQ ID No. 1.

Beispiele

1. Experimentelle Verfahren

1.1 Bakterienstämme und Plasmide

[0036] M. bovis BCG-Stamm Chicago (ATCC 27289) wurde in Dubos-Basisnährlösung (Difco) supplementiert mit Dubos-Albuminmedium (Difco) bei 37°C kultiviert. Eine mittlogarithmische Kultur wurde aliquotiert und bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt. L. monocytogenes EGD Sv 1/2a (Domann und Chakraborty, 1989), welches ursprünglich von G. B. Mackaness erhalten wurde, wurde in Gehirn-Herz-Infusionsnährlösung (brain heart infusion, BHI) (Difco) bei 37°C mit Belüftung wachsen gelassen. Plasmid pILH-1 war ein großzügiges Geschenk von Dres. I. Gentshev und W. Goebel (Universität Würzburg, Deutschland). Die Mycobakterien-E.-coli-Shuttlevektoren pAT261 und pMV306 wurden von MedImmune (Gaithersburg, U.S.A.) erhalten.

1.2 Enzyme und allgemeine genetische Techniken

[0037] Restriktionsenzyme (Boehringer Mannheim) und T4 DNA-Ligase (Pharmacia) wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet. Molekulares Klonieren und rekombinante DNA-Techniken wurden gemäß Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

1.3 DNA-Manipulationen und Sequenzieren

[0038] Extrachromosomales pAT261-Expressionsplasmid (parentaler Vektor pAB261; Stover et al., 1993) und integratives pMV306-Expressionsplasmid (parentaler Vektor pMV361; Stover et al., 1991) wurden zur Hly-Sekretion verwendet. Die Plasmide pAT261 und pMV306 haben gebräuchliche Elemente gemeinsam, die eine Expressionskassette, das Tn903-abgeleitete aph-Gen, welches Kanamycinresistenz als einen selektierbaren Marker verleiht, und einen E. coli-Replikationsursprung, welcher von pUC19 abgeleitet ist, einschließen. Sie unterscheiden sich durch die Insertion von entweder einem mycobakteriellen Plasmid-Replikationsursprung (pAT261) oder den attP- und int-Genen des Mycobakteriophagen L5 (pMV306). Das inserierte DNA-Fragment des M. bovis-BCG-spezifischen Ag85B-Gens in Plasmidkonstrukt pAT261 ist unter der Kontrolle des BCG-hsp60-Promotors. Die Pst I-Restriktionsstelle (Position 4404, MedImmune) stromabwärts der kodierenden Sequenz für das reife Ag85B-Protein wurde zum Konstruieren von Hly-abgeleiteten Fusionen verwendet, welche die hämolytische Aktivität von nativem Hly von L. monocytogenes EGD aufrechterhalten und durch das N-terminale Ag85B-spezifische Signalpeptid exportiert werden. Das 1,7 kb Pst I-Fragment (ursprüngliche Position 1357 und 4277; Hess et al., 1986) von der ursprünglichen Genfusion hly-hlyA kodiert durch Plasmid pILH-1 (Gentschev et al., 1995; Hess et al., 1996) wurde zum Konstruieren von pAT261:Hly verwendet. Die vollständige Xba-I-Sal-I-DNA-Expressionskassette wurde für das kodierte hybride Ag85B-Hly-Protein des Plasmids pAT261:Hly in das Plasmid pMV306 eingeführt, wobei die Expressionskassette den hsp60-Promotor einschließt. Dies resultierende Konstrukt wurde pMV306:Hly genannt. Die korrekte DNA-Sequenz dieser Plasmide an den Fragmentinsertionsstellen wurde unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide BCG-Hly5-GCTTTGTCCTGCTG und BCG-Hly3-GGAAGTCAGGGTGA (Sequierserve, Vaterstetten, Germany) bestimmt. Die DNA-Sequenzanalyse zeigte eine zufällige Insertion eines kurzen Pst I-DNA Fragments am 3'-Ende der hly-hlyA-Genfusion, welche für 11 Aminosäuren kodiert.

1.4 Charakterisierung rekombinanter M. bovis BCG-Stämme

[0039] Die Plasmide pAT261:Hly oder pMV306:Hly wurden in M. bovis BCG-Stamm Chicago durch ein Standard-Elektroporationsprotokoll (Langermann et al., 1994) eingeführt, und dann wurden rekombinante Kolonien auf Middlebrook 7H10-Agar supplementiert mit Kanamycin (15 µg/ml) selektiert. Kanamycinresistente Kolonien wurden für drei Wochen bis zur mittlogarithmischen Phase in Dubos-Flüssigmedien (Difco) wachsen gelassen, welche 10 % Dubos-Albuminmedium (Difco) und 15 µg/ml Kanamycin enthielten. Nach Waschen der Zellen in phosphatgepufferter Saline (PBS) plus Tween 80 wurde die Zellsuspension 20-fach in RIPA-Puffer (1 % NP-40, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) konzentriert, um die Zellen zu lysieren. Bakterienfreier Überstand (1 ml) dieser Kulturen wurde durch 0,2-µm-Membranfilter gefiltert. Das Hly-Fusionsprotein im Überstand wurde durch Inkubieren mit 100 µl Butylsepharose (Pharmacia) für 30 min bei Raumtemperatur in einer rotierenden Vorrichtung (Schoel et al., 1994) angereichert. Nach Zentrifugation (3000 rpm) wurde das Pellet in Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) gelöst. Danach wurden Proteine durch 10 % SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese wie früher beschrieben getrennt (Laemmli, 1970) und wurden auf Hybond-PVDF-Membranen (Amersham Life Science) übertragen. Immunfärbungen wurden mit dem anti-Hly mAb H14-3 (Nato et al., 1991) und Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Das Waschverfahren und die chemilumineszente Immundetektion wurden gemäß der Beschreibung des Herstellers durchgeführt [BM Westernblotting-Kit (Maus/Kaninchen) (Boehringer Mannheim)]. Die Signalentwicklung auf Röntgenfilm (Kodak, XOMAT-AR) wurde für 1 min durchgeführt.

[0040] Die hämolytische Aktivität von Überständen und Suspensionen mit ganzen Bakterien von BCG pAT261:Hly, BCG pMV306:Hly, BCG und L. monocytogenes wurde durch serielles Verdünnen der Proben in phosphatgepufferter Saline (PBS) bestimmt, welche 0,1 % Rinderserumalbumin enthält. Verdünnte Proben (100 µl) wurden nacheinander durch Hinzufügen von Cystein (20 mM Endkonzentration) aktiviert und wurden bei 37 °C für 45 min mit 50 µl Schaf-Erythrozyten (6×10^8 Zellen/ml in PBS, pH 6,0) in 96-Lochplatten inkubiert. Hämolytische Aktivitäten sind vollständige CHU, welche als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung definiert sind, bei welcher vollständige Hämolyse detektierbar ist (Gentschev et al., 1995).

1.5 In vitro-Analyse von mycobakteriellem Wachstum

[0041] Makrophagenähnlichen Zellen des Menschen und der Maus THP-1 (ATCC TIB-202) bzw. J774A.1 (ATCC TIB-67) wurde erlaubt, auf 24-Lochplatten (10^6 pro Loch) zu adhären. In Fall vom THP-1 wurde Adhärenz durch Stimulierung mit 10 nM PMA (Sigma) 48 h vor Infektion erzielt. Zellen wurden bei einer Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, moi) von 10 Mycobakterien (BCG, BCG pAT261:Hly oder BCG pMV306:Hly) bezogen auf eine Zelle für 3 h infiziert. Sofort nach Infektion wurden CFU durch Platieren serieller Verdünnungen von Überständen und Zelllysaten auf 7H10-Agar angereichert mit Bacto-Middlebrook-OADC

(Difco) und entsprechend 15 µg/ml Kanamycin bestimmt. Der Grad der mycobakteriellen Aufnahme durch Makrophagen war vergleichbar. Die verbleibenden Proben infizierter Makrophagen wurden mit PBS gewaschen und weitere 14 Tage in Anwesenheit von 200 µg/ml Gentamycin inkubiert. Intrazelluläres Wachstum rekombinanter BCG-Stämme wurde durch CFU-Analyse nach 1, 8 oder 15 Tagen nach Infektion (post Infektion, p. i.) bestimmt.

