



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 32 706 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 996 717 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 706.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/05106**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 946 321.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/007839**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.08.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **18.02.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **07.12.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(30) Unionspriorität:

**97202434      05.08.1997      EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Vlaams Interuniversitair Instituut voor  
Biotechnologie vzw., Zwijnaarde, BE**

(72) Erfinder:

**NEIRYNCK, Sabine, B-9160 Lokeren, BE; MIN JOU,  
Willy, B-9070 Destelbergen, BE; FIERIS, Walter,  
B-9070 Destelbergen, BE**

(74) Vertreter:

**Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80331  
München**

(54) Bezeichnung: **IMMUNSCHÜTZENDES INFLUENZAANTIGEN UND DESSEN VERWENDUNG ZUR IMPFUNG**

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 immunschützende Influenza-Antigene, die in der Natur nicht existieren. Die Erfindung betrifft zudem die Verwendung der Antigene zur Vakzinierung und Vakzine, die sie enthalten, sowie Verfahren zur Zubereitung der Antigene.

**[0002]** Influenza wird durch ein RNA-Virus der Myxovirusgruppe verursacht. Influenzaviren können, gestützt auf antigene Unterschiede im Nukleoprotein und im Matrixprotein, in drei Typen (A, B und C) klassifiziert werden. Typ A- und B-Influenza-Viren enthalten jeweils 8 RNA-Segmente, während Typ C nur 7 RNA-Segmente hat. Influenza A ist das Wichtigste und ist sehr pathogen für Menschen sowie für Tiere, beispielsweise für Schweine und Pferde. Typ B-Influenza verursacht Erkrankungen im Menschen. Influenza C ist weniger gravierend und wurde aus Menschen und Schweinen isoliert. Der Virus wird durch die Luft übertragen, hauptsächlich durch Tröpfchen, die während des Hustens oder Niesens ausgestoßen werden. Die Influenzaviren verursachen eine Infektion der Atemwege, die üblicherweise von Husten, hohem Fieber und Myalgie begleitet wird. Obwohl eine Influenzainfektion oft nicht zum Tod des infizierten Individuums führt, kann die Morbidität ernsthaft sein. Als Konsequenz davon können Influenzaepidemien zu einem beträchtlichen wirtschaftlichen Verlust führen. Außerdem kann eine Influenzainfektion für bestimmte Gruppen an Individuen gefährlicher sein, beispielsweise für jene, die einen Herzinfarkt erlitten haben, für CARA-Patienten oder für ältere Menschen. Ein Vakzin gegen Influenza ist daher sehr wünschenswert.

**[0003]** Das Influenza A-Virus enthält in seiner Membran zwei hochgradig immunogene aber sehr variable Proteine, das Hämagglutinin und die Neuraminidase. Aufgrund der Variabilität dieser zwei Proteine wurde bislang kein Breitband-, langfristig wirkendes Vakzin gegen Influenza A entwickelt. Das üblicherweise verwendete Influenza Vakzin muss beinahe jedes Jahr angepasst werden, um der antigenen Drift des Virus zu folgen. Unter diesen Bedingungen kann das Vakzin ungefähr 80% der immunisierten Personen schützen. Wenn im Virus drastischere Veränderungen auftreten, was bekannt ist als antigene Verschiebung, ist das Vakzin nicht mehr länger von schützender Wirkung.

**[0004]** Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein neues immunschützendes Antigen zur Verwendung in Vakzinen zur Verfügung zu stellen, das nicht auf das sich schnell ändernde Hämagglutinin und/oder die Neuraminidase gestützt ist und das daher nicht die Nachteile dieser bekannten Antigene und darauf basierenden Vakzine aufweist.

**[0005]** In der Forschung, die zur vorliegenden Erfindung führte, wurde herausgefunden, dass gut konservierte Membranproteine von Influenza, die nicht Hämagglutinin und Neuraminidase sind, zur Hervorrufung einer Schutzwirkung verwendet werden können. Besonders nützlich für diese Herangehensweise ist das Membranprotein M2.

**[0006]** Die M2-mRNA wird durch das RNA-Segment 7 des Influenza A-Virus kodiert. Es wird durch eine gesplittede mRNA kodiert (Lamb et al., 1981). Wie das Hämagglutinin und die Neuraminidase ist das M2-Protein ein integrales Membranprotein des Influenza A-Virus. Das Protein ist aber viel kleiner, nur 97 Aminosäuren lang. 24 Aminosäuren am Amino-Terminus sind außerhalb der Membranoberfläche exponiert, 19 Aminosäuren durchspannen die Lipid-Doppelschicht, während die verbleibenden 45 Reste sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran befinden (Lamb et al., 1985).

**[0007]** Das M2-Protein wird reichlich auf der Zelloberfläche von Influenza A-infizierten Zellen exprimiert (Lamb et al., 1985). Das Protein findet sich auch in der Membran des Viruspartikels selbst, aber in viel kleineren Mengen, 14 bis 68 Moleküle an M2 pro Virion (Zebedee und Lamb, 1988). Das M2-Protein wird posttranslational durch die Anheftung einer Palmitinsäure an ein Cystein an Position 50 modifiziert (Sugrue et al., 1990).

**[0008]** Das M2-Protein ist ein Homotetramer, das sich aus zwei disulfid-verknüpften Dimeren zusammensetzt, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden (Sugrue und Hay, 1991). Durch ortsspezifische Mutagenese zeigten Holsinger und Lamb (1991), dass die Cysteinreste an Position 17 und 19 an der Bildung der Wasserstoffbrücke beteiligt sind. Nur das Cystein an Position 17 liegt in allen analysierten Viren vor, daher erscheint es wahrscheinlich, dass das der wichtigste Rest ist. In den Virusstämmen, wo Cystein 19 auch vorliegt, ist nicht bekannt, ob eine zweite Wasserstoffbrücke zwischen demselben Dimer (schon verknüpft durch Cys17-Cys17) oder mit dem anderen Dimer gebildet wird.

**[0009]** Durch Vergleichen der Sequenzen der M2-Proteine, die aus verschiedenen Influenza A-Virusstämmen des Menschen isoliert wurden, ergab sich eine auffallende Konservierung des extrazellulären Anteils des

M2-Proteins (Tabelle 1). Seit im Jahr 1933 der erste humane Influenz A-Stamm isoliert wurde, A/WS/33 (H1N1), bis zum erst kürzlich sequenzierten Virus A/Guangdong/39/89 (H3N2), konnte kein Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des M2-Proteins beobachtet werden. Zwei Virusstämme passten nicht in dieses konservierte Muster, A/PR/8/34 (H1N1), der einen Aminosäureaustausch aufweist, und A/Fort Monmouth/1/47 (H1N1), der in den Aminosäuren drei Unterschiede aufweist. Diese zwei Stämme repräsentieren wahrscheinlich Seitenäste im evolutionären Baum.

**[0010]** Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domäne des Influenza A M2-Proteins der folgenden Virusstämme: A/WSN/33 (Markushin et al., (1988)), A/PR/8/34 (Allen et al. (1980), Winter und Fields (1980)), A/WS/33, A/Fort Warren/1/50, A/Singapore/1/57 and A/Port Chalmers/1/73 (wurden alle beschrieben durch Zebedee und Lamb (1989)), A/Udorn/72 (Lamb und Lai (1981)), A/Leningrad/134/57 (Klimov et al. (1992)), A/Ann Arbor/6/60 (Cox et al. (1988)), A/Bangkok/1/79 (Ortin et al. (1983)), A/New York/83 (Belshe et al. (1988)), A/Fort Monmouth/1/47 (EMBL U02084), A/USSR/90/77 (EMBL X53029) und A/Guangdong/39/89 (EMBL L 18999).

Tabelle I

## Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des M2-Proteins

Stamm	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AWS/33 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AWSN/33 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
APR/8/34 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp
AFort Monmouth/1/47 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Lys	Asn	Glu	Trp	Glu	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AFort Warren/1/50 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AUSSR/90/77 (H1N1)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
ASingapore/1/57 (H2N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
ALeningrad/134/57 (H2N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AAnn Arbor/6/60 (H2N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AUdorn/72 (H3N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
APort Chalmers/1/73 (H3N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
ABangkok/1/79 (H3N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
ANY/83 (H3N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp
AGuangdong/39/89 (H3N2)	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp

[0011] Die vorliegenden Erfinder erwarteten, dass der konservierte Charakter dieses Typs von Membranproteinen diese zu guten Kandidaten für die Entwicklung eines Vakzins machen könnte. Im Prinzip ist die schützende Funktion von Anti-M2-Antikörpern bereits bekannt. Experimentelle Daten zeigten, dass ein monoklonaler Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil des M2-Proteins (14C2) gerichtet ist, die Verbreitung des Virus vermindern kann, obwohl die Infektiosität des Virus in vitro nicht reduziert wurde (Zebedee und Lamb, 1988). Außerdem wurde gezeigt, dass passiv verabreichte monoklonale Antikörper (14C2) die virale Vervielfältigung in den Lungen von Mäusen inhibieren konnte (Treanor et al., 1990). Beide Herangehensweisen verlassen sich auf die Verabreichung von Anti-M2-Antikörpern. Die passive Verabreichung von monoklonalen An-

tikörpern als Mittel der Verteidigung gegen eine Infektion wird jedoch vorzugsweise vermieden, weil die Immunogenizität von heterologen Immunglobulinen nach wiederholter Verabreichung zur Entfernung der Antikörper aus dem Körper führen kann und daher zu einer Reduktion der Behandlungswirksamkeit. Sogar homologe Antikörper können anti-idiotypische Antikörper auslösen. Außerdem fand man heraus, dass Menschen, die mit dem Virus infiziert wurden, Anti-M2-Antikörper haben, wobei diese Antikörper aber nicht gegen die Infektion schützen (entweder ist deren Konzentration oder deren Natur nicht ausreichend, um wirksam zu sein). Das macht es unwahrscheinlich, dass passive Verabreichung von Anti-M2-Antikörpern für die Verwendung in Menschen geeignet ist. Es hält auch davon ab, zu versuchen, Vakzine für den Menschen zu entwickeln, die auf dieses Antigen gestützt sind.

**[0012]** Kürzlich wurde der Schutz von Mäusen gegenüber einer Infektion mit homologem oder heterologem Virus beschrieben (Slepushkin et al., 1995). Diese Autoren verwendeten eine Formulierung eines unvollständigen Freund'schen Adjuvans und einen Membranextrakt von Sf9-Zellen, die das vollständige M2-Protein exprimieren, für Immunisierungen. Diese Herangehensweise ist ebenfalls nicht geeignet für die Vakzinierung von Menschen, weil sie sich auf die Verwendung von außergewöhnlich wirkungsvollem Freund'schen Adjuvans verlässt, das bei Menschen verboten ist.

**[0013]** Insgesamt sollte die Verwendung von Antikörpern, die den Schutz gegenüber Influenza zur Verfügung stellen, vorzugsweise vermieden werden. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, dass eine prophylaktische Behandlung mit Antikörpern im Menschen effektiv sein wird. Die Immunisierung mit vollständigem M2-Protein im Menschen, wie es beschrieben ist, ist nicht realistisch, weil sie sich auf ein unvollständiges Freund'sches Adjuvans verlässt, das im Menschen nicht verwendet werden kann, und in höheren Tieren gegen-indiziert ist.

**[0014]** Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein alternatives Influenza-Antigen zur Verfügung zu stellen, das ausreichend immunschützend gegenüber einem breiten Spektrum an Influenzastämmen ist und das nicht abhängig ist von Freund'schem Adjuvans, damit es im Menschen verwendet werden kann.

**[0015]** Gemäß der Erfindung wurde nun gefunden, dass es möglich ist, solch ein neuartiges, in der Natur nicht existierendes Antigen zuzubereiten. Dafür wird der extrazelluläre Teil eines konservierten Influenza Membranproteins oder ein funktionelles Fragment davon an einem präsentierenden Träger, beispielsweise ein (Poly-)Peptid, fusioniert. Das konservierte Influenza Membranprotein ist beispielsweise der gut konservierte extrazelluläre Teil des M2-Proteins. Das Membranprotein wird vorzugsweise genetisch an ein präsentierendes (Poly-)Peptid als präsentierenden Träger fusioniert, wobei das (Poly-)Peptid den extrazellulären Teil stabilisiert und überraschenderweise die Immunogenizität des dadurch erhaltenen Fusionsprodukts potenziert. Es ist so gedacht, dass das präsentierende (Poly-)Peptid den extrazellulären Teil in seine Wildtypstruktur bringt, wodurch das Antigen in einer Form präsentiert wird, die man auch auf dem Virus und auf infizierten Zellen findet.

**[0016]** Ein 'funktionales Fragment des konservierten Influenzamembranproteins' ist ein Fragment, das in der Lage ist einen statistisch wesentlich höheren Immunschutz hervorzurufen, wenn es in einer immunschützenden Dosis an Testmitglieder einer Art verabreicht wird, als man in Kontrollmitgliedern der gleichen Spezies findet, die das funktionale Fragment nicht erhalten.

**[0017]** In einer Ausführungsform der Erfindung wird der 23 Aminosäuren lange extrazelluläre Teil des M2-Proteins an den Amino-Terminus des menschlichen Hepatitis B Virus Core-Proteins fusioniert. Auf diese Weise wird die Wildtypstruktur des M2-Proteins in viralen Partikeln und auf infizierten Zellen, wo sich der freie N-Terminus in die extrazelluläre Umgebung erstreckt, nachgeahmt.

**[0018]** Alternative präsentierende (Poly-)Peptide sind multiple C3d-Domänen (Dempsey et al., 1996), Fragment C des Tetanustoxins oder Ty-Partikel der Hefe. 'Präsentierende (Poly-)Peptide' sollen jeden Abschnitt an Aminosäure(n) umfassen, der den extrazellulären Teil gegenüber der Umgebung in einer Form präsentieren kann, die im Wesentlichen dem Wildtyp entspricht.