1.6 LDH-Freisetzung

[0042] Die Cytotoxizität rekombinanter BCG-Stämme und *L. monocytogenes* EGD als positive Kontrolle wurde durch Messen der LDH-Freisetzung durch infizierte J774A.1-Makrophagen bestimmt. Die Kulturüberstände und Zelllysate von BCG-, BCG pAT261:Hly-, BCG pMV306:Hly- oder *L. monocytogenes* EGD-infizierten J774A.1-Makrophagen wurden auf LDH-Aktivität getestet, indem ein Quantifizierungs-Kit von Promega verwendet wurde. J774A.1-Zellen (10^4 pro Loch) wurden in 96-Lochplatten gesät und bei einem moi von 10 infiziert. Eine Stunde nach Infektion wurde Gentamycin (Endkonzentration 200 µg/ml) zu den Proben hinzugefügt. Die LDH-Aktivität wurde nach 3, 4, 5 oder 24 h p. i. gemäß den Anweisungen des Herstellers quantitativ analysiert. Der Prozentwert der Cytotoxizität wurde wie folgt berechnet: % Cytotoxizität = $(J774A.1\text{-infiziert} - J774A.1\text{ spontan}) / (J774A.1\text{ Maximum} - J774A.1\text{ spontan} \times 100)$.

2. Ergebnisse

2.1 Konstruktion der Mycobakterien-Escherichia-coli-Shuttle-Expressionsvektoren pAT261:Hly und pMV306:Hly

[0043] Um die phagolysosomale Escape-Funktion [vermittelt durch Hly von *L. monocytogenes* EGD Sv 1/2a (Domann und Chakraborty, 1989)] auf BCG Chicago zu transferieren, wurden zwei verschiedene *E. coli*-Mycobakterien-Shuttlevektoren pAT261 und pMV306 verwendet. Der Vektor pAT261 der zweiten Generation, ein pMV261-Derivat (Stover et al., 1991), steuert eine extrachromosomale Hly-Expression mit etwa fünf Plasmidkopien bezogen auf das BCG-Genom, und das integrative Plasmid pMV306, ein Derivat von pMV361, ermöglicht eine stabile chromosomale Expression von Hly ([Fig. 1](#)) (Stover et al., 1991).

[0044] Ein pILH-1-abgeleitetes 1,7 kb Pst I-DNA Fragment, welches ein offenes Leseraster (open reading frame ORF) von hly-hlyA (*E. coli* pHly152-spezifisches Hämolyysin A) kodiert, wurde in eine Pst I-Stelle von Plasmid pAT261 (Gentschev et al., 1995; Stover et al., 1993) inseriert. Diese resultierende Genfusion kodiert für die Expression sekretierter Proteine, welche durch das BCG-spezifische Ag85B-Signalpeptid (Matsuo et al., 1990) in den Überstand geleitet werden. Das Konstrukt wurde pAT261:Hly genannt, und seine Xba-I-Sal-I-DNA-Expressionskassette unter transkriptioneller Kontrolle des mycobakteriellen hsp60-Promotors wurde danach zur Insertion in den parentalen pMV306-Vektor verwendet, was zu dem Konstrukt pMV306:Hly ([Fig. 1](#)) führte. Die DNA-Sequenz der hly-spezifischen Insertionsstellen in beiden mycobakteriellen Expressionsplasmiden, welche die kodierende Sequenz für das BCG-spezifische Ag85B-Signalpeptid einschließen, wurde analysiert (Matsuo et al., 1990). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des vollständigen Hly-Fusionsproteins wird in [Fig. 2](#) gezeigt. Das reife Hly-Fusionsprotein besteht aus 30 Aminosäuren (aa) am N-Terminus und 52 aa am C-terminalen Teil der Fusion, welche ursprünglich zu HlyA von *E. coli* gehören (Gentschev et al., 1995).

[0045] Danach wurde jedes Plasmidkonstrukt pAT261:Hly oder pMV306:Hly in den BCG Chicago-Stamm elektroporiert, was zu BCG pAT261:Hly oder BCG pMV306:Hly mit Hly-Plasmidexpression bzw. chromosomaler Hly-Expression führte.

2.2 Analyse der Hly-Expression in BCG pAT261:Hly und BCG pMV306:Hly

[0046] Um die Hly-Sekretion durch den BCG pAT261:Hly- oder durch den BCG pMV306:Hly-Stamm zu charakterisieren, wurden geeignete Überstände und mycobakterielle Lysate mittlogarithmisch gewachsener Kulturen gemäß Stover et al. (1993) hergestellt. Die Hly-Fusion wurde über hydrophobe Interaktionschromatographie angereichert, um die beobachtete Kreuzreaktivität von anti-Hly-monoklonalen Antikörpern (mAb) zu überwinden, welche zur Immunfärbung verfügbar sind (Schoel et al., 1994; Nato et al., 1991). Das Hly-Fusionsprotein ist in Lysaten und Überständen von beiden mycobakteriellen Stämmen BCG pAT261:Hly und BCG pMV306:Hly detektierbar ([Fig. 3](#)). Die vorhergesagte Größe 62 kDa des Hly-abgeleiteten Polypeptids ist leicht größer als diejenige des ursprünglichen 58 kDa Hly-Proteins von *L. monocytogenes*.

[0047] Um die Porenbildungskapazität des Hly-Fusionsproteins zu charakterisieren, welches durch BCG pAT261:Hly und BCG pMV306:Hly sekretiert wird, wurde die hämolytische Aktivität von Suspensionen mit gan-

zen Bakterien und Überständen bestimmt. Die Proben von BCG pAT261:Hly und BCG pMV306:Hly zeigen hämolytische Aktivität auf Schaf-Erythrozyten (Tabelle 1), was ausdrücklich einen erfolgreichen Transfer einer cytolytischen Hly-Funktion auf mycobakterielle Spezies beweist.

Tabelle 1 Hämolytische Aktivitäten von Überstand und Suspensionen mit ganzen Bakterien von rekombinanten BCG-Stämmen und *L. monocytogenes* EGD

| Stamm | Hämolytische Aktivität (CHU) ^a | |
|-----------------------------|---|--|
| | Überstand | Suspension mit ganzen Bakterien ^b |
| <i>L. monocytogenes</i> EGD | 8 | 16 |
| BCG pAT261:Hly | 2 | 4 |
| BCG pMV306:Hly | 2 | 4 |
| BCG | ND ^c | ND |

^a Die hämolytische Aktivität ist in vollständigen Einheiten (complete hemolytic units CHU) angegeben, welche als der Reziprokwert der höchsten Verdünnung mit vollständiger Hämolyse definiert sind.

^b Extrazelluläre und membrangebundene hämolytische Aktivität.

^c ND, nicht detektierbar.

2.3 Wachstum rekombinanter BCG-Stämme in Makrophagen

[0048] Überleben von BCG pAT261:Hly- oder BCG pMV306:Hly-Mikroorganismen in Wirtszellen wurde durch mycobakterielle CFU von infizierten Makrophagen an Tag 1, 8 oder 15 nach Infektion (post Infektion p. i.) beobachtet. Die menschliche Monozytenzelllinie THP-1 (ATCC TIB-202) und die makrophagenähnliche Zelllinie J774A.1 (ATCC TIB-67) der Maus wurden als mycobakterielle Zielzellen verwendet. Mit Phorbolmyristataacetat (PMA) stimulierte THP-1-Zellen ähneln nativen menschlichen monozytenabgeleiteten Makrophagen (Tsuchiya et al., 1982). Drei Stunden nach Infektion von THP-1- oder J774A.1-Zellen wurde die Effizienz einer mycobakteriellen Phagozytose bestimmt. Eine nachfolgende Langzeitkultur wurde in Anwesenheit von 200 µg/ml Gentamycin durchgeführt, um freigesetzte oder nichtphagozytierte Mycobakterien im Überstand zu töten. Wie in [Fig. 4](#) dargestellt, hörten alle BCG-Stämme, BCG pAT261:Hly und BCG pMV306:Hly, in allen Wirtszelltypen auf zu wachsen. Überdies zeigten BCG pMV306:Hly-Bakterien eine beeinträchtigte intrazelluläre Persistenz in THP-1- und J774A.1-Wirtszellen verglichen mit dem parentalen BCG-Stamm. Bemerkenswerterweise war die intrazelluläre Überlebensrate von BCG pMV306:Hly-Bakterien in THP-1-Makrophagen schon an Tag 1 p. i. bezüglich zu Werten von BCG- oder BCG pAT261:Hly-infizierten Proben reduziert.

[0049] Im Gegensatz dazu war die intrazelluläre Persistenz von BCG pMV306:Hly vergleichbar zu BCG in THP-1 ([Fig. 4](#)). Interessanterweise waren an Tag 15 p. i. lebensfähige BCG pAT261:Hly-Bakterien in infizierten J774A.1-Zellen nicht detektierbar, was eine vollständige Wachstumsinhibition dieser mycobakteriellen Konstrukte wenigstens in Anwesenheit von Gentamycin nahelegt.

[0050] Um Einblicke in die beeinträchtigte intrazelluläre Persistenz von BCG pAT261:Hly- und BCG pMV306:Hly-Stämmen zu gewinnen, wurde die Cytotoxizität dieser rekombinanten BCG-Stämme für J774A.1-Makrophagen in Kurzzeitkulturen bestimmt. Cytotoxizität wurde durch Messen von Lactat-Dehydrogenaseaktivität (LDH-Aktivität) in Überständen von Wirtszellen infiziert mit BCG, BCG pAT261:Hly, BCG pMV306:Hly oder *L. monocytogenes* EGD 3, 4, 5 und 24 h p. i. analysiert. 24 h p. i. unterschied sich die Menge der in Überstände freigesetzten LDH nicht signifikant zwischen parental BCG-, BCG pAT261:Hly- oder BCG pMV306:Hly-infizierten und nichtinfizierten Wirtszellen ([Fig. 4](#)). Im Gegenteil verursachte der schnellwachsende und hämolytische *L. monocytogenes* EGD-Stamm eine große LDH-Freisetzung in den Überstand innerhalb von 24 h p. i. Diese Daten lassen darauf schließen, dass eine Sekretion von hämolytischem Hly durch rekombinante BCG-Stämme die Cytotoxizität des parental BCG-Stamms nicht veränderte. Vielmehr zeigten beide

BCG pAT261:Hly- und BCG pMV306:Hly-Stämme eine beeinträchtigte Persistenz in Mausmakrophagen verglichen mit dem nichtrekombinanten BCG-Träger.

Referenzen

- Aidoo, M., Lalvani, A., Allsopp, C.E.M. et al. (1995), Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria, *The Lancet* 345: 1003.
- Andersen, P. (1994), Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial protein, *Infect. Immun.* 62: 2536-2544.
- Andersen, P., Andersen, A.B., Sorensen, A.L. und Nagai, S. (1995), Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice, *J. Immunol.* 154: 3359.
- Berche, P., Gaillard, J.L. und Sansonetti, P.J. (1987), Intracellular growth of *L. monocytogenes* as a prerequisite for in vivo induction of T cell-mediated immunity, *J. Immunol.* 138: 2266-2276.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P. und Portnoy, D. A. (1990), *Bacillus subtilis* expressing a hemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells, *Nature* 354: 175-176.
- Blander, S.J. und Horwitz, M.A. (1991), Vaccination with a major secretory protein of *Legionella* induces humoral and cell-mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*, *J. Immunol.* 147: 285.
- Bosch, F.X., Durst, M., Schwarz, E., Boukamp, P., Fusenig, N.E. und zur Hausen, H. (1991), The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression?, *Behring Inst. Mitt.* 108.
- Bulow, R. und Boothroyd, J.C. (1991), Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes, *J. Immunol.* 147: 3496.
- Clemens, D.L. und Horwitz, M.A. (1996), The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin, *J. Exp. Med.* 184: 1349-1355.
- Darji, A., Chakraborty, T., Wehland, J. und Weiss, S. (1996), Listeriolysin generates a route for the presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex class I, *Eur. J. Immunol.* 25: 2967-2971.
- Domann, E. und Chakraborty, T. (1989), Nucleotide sequence of the listeriolysin gene from a *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strain, *Nucleic Acids Res.* 17: 6406.
- Flesch, I., Hess, J.H., Oswald, I.P. und Kaufmann, S.H.E. (1994), Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN- γ stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor- α and by IL-10, *Int. Immunol.* 6: 693-700.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B. und Bloom, B.R. (1992), Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12013-12017.
- Fu, T.M., Friedman, A., Ulmer, J.B., Liu, M.A. und Donnelly, J.J. (1997), Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced DNA immunization, *J. Virol.* 71: 2715.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. und Sansonetti, P.J. (1987), In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2, *Infect. Immun.* 55: 2822-2829.
- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Mollenkopf, H.-J., Hess, J., Kaufmann, S.H.E., Kuhn, M., Krohne, G.F. und Goebel, W. (1995), *Salmonella* secreting active listeriolysin changes its intracellular localization, *Infect. Immun.* 63: 4202-4205.
- Grange, J.M. (1996), Epidemiological aspects of drug resistance, in *Mycobacteria and human disease*, Arnold, London, Seiten 124-125.
- Haas, G., Plikat, U., Debre, P., Lucchiari, M., Katlama, C., Dudoit, Y., Bonduelle, O., Bauer, M., Ihlenfeldt, H.G., Jung, G., Maier, B., Meyerhans, A. und Autran, B. (1996), Dynamics of viral variants in HIV-1 Nef and specific cytotoxic T lymphocytes in vivo, *J. Immunol.* 157: 4212.
- Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H.G. et al. (1996), Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG, *Infect. Immun.* 64: 16.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S.A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R.P., Elbeik, T., Feinberg, M.B., Buchbinder, S.P. und Walker, B.D. (1996), Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load, *J. Immunol.* 156: 2616.
- Harth, G., Lee, B.-Y., Wang, J., Clemens, D.L. und Horwitz, M.A. (1996), Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immun.* 64: 3038-3047.
- Hess, J., Wels, W., Vogel, M. und Goebel, W. (1986), Nucleotide sequence of plasmid-encoded hemolysin de-