**[0019]** Alternativ kann der präsentierende Träger eine nicht-peptidische Struktur wie Glykane, Polyethylenglykole, Peptidomimetika, synthetische Polymere, etc. sein.

**[0020]** Nach Expression des neuartigen Antigens in einer geeigneten Akzeptorzelle kann es entweder als solches (abhängig von der Akzeptorzelle) oder als Teil eines Membranfragments oder in isolierter Form verwendet werden.

**[0021]** Der Ausdruck 'präsentierender Träger' wird verwendet, um alle Typen präsentierender Moleküle anzu-

zeigen, sowohl (Poly-)Peptide als auch andere.

**[0022]** Es wird dem Fachmann klar sein, dass ein Genkonstrukt, das die kodierende Information für das Antigen und das präsentierende (Poly-)Peptid umfasst, nicht nur verwendet werden kann, um das neue, wie oben beschriebene Antigen zuzubereiten, sondern dass es gegebenenfalls in Anwesenheit von geeigneten transkriptions- und/oder translationsregulatorischen Sequenzen auch verwendet werden kann, um in einem DNA-Vakzin, oder in auf Vakzinia basierenden Vakzinkonstruktionen verwendet werden kann.

**[0023]** Ein präsentierendes (Poly-)Peptid kann in das Fusionsprodukt als Einzelkopie oder als multiple Kopien eingebaut werden. Das Fragment d des dritten Komplementproteins (C3d) wird vorzugsweise in mehrere Kopien, vorzugsweise drei oder mehr, verwendet.

**[0024]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann das Fusionsprodukt darüber hinaus ein zusätzliches Peptid an einer geeigneten internen Stelle (Schödel et al., 1992) oder C-terminal (Borisova et al., 1989) umfassen. Dieses zusätzliche Peptid soll die schützende Funktion des Antigens weiter steigern, und kann beispielsweise ein Epitop einer T-Helferzelle oder einer zytotoxischen T-Zelle sein.

**[0025]** Das erfindungsgemäße Antigen kann durch Zubereitung eines Genkonstrukts erhalten werden, das eine kodierende Sequenz für wenigstens den extrazellulären Teil eines konservierten Influenzamembranproteins oder eines funktionalen Fragments davon und gegebenenfalls die kodierende Sequenz für ein präsentierendes (Poly-)Peptid, das daran funktionell geknüpft ist, umfasst, gegebenenfalls in Anwesenheit von geeigneten transkription- und/oder translation- und/oder sekretion-regulierenden Sequenzen, das Einbringen dieses Genkonstrukts in eine geeignete Akzeptorzelle, das Bewirken der Expression des Genkonstrukts in der Akzeptorzelle und gegebenenfalls das Isolieren des Antigens aus der Akzeptorzelle oder seinem Kulturmedium.

**[0026]** Der Bedarf an transkription- und/oder translation- und/oder sekretionsregulierenden Sequenzen hängt davon ab, ob das Gen in einen Vektor integriert werden soll oder ob das Gen in das Genom der Akzeptorzelle an einer Position integriert werden soll, die bereits diese Signale zur Verfügung stellt.

**[0027]** Die kodierende Sequenz für ein präsentierendes (Poly-)Peptid liegt nur vor, wenn das Fusionsprodukt eine Fusion zwischen dem Antigen und einer peptidischen Struktur ist und wenn es wünschenswert ist, die zwei Strukturen im DNA-Konstrukt direkt miteinander zu verbinden. In jedem anderen Fall kann der präsentierende Träger dem Antigen in einer anderen Weise zugesetzt werden.

**[0028]** Die geeignete Akzeptorzelle kann ausgewählt werden zum Beispiel aus *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, Hefe (z. B. *Pichia pastoris*), Insektenzellen (z. B. Sf9), Säugerzellen (z. B. Vero-Zellen) und dergleichen. Im Fall von *L. lactis* muss das Antigen nicht isoliert werden, sondern die erzeugten Bakterien können direkt für intranasale oder orale Verwendung verwendet werden.

**[0029]** Die Erfindung betrifft des Weiteren Vakzine, die wenigstens das Antigen der Erfindung umfassen. Dieses Antigen kann in isolierter Form vorliegen oder als Teil eines Membranfragments vorliegen oder auf der Akzeptorzelle exprimiert werden. Das erfindungsgemäße Antigen kann zusammen mit geeigneten Exzipienten verwendet werden. Der Fachmann für Vakzindesign wird befähigt sein, geeignete Exzipienten auszuwählen. Anleitung kann zum Beispiel in *Methods in molecular medicine: Vaccine Protocols* (1996) Hrsg. Robinson, A., Farrar, G. H. und Wiblin, C. N. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA gefunden werden.

**[0030]** Die erfindungsgemäßen Antigene können allein oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen Influenza Antigenen, beispielsweise mit Neuraminidase, Hämagglutinin oder nativen M2, verwendet werden.

**[0031]** Die Erfindung betrifft darüber hinaus die Verwendung der Antigene in der Zubereitung eines Vakzins gegen Influenza. Die Vakzine können direkte Vakzine sein, d. h. Vakzine, die Fusionsprodukte beinhalten, oder indirekte Vakzine wie DNA-Vakzine. Letztere sind Vakzine, die eine Fusions-cDNA unter der Regulation eines eukaryotischen Promoters umfassen, der im Empfänger aktiv ist. Das eigentliche Antigen wird dann im Empfänger des Vakzins hergestellt.

**[0032]** Die erfindungsgemäßen Vakzine sind sowohl für die Verwendung im Menschen als auch in Tieren gedacht, beispielsweise in Schweinen und Pferden, von denen bekannt ist, dass sie mit Influenza A infiziert sind.

**[0033]** Eine ähnliche Herangehensweise, wie sie hier beschrieben ist für die Zubereitung neuartiger Fusions-

antigene von Influenza A, kann angepasst werden, um ähnliche Fusionsantigene und Vakzine zuzubereiten, die die Fusionsantigene oder die für die Fusionsantigene kodierende DNA für Influenza B und C enthalten.

**[0034]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Zubereitung der Antigene, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- a) Herstellen eines Genkonstrukts, wobei das Genkonstrukt eine kodierende Sequenz für wenigstens den extrazellulären Teil eines konservierten Influenzamembranproteins oder für ein funktionales Fragment davon und wenigstens eine kodierende Sequenz für ein daran funktional verknüpftes (Poly-)Peptid umfasst, gegebenenfalls in Anwesenheit von geeignetem transkriptions- und/oder translations- und/oder sekretions-regulierenden Sequenzen,
- b) Einbringen dieses Genkonstrukts in eine geeignete Akzeptorzelle,
- c) Herbeiführen der Expression des Genkonstrukts in der Akzeptorzelle, und
- d) gegebenenfalls Isolieren des Antigens aus der Akzeptorzelle oder ihrem Kulturmedium.

**[0035]** Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel weiter illustriert. Das Beispiel beschreibt detailliert die Zubereitung von Fusionsproteinen der M2-Sequenz mit verschiedenen präsentierenden (Poly-)Peptiden und deren Verwendung bei der Immunisierung. Anstelle von M2 und den hier beschriebenen präsentierenden Trägern, wird der Fachmann in der Lage sein, andere konservierte Influenza Membranproteine oder andere präsentierende Träger auszuwählen.

**[0036]** Im Beispiel wird Bezug genommen auf die folgenden Figuren:

**[0037]** Figur 1: Herstellung von pATIPM2m1.

E1 und E2 = erstes und zweites Exon des Influenza M2-Proteins,  
 M2e = extrazellulärer Teil des M2-Proteins,  
 M2t = Transmembranteil; und  
 M2c = zytoplasmatischer Schwanz.  
 Dicke Linie = Vektor

- (a) Entfernen des Introns aus dem m2-Gen,
- (b) Einführen einer BclI-Stelle zwischen dem extrazellulären Teil und der Transmembrandomäne des M2-Proteins,
- (c) Nukleotid- und Aminosäuresequenz des extrazellulären Teils des M2-Proteins von A/PR/8/34.

**[0038]** Figur 2: Herstellung von pIPM2hB2Mm2s2.

ori = Replikationsursprung  
 cat = Chloramphenikol Acetyltransferase,  
 bla =  $\beta$ -Laktamase,  
 lpp = Lipoprotein,  
 hB2M = humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin,  
 ompa-ss = Signalsequenz des Proteins A der äußeren Membran von E. coli,  
 ssDNA = einzelsträngige DNA,  
 M2e = extrazellulärer Teil des M2-Proteins.

- (a): Flussdiagramm der Herstellung
- (b): Details der Schlüsselsequenzen.

**[0039]** Figur 3: Herstellung von pPLcIPM2HBcm.

ori = Replikationsursprung  
 cat = Chloramphenikol Acetyltransferase,  
 bla =  $\beta$ -Laktamase,  
 HBc = Hepatitis B-Core,  
 ssDNA = einzelsträngige DNA,  
 M2e = extrazellulärer Teil des M2-Proteins.

- (a): Flussdiagramm der Plasmidherstellung,
- (b): Sequenz, um die eingeführte BamHI-Restriktionsstelle im Hepatitis B-Core-Gen,
- (c): Details der Schlüsselsequenzen.

**[0040] Fig. 4:** Analyse der löslichen Fraktion auf einem SDS 12,5% PAGE, wobei die lösliche Fraktion 150 µl Ausgangskultur von Stamm MC1061 [pcl857] entspricht und die Plasmide pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (Expression von HBc) oder pPLcIPM2HBcm (Expression von IPM2HBcm) enthält. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt.

MW = Molekulargewichtsmarker,  
 NI = nicht-induzierte Kultur,  
 I = induzierte Kultur.

**[0041] Fig. 5:** Analyse wie in [Fig. 4](#) der löslichen Fraktion, wobei die lösliche Fraktion 150 µl Ausgangskultur des MC1061 [pcl857] Stamms entspricht, der mit pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (Expression von HBc) oder pPLcIPM2HBcm (Expression von IPM2HBcm) transformiert wurde. Nach der Elektrophorese wurden die relevanten Proteine mittels eines Westernblotting-Experiments nachgewiesen. Nachweis mit einem monoklonalen Antikörper gegen HBc (A) und einem monoklonalen Antikörper, der für den extrazellulären Teil des M2-Proteins spezifisch ist (B).

MW = Molekulargewichtsmarker,  
 NI = nicht-induzierte Kultur,  
 I = induzierte Kultur.

**[0042] Fig. 6:** Sequenz des Amino-Terminus des M2-Proteins im Vergleich zum Amino-Terminus von IPM2HBcm, wie sie experimentell bestimmt wurde. Sequenz von A/Udorn/72 (Lamb und Zebedee, 1985).

**[0043] Fig. 7:** Lösliche Fraktionen vom Stamm MC1061 [pcl857], der mit pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (Expression von HBc) beziehungsweise pPLcIPM2HBcm (Expression von IPM2HBcm) transformiert wurde, analysiert im nativen Zustand mittels eines Dot-Blots. Nachweis mit einem monoklonalen Antikörper gegen HBc (A) und einem monoklonalen Antikörper, der für den extrazellulären Teil des M2-Proteins spezifisch ist (B).

NI = nicht-induzierte Kultur,  
 I = induzierte Kultur.

**[0044] Fig. 8:** Übersicht über die rektale Temperatur (A1), das Gewicht (A2) und das Überleben der Mäuse (B), die mit IPM2HBcm vakziniert wurden, nachdem sie einer letalen Dosis mit 5 LD<sub>50</sub> m.a. A/PR/8/34 ausgesetzt worden waren. Die statistische Relevanz wurde mittels des exakten Tests von Fischer berechnet. Mäuse, die mit unterschiedlichen Dosen des Antigens immunisiert worden waren, wurden mit der Kontrollgruppe verglichen. Die folgenden Resultate wurden erhalten: für 50 µg IPM2HBcm  $p < 0,001$ ; für 10 µg  $p < 0,005$  und für die 5 µg Dosis  $p < 0,05$ . [Fig. 8C](#) zeigt das Überleben der Mäuse, die intraperitoneal mit IPM2HBcm beziehungsweise IM2HBcm vakziniert worden waren, nach einer letalen Dosis mit 30HAU X-47. [Fig. 8D](#) zeigt das Überleben der Mäuse, die intranasal mit IPM2HBcm beziehungsweise IM2HBcm vakziniert worden waren, nach einer letalen Dosis mit 30HAU X-47.

**[0045] Fig. 9:** Analyse der Serumproben der vier Ansätze, von denen in [Fig. 8](#) berichtet wurde. Das Präimmunserum (a), das entnommene Serum nach der ersten (b), nach der zweiten (c) und nach der dritten (d) Immunisierung und das entnommene Serum nach der Dosisexposition (e) wurden zunächst 1/50 verdünnt. Die anschließenden Verdünnungsschritte waren 1/3. Die aufgetragene Absorption ist ein bereinigter Wert, der wie in den Ergebnissen unter „Analyse der Serumproben“ beschrieben erhalten wurde.

**[0046] Fig. 10:** Herstellung von pPLcIM2HBcm.

ori = Replikationsursprung  
 cat = Chloramphenikol Acetyltransferase,  
 bla =  $\beta$ -Laktamase,  
 M2e = extrazellulärer Teil des M2-Proteins.  
 HBc = Hepatitis B-Core.