- terminant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence, *FEMS Lett.* 34: 1-11.
- Hess, J. und Kaufmann, S.H.E. (1993), Vaccination strategies against intracellular microbes, *FEMS Microbiol. Immunol.* 7: 95-103.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. und Kaufmann, S.H.E. (1996), Superior efficacy of secreted over somatic p60 or listeriolysin antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1458-1463.
- Hess, J. und Kaufmann, S.H.E. (1997), Principles of cell-mediated immunity underlying vaccination strategies against intracellular pathogens, in *Host Response to Intracellular Pathogens*, S.H.E. Kaufmann (Hrsg.), R.G. Landes Co., Austin, Seiten 75-90.
- Horwitz, M.A., Lee, B.-W. E., Dillon, B.J. und Harth, G. (1995), Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1530-1534.
- Houbiers, J.G.A., Nijman, H.W., van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., Kenemans, P., van de Velde, C.J.H., Brand, A., Momburg, F., Kast, W.M. und Melief, C.J.M. (1993), In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53, *Eur. J. Immunol.* 23: 2072.
- Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Orme, I.M., Baldwin, S., D'Souza, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandenbussche, P., Van Vooren, J.-P., Liu, M.A. und Ulmer, J.B. (1996), Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine, *Nat. Med.* 2: 893-898.
- Kaufmann, S.H.E. (1993), Immunity to intracellular bacteria, *Annu. Rev. Immunol.* 11: 129-163.
- Khan, I.A., Ely, K.H. und Kasper, L.H. (1991), A purified parasite antigen (p30) mediates CD8 T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice, *J. Immunol.* 147: 3501.
- King, C.H., Mundayoor, S., Crawford, J.T. und Shinnik, T.M. (1993), Expression of contact-dependent cytolytic activity by *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the genomic locus that encodes the activity, *Infect. Immun.* 61: 2708-2712.
- Kochi, A. (1991), The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization, *Tubercle* 72: 1-6.
- Ladel, C.H., Daugelat, S. und Kaufmann, S.H.E. (1995), Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance, *Eur. J. Immunol.* 25: 377-384.
- Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685.
- Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J.E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E. und Stover, C.K. (1994), Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant Bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A., *J. Exp. Med.* 180: 2277-2286.
- Matsui, M., Moots, R.J., Warburton, R.J., Peace-Brewer, A., Tussey, L.G., Quinn, D.G., McMichael, A.J. und J.A. Frelinger (1995), Genetic evidence for differences between intracellular peptides of influenza A matrix peptide-specific CTL recognition, *J. Immunol.* 154: 1088.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K. und Yamada, T. (1990), Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen, *J. Bacteriol.* 170: 3847-3854.
- Mazzaccaro, R.Z., Gedde, M., Jensen, E.R., Van Santen, H.M., Ploegh H.L., Rock, K.L. und Bloom, B.R. (1996), Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11786-11791.
- McDonough, K.A., Kress, Y. und Bloom, B.R. (1993), Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages, *Infect. Immun.* 61: 2763-2773.
- Murray, P.J., Aldovini, A. und Young, R.A. (1996), Manipulation and potentiation of anti-mycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 934-939.
- Nato, F., Reich, K., Lhopital, S., Rouye, S., Geoffroy, C., Mazie, J.C. und Cossart, P. (1991), Production and characterization of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against listeriolysin O., *Infect. Immun.* 59: 4641-4646.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S. und Hinrichs, D.J. (1988), Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*, *J. Exp. Med.* 167: 1459-1471.
- Roche, P.W., Triccas, J.A. und Winter, N. (1995), BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes, *Trends Microbiol.* 3: 397-401.
- Russell, D.G. (1995), *Mycobacterium* and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. *Trends in Cell Biology* 5: 125-128.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schoel, B., Welzel, M. und Kaufmann, S.H.E. (1994), Hydrophobic interaction chromatography for the purification of cytolytic bacterial toxins, *J. Chromatography A* 667: 131-139.

- Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. und Andersen, A.B. (1995), Purification and characterization of a low-molecular-mass-T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immun.* 63: 1710.
- Stover, C.K., Bansal, G.P., Hanson, M.S. Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Young, J.F., Koenig, S., Young, D.B., Sadziene, A., Barbour, A.G. (1993), Protective immunity elicited by recombinant Bacille Calmette Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: A candidate Lyme disease vaccine, *J. Exp. Med.* 178: 197-209.
- Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, W.R., Jr. und Bloom, B.R. (1991), New use of BCG for recombinant vaccines, *Nature* 351: 456-460.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. und Russell, D.G. (1994), Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase, *Science* 263: 678-681.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. und Tada, K. (1982), Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, *Cancer Res.* 42: 1530-1536.
- Tweten, R.K. (1995), Pore-forming toxins of gram-positive bacteria, in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, J.A. Roth et al. (Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., Seiten 207-228.
- van Elsas, A., van der Burg, S.H., van der Minne, C.E., Borghi, M., Mourer, J.S., Melief, C.J.M. und Schrier, P.I. (1996), Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from Melan-A/MART-1 self antigen, *Eur. J. Immunol.* 26: 1683.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
- (B) STRASSE: Hofgartenstraße 2
- (C) STADT: München
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 80539

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Tuberkulosevakzine

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) MEDIENTYP: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Fassung #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1881 Basenpaaren
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) POSITION:1..1878

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| ATG ACA GAC GTG AGC CGA AAG ATT CGA GCT TGG GGA CGC CGA TTG ATG | 48 |
| Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met | |
| 1 5 10 15 | |
| ATC GGC ACG GCA GCG GCT GTA GTC CTT CCG GGC CTG GTG GGG CTT GCC | 96 |
| Ile Gly Thr Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala | |
| 20 25 30 | |
| GGC GGA GCG GCA ACC GCG GGC GCG TTC TCC CGG CCG GGG CTG CCG GTC | 144 |
| Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val | |
| 35 40 45 | |
| GAG TAC CTG CAG TCT GCA AAG CAA TCC GCT GCA AAT AAA TTG CAC TCA | 192 |
| Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser | |
| 50 55 60 | |
| GCA GGA CAA AGC ACG AAA GAT GCA TCT GCA TTC AAT AAA GAA AAT TCA | 240 |
| Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser | |
| 65 70 75 80 | |

DE 698 36 588 T2 2007.04.05

| | |
|---|-----|
| ATT TCA TCC ATG GCA CCA CCA GCA TCT CCG CCT GCA AGT CCT AAG ACG | 288 |
| Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr | |
| 85 90 95 | |
| CCA ATC GAA AAG AAA CAC GCG GAT GAA ATC GAT AAG TAT ATA CAA GGA | 336 |
| Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| TTG GAT TAC AAT AAA AAC AAT GTA TTA GTA TAC CAC GGA GAT GCA GTG | 384 |
| Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val | |
| 115 120 125 | |
| ACA AAT GTG CCG CCA AGA AAA GGT TAC AAA GAT GGA AAT GAA TAT ATT | 432 |
| Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile | |
| 130 135 140 | |
| GTT GTG GAG AAA AAG AAG AAA TCC ATC AAT CAA AAT AAT GCA GAC ATT | 480 |
| Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile | |
| 145 150 155 160 | |
| CAA GTT GTG AAT GCA ATT TCG AGC CTA ACC TAT CCA GGT GCT CTC GTA | 528 |
| Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val | |
| 165 170 175 | |
| AAA GCG AAT TCG GAA TTA GTA GAA AAT CAA CCA GAT GTT CTC CCT GTA | 576 |
| Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val | |
| 180 185 190 | |
| AAA CGT GAT TCA TTA ACA CTC AGC ATT GAT TTG CCA GGT ATG ACT AAT | 624 |
| Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn | |
| 195 200 205 | |
| CAA GAC AAT AAA ATC GTT GTA AAA AAT GCC ACT AAA TCA AAC GTT AAC | 672 |
| Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn | |
| 210 215 220 | |
| AAC GCA GTA AAT ACA TTA GTG GAA AGA TGG AAT GAA AAA TAT GCT CAA | 720 |
| Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln | |
| 225 230 235 240 | |
| GCT TAT CCA AAT GTA AGT GCA AAA ATT GAT TAT GAT GAC GAA ATG GCT | 768 |
| Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala | |
| 245 250 255 | |
| TAC AGT GAA TCA CAA TTA ATT GCG AAA TTT GGT ACA GCA TTT AAA GCT | 816 |
| Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala | |
| 260 265 270 | |
| GTA AAT AAT AGC TTG AAT GTA AAC TTC GGC GCA ATC AGT GAA GGG AAA | 864 |
| Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys | |
| 275 280 285 | |
| ATG CAA GAA GAA GTC ATT AGT TTT AAA CAA ATT TAC TAT AAC GTG AAT | 912 |
| Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn | |
| 290 295 300 | |
| GTT AAT GAA CCT ACA AGA CCT TCC AGA TTT TTC GGC AAA GCT GTT ACT | 960 |
| Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr | |
| 305 310 315 320 | |

DE 698 36 588 T2 2007.04.05

| | |
|---|------|
| AAA GAG CAG TTG CAA GCG CTT GGA GTG AAT GCA GAA AAT CCT CCT GCA | 1008 |
| Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala | |
| 325 330 335 | |
| TAT ATC TCA AGT GTG GCG TAT GGC CGT CAA GTT TAT TTG AAA TTA TCA | 1056 |
| Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser | |
| 340 345 350 | |
| ACT AAT TCC CAT AGT ACT AAA GTA AAA GCT GCT TTT GAT GCT GCC GTA | 1104 |
| Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val | |
| 355 360 365 | |
| AGC GGA AAA TCT GTC TCA GGT GAT GTA GAA CTA ACA AAT ATC ATC AAA | 1152 |
| Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys | |
| 370 375 380 | |
| AAT TCT TCC TTC AAA GCC GTA ATT TAC GGA GGT TCC GCA AAA GAT GAA | 1200 |
| Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu | |
| 385 390 395 400 | |
| GTT CAA ATC ATC GAC GGC AAC CTC GGA GAC TTA CGC GAT ATT TTG AAA | 1248 |
| Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys | |
| 405 410 415 | |
| AAA GGC GCT ACT TTT AAT CGA GAA ACA CCA GGA GTT CCC ATT GCT TAT | 1296 |
| Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr | |
| 420 425 430 | |
| ACA ACA AAC TTC CTA AAA GAC AAT GAA TTA GCT GTT ATT AAA AAC AAC | 1344 |
| Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn | |
| 435 440 445 | |
| TCA GAA TAT ATT GAA ACA ACT TCA AAA GCT TAT ACA GAT GGA AAA ATT | 1392 |
| Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile | |
| 450 455 460 | |
| AAC ATC GAT CAC TCT GGA GGA TAC GTT GCT CAA TTC AAC ATT TCT TGG | 1440 |
| Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp | |
| 465 470 475 480 | |
| GAT GAA GTA AAT TAT GAT CCT GAA GGT AAC GAA ATT GTT CAA CAT AAA | 1488 |
| Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys | |
| 485 490 495 | |
| AAC TGG AGC GAA AAC AAT AAA AGC AAG CTA GCT CAT TTC ACA TCG TCC | 1536 |
| Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser | |
| 500 505 510 | |
| ATC TAT TTG CCA GGT AAC GCG AGA AAT ATT AAT GTT TAC GCT AAA GAA | 1584 |
| Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu | |
| 515 520 525 | |
| TGC ACT GGT TTA GCT TGG GAA TGG TGG AGA ACG GTA ATT GAT GAC CGG | 1632 |
| Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg | |
| 530 535 540 | |
| AAC TTA CCA CTT GTG AAA AAT AGA AAT ATC TCC ATC TGG GGC ACC ACG | 1680 |
| Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr | |
| 545 550 555 560 | |

| | |
|---|------|
| CTT TAT CCG AAA TAT AGT AAT AAA GTA GAT AAT CCA ATC GAA TAT GCA | 1728 |
| Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala | |
| 565 570 575 | |
| | |
| TTA GCC TAT GGA AGT CAG GGT GAT CTT AAT CCA TTA ATT AAT GAA ATC | 1776 |
| Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile | |
| 580 585 590 | |
| | |
| AGC AAA ATC ATT TCA GCT GCA GTT CTT TCC TCT TTA ACA TCG AAG CTA | 1824 |
| Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu | |
| 595 600 605 | |
| | |
| CCT GCA GAG TTC GTT AGG CGC GGA TCC GGA ATT CGA AGC TTA TCG ATG | 1872 |
| Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met | |
| 610 615 620 | |
| | |
| TCG ACG TAG | 1881 |
| Ser Thr | |
| 625 | |

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 626 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | |
|---|--|
| Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met | |
| 1 5 10 15 | |
| | |
| Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala | |
| 20 25 30 | |
| | |
| Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val | |
| 35 40 45 | |
| | |
| Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser | |
| 50 55 60 | |
| | |
| Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser | |
| 65 70 75 80 | |
| | |
| Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr | |
| 85 90 95 | |
| | |
| Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| | |
| Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val | |
| 115 120 125 | |
| | |
| Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile | |
| 130 135 140 | |
| | |
| Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile | |
| 145 150 155 160 | |

DE 698 36 588 T2 2007.04.05

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Val | Asn | Ala | Ile | Ser | Ser | Leu | Thr | Tyr | Pro | Gly | Ala | Leu | Val | 165 | 170 | 175 |
| Lys | Ala | Asn | Ser | Glu | Leu | Val | Glu | Asn | Gln | Pro | Asp | Val | Leu | Pro | Val | 180 | 185 | 190 |
| Lys | Arg | Asp | Ser | Leu | Thr | Leu | Ser | Ile | Asp | Leu | Pro | Gly | Met | Thr | Asn | 195 | 200 | 205 |
| Gln | Asp | Asn | Lys | Ile | Val | Val | Lys | Asn | Ala | Thr | Lys | Ser | Asn | Val | Asn | 210 | 215 | 220 |
| Asn | Ala | Val | Asn | Thr | Leu | Val | Glu | Arg | Trp | Asn | Glu | Lys | Tyr | Ala | Gln | 225 | 230 | 235 |
| Ala | Tyr | Pro | Asn | Val | Ser | Ala | Lys | Ile | Asp | Tyr | Asp | Asp | Glu | Met | Ala | 245 | 250 | 255 |
| Tyr | Ser | Glu | Ser | Gln | Leu | Ile | Ala | Lys | Phe | Gly | Thr | Ala | Phe | Lys | Ala | 260 | 265 | 270 |
| Val | Asn | Asn | Ser | Leu | Asn | Val | Asn | Phe | Gly | Ala | Ile | Ser | Glu | Gly | Lys | 275 | 280 | 285 |
| Met | Gln | Glu | Glu | Val | Ile | Ser | Phe | Lys | Gln | Ile | Tyr | Tyr | Asn | Val | Asn | 290 | 295 | 300 |
| Val | Asn | Glu | Pro | Thr | Arg | Pro | Ser | Arg | Phe | Phe | Gly | Lys | Ala | Val | Thr | 305 | 310 | 315 |
| Lys | Glu | Gln | Leu | Gln | Ala | Leu | Gly | Val | Asn | Ala | Glu | Asn | Pro | Pro | Ala | 325 | 330 | 335 |
| Tyr | Ile | Ser | Ser | Val | Ala | Tyr | Gly | Arg | Gln | Val | Tyr | Leu | Lys | Leu | Ser | 340 | 345 | 350 |
| Thr | Asn | Ser | His | Ser | Thr | Lys | Val | Lys | Ala | Ala | Phe | Asp | Ala | Ala | Val | 355 | 360 | 365 |
| Ser | Gly | Lys | Ser | Val | Ser | Gly | Asp | Val | Glu | Leu | Thr | Asn | Ile | Ile | Lys | 370 | 375 | 380 |
| Asn | Ser | Ser | Phe | Lys | Ala | Val | Ile | Tyr | Gly | Gly | Ser | Ala | Lys | Asp | Glu | 385 | 390 | 395 |
| Val | Gln | Ile | Ile | Asp | Gly | Asn | Leu | Gly | Asp | Leu | Arg | Asp | Ile | Leu | Lys | 405 | 410 | 415 |
| Lys | Gly | Ala | Thr | Phe | Asn | Arg | Glu | Thr | Pro | Gly | Val | Pro | Ile | Ala | Tyr | 420 | 425 | 430 |
| Thr | Thr | Asn | Phe | Leu | Lys | Asp | Asn | Glu | Leu | Ala | Val | Ile | Lys | Asn | Asn | 435 | 440 | 445 |
| Ser | Glu | Tyr | Ile | Glu | Thr | Thr | Ser | Lys | Ala | Tyr | Thr | Asp | Gly | Lys | Ile | 450 | 455 | 460 |
| Asn | Ile | Asp | His | Ser | Gly | Gly | Tyr | Val | Ala | Gln | Phe | Asn | Ile | Ser | Trp | 465 | 470 | 475 |

```

Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
      485                      490                      495

Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser
      500                      505                      510

Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu
      515                      520                      525

Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg
      530                      535                      540

Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr
      545                      550                      555                      560

Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala
      565                      570                      575

Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile
      580                      585                      590

Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu
      595                      600                      605

Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
      610                      615                      620

Ser Thr
      625