**[0047] Fig. 11:** Analyse der löslichen Fraktion auf einem 12,5%-igen SDS PAGE-Gel, wobei die lösliche Fraktion 5 µg HBc oder I(P)M2HBcm enthält (wie in einem ELISA bestimmt (siehe Material und Methoden)), von Stamm MC1061 [pcl857], der die Plasmide pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (Expression von HBc), pPLcIPM2HBcm (Expression des Fusionsproteins IPM2HBcm mit dem extrazellulären Teil des M2-Proteins abgeleitet von A/PR/8/34) beziehungsweise pPLcIM2HBcm (Expression von IM2HBcm, enthalten die allgemeinere M2-Sequenz) enthält.



MW = Molekulargewichtsmarker,  
 NI = nicht-induzierte Kultur,  
 I = induzierte Kultur.

**[0048] Fig. 12:** Analyse der löslichen Fraktion in einem Westernblot (siehe Material und Methoden), wobei die lösliche Fraktion 2,5 µg HbC oder I(P)M2HBcm enthält (wie in einem ELISA bestimmt (siehe Material und Methoden)), von Stamm MC1061 [pcl857], der die Plasmide pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (Expression von HbC), pPLcIPM2HBcm (Expression des IPM2HBcm) beziehungsweise pPLcIM2HBcm (Expression von IM2HBcm) enthält. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper der gegen HbC gerichtet ist (A) und einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für den extrazellulären Teil des M2-Proteins ist (B).

MW = Molekulargewichtsmarker,  
 NI = nicht-induzierte Kultur,  
 I = induzierte Kultur.

**[0049] Fig. 13:** Übersicht über die Oligonukleotide, die für die PCR-Amplifikation von hbc und i(p)m2hbc verwendet wurden. 's' oder 'a' gefolgt vom Namen des Oligonukleotids steht für die Verwendung dieser Primer in Sense-(s) oder Antisense-(a) Orientierung. Die eingerahmte Sequenz zeigt die veränderten Leu-Kodons an.

**[0050] Fig. 14:** Übersicht über die Herstellung der hbc- und m2hbc-Fusionen in Vektoren für *L. lactis*.

ori = Replikationsursprung für *E. coli*,  
 ori (+) = Replikationsursprung für *L. lactis*,  
 ermA und ermM = Erythromycinresistenzgene,  
 P1 = *L. lactis* Promoter,  
 bla =  $\beta$ -Laktamase,  
 HbC = Hepatitis B-Core,  
 M2e = extrazellulärer Teil des M2-Proteins.  
 usp45-ss = Signalsequenz von usp45,  
 mIL2 = Interleukin 2 der Maus und  
 mIL6 = Interleukin 6 der Maus.

**[0051] Fig. 15:** Analyse der Expression des Hepatitis B Core (HbC)- und des M2-HbC Fusionsproteins in einem Western-Blot. Ein Äquivalent von  $10^9$  *L. lactis*-Bakterien vom Stamm MG1363, der pTREX1 (Kontrolle), pT1HbC, pT1HbClL2, pT1HbClL6 (Expression von HbC allein oder in Kombination mit mIL2 beziehungsweise mIL6), pT1PM2HbC, pT1PM2HbClL2, pT1PM2HbClL6 (Expression von IPM2HBcm alleine oder in Kombination mit mIL2 beziehungsweise mIL6), pT1M2HbC, pT1M2HbClL2, pT1M2HbClL6 (Expression von IM2HBcm alleine oder in Kombination mit mIL2 beziehungsweise mIL6), wurde in einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Der erste Antikörper, p-anti-HbC (Dako Corporation, Carpinteria, CA., USA), wurde 5000-fach verdünnt. Die gebundenen Antikörper wurden mit einer 1/2000 Verdünnung des polyklonalen Anti-Kaninchen IgG, das mit alkalischer Phosphatase markiert war, nachgewiesen (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL., USA). I(P)M2HBcm steht entweder für IPM2HBcm oder IM2HBcm.

MW = Molekulargewichtsmarker,  
 C = Kontrolle und  
 – = Expression des Antigens alleine

**[0052] Fig. 16:** Analyse der Expression der M2-HbC-Fusionsproteine in einem Western-Blot. Ein Äquivalent von 2 bis  $3 \times 10^9$  *L. lactis* Bakterien vom Stamm MG1363, die pT1HbC (Kontrolle), pT1PM2HbC, pT1PM2LHbC (Expression von IPM2HBcm), pT1M2HbC, pT1M2LHbC (Expression von IM2HBcm) enthielten, wurden auf einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden mit einer IgG-Fraktion eines polyklonalen Maus Anti-M2e Antikörper nachgewiesen (siehe Material und Methoden). Die gebundenen Antikörper wurden mit einer 1/2000-Verdünnung des mit alkalischer Phosphatase konjugierten polyklonalen Anti-Maus IgG ( $\gamma$ -Kette-spezifisch) nachgewiesen (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL., USA).

MW = Molekulargewichtsmarker,  
 C = Kontrolle,  
 E = Leucinkodons optimiert für die Verwendung in *E. coli*, und  
 L = Leucinkodons optimiert für die Verwendung in *L. lactis*.

**[0053]** Dies sind die Plasmide pT1PM2LHbC bzw. pT1M2LHbC. I(P)M2HBcm steht entweder für IPM2HBcm

oder IM2HBcm.

**[0054] Fig. 17:** Übersicht über die Oligonukleotide, die für die PCR-Amplifikation des extrazellulären Teils des M2-Proteins und des C3d verwendet wurden. 's' oder 'a' nach dem Namen eines Oligonukleotids steht für die Verwendung dieses Primers in Sense(s)- oder Antisense(a)-Orientierung. Der eingerahmte Bereich zeigt die veränderten Leu-Kodons an.

**[0055] Fig. 18:** Übersicht über die Herstellung der m2c3d3-Fusionen in *L. lactis*.

ori	= Replikationsursprung für <i>E. coli</i> ,
ori (+)	= Replikationsursprung für <i>L. lactis</i> ,
ermA und ermM	= Erythromycinresistenzgene,
P1	= <i>L. lactis</i> Promoter,
bla	= $\beta$ -Laktamase,
M2e	= extrazellulärer Teil des M2-Proteins.
usp45-ss	= Signalsequenz von usp45,
spaX	= vom <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A abgeleitete Ankersequenz,
C3d	= Fragment d des Komplementproteins 3, und
mIL6	= Interleukin 6 der Maus.

**[0056] Fig. 19:** Übersicht über die für die PCR-Amplifikation von ttfc und m2ttfc verwendeten Oligonukleotide. 's' oder 'a' nach dem Namen eines Oligonukleotids steht für die Verwendung dieses Primers in Sense(s)- oder Antisense(a)-Orientierung. Der eingerahmte Bereich zeigt die veränderten Leu-Kodons an.

**[0057] Fig. 20:** Übersicht über die Herstellung von m2ttfc in Vektoren für *L. lactis*.

ori	= Replikationsursprung für <i>E. coli</i> ,
ori (+)	= Replikationsursprung für <i>L. lactis</i> ,
ermM und erm $\mu$	= Erythromycinresistenzgene,
P1	= <i>L. lactis</i> Promoter,
bla	= $\beta$ -Laktamase,
TTFC	= Fragment C des Tetanustoxins,
M2e	= extrazellulärer Teil des M2-Proteins.
usp45-ss	= Signalsequenz von usp45,
mIL2	= Interleukin 2 der Maus, und
mIL6	= Interleukin 6 der Maus.

**[0058] Fig. 21:** Analyse der Expression des IPM2TTFC Fusionsproteins in einem Western-Blot. Ein Äquivalent von  $10^9$  *L. lactis* Bakterien vom Stamm MG1363, die pT1TT (Kontrolle), pT1PM2LTT (Expression von IPM2TT), pT1PM2LTTIL2 (Expression von IPM2TT in Kombination mit mIL2) bzw. pT1PM2LTTIL6 (Expression von IPM2TT in Kombination mit mIL6) enthielten, wurden in einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Der erste Antikörper, eine IgG-Fraktion einer polyklonalen Maus Anti-M2e-Antikörpers (siehe Material und Methoden), wurden 2500-fach verdünnt. Die gebundenen Antikörper wurden mit einer 1/2000-Verdünnung des polyklonalen Anti-Maus IgG, das mit Meerrettichperoxidase markiert war, nachgewiesen (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL., USA). 30 mg 4-Chlor-1-Naphtol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) wurden in 10 ml Methanol aufgelöst. Danach wurden 40 ml PBS, pH 7,4 und 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt.

MW	= Molekulargewichtsmarker,
–	= Expression des Antigens alleine,
mIL2	= Expression des Antigens in Kombination mit mIL2, und
mIL6	= Expression des Antigens in Kombination mit mIL6.

**[0059] Fig. 22:** Primersatz, der für die PCR-Amplifikation des Sekretionssignals des gp67 Bakulovirusprotein verwendet wurde.

**[0060] Fig. 23:** Primersatz, der für die PCR-Amplifikation des extrazellulären Teils des M2-Proteins während der Herstellung der sgpM2C3d3-Fusion verwendet wurde.

**[0061] Fig. 24:** Herstellung des Bakulovirustransfervektors pACsgpM2C3d3.

bla	= $\beta$ -Laktamase,
fette graue Linie	= homologer Bereich zum Bakulovirus,
C3d	= Fragment d des Komplementproteins 3,
M2e	= extrazellulärer Teil des M2-Proteins,
ori	= Replikationsursprung für E. coli,
phP	= Polyhedrinpromotor des Bakulovirus,
sgp67	= Sekretionssignal des gp67 Protein des Bakulovirus.

[0062] [Fig. 25](#): Ausschnitt aus den Nukleotid- und Aminosäureschlüsselsequenzen der sgpM2C3d3-Fusion.

C3d	= Fragment d des Komplementproteins 3,
M2e	= extrazellulärer Teil des M2-Proteins, und
sgp67	= Sekretionssignal des gp67 Protein des Bakulovirus.

[0063] [Fig. 26](#): Analyse des rekombinanten AcNPV/sgpM2C3d3 Bakulovirus mittels PCR-Amplifikation des Polyhedrinlokus (Primer TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG und CAACAACGCACAGAATCTAG). Die Kontrollreaktionen wurden mit dem parentalen Transfervektor pACsgpM2C3d3 und mit dem Wildtyp AcNPV-Bakulovirus durchgeführt.

M = DNA-Längenmarker.

[0064] [Fig. 27](#): Expression des sekretierten M2C3d3 durch Sf9 Insektzellen, die mit rekombinanten AcNPV/sgpM2C3d3-Bakulovirus wie über Westernanalyse (10% PAGE-Gel) eines geernteten Überstands nachgewiesen wurde, infiziert waren. Ein Überstand von kontroll-infizierten Zellen oder ein Überstand, der nach der Infektion mit Wildtyp AcNPV-Bakulovirus erhalten wurde, sind als Kontrollen eingeschlossen.

MW = Molekulargewichtsmarker.

[0065] [Fig. 28](#): Übersicht über das Überleben von Mäusen nach einer letalen Exposition gegenüber 5 LD<sub>50</sub> m.a. X47. Mäuse, die mit 3 × 10 µg IM2HBcm vakziniert worden waren, wurden mit passiv immunisierten Mäusen (P) verglichen.

[0066] [Fig. 29](#): Übersicht über die DNA-Vakzinierungskonstrukte.

RT	= reverse Transkriptase,
PCMV	= Promoter des Cytomegalievirus
bla	= $\beta$ -Laktamase,
npt	= Neomycinresistenz.

[0067] [Fig. 30](#): Expression in HEKT-Zellen in einer Western-Blotanalyse. Der erste Antikörper (paM2 (siehe Material und Methoden)) wurde 2000-fach verdünnt. Die gebundenen Anti-M2-Antikörper wurden mit einem mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-Maus IgG nachgewiesen.

MW	= Molekulargewichtsmarker,
M2	= in Insektzellen exprimiertes M2-Protein
1	= pCDNA3
2	= pCIM2
3	= pCIM2HBcm
4	= pCIP3M2HBcm.

[0068] [Fig. 31](#): Antikörperreaktion gegen das M2-Protein in einer ELISA-Analyse.

A. Mikrotiterplatten wurden mit Periplasma-enthaltendem hB2M oder IPM2hB2M (siehe Material und Methoden) beschichtet.

B. Mikrotiterplatten wurden mit in Insekten-Zellen exprimiertem M2-Protein (siehe Material und Methoden) beschichtet.

[0069] Die folgenden Abkürzungen werden verwendet werden:

1 LD <sub>50</sub> :	letale Dosis; die virale Exposition, die notwendig ist, um die Hälfte der Population an infizierten Mäusen zu töten,
BCIP:	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp:	Basenpaar(e)
CIP:	Kalbsdarmphosphatase
C3d:	Fragment d des Komplementproteins 3
DEA:	Diethylamin
HAU:	Hämagglutininierungseinheiten
hB2M:	humanes $\beta$ 2-Mikroglobulin
HBc:	Hepatitis B-Coreprotein
IM2HBcm:	universales Influenza A M2-Proteinfragment fusioniert an HBc
IPM2hB2M2m:	Influenza A M2-Proteinfragment (aus A/PR/8/34) fusioniert an hB2M
IPM2HBc:	Influenza A M2-Proteinfragment (aus A/PR/8/34), fusioniert an HBc und enthaltend vier zusätzliche Aminosäuren zwischen dem ersten Methionin und dem Beginn des extrazellulären Teils des M2-Proteins
IPM2HBcm:	Influenza A M2-Proteinfragment (aus A/PR/8/34) fusioniert an HBc
IPTG:	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
m.a.:	Maus-adaptiert
M2C3d3:	universales Influenza M2-Fragment fusioniert an drei Kopien des C3d
cM2C3d3:	zytoplasmatische Form des M2C3d3
sM2C3d3:	sekretierte Form des M2C3d3
sM2C3d3X:	die Form von M2C3d3, die kovalent sich mit der Zellwand verbindet
MES:	2-(N-Morpholino)ethansulphonsäure
MPLA:	Monophosphoryllipid A
NBT:	Nitroblau-Tetrazolium
OmpA-ss:	Signalsequenz des Proteins A der äußeren Membran
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE:	Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TDM:	Trehalose-Dicorynomycolat
pHP:	Polyhedrin-Promoter des Bakulovirus
sgp67:	Sekretionssignal des Bakulovirus gp67-Proteins

## BEISPIEL:

## EINLEITUNG

**[0070]** Dieses Beispiel zeigt die Zubereitung verschiedener Fusionsantigene, die auf dem Influenza A Virusprotein M2 aufbauen. Das M2-Fragment wurde an den Amino-Terminus verschiedener präsentierender Träger fusioniert.