```

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend ein Fusionspolypeptid umfassend (a) wenigstens eine Domäne eines Mycobacterium-Polypeptids, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht.

2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, wobei die phagolysosomale Escape-Domäne aus einem Organismus der Gattung *Listeria* stammt.

3. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die phagolysosomale Domäne kodiert ist durch ein Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus:

- (a) der Nukleotidsequenz von Nukleotid 211-1722 wie in SEQ ID No. 1 gezeigt,
- (b) einer Nukleotidsequenz, welche für dieselbe Aminosäuresequenz wie die Sequenz von (a) kodiert, und
- (c) einer Nukleotidsequenz hybridisierend unter stringenten Bedingungen mit der Sequenz von (a) oder (b).

4. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Domäne, welche fähig ist, eine Immunantwort hervorzurufen, ein Peptid oder Polypeptid ist, welches fähig, MHC-Klasse-I-restringierte CD8-T-Zellantworten hervorzurufen.

5. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Domäne, welche fähig ist, eine Immunantwort hervorzurufen, ausgewählt ist aus den Mycobacterium-Antigenen Ag85B (*M. tuberculosis*), Ag85B (*M. bovis*), Ag85A (*M. tuberculosis*) und ESAT-6 (*M. tuberculosis*) oder einem immunogenen Fragment davon.

6. Nukleinsäure gemäß Anspruch 5, wobei die Domäne, welche fähig ist, eine Immunantwort hervorzurufen, das Antigen Ag85B oder ein immunogenes Fragment davon ist.

7. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei dem Fusionspolypeptid eine Signalpeptidsequenz voransteht.

8. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei ein Peptidlinker zwischen der eine Immunantwort hervorruufenden Domäne und der phagolysosomalen Domäne angeordnet ist.
9. Rekombinanter Vektor umfassend wenigstens eine Kopie eines Nukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Vektor gemäß Anspruch 9, wobei das Nukleinsäuremolekül operativ mit einer Expressionskontrollsequenz verbunden ist.
11. Vektor gemäß Anspruch 10, wobei die Expressionskontrollsequenz in Mycobacterien aktiv ist.
12. Vektor gemäß Anspruch 9, 10 oder 11, welcher ein extrachromosomaler Vektor ist.
13. Vektor gemäß Anspruch 9, 10 oder 11, welcher ein chromosomaler Vektor ist.
14. Zelle, welche ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder einen Vektor gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13 umfasst.
15. Rekombinante Mycobacterium-bovis-Zelle, welche wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül umfasst kodierend ein Fusionspolypeptid umfassend (a) wenigstens eine Domäne, welche fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht.
16. Zelle gemäß Anspruch 15, wobei die Domäne oder das Peptid oder das Polypeptid fähig zum Hervorrufen einer Immunantwort ausgewählt ist aus Autoantigenen, Tumorantigenen, Virusantigenen, Parasitenantigenen, bakteriellen Antigenen und immunogenen Fragmenten davon.
17. Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, welche fähig zum Expressieren des wenigstens einen rekombinanten Nukleinsäuremoleküls ist.
18. Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17, welche fähig zum Sekretieren eines Polypeptids kodiert durch das wenigstens eine Nukleinsäuremolekül ist.
19. Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18, welche eine intrazelluläre Persistenz in infizierten Makrophagen hat, welche gleich oder kleiner ist als die intrazelluläre Persistenz einer nativen Mycobacterium-Zelle.
20. Rekombinantes Fusionspolypeptid kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend als aktives Mittel eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 20, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch akzeptablen Verdünnern, Trägern und Hilfsstoffen.
22. Zusammensetzung gemäß Anspruch 21, welche eine Lebendvaccine geeignet zur Verabreichung auf eine mukosale Oberfläche oder über den parenteralen Weg ist.
23. Verfahren zur Herstellung einer Lebendvaccine umfassend Formulieren einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 in einer pharmazeutisch wirksamen Menge mit pharmazeutisch akzeptablen Verdünnern, Trägern und Hilfsstoffen.
24. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten bakteriellen Zelle gemäß Anspruch 14 umfassend die Schritte:
 - (i) Inserieren eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls in eine bakterielle Zelle, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Fusionspolypeptid kodiert umfassend (a) wenigstens eine Domäne eines Mycobacterium-Polypeptids, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht, und
 - (ii) Kultivieren der Zelle erhalten gemäß (i) unter geeigneten Bedingungen.
25. Das Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei die Zelle eine M. bovis-Zelle ist.

26. Verfahren zum Herstellen einer rekombinanten bakteriellen Zelle gemäß Anspruch 15 umfassend die Schritte:

(i) Inserieren eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls in eine Mycobacterium-bovis-Zelle, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Fusionspolypeptid kodiert umfassend (a) wenigstens eine Domäne von einem Polypeptid, wobei die Domäne fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen, und (b) eine phagolysosomale Escape-Domäne, welche ein Entweichen des Fusionspolypeptids aus dem Phagolysosom in das Cytosol von Säugerzellen ermöglicht, und

(ii) Kultivieren der Zelle erhalten gemäß (i) unter geeigneten Bedingungen.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26 umfassend Inserieren wenigstens ein weiteres rekombinantes Nukleinsäuremolekül in die Mycobacterium-bovis-Zelle, wobei das weitere rekombinante Nukleinsäuremolekül ein Peptid oder Polypeptid kodiert, welches fähig ist, eine Immunantwort in einem Säuger hervorzurufen.