## MATERIAL UND METHODEN

## 1. Bakterienstämme und Plasmide

**[0071]** Alle Plasmidkonstruktionen, die für die Expression in *Escherichia coli* durchgeführt wurden, wurden im Stamm MC 1061 (hsdR mcrB araD139 $\Delta$ (araABC-leu)7697  $\Delta$ lacX74 galU galK rpsL thi (Casadaban und Cohen, 1980)) aufgrund der hohen Transformationseffizienz durchgeführt. Die erste Transformation nach der Mutagenese wurde in WK6 $\lambda$ mutS ( $\Delta$ (lac-proAB), galE, strA, mutS:: Tn10/lacI<sup>q</sup>, Z $\Delta$ M15, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>; Zell und Fritz, 1987) durchgeführt. Die Expressionsstudien des humanen  $\beta_2$ -Mikroglobulins und Derivate wurden im *E. coli* Stamm C3000 (Hfr, sup-, thi ( $\lambda^-$ )) durchgeführt. Die Expressionsstudien des Hepatitis-B Core-Proteins und Derivate davon wurden in MC1061 [pcl857] durchgeführt. pcl857 wurde in Remaut et al., 1983b, beschrieben. Ein Derivat dieses Plasmids, pcl857K1, wurde in Steidler et al., 1994, beschrieben.

**[0072]** Das Plasmid p714 (Parker und Wiley, 1989) war ein freundliches Geschenk von Dr. K. Parker und das Plasmid pPLcA1 (Nassal, 1988) von Dr. M. Nassal. Das Plasmid pPLc245 wurde in Remaut et al., 1983a, beschrieben.

**[0073]** Für die Konstruktionen und Expressionen im *Lactococcus lactis* Stamm wurde MG1363 (Gasson, 1983) verwendet. Der Vektor für die konstitutive Expression in *L. lactis*, pTREX1 (Wells und Schofield, 1996), war ein großzügiges Geschenk von Dr. K. Schofield. Das Plasmid pL2MIL2 für die Expression von Interleukin

2 ist in Steidler et al., 1995, beschrieben. Ein analoges Plasmid für die Expression von Interleukin 6, pL2MIL6, wird in Steidler et al., 1996, beschrieben.

**[0074]** Der Vektor pSG5.C3d.YL (Dempsey et al., 1996) ist ein Geschenk von Dr. Fearon.

**[0075]** Der Bakulovirustransfervektor pACGP67A (Pharmingen, San Diego, CA, USA) enthält ein modifiziertes Segment des Bakulovirusgenoms, das den Polyhedrinpromoter gefolgt von dem Sekretionssignal, das von dem gp67 Bakulovirusprotein abgeleitet wurde, und eine Klonierungstelle zum Einsetzen einer fremden Gensequenz. Er wird hergestellt, um die Integration in das Bakulovirusgenom (oder einer modifizierten Version davon) mittels homologer Rekombination zu erlauben. Das resultierende rekombinante Bakulovirus ist in der Lage, das Gen von Interesse ausgehend vom Polyhedrinpromoter als sekretiertes Protein mittels Spaltung des gp67 Sekretionssignals zu exprimieren.

## 2. Virus

**[0076]** Das Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) wurde an Mäuse durch mehrfache Lungenpassagen angepasst. Nach der Anpassung wurde das Virus in Eiern gezüchtet (Kendal et al., 1982), und über einen Saccharosegradienten gereinigt. Der Titer [(Hämagglutininierungseinheiten (HAU) (Hirst, 1941; Kendal et al., 1982))] und die Letalität in Mäusen wurde bestimmt. Im Falle von m.a. A/PR/8/34 korrespondierten 1 LD<sub>50</sub> mit 10 HAU, die in 50 µl vorlagen.

**[0077]** Der Influenzastamm X-47 (H3N2)(Baez et al., 1980) wurde in Experimenten für die heterologe Exposition verwendet. Dieser Stamm wurde an Mäuse über mehrere Lungenpassagen angepasst.

## 3. Tiere

**[0078]** Weibliche Balb/c-Mäuse wurden von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) gekauft. Die Mäuse wurden im Alter von 6 bis 7 Wochen verwendet.

## 4. Antikörper

**[0079]** Der monoklonale Mausantikörper, der gegen das Hepatitis B Core-Protein gerichtet ist, war ein freundliches Geschenk von Dr. Sc. H. Claeys (Bloedtransfusiecentrum, Leuven).

**[0080]** Ein monoklonaler Mausantikörper, der spezifisch für das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist, wurde von Boehringer erworben (Mannheim, Deutschland).

**[0081]** Mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper, die spezifisch für Maus IgG oder Maus IgG ( $\gamma$ -Kette-spezifisch) waren, wurden von Sigma Chemical Co. gekauft (St. Louis, Mo., USA).

## 5. Wachstumsmedien

**[0082]** E. coli wurde in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl) gezüchtet, soweit nichts anderes erwähnt ist. Das M9-Minimalmedium (Miller, 1972), supplementiert mit 0,2% Casaminoäuren, wurde in Experimenten verwendet, wenn die exprimierten Proteine in das Wachstumsmedium sekretiert wurden und aufgereinigt werden mussten.

**[0083]** Das M17-Wachstumsmedium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), ergänzt mit 0,5% Glukose (GM17), wurde für die Kultivierung von L. lactis verwendet. Erythromycin wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet (Medium GM17E). L. lactis wurde bei 28°C ohne Schütteln verwendet.

**[0084]** Die Hybridome und die Myelomzellen wurden in RPMI 1640 gezüchtet (Gibco BRL, Bethesda, Md., USA), das mit 10% fötalem Kälberserum, 0,3 mg/ml L-Glutamin, 0,4 mM Natriumpyruvat, 100 u/ml Penicillin und 100 ng/ml Streptomycin ergänzt wurde.

**[0085]** Sf9 Insektenzellen wurden in TC100-Medium kultiviert (Gibco BRL, Bethesda, MD, USA), das mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 ng/ml Streptomycin ergänzt wurde.

## 6. Adjuvanzen

**[0086]** Für die erste Immunisierung wurde Rib-Adjuvans (Ribi Immunochem Research Inc., MT, USA) verwendet. Eine vollständige Dosis an Rib-Adjuvans enthält 50 µg MPLA (Monophosphoryllipid A), 50 µg TDM (Trehalose-Dicorynomycolat), 2% Squalen und 0,01% Tween 80.

**[0087]** Für die zweite und dritte Immunisierung wurde MPLA (Ribi Immunochem Research Inc., Hamilton, MT, USA) alleine oder gemischt mit einer gleichen Menge an Adjuvanspeptid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) verwendet.

## 7. DNA-Manipulationen

**[0088]** Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen, T4-Polynukleotid-Kinase und T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim, Deutschland; Gibco BRL, Bethesda, Md. USA, oder New England Biolabs, Beverly, MA, USA) wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet. Zu analytischen Zwecken wurde Plasmid DNA gemäß Birnboim und Doly (1979) extrahiert. Zu präparativen Zwecken wurde die Plasmid DNA gemäß Kahn et al. (1979) isoliert. Restriktionsfragmente und DNA wurden mittels des GeneClean-Verfahrens nach Vogelstein und Gillespie (1979) und Struhl (1985) isoliert. Die erforderlichen Materialien wurden von Bio 101 (La Jolla, CA., USA) erworben. Für die Isolierung von Plasmid DNA aus *L. lactis* war eine Vorbehandlung der Bakterien zur Schwächung der Zellwand notwendig. Das bakterielle Pellet wurde in 50 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8–1 mM EDTA) resuspendiert. Danach wurden weitere 50 µl TE mit 10 mg/ml Lysozym (Boehringer, Mannheim, Deutschland) ergänzt und 200 µl/ml Mutanolysin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) zugefügt. Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten auf 37°C inkubiert und dann für 5 Minuten auf Eis gesetzt. Weitere Behandlungen waren identisch zu jenen, die für die Plasmidisolation aus *E. coli* verwendet wurden.

**[0089]** Für alle Herstellungen in *L. lactis* wurde gereinigte Plasmid-DNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen unter Verwendung von Qiaex II (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

## 8. PCR-Amplifikation

**[0090]** Alle PCR-Reaktionen wurden gemäß einem Basisprotokoll ausgeführt. In jeder Reaktion wurden ungefähr 50 ng reiner Matrize und 50 pmol Sense- und Antisense-Oligonukleotide (Life Technologies, Paisley, UK) verwendet. Zwei Einheiten Vent<sub>R</sub>®DNA-Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA., USA) wurden nach Erhitzen der Proben auf 94°C zugesetzt. Die Anlagerungstemperatur ( $T_a$ ) wurde gemäß der Zusammensetzung der Primer auf ungefähr 7°C unterhalb der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) eingestellt. In diesen PCR-Amplifikationen wurden die besten Ergebnisse bei 60°C erhalten. Die Synthese von hbc und den Fusionsgenen ipm2hbc und im2hbc wurde für 45 Sekunden auf 72°C ausgeführt. Die Synthese der Sequenz, die für den extrazellulären Teil des M2-Proteins kodiert (cm2 und sm2), wurde für 20 Sekunden auf 72°C gelassen. Insgesamt wurden 30 Amplifikationsrunden durchgeführt. Die Kontrollreaktionen enthielten keine Oligonukleotide. Drei verschiedene Konzentrationen an MgSO<sub>4</sub>, 2, 3 und 4 mM, wurden verwendet. Die PCR-Reaktion, die eine signifikante Menge des erwarteten Fragments unter den stringentesten Bedingungen bewirkte (niedrigste Mg<sup>2+</sup>-Konzentration und höchste  $T_m$ ), wurde für das weitere Klonieren verwendet.

**[0091]** Das C3d3-Fragment wurde vom pSG5.C3d.YL mit den Oligonukleotiden C3ds und C3da unter Verwendung von Pwo DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) amplifiziert. Die Anlagerungstemperatur wurde auf 60°C gesetzt und die Synthese wurde für 2 Minuten auf 72°C durchgeführt.

**[0092]** Die Amplifikation des Bakulovirus gp67 Sekretionssignals wurde mit Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) vom pACGP67A unter Verwendung der Primer GP67s und GP67a gemacht. Insgesamt wurden 25 Zyklen mit einer Synthese auf 72°C für 1 Minute durchgeführt.

## 9. Ligation

**[0093]** Die Ligationen für *L. lactis* wurden mit Ready-To-Go™ T4 DNA-Ligase (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), durchgeführt. Nach Inkubation für 1 Stunde auf 20°C wurde das Gemisch mit Phenol (Life Technology, Paisley, UK) und Chloroform/Iso-Amyl-Alkohol (24/1) extrahiert. Die DNA wurde mit see-DNA (Amersham International, Buckinghamshire, UK) präzipitiert. Das vollständig resuspendierte Pellet wurde für die Elektroporation verwendet (Wells et al., 1993).

## 10. Proteinaufreinigungsmedien

**[0094]** Alle Chromatographiemedien wurden von Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) erworben mit Ausnahme der CF11-Zellulose, die von Whatman International Ltd. (Maidstone, UK) erworben wurde.

## 11. Proteingele

**[0095]** Die Proteinproben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gemäß Laemmli, 1970, analysiert. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit 10% Trichlor-Essigsäure fixiert und mit 0,05% Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in Entfärber gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Inkubation des Gels in Entfärber (30% Methanol–7% Essigsäure) entfernt. Das Gel wurde in 40% Ethanol eingeweicht, bevor es zwischen zwei Blättern permeablen Zellophans getrocknet wurde.

## 12. Western-Blot und Dot-Blot

**[0096]** Für die immunologische Charakterisierung wurden die Proteine elektrophoretisch vom SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Porendurchmesser 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassal, Deutschland) mittels eines Trockenblotapparats (Plexi-labo, Gent, Belgien) transferiert. Der Filter wurde für mindestens 2 h in PBS pH 7,4 (14,5 mM Phosphatpuffer pH 7,4 – 150 mM NaCl) mit 2,5% Magermilchpulver und 0,1% Triton X-100 (Blockierpuffer) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in Blockierpuffer verdünnt wurde, wurde auf Raumtemperatur für 30 bis 60 Min. ausgeführt. Überschuss an ungebundenem Antikörper wurde durch drei Waschschrte mit Blockierpuffer entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper der geeigneten Spezifität nachgewiesen. Anschließend wurde der Filter zweimal mit PBS pH 7,4 – 0,1% Triton X-100 gewaschen. Ein dritter Waschschrte wurde mit dem Substratpuffer ausgeführt (100 mM Tris-HCl pH 9,5 – 100 mM NaCl – 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Der Filter wurde dann in Substratpuffer mit 165 µg/ml Nitroblautetrazolium (NBT) und 165 µg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) inkubiert, bis ein klares Signal erschien. Der Blot wurde schließlich gründlich mit Leitungswasser gewaschen und getrocknet.