28. Verfahren gemäß Anspruch 26 oder 27, wobei die Domäne oder das Peptid oder das Polypeptid fähig zum Hervorrufen einer Immunantwort ausgewählt ist aus Autoantigenen, Tumorantigenen, Virusantigenen, Parasitenantigenen, bakteriellen Antigenen und immunogenen Fragmenten davon.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

A

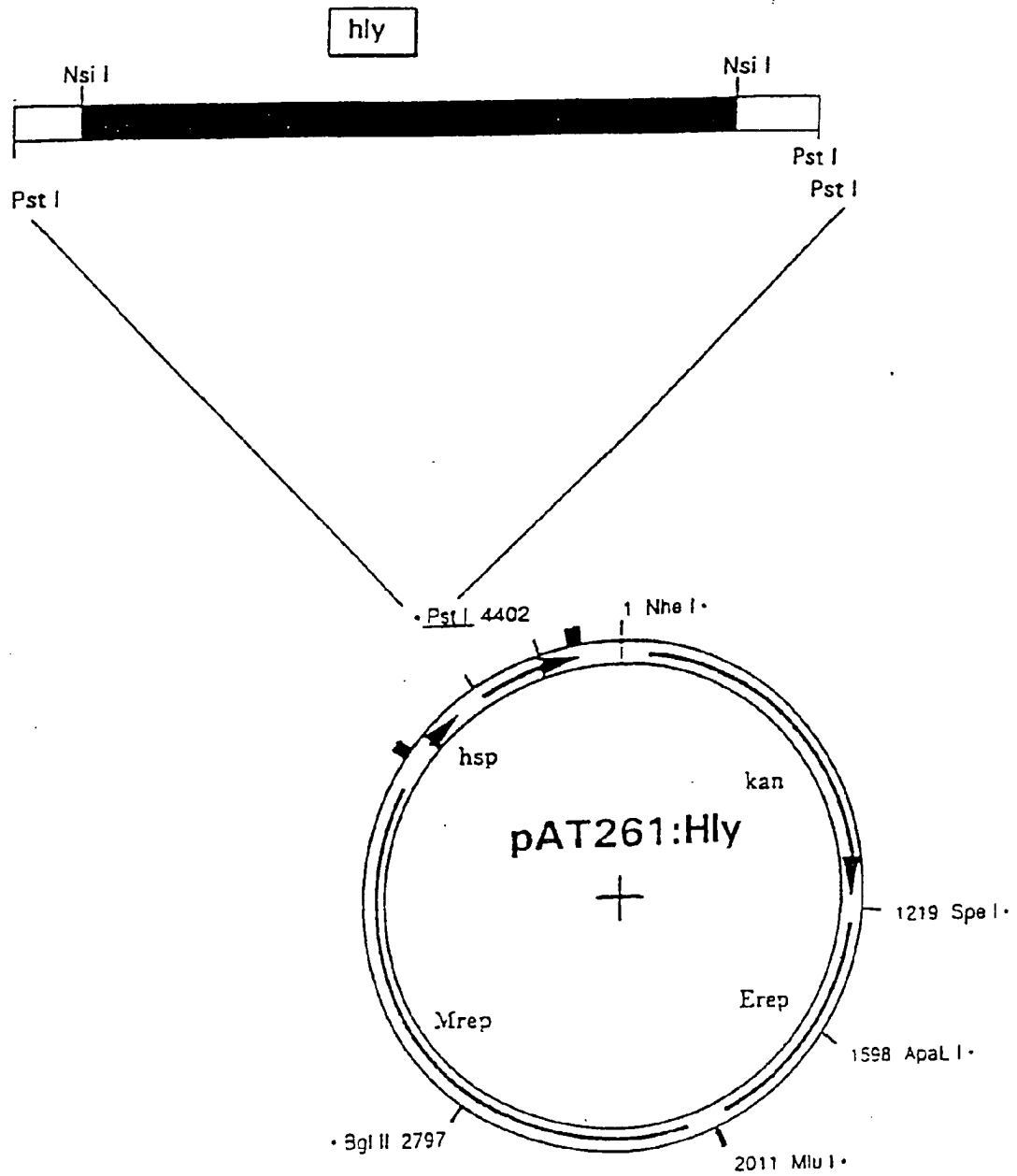


FIG. 1

B

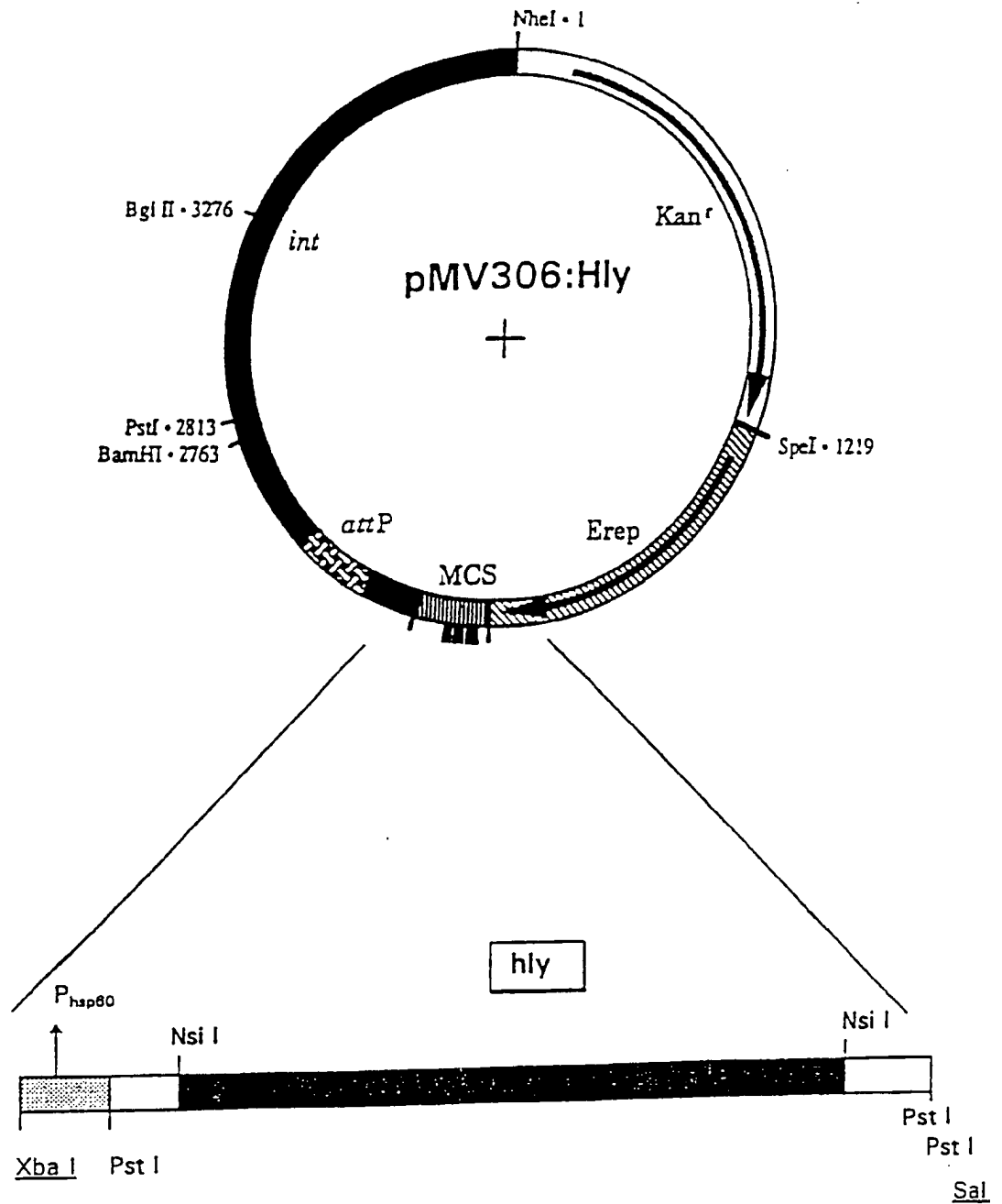


FIG. 1

FIG. 2

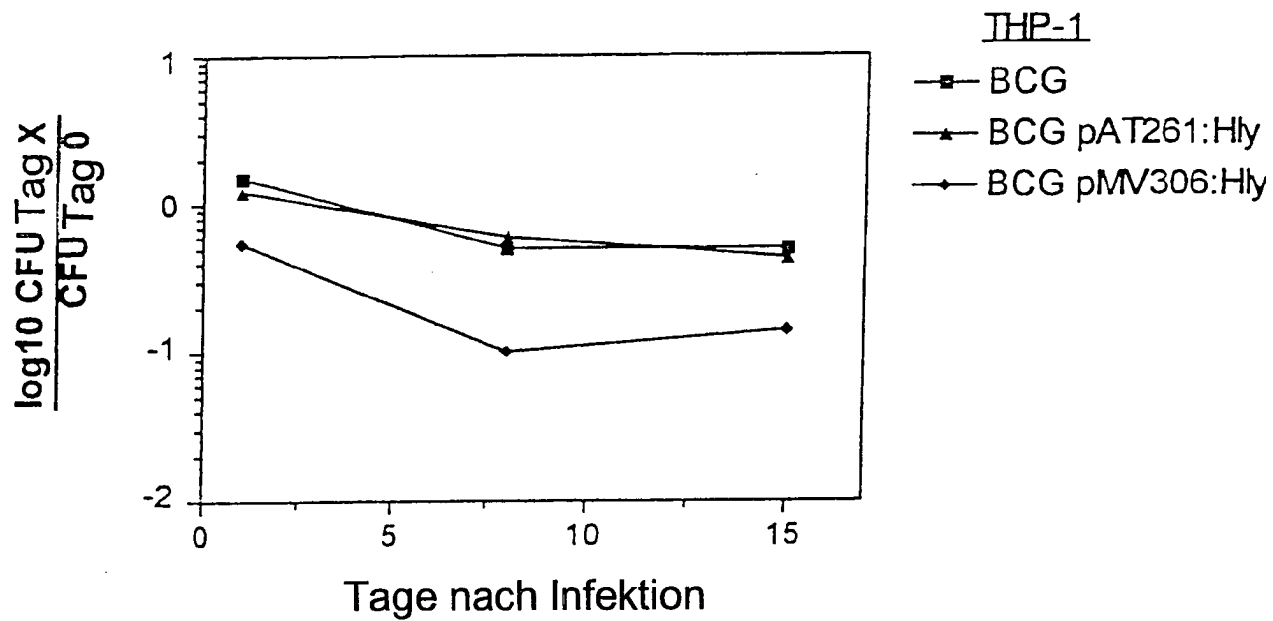
| | |
|--------------------|--|
| Ag85B-Signalpeptid | reife Ag85B-Sequenz |
| | ▼ |
| 1 | <u>MTDVS</u> RKIRA WGRRLMIGTA AAVVLPGLVG LAGGAATAGA FSRPGLPVEY |
| | |
| HlyA-Peptidlinker | reife Hly-Sequenz |
| 51 | <u>LQSAKQ</u> SAAN <u>KLHSAGQ</u> STK DASAFNKENS ISSMAPPASP PASPKTPIEK |
| | (Pst I) (Nsi I) |
| 101 | KHADEIDKYI QGLDYNKNNV LVYHGDAVTN VPPRKG YKDG NEYIVVEKKK |