**[0097]** Die Dot-Blot-Analyse wurde auf ähnliche Weise wie der Western-Blot ausgeführt, mit der Ausnahme, dass die Proteine nicht durch Elektrophorese sondern durch Filtern der Proben durch eine Nitrozellulosemembran transferiert wurden.

## 13. ELISA

**[0098]** In jedem ELISA wurde eine 0,1%-ige Kaseinlösung zum Blockieren und zur Herstellung der Antikörperverdünnungen verwendet. Die Kaseinvorratslösung (2,5%) wurde wie folgt zubereitet: 6,25 g Kaseinpulver wurden in 200 ml 300 mM NaOH über Nacht unter Rühren bei 37°C aufgelöst. Der pH wurde dann auf 7,0 durch Zugabe von 2 N HCl eingestellt. Das Endvolumen wurde auf 250 ml (Nunc Bulletin Nr. 7, Dezember, 1989) gebracht. Natriumazid (0,02%) wurde als Konservierungsmittel zugesetzt.

**[0099]** Verschiedene ELISA's wurden entwickelt, um die Konzentration der Hepatitis B Core- oder der menschlichen β2-Mikroglobulininfusionsproteine zu bestimmen. Die Mikrotiterplatten (Typ II F96 maxisorp Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) wurden für 1,5 h auf Raumtemperatur oder über Nacht auf 4°C mit einer 1/2-Verdünnungsserie der Proben beschichtet, die IPM2HBcm oder IPM2hB2Mm enthielten. Auf der gleichen Platte wurde eine 1/2-Verdünnungsserie des gereinigten HBc bzw. hB2M, ausgehend von 2 µg/ml, als Standard verwendet. Zwischen jedem Inkubationsschrte wurden die Platten zweimal mit Leitungswasser und einmal mit PBS, pH 7,4 – 0,05% Triton X-100 gewaschen, mit der Ausnahme, dass nach dem Blockieren die Platten nicht gewaschen wurden. Die Mikrotiterplatten wurden mit 0,1% Kaseinlösung für 2 h auf Raumtemperatur oder auf 4°C über Nacht blockiert. Als Primärantikörper verwendeten wir Maus Anti-HBc bzw. Maus Anti-hB2M. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-Maus IgG (γ-kettenspezifisch) Antikörper nachgewiesen. Die Inkubation mit der Antikörperlösung wurde bei Raumtemperatur für 1,5 h ausgeführt. Schließlich wurden die Mikrotiterplatten für 1 h mit Substratpuffer (10% Diethanolamin – 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> – 0,02% NaN<sub>3</sub> pH 9,8), der 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat enthielt, inkubiert. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen und die Wellenlänge bei 490 nm wurde zur Normalisierung verwendet.

## 14. Zubereitung polyklonalen Anti-M2's

**[0100]** Alle Mäuse, die mit IPM2HBcm immunisiert worden waren und die letale Exposition mit m.a. A/PR/8/34 Influenza A-Virus (siehe Ergebnisse, Immunisierung) überlebt hatten, wurden mit 250 µl 25 mg/ml Tribromme-

thanol (i. p. injiziert) anästhesiert und Blutproben wurden mittels Herzpunktion genommen. Das Serum wurde wie unten hierin beschrieben isoliert. Das Rohserum gab einen hohen Hintergrund im Western-Blot, daher wurde eine IgG-Fraktion zubereitet. Das Rohserum wurde durch einen 0,45 µm Filter (Millipore Millex-HV, Millipore, Bedford, MA., USA) gefiltert und 10-fach in Ladepuffer (PBS-10 mM EDTA, pH 8) verdünnt. Dieses Gemisch wurde auf eine äquilibrierte Protein-G-Sepharose-4-Fast-Flow-Säule ( $\varnothing = 1$  cm, h = 8 cm) geladen. Die gebundenen IgG-Moleküle wurden mit 100 mM Glyzin-HCl, pH 2,7, eluiert. Fraktionen zu 1 ml wurden in Röhrchen gesammelt, die, um den pH ins Neutrale zu bringen, 50 µl 1 M Tris-HCl pH 9,5, enthielten.

**[0101]** Die Quantität der Anti-M2-Antikörper in den vereinigten Peak-Fractionen war 2,6 µg/ml. Das wurde in einem ELISA bestimmt, vergleichbar zum Nachweis der Anti-M2-Antikörper im Serum immunisierter Mäuse. Ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen humanes  $\beta$ -Mikroglobulin (Cymbus Bioscience, Southampton, UK) wurde als Standard verwendet.

#### 15. Serumzubereitung

**[0102]** Fünf Blutproben wurden von jeder Maus genommen: Das Präimmunserum (a), das Serum das nach der ersten (b), nach der zweiten (c) und nach der dritten (d) Immunisierung genommen wurde, und das Serum, das nach der Exposition (e) genommen wurde. Dieses Blut wurde für 30 Min. auf 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann auf Eis für wenigstens 1 Stunde gesetzt und zweimal 5 Min. auf 16000 g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Serum wurde isoliert.

**[0103]** Gleiche Volumina von Seren, die von verschiedenen Mäusen erhalten wurden, wurden für die Analyse der Antikörperherstellung vereinigt.

#### 16. RT-PCR

**[0104]** Allantoide Flüssigkeit von A/Ann Arbor/6/60 (215 HAU) wurden in AMV-Puffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland) auf 65°C für 30 Min. inkubiert. 1/20 dieses Gemischs wurde für die reverse Transkriptase (RT-)Reaktion verwendet. Zu diesem vRNA (genomische virale RNA Gemisch wurden 50 µmol Oligonukleotid (RT-NTRNA7), 10 mM DTT und 2,5 mM dNTP zugesetzt. Nach einer Inkubation für 10 Min. auf 70°C wurden 20 Einheiten AMV reverser Transkriptase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 40 Einheiten RNase Inhibitor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Die RT-Reaktion wurde auf 42°C für 1 h durchgeführt. 1/3 dieses Reaktionsgemischs wurde für die PCR-Reaktion verwendet, wie bereits früher beschrieben.

#### 17. Transfektion und Expression

**[0105]** HEKT-Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte zu  $2 \times 10^5$  Zellen/Loch gesetzt und für 24 h kultiviert. 2 µg pDNA wurden zusammen mit FuGene TM 6 Transfektionsreagenz (Boehringer, Mannheim, Deutschland) zu den Zellen zugegeben. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 100 µl PBS, pH 7,4 – 5 mM EDTA – 0,5% Nonidet P40 lysiert. Die lösliche Fraktion wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 10 000 g isoliert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS, pH 7,4 resuspendiert.

#### 18. DNA-Vakzin-erung

**[0106]** Die Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 1 µg/µl verwendet. Drei intramuskuläre Injektionen wurden in einem drei-wöchigem Intervall verabreicht. Das Serum wurde zwei Wochen nach jeder Immunisierung entnommen, vereinigt und in einem ELISA für die Antikörperreaktion gegenüber dem extrazellulären Teil des M2-Proteins (siehe Material und Methoden hierin weiter oben) analysiert.

#### 19. ELISA II

**[0107]** Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/ml M2, das in Sf9 Insektenzellen exprimiert wurde (Black et al., 1993a, b) beschichtet. Der Rest der Prozedur war wie im vorhergehenden Teil der Material und Methoden beschrieben.



## 20. Liste der Plasmide

## 20.1 E. coli

pATIPM2m1:	Plasmid, das das ununterbrochene m2-Gen von A/PR/8/34 enthält
pIPM2hB2Mm2s2:	Plasmid zur Expression von IPM2hB2Mm, mit dem richtigen Amino-Terminus von M2
pPLcIPM2HBc:	Expressionsplasmid für IPM2HBc mit vier Aminosäuren zwischen dem initiierten Methionin und dem Amino-Terminus von M2e
pPLcIPM2HBcm:	Expressionsplasmid für IPM2HBcm mit dem richtigen Amino-Terminus von M2e. Die Sequenz von M2 wurde von A/PR/8/34 abgeleitet.
pPLcIM2HBcm:	Expressionsplasmid für IM2HBcm mit dem richtigen Amino-Terminus des universellen M2.

## 20.2 L. lactis

pT1TT:	Plasmid für die Expression von TTFC
pT1PM2LTT:	Expression von IPM2TT mit Leucinkodons, die an L. lactis angepasst wurden. Die Sequenz von M2e wurde abgeleitet von A/PR/8/34.
pT1PM2LTTIL2:	Expression von IPM2TT mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL2
pT1PM2LTTIL6:	Plasmid für die Expression von IPM2TT mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL6
pT1HBc:	Plasmid für die Expression von HBc
pT1HBcIL2:	Expression von HBc in Kombination mit mL2
pT1HBcIL6:	Expression von HBc in Kombination mit mL6
pT1PM2HBc:	Plasmid für die Expression von IPM2HBcm. Die Sequenz von M2e wurde von A/PR/8/34 abgeleitet.
pT1PM2HBcIL2:	Expression von IPM2HBcm in Kombination mit mL2
pT1PM2HBcIL6:	Expression von IPM2HBcm in Kombination mit mL6
pT1M2HBc:	Plasmid für die Expression von IM2HBcm mit der universellen Sequenz für M2e
pT1M2HBcIL2:	Expression von IM2HBcm in Kombination mit mL2
pT1M2HBcIL6:	Expression von IM2HBcm in Kombination mit mL6
pT1PM2LHBC:	Plasmid für die Expression von IPM2HBcm mit an L. lactis angepassten Leucinkodons
pT1PM2LHBCIL2:	Expression von IPM2HBcm mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL2
pT1PM2LHBCIL6:	Plasmid für die Expression von IPM2HBc mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL6
pT1M2LHBC:	Expression von IM2HBcm mit an L. lactis angepassten Leucinkodons
pT1M2LHHcIL2:	Expression von IM2HBcm mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL2
pT1M2LHBCIL6:	Expression von IM2HBcm mit angepassten Leucinkodons in Kombination mit mL6
pT1cM2L:	Plasmid für die Expression der zytoplasmatischen Form von M2e mit an L. lactis angepassten Leucinkodons
pT1cM2LC3d:	Expression von cM2LC3d mit angepassten Leucinkodons
pT1cM2LC3d3:	Expression von cM2LC3d3 (mit drei aufeinander folgenden C3d-Domänen) mit angepassten Leucinkodons
pT1sM2LX:	Plasmid für die Expression der sekretierten und der verankerten Form von M2e mit an L. lactis angepassten Leucinkodons
pT1sM2LC3d:	Expression von sM2LC3d mit angepassten Leucinkodons
pT1sM2LC3d3:	Expression von sM2LC3d3 (mit drei aufeinander folgenden C3d-Domänen) mit angepassten Leucinkodons

## 20.3

pUCM2:	Plasmid, das das ununterbrochene m2-Gen von A/Ann Arbor/6/60 enthält
pCDNA3:	Ausgangsvektor für die eukaryotische Genexpression
pCIM2:	das Plasmid, das für die DNA-Vakzinierungen verwendet wurde, es trägt das ununterbrochene m2-Gen von A/Ann Arbor/6/60
pCIM2HBcm:	das Plasmid, das für die DNA-Vakzinierungen verwendet wurde, es trägt im2hbcn
pCIP3M2HBcm:	das Plasmid, das für die DNA-Vakzinierungen verwendet wurde, es enthält dreimal die extrazelluläre Domäne des M2-Proteins genetisch fusioniert an das Hepatitis B Core-Protein. Das Fusionsprotein, IP3M2HBcm beginnt mit dem richtigen Amino-Terminus von M2e. Die Sequenz von M2 wurde von A/PR/8/34 abgeleitet.

## EXPERIMENTE

## 1. Herstellung, von pATIPM2m

**[0108]** Das RNA-Segment 7 des Influenza A-Virus A/PR/8/34 (H1N1) wurde mittels einer Prozedur wie vorher für RNA-Segment 4 in Min Jou et al., 1980, beschrieben, kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pATIPMA genannt und ist kommerziell erhältlich (LMBP Katalog 1992, Nr. 1774).

**[0109]** Die mRNA des M2-Proteins ist kein colineares Transkript des RNA-Segments 7. Tatsächlich mußte ein 689 Nukleotide-langes Intron entfernt werden (Lamb et al., 1981).

**[0110]** Im Plasmid pATIPMA schneidet Stul nach dem ersten Nukleotid des zweiten Exons (siehe [Fig. 1a](#)). Dieses Nukleotid wurde in den synthetischen Oligonukleotiden mit eingeschlossen, die zur Kodierung des ersten Exons verwendet wurden. Das synthetische erste Exon, das den Amino-Terminus des reifen M2-Proteins kodiert, wurde so entworfen, dass es einen einzelsträngigen GATC-Überhang am 5'-Ende enthielt. Das erlaubte es uns, die Verbindung zu einer vorhergehenden BamHI-Stelle im Vektor pATIPMA zu machen und das ursprüngliche erste Exon zu ersetzen.

**[0111]** Darüber hinaus wurde die Kodonverwendung für die Expression in *E. coli* optimiert.

**[0112]** Als nächstes führten wir mittels ortsspezifischer Mutagenese (Stanssens et al., 1989) eine BclI-Stelle an der Verbindungsstelle zwischen dem extrazellulären Teil und der Membranverankerungsregion des M2-Proteins ein (siehe [Fig. 1b](#)). Die Aminosäuresequenz des extrazellulären Teils wurde nicht verändert. Das resultierende Plasmid, pATIPM2m1, trägt das ununterbrochene m2-Gen aus A/PR/8/34.