| 151 | KSINQNNADI QVVNAISSLT YPGALVKANS ELVENQPDVL PVKRDSLTL |
| 201 | IDLPGMTNQD NKIVV KNATK SNVNNAVNTL VERWNEKYAQ AYPNV SAKID |
| 251 | YDDEMAYSES QLIAKFGTAF KAVNNSLNVN FGAIS EGKMQ EEVISFKQIY |
| 301 | YNVNVNEPTR PSRFFGKAVT KEQLQALGVN AENPPAYISS VAYGRQVYLK |
| 351 | LSTNSHSTKV KAAFDAAVSG KSVSG DVELT NIKNSSFKA VTYGGS AKDE |
| 401 | VQIIDGNLGD LRDILKKGAT FNRETPGVPI AYTTN FLKDN ELAVIKNNSE |
| 451 | YIETTSKAYT DGKIN IDHSG GYVAQFNISW DEVNYDPEGN EIVQHKNWSE |
| 501 | NNKSKLAHFT SSIYLPGNAR NINVYAKECT GLAWE WWRTV IDDRNLPLVK |
| | |
| | HlyA-Peptidlinker |
| 551 | NRNLSIWGTT LYPKYSNKVD NP IE YALAYG SQGDLNPLIN EISKJISAIV |
| | (Nsi I) (Pst I) |
| | zufällige Peptidsequenz |
| 601 | LSSLTSKLPA EFVRRGSGIR SLSMST |
| | (Pst I) |

FIG. 3



FIG. 4

A



B

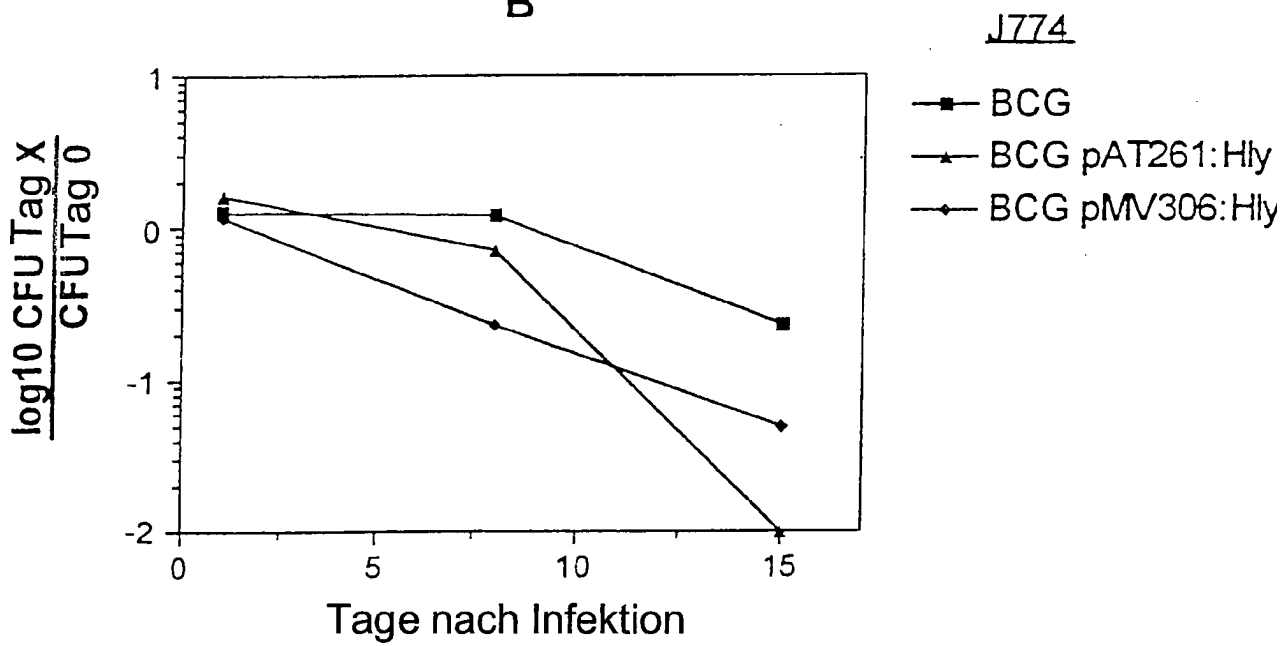


FIG. 4