## 2. Herstellung von IPM2hB2Mm

**[0113]** Parker und Wiley (1989) exprimierten humanes  $\beta$ 2-Mikroglobulin im Periplasma von *E. coli* indem sie das Plasmid p714 verwendeten. Das Plasmid enthält den kodierenden Bereich für  $\beta$ 2-Mikroglobulin, dem die Signalsequenz des äußeren Membranproteins A von *E. coli* (OmpA-ss) vorausgeht (siehe [Fig. 2a](#)). Die OmpA-Signalsequenz wird für die Translokation des Proteins, an das diese Sequenz fusioniert ist, ins Periplasma benötigt. Die Signalsequenz wird nach dem Transport abgespalten. Auf dem Plasmid p714 steht das humane  $\beta$ 2-Mikroglobulin unter der Kontrolle sowohl des Lipoprotein(lpp)- als auch des lacWS-Promoters. Zusatz von 1 mM IPTG im Laufe einer halblogarithmischen Wachstumsphase einer Kultur führt zur Herstellung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin.

**[0114]** Die kodierende Sequenz des extrazellulären Teils des M2-Proteins, die als ein BamHI-BclI-Fragment aus pATIPM2m1 isoliert wurde, wurde zwischen die Signalsequenz des ompA und dem humanen  $\beta$ 2-Mikroglobulin eingesetzt (für Details siehe [Fig. 2a](#)). Aufgrund der Konstruktion befanden sich neun zusätzliche Nukleotide zwischen dem Ende der ompA-Signalsequenz und dem Beginn des m2-Fragments, die entfernt werden mussten (siehe [Fig. 2b](#)). Das wurde mittels „Looping out“-Mutagenese gemäß Nakamaye und Eckstein, 1986, gemacht. Als ein Ergebnis wurde das Plasmid pIPM2hB2Mm2s2 erhalten.

## 3. Lokalisierung des IPM2hB2Mm

**[0115]** Eine frisch angezogene Vorkultur von C3000, die p714 oder pIPM2hB2Mm2s2 enthielt, wurde 1/100 in LB mit Ampicillin verdünnt. Wie oben beschrieben standen die hb2m- und ipm2hb2mm-Gene unter Kontrolle des lacUV5-Promoters. Sobald die Kulturen eine Dichte von ungefähr  $5,5 \times 10^8$  Bakterien/ml erreichten, wurden sie in zwei Teile aufgeteilt und eine Hälfte jeder Kultur wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h Induktion wurden die Bakterien geerntet und fraktioniert. Das Periplasma der Bakterien wurde mittels osmotischem Schock (Neu und Heppel, 1965) isoliert. Die verbleibenden Bakterien wurden sonifiziert (Vibra cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, Conn., USA) und für 10 Min. auf 16000 g zentrifugiert, um das Zytoplasma zu isolieren. Die verschiedenen Proben wurden auf einem 15%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Humanes B2M und das Fusionsprotein IPM2hB2Mm wurden in das Periplasma transportiert, wohingegen die Vorläufer, die immer noch die Signalsequenz enthielten, mit den Bakterien assoziiert blieben. Die Bestimmung des Amino-Terminus des reifen IPM2hB2Mm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Vandekerckhove) über automatisierten Edman-Abbau mit einem Modell 470A Gasphasensequenzierer gekoppelt an ein Modell 120A On-Line-Phenylthiohydantoin Aminosäure-Analysator (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA), zeigte, dass die OmpA-Signalsequenz korrekt abgespalten wurde.

## 4. Aufreinigung von IPM2hB2Mm

**[0116]** Das Fusionsprotein IPM2hB2Mm konnte effizient im Periplasma von *E. coli* exprimiert werden. Während das Durchführen eines osmotischen Schocks eine kritische Prozedur ist, insbesondere bei großen Volumina, beschrieben Steidler et al. (1994) ein elegantes System, das auf der kontrollierten Expression des Kil-Proteins aufbaut, zur Freisetzung periplasmatischer Proteine in das Wachstumsmedium.

**[0117]** Das kil-Gen liegt auf einem kompatiblen Plasmid unter der Kontrolle des stringent regulierten  $P_L$ -Promotors vor, dem linken Promoter des Phagen  $\lambda$  (Remaut et al., 1981). Das Plasmid pcl857K1 trägt auch den temperatursensitiven Repressor des  $P_L$ -Promotors, cl857. Das Fusionsprotein IPM2hB2Mm wird nach Induktion mit 1 mM IPTG synthetisiert und am Ende der Herstellungsphase wird die Kultur von 28°C auf 42°C umgestellt, um Kil zu induzieren.

**[0118]** Eine Fermentation (BioFlo IV Fermentor, New Brunswick Scientific Co., Edison, N. J., USA) wurde mittels der oben beschriebenen Standardinduktionsprozedur ausgeführt. Die Kultur wurde in einer Kontifuge 17RS (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) auf 11000 g zentrifugiert und das Wachstumsmedium wurde isoliert. Die Natriumchloridkonzentration des Wachstumsmediums wurde auf 300 mM angepasst und mit 20 mM MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), pH 6,5 gepuffert. Diese Lösung wurde auf eine mit 20 mM MES, pH 6,5 – 300 mM NaCl äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule ( $\varnothing = 5$  cm, h = 6,5 cm) geladen. Unter diesen Bedingungen band IPM2hB2Mm nicht an die Matrix. Die Ammoniumsulfatkonzentration des Durchflusses wurde auf 0,8 M mit einer 3,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, pH 7, gebracht. Das Gemisch wurde auf eine mit 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibrierte Phenylsepharosesäule ( $\varnothing = 5$  cm, h = 17 cm) geladen. Ein fallender Ammoniumsulfatkonzentrationsgradient, der mit 0,8 M begann und bei 0 endete, setzte das gebundene Fusionsprotein nicht frei. Das wurde durch Eluieren der Säule mit einem pH-Gradienten von 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 – 5 mM NaAc, pH 5,5, erreicht. Die Peak-Fractionen wurden vereinigt und 10-fach in 20 mM Diethylamin (DEA), pH 8,5, verdünnt.

**[0119]** Das vollständige Gemisch wurde auf eine mit 20 mM DEA, pH 8,5, äquilibrierten Sepharose Q-Säule ( $\varnothing = 0,8$  cm, h = 2,3 cm) geladen. Das Protein wurde von der Säule mit einem Salzgradienten von 0–1 M eluiert. Die Peakfraktionen wurden vereinigt und auf eine Sephacryl S-100-Gelfiltrationssäule ( $\varnothing = 1,5$  cm, h = 47 cm) geladen. Nur ein Peak mit dem erwarteten Molekulargewicht von ungefähr 15 kDa wurde beobachtet. Das gereinigte IPM2hB2Mm wurde verwendet, um Mäuse zu immunisieren, zur Zubereitung von Hybridomen, die monoklonale Antikörper sekretieren, die gegen das M2-Protein gerichtet sind.

## 5. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das M2-Protein

**[0120]** Balb/c-Mäuse wurden dreimal mit 2,5  $\mu\text{g}$  gereinigtem IPM2hB2Mm immunisiert. Für die erste Injektion wurde eine komplette Dosis Ribi-Adjuvans verwendet. Die zweite und die dritte Immunisierung wurde in Anwesenheit von 50  $\mu\text{g}$  MPLA durchgeführt. Die Injektionen wurden in einem Intervall von drei Wochen verabreicht. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und mit den SP2/0-AG14 Myelomzellen unter Verwendung eines Standardprotokolls (Köhler und Milstein, 1975) fusioniert. Überstände verschiedener Immunglobulin-produzierender Zellklone wurden im ELISA und im Western-Blot auf Reaktivität gegen das andere Fusionsprotein IPM2HBcm (weiter unten beschrieben) getestet. Das Hepatitis B Core-Protein alleine wurde verwendet als eine Kontrolle, um falsch-positive Klone zu eliminieren. Der Isotyp des Antikörpers wurde bestimmt (Isostrip, Boehringer, Mannheim, Deutschland). Zwei verschiedene Immunglobulinsubtypen, die den extrazellulären Teil des M2-Proteins erkennen, wurden erhalten, ein IgM und ein IgG2a. In späteren Experimenten wurde vor allem der IgG2a-Antikörper verwendet.

## 6. Expression von HBc und IPM2HBcm

**[0121]** Die Expression der Proteine unter Kontrolle des  $P_L$ -Promotors wurde durch Umstellen einer exponentiell wachsenden Kultur von 28°C auf 42°C (Remaut et al., 1981) durchgeführt. Eine gesättigte Vorkultur von MC1061 [pcl857], die das Plasmid pPLc245 (Kontrolle), pPLcA1 (das das hbc-Gen trägt) oder beziehungsweise das Plasmid pPLcIPM2HBcm (das das Fusionsgen ipm2hbc enthält) enthält, wurde 1/100 in LB-Medium (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) verdünnt und für 4 h bei 28°C unter Schütteln kultiviert. Sobald die Kulturen eine Dichte von  $4,5 \times 10^8$  bis  $5,5 \times 10^8$  Bakterien/ml erreichten wurden sie aufgeteilt, eine Hälfte wurde für 4 h bei 28°C inkubiert, die andere Hälfte wurde auf 42°C umgestellt. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation (2 Min. auf 16000 g in einer Mikrozentrifuge) konzentriert.

**[0122]** Das Kulturmedium wurde entfernt und die Bakterien wurden in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl – 1 mM ED-

TA, pH 7,6) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Sonifizierung geöffnet (Vibra cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, Conn., USA) und die Bakterientrümmern wurden für 10 Min. auf 16000 g in einer Mikrozentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde isoliert und das Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden auf einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel, in einem Western-Blot und auf einem Dot-Blot analysiert.

#### 7. Herstellung von IPM2HBcm in großem Maßstab

**[0123]** Der MC1061 [pcl857, pPLcIPM2HBcm] Stamm wurde in einem BioFlo IV Fermenter kultiviert (New Brunswick Scientific Co., Edison, N. J., USA). Sobald die Kultur eine Dichte von ungefähr  $5,5 \times 10^8$  Zellen/ml erreichte, wurde die Temperatur auf 42°C angehoben. Nach dreistündiger Induktion wurde die Kultur in einer Kontifuge 17RS (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 11000 g zentrifugiert. Die Bakterien wurden gesammelt und in einem Volumen (in ml) Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8 – 150 mM NaCl – 5% Glycerin mit einer Proteaseinhibitorcocktail-Tablette (Complete; Boehringer, Mannheim, Deutschland) pro 25 ml) entsprechend dem zweifachen Gewicht (in g) der pelletierten Bakterien resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 1 mg/ml Lysozym (frisch aufgelöst in 25 mM Tris-HCl, pH 8) für eine halbe Stunde auf Eis behandelt. Anschließend wurden die Bakterien mit 0,2% Triton X-100 in Anwesenheit von 25 mM EDTA, pH 8, lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate für 1 h in einem Sorvall SS-34-Rotor (Du Pont, Wilmington, DE, USA) bei 48000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und für die Aufreinigung von IPM2HBcm verwendet.

#### 8. Immunisierung mit IPM2HBcm

**[0124]** Balb/c-Mäusen wurde dreimal intraperitoneal, aufgereinigtes IPM2HBcm in Anwesenheit von Adjuvans injiziert. Kontrollmäuse erhielten nur PBS-Puffer, pH 7,4, und Adjuvans. Für die erste Immunisierung wurde eine halbe Dosis Ribi-Adjuvans verwendet. Bei der zweiten und dritten Injektion verwendeten wir 25 µg MPLA und 25 µg MDP.

**[0125]** Die Mäuse wurden durch Anwenden einer leichten Etheranästhesie, nach der 50 Mikroliter der Antigenlösung in PBS-Puffer, die entweder 10 Mikrogramm IPM2HBcm oder IM2HBcm ohne jedes Adjuvans enthielt, in das Nasenloch gegeben wurden, intranasal immunisiert.

#### 9. Expression in *L. lactis*

**[0126]** Einzelkolonien vom *L. lactis*-Stamm MG1363, die das Plasmid pT1HBc, pT1PM2HBc, oder beziehungsweise pT1M2HBc oder die Derivate mit mL2 (pT1HBcIL2, pT1PM2HBcIL2 und pT1M2HBcIL2) oder mL6 (pT1HBcIL6, pT1PM2HBcIL6 und pT1M2HBcIL6) enthielten, wurden jeweils mit 10 ml GM17E inokuliert. MG1363 [pTREX1] wurde als Kontrolle verwendet. Die Bakterien wurden für ungefähr 16 h bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 2000 g für 20 Min. (Sorvall 11 RT6000 D) gesammelt. Das Wachstumsmedium wurde isoliert und die Bakterien wurden in 250 µl TE resuspendiert. Nach Resuspension wurden zusätzliche 250 µl TE, ergänzt mit 10 mg/ml Lysozym und 200 u/ml Mutanolysin, zugesetzt. Dieses Gemisch wurde für 10 Min. auf 37°C inkubiert und dann für 5 Min. auf Eis gestellt. Dann wurden 500 µl Laemmli Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8 – 5% SDS – 1,2 M β-Mercaptoethanol – 0,008% Bromphenolblau – 16% Glycerin) zugesetzt und die Proben wurden für 5 Min. gekocht. Ein Äquivalent zu 1 ml Originalkulturvolumen oder  $10^9$  Bakterien wurden auf einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Die Herstellung von mL2 oder mL6 im Kulturüberstand wurde in einem Bio-Assay der auf der Proliferation von CTLL2-Zellen (mL2, Gillis et al., 1978) oder der Proliferation eines B-Zellhybrids, 7TD1 (mL6, Van Snick et al., 1986) aufbaut, bewertet.

#### 10. Passive Immunisierung

**[0127]** Die gereinigte Zubereitung der IM2HBcm-Partikel wurde verwendet, um sieben Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse zu immunisieren. Insgesamt wurden 40 Mäuse mit 10 pg IM2HBcm immunisiert. Eine 40 Mäuse umfassende Kontrollgruppe erhielt nur Puffer. Insgesamt wurden drei Injektionen in Kombination mit geeignetem Adjuvans in dreiwöchigen Intervallen (siehe Material und Methoden) gegeben. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung wurde 28 Mäusen von jeder Gruppe Blut entnommen und das Serum isoliert (siehe Material und Methoden). Das Serum wurde intraperitoneal an naive Mäuse 24 h vor der Infektion verabreicht. Dieser Prozess wird passive Immunisierung genannt. Zwölf Mäuse erhielten 800 µl Serum von IM2HBcm immunisierten Mäusen und weitere zwölf Mäuse erhielten Serum von der Kontrollgruppe. Diese 24 Mäuse und die verbleibenden 24 immunisierten Mäuse wurden drei Wochen nach der dritten Immunisierung einer Dosis von 5 LD<sub>50</sub> m.a. X47 ausgesetzt. Das Virus wurde intranasal in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach Etheranästhesie verabreicht. Die Morbidität wurde durch Messen der Rektaltemperatur und des Gewichts jeden zweiten Tag verfolgt.

11. Konstrukte für die DNA-Vakzinierung ([Fig. 29](#))

**[0128]** Der Säugetierexpressionsvektor pCDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande), der den Promoter des Zytomegalievirus trägt, wurde verwendet, um die verschiedenen DNA-Vakzinierungsvektoren herzustellen.

**[0129]** Das ununterbrochene m2-Gen wurde mittels RT-PCR aus dem Influenza A-Virus A/Ann Arbor/6/60 (siehe Material und Methoden) isoliert. Das amplifizierte Fragment wurde mit BglII und XbaI geschnitten und in den mit BglII und XbaI geöffneten pUC19 eingesetzt. Das Plasmid wurde pUCM2 genannt. Die Sequenz des m2-Gens wurde bestimmt und es wurde gezeigt, dass sie mit der kaltadaptierten Form des Gens korrespondiert. Das m2-Gen wurde als pUCM2 als ein 321 bp langes EcoRI-XbaI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI und XbaI geöffneten pCDNA3 eingesetzt. Das führte zum Plasmid pCIM2.

**[0130]** Zwei Fusionsgene, nämlich ip3m2hbcn und im2hbcn, wurden ebenfalls in pCDNA3 eingesetzt. Das im2hbcn-Gen wurde mittels PCR von pPLcIM2HBcm amplifiziert. Das Fragment wurde mit SpeI geschnitten und mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. Dieses 630 bp lange Fragment wurde in den mit EcoRV und XbaI geöffneten pCDNA3 eingesetzt. Das resultierende Plasmid wurde pCIM2HBcm genannt.

**[0131]** Während der Herstellung von pPLcIPM2HBc (siehe [Fig. 3a](#)) wurden Plasmide auch mit zwei und drei eingesetzten M2-Fragmenten erhalten. Diese Plasmide wurden pPLcIPM2M2HBc und pPLcIP3M2HBc genannt. Das ip3m2hbcn-Gen wurde mittels PCR von pPLcIP3M2HBc amplifiziert. Das Fragment wurde mit SpeI geschnitten, mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den mit EcoRV und XbaI geöffneten pCDNA3 eingesetzt. Das Plasmid wurde pCIP3M2HBcm genannt.

**[0132]** Die Plasmid-DNA wurde mit einem EndoFreePlasmid Giga Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Konzentration der pDNA wurde mittels spektrophotometrischer Analyse bestimmt.

## 12. Expression in HEKT-Zellen

**[0133]** Die Plasmide pCDNA3, pCIM2, pCIM2HBcm und pCIP3M2HBcm wurden in HEKT-Zellen (siehe Material und Methoden) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und in einem Western-Blot-Experiment analysiert.

## 13. Analyse des Serums

**[0134]** Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurden Serumproben genommen und in einem ELISA analysiert. In Feld A von [Fig. 31](#) werden die zwei Vektoren, die das Hbc-Fusionsprotein exprimieren können, mit dem Kontrollvektor verglichen. Der ELISA wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

## ERGEBNISSE

## 1. Herstellung von IPM2HBcm

**[0135]** Das Plasmid pPLcA1 (siehe [Fig. 3a](#)) enthält das Hepatitis B Core(hbc)-Gen unter Kontrolle des P<sub>L</sub>-Promotors des Bakteriophagen  $\lambda$  (ein Geschenk von Dr. Nassal). Das 346 bp lange NcoI-XbaI Hbc-Fragment, das aus pPLcA1 isoliert wurde, wurde in den NcoI und XbaI geöffneten pMa581, ein Derivat des pMa58, eingesetzt. Das Plasmid wurde pMaHBc genannt. Am 5'Ende des Hepatitis B-Cores, direkt anschließend an das Startkodon, führten wir eine BamHI-Schnittstelle, korrekt platziert im Leserahmen des Hbc, mittels ortsspezifischer Mutagenese ein (Stanssens et al., 1989)(für Details siehe [Fig. 3a](#) und b). Das resultierende Plasmid wurde pMaHBcm genannt. Die Information, die für den extrazellulären Teil des M2-Proteins kodiert, wurde als ein 72 bp langes BamHI-BclI-Fragment, das von pATIPM2m1 abgeleitet wurde, in den BamHI geöffneten pMaHBcm kloniert, was zum Vektor pIPM2HBc führte. Das hbc-Gen im Expressionsvektor pPLcA1 wurde dann durch das 418 bp lange NcoI-XbaI m2hbc-Fragment ersetzt, was pPLcIPM2HBc schuf. Aufgrund der Herstellungsweise lagen vier zusätzliche Aminosäuren zwischen dem ersten Methionin und dem Start des extrazellulären Teils des M2-Proteins vor und mussten entfernt werden (siehe [Fig. 3c](#)). Das wurde bewerkstelligt durch „Looping out“-Mutagenese (Deng und Nickolov, 1992). Das resultierende Plasmid wurde pPLcIPM2HBcm genannt (siehe [Fig. 3a](#) und c).

## 2. Expression des Fusionsproteins

**[0136]** Die Plasmide pPLc245 (Kontrolle) und, pPLcA1 (hbc-Gen) und pPLcIPM2HBcm (ipm2hbc-Gen) wur-

den in MC1061 [pcl857] transformiert. Nach Kultur und Induktion wurden die Bakterien mittels Sonifizierung lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert und ein Aliquot der Überstände wurde auf ein 12,5%-iges SDS-PAGE-Gel geladen (siehe [Fig. 4](#)). Dieselben Fraktionen wurden auch mittels eines Western-Blots analysiert. Zwei verschiedene monoklonale Antikörper wurden verwendet: ein Antikörper, der spezifisch für das Hepatitis B Core-Protein ist und ein monoklonaler Antikörper (IgG2a), der gegen den extrazellulären Teil des M2-Proteins gerichtet ist.

**[0137]** Der monoklonale Antikörper gegen den Hepatitis B-Core offenbarte zwei verschiedenen Banden (siehe [Fig. 5A](#)), von denen eine dem Hepatitis B Core-Protein und die andere dem Fusionsprotein entsprach. Das letztere Protein hat eine geringere Beweglichkeit, was der Insertion der extrazellulären Domäne des M2-Proteins entspricht. Die Anwesenheit des M2-Fragments wurde mittels des Antikörpers, der spezifisch für den extrazellulären Teil des M2-Proteins ist, bestätigt (siehe [Fig. 5B](#)).

**[0138]** Die N-terminale Aminosäuresequenz von IPM2HBcm wurde mittels automatisierten Edman-Abbau auf einen Modell 470A Gasphasensequenzierer gekoppelt an ein Modell 120A online-Phenylthiohydantoin-Aminosäure-Analysator (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) bestimmt (Dr. J. Vandekerckhove). Diese Analyse zeigte die N-terminale Sequenz Ser-Leu-Leu, die exakt dieselbe wie die aminoterminal Sequenz des M2-Proteins des Influenza A-Virus ist ([Fig. 6](#)). Die erste Aminosäure, Methionin, wurde in *E. coli* entfernt. Der Amino-Terminus des Fusionsproteins korrespondiert daher mit dem des Wildtyp M2-Proteins (Tabelle 1; Lamb et al., 1985).

**[0139]** Das Hepatitis B Core-Protein, auch wenn es in *E. coli* exprimiert wird, assoziiert spontan um Partikel zu bilden, die nicht von den viralen Core-Partikeln, die im Blut von Hepatitis B-infizierten Patienten zirkulieren, unterschieden werden können (Cohen und Richmond, 1982). Clarke und Mitarbeiter (1987) zeigten, dass ein Peptid, das am Amino-Terminus des Hepatitis B Core-Proteins eingesetzt wird, an der Oberfläche des Partikels nachgewiesen werden konnte.

**[0140]** Elektronenmikrographien (Dr. G. Engler) zeigten, dass das IPM2HBcm-Fusionsprotein in der Lage war, ähnliche Partikel zu bilden. Um zu untersuchen, ob die Insertion des extrazellulären Teils des M2-Proteins zur Oberflächenlokalisierung dieses Fragments führte, wurden lösliche Fraktionen, die HBC oder IPM2HBcm enthielten, auf eine Nitrozellulosemembran in einem Dot-Blot geladen. Die Dot-Blots wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen HBC oder gegen M2 gerichtet ist, behandelt. [Fig. 7](#) zeigt klar ein Signal in der löslichen pLcIPM2HBcm-Fraktion, wenn diese mit einem Antikörper, der gegen das M2-Protein gerichtet ist behandelt wird (Feld B). Weil die lösliche Fraktion im nativen Zustand auf die Nitrozellulosemembran geladen wurde, schlussfolgern wir, dass sich das Epitop auf der Oberfläche des Hepatitis B Core-Partikels befindet.

### 3. Reinigung des IPM2HBcm

**[0141]** Die bakteriellen Lysate wurden zubereitet wie in Material und Methoden beschrieben. Die Konzentration von Tris-HCl, pH 8, und NaCl wurden auf 20 mM bzw. 50 mM eingestellt. Dieses Gemisch wurde auf ein mit 20 mM Tris-HCl, pH 8–50 mM NaCl äquilibrierte DEAE-Sepharosesäule ( $\varnothing = 2,5$  cm,  $h = 5,5$  cm) geladen. Das Fusionsprotein wurde nicht von der Säule zurückgehalten. Zum Durchfluss wurde 3,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7, bis zu einer Endkonzentration von 1,2 M zugesetzt. Dieses Gemisch wurde unter Rühren im Kaltraum für 16 h inkubiert. Das Präzipitat wurde über eine CF11-Zellulosesäule ( $\varnothing = 2,5$  cm,  $h = 3,5$  cm) entfernt. Die Säule wurde mit PBS, pH 7,4, eluiert. Das Eluat von ungefähr 50 ml wurde in einer Zentriprep 30 (Amicon Corporation, Danvers, 111., USA) auf 5 ml konzentriert und auf eine Sephacryl S-300-Säule ( $\varnothing = 2,5$  cm,  $h = 91$  cm) geladen, die mit PBS, pH 7,4, äquilibriert worden war. Die Peak-Fractionen wurden vereinigt und die Konzentration des IPM2HBcm wurde in einem ELISA bestimmt. Der LPS-Gehalt wurde bestimmt (LAL Coatest<sup>®</sup> Endotoxin erworben von Endosafe Inc., Charleston, SC., USA) und war ausreichend niedrig (5 bis 9 ng/50  $\mu\text{g}$  IPM2HBcm), um die Immunisierung nicht zu stören.

### 4. Immunisierung

**[0142]** Die gereinigte Zubereitung der IPM2HBcm-Partikel wurde verwendet, um sieben Wochen alte Balb/c-Mäuse zu immunisieren. Vier verschiedene Gruppen à 12 Mäuse wurden bewertet. Die erste Gruppe erhielt 50  $\mu\text{g}$  IPM2HBcm, die zweite 10  $\mu\text{g}$ , die dritte 5  $\mu\text{g}$  und die vierte, eine Kontrollgruppe, erhielt nur Puffer mit Adjuvans. Insgesamt wurden 3 Injektionen mit dem entsprechenden Adjuvans gegeben. Die Injektionen wurden in einem dreiwöchigen Intervall verabreicht. Drei Wochen nach der letzten Inokulation wurden die Mäuse einer Dosis von 5 LD<sub>50</sub> m.a. A/PR/8/34 ausgesetzt. Der Virus wurde intranasal in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  nach Etheranästhesie verabreicht. Die Morbidität wurde durch Messen der Rektaltemperatur



([Fig. 8A1](#)) und des Gewichts ([Fig. 8A2](#)) jeden zweiten Tag verfolgt.

**[0143]** Alle mit IPM2HBcm immunisierten Mäuse zeigten in signifikantem Ausmaß einen Schutz gegenüber der anschließenden Exposition gegenüber Influenza. In Abhängigkeit von der verabreichten Dosis überlebten 9 bis 11 der 12 Mäuse die Influenzainfektion im Gegensatz zu nur 2 von 11 der Kontrollgruppe (siehe [Fig. 8B](#)).

#### 5. Analyse der Serumproben

**[0144]** Einen Tag vor der ersten (Blutentnahme a) und zwei Wochen nach jeder Injektion (Blutentnahme b, c und d) wurden Blutproben genommen. Drei Wochen nach der Exposition, wenn sich die Mäuse ausreichend von der Influenzainfektion erholt hatten, wurde eine letzte Blutprobe (e) genommen. Das Serum wurde in einem ELISA (siehe Material und Methoden) analysiert, um die IgG-Antikörper, die gegen den extrazellulären Teil des M2-Proteins gerichtet sind, zu identifizieren. Um das zu machen, machten wir Gebrauch von dem anderen Fusionsprotein IPM2hB2Mm. Eine Hälfte der Mikrotiterplatte wurde mit humanem  $\beta$ 2-Mikroglobulin beschichtet, die andere Hälfte wurde mit dem Fusionsprotein IPM2hB2Mm beschichtet, wobei beide als ungereinigter Kulturüberstand verwendet wurden. Die Konzentration des verwendeten IPM2hB2Mm war 1  $\mu$ g/ml. Dieselbe Konzentration an Gesamtprotein wurde in den beiden Ansätzen verwendet. Daher musste der hB2M-Gehalt des Kulturüberstandes der Bakterien, die hB2M exprimieren, angepasst werden auf 1  $\mu$ g/ml durch Zusetzen von gereinigtem hB2M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA). Verdünnungsreihen (1/3) der verschiedenen Serumproben, beginnend mit 1/50, wurden auf die mit hB2M und IPM2hB2Mm beschichteten Löcher geladen. Der ELISA wurde wie in Material und Methoden beschrieben weiter entwickelt.

**[0145]** Um den Wert für die spezifische Reaktivität gegenüber dem extrazellulären Teil des M2-Proteins zu erhalten, wurde die Absorption des hB2M bei einer gegebenen Verdünnung von der Absorption des IPM2hB2Mm der korrespondierenden Verdünnung abgezogen. [Fig. 9](#) zeigt klar eine hohe Antikörperreaktion gegenüber dem extrazellulären Teil des M2-Proteins in Mäusen, die drei Injektionen des Vakzins erhalten hatten. Der Serumtiter stieg nach der Exposition weiter an.

#### 6. Herstellung des IM2HBcm

**[0146]** Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein universales Vakzin gegen Influenza A-Viren herzustellen. In den oben beschriebenen Vakzinierungsuntersuchungen zeigten wir den Schutz gegen das Influenza-Virus, von dem die original M2-Sequenz abgeleitet wurde, A/PR/8/34 (homologer Schutz). Der extrazelluläre Teil des M2-Proteins dieses Virus unterscheidet sich von den meisten anderen Viren, die bis dato sequenziert wurden durch nur eine Aminosäure (siehe Tabelle 1). Daher wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem das Glycin an Position 20 in ein Aspartat geändert wurde.

**[0147]** Um das zu erreichen machten wir Gebrauch von einem Zwischenproduktvektor der Herstellung von pPLcIPM2HBcm, nämlich pMalIPM2HBc2 (siehe [Fig. 3a](#)). Das Plasmid pMalIPM2HBc2 enthält noch nicht das mutierte m2 (Deletion der zwölf zusätzlichen Nukleotide)-Fragment, das am ersten reifen Kodon des M2-Proteins beginnt. Daher wurde dieses Fragment aus pPLcIPM2HBcm durch Schneiden mit SgrAI und EcoRI isoliert. Diese 499 bp lange SgrAI-EcoRI-Fragment wurde in den mit SgrAI und EcoRI geöffneten Vektor pMalIPM2HBc2 kloniert, was zur Herstellung von pMalIPM2HBc3 führte (siehe [Fig. 10](#)).

**[0148]** Durch ortsspezifische Mutagenese nach Deng und Nickoloff (1992) wurde die Sequenz des extrazellulären Teils des M2-Proteins geändert in die universalere M2-Sequenz (Gly 20  $\rightarrow$  Asp). Das neue Plasmid wurde pIM2HBcm genannt. Die Sequenz wurde auf einem Modell 373A-Sequenzierer (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) bestimmt und es wurde gezeigt, dass sie die gewünschte Mutation enthält. Das mutierte M2-Fragment wurde aus pIM2HBcm als ein 499 bp langes SgrAI-EcoRI-Fragment isoliert und wieder in den Expressionsvektor pPLcIPM2HBcm, der mit SgrAI und EcoRI geöffnet wurde, eingeführt, um pPLcIM2HBcm zu schaffen.

#### 7. Expression von IM2HBcm

**[0149]** Der Stamm MC1061 [pcl857], der pPLc245, pPLcA1, pP1cIPM2HBcm oder beziehungsweise pPLcIM2HBcm enthielt, wurde wie unter Experimente beschrieben kultiviert. Die Bakterien wurden gesammelt und mittels Sonifizierung geöffnet. Die lösliche Fraktion wurde isoliert und die Konzentration des Hepatitis B Core-Proteins oder der abgeleiteten Fusionsproteine wurde in einem ELISA bestimmt. Eine lösliche Fraktion, die 5  $\mu$ g HBc oder I(P)M2HBcm enthielt, wurde auf einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel analysiert (siehe [Fig. 11](#)). Dieselben Fraktionen wurden auch in einem Western-Blot analysiert (siehe [Fig. 12](#)). Die Proteine von

Interessen wurden mit einem Antikörper, der gegen das Hepatitis B Core-Protein gerichtet ist oder mit dem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für den extrazellulären Teil des M2-Proteins ist, nachgewiesen. Man kann schlussfolgern, dass das neue Fusionsprotein, IM2HBcm, ebenso effizient wie IPM2HBcm exprimiert wird. Darüber hinaus hat der Aminosäurewechsel im extrazellulären Teil des M2-Proteins (Gly 20 → Asp) keinen Effekt auf die Bindung des monoklonalen Anti-M2-Antikörpers.

## 8. Immunisierung gegen heterologe Exposition

**[0150]** Eine ähnliche Prozedur, wie sie unter Punkt 4 beschrieben wurde, wurde verwendet, um die Effizienz von IPM2HBcm und IM2HBcm, Mäuse gegen eine heterologe Exposition mit Influenza zu schützen, zu testen. 10 Mikrogramm von IPM2HBcm oder IM2HBcm (gereinigt in identischer Weise wie IPM2HBcm) wurden für die Immunisierung verwendet. Die Mäuse wurden 30 HAU X-47 ausgesetzt.

**[0151]** Alle immunisierten Mäuse zeigten ein signifikantes Ausmaß an Schutz gegenüber der heterologen Exposition. 8 (im Fall von IPM2HBcm,  $p < 0,05$ ) oder 12 (im Fall von IM2HBcm,  $p < 0,0001$ ) von 12 Mäusen überlebten die Influenzainfektion im Gegensatz zu nur 2 von 11 in der Kontrollgruppe ([Fig. 8C](#)).

**[0152]** Um den Effekt der intranasalen Verabreichung zu testen, wurde dieselbe Prozedur verfolgt, aber anstelle der intraperitonealen Injektion wurde das Antigen intranasal verabreicht. Auch in diesem Fall ist der Schutz deutlich: 12 (im Fall von IPM2HBcm,  $p < 0,0001$ ) oder 11 (im Fall von IM2HBcm,  $p < 0,001$ ) von 12 Mäusen überlebten die Influenzainfektion im Gegensatz zu 2 von 11 in der Kontrollgruppe (**Fig. 8D**).

## 9. Herstellung der Vektoren für die Expression der M2-HBc-Fusionsproteine in *L. lactis*

**[0153]** Das Plasmid pTREX1 (Wells und Schofield, 1996) wurde verwendet, um das Hepatitis B Core-Protein und zwei M2-HBc-Fusionsproteine, IPM2HBcm und IM2HBcm, in *Lactococcus lactis* zu exprimieren. Dieses Plasmid hat einen konstitutiven *L. lactis* chromosomalen Promotor, P1, dem der Translationsinitiationsbereich des Gen 10 des *E. coli* Bakteriophagen T7 (Wells und Schofield, 1996) folgt. Der Transkriptionsterminator wurde von der T7 RNA-Polymerase abgeleitet. Das Plasmid pTREX1 trägt auch zwei Gene für Erythromycinresistenz.

**[0154]** Das Expressionsplasmid, pTREX1, wurde mit SphI geschnitten, was einen 3'CATG Überhang hinterlässt, der mit der Klenow DNA Polymerase entfernt wurde. Die entfernten Nukleotide wurden in den Sense-Linker für PCR-Amplifikationen der verschiedenen Gene eingeschlossen. Die linearisierten Vektoren wurden dann mit BamHI geschnitten und mit CIP (Kalbsdarmphosphatase; Boehringer, Mannheim Deutschland) behandelt.

**[0155]** Die Gene *hbc*, *ipm2hbc* und *im2hbc* wurden mittels PCR (siehe Material und Methoden) amplifiziert. Der Antisense-Linker (HBca) war in allen Amplifikationen identisch und stellte eine SpeI und eine BclI-Stelle nach dem Stoppkodon zur Verfügung (siehe [Fig. 13](#)). Für die Amplifikation des *ipm2hbc* und des *im2hbc* konnte dasselbe Sense-Oligonukleotid (M2s) verwendet werden, weil die Gly → Asp Mutation im extrazellulären Teil des M2-Proteins weiter stromabwärts lokalisiert ist.

**[0156]** Die Amplifikation des *hbc* von pPLcA1 war nur möglich, nachdem der Vektor mit Scal linearisiert worden war. Der Amplifikationsbereich, der unter den stringentesten Bedingungen eine ausreichende Menge an Fragment produzierte, wurde für das weitere Klonieren verwendet. Das amplifizierte Fragment, *hbc*, *ipm2hbc* oder *im2hbc*, wurde mit BclI geschnitten, mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in dem mit SphI und BamHI geöffneten pTREX1 (siehe [Fig. 14](#)) eingesetzt. Die neuen Plasmide wurden pT1HBc, pT1PM2HBc (in dem der extrazelluläre Teil des M2-Proteins vom Virus A/PR/8/34 stammt) und pT1M2HBc (in dem die Sequenz des extrazellulären Teils des M2-Proteins dem Typ entspricht, der in nahezu allen humanen Influenza A-Viren, die bis dato sequenziert sind, vorliegt) genannt. Die Sequenzen der eingesetzten Fragmente wurden auf einem Modell 373A Sequenzierer (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) bestimmt und als korrekt bestätigt.

**[0157]** In Anbetracht der Verwendung von *Lactococcus lactis* als verbessertem Vakzinzufuhrvehikel, wurden zwei Zytokine der Maus, Interleukin 2 (mIL2) und Interleukin 6 (mIL6) als zweite Cistronen im selben Operon wie das Antigen eingesetzt. Auf diese Weise konnten wir Bakterien erhalten, die das Antigen, z. B. IM2HBcm, zusammen mit sekretiertem Interleukin 2 oder 6 der Maus exprimieren. Um die Sekretion der Interleukine in das Wachstumsmedium zu erreichen, wurden sie im Leseraster an das usp45-Sekretionssignalpeptid von *Lactococcus* (van Asseldonk et al., 1990) fusioniert. Die Plasmide pT1HBc, pT1PM2HBc und pT1M2HBc wur-



den mit *SpeI* geschnitten und mit *CIP* behandelt. Das Interleukin 2-Gen der Maus wurde aus einem 572 bp langen *XbaI*-*SpeI*-Fragment von Plasmid pL2MIL2 (Steidler et al., 1995) isoliert. Dieses Fragment wurde in die mit *SpeI* geöffneten pT1HBc, pT1PM2HBc und pT1M2HBc eingesetzt, was zu pT1HBcIL2, pT1PM2HBcIL2 bzw. pT1M2HBcIL2 führte. In analoger Weise wurde das Interleukin 6-Gen der Maus aus einem 687 bp langen *XbaI*-*SpeI*-Fragment von pL2MIL6 (Steidler et al., 1996) isoliert und in die *SpeI* geöffneten Vektoren pT1HBc, pT1PM2HBc und pT1M2HBc eingesetzt, um pT1HBcIL6, pT1PM2HBcIL6 bzw. pT1M2HBcIL6 zu schaffen.

#### 10. Expression von HBc und M2HBc in *L. lactis*

**[0158]** *Lactococcus lactis* Stamm MG1363 (Gasson, 1983), der die Plasmide für die Expression des Antigens alleine (pT1HBc, pT1PM2HBc und pT1M2HBc) oder in Kombination mit Interleukin 2 der Maus (pT1HBcIL2, pT1PM2HBcIL2 und pT1M2HBcIL2) oder Interleukin 6 der Maus (pT1HBcIL6, pT1PM2HBcIL6 und pT1M2HBcIL6) enthielt, wurde wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert. MG1363 [pTREX1] wurde als Kontrolle verwendet.

**[0159]** Ein Äquivalent zu  $10^9$  Bakterien wurde mittels 12,5%-iger SDS-PAGE analysiert. Die Expression des Hepatitis B Core-Proteins und der M2-HBc-Fusionsproteine wurde mittels Western-Immunoblots analysiert (siehe [Fig. 15](#)), die wie in Material und Methoden beschrieben ausgeführt wurde. Die Expression von IM2HBc in MG1363 [pT1M2HBcIL6] war nicht so hoch wie bei den anderen Konstrukten. Durch Durchmusterung verschiedener Kolonien konnte ein Klon mit vergleichbaren Expressionsmengen isoliert werden.

**[0160]** Die Herstellung und Sekretion der Interleukine in das Wachstumsmedium wurde in einem biologischen Assay analysiert. Die biologische Aktivität von mIL2 wurde mittels der Proliferation einer T-Zelllinie, CTLL2 (Gillis et al., 1978) im Vergleich zu einem humanen IL2-Standard untersucht. Die biologische Aktivität von mIL6 wurde gemessen mittels der Proliferation eines B-Zellhybrids, 7TD1 (Van Snick et al., 1986). Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Konzentrationen an Interleukin 2 und 6 pro ml Kulturmedium, die von den verschiedenen Expressionsplasmiden hergestellt wurden. Der Überstand von Kulturen, die mIL6 produzierten, führte nicht zur Proliferation in einem mIL2-Assay und umgekehrt.

Tabelle 2

Plasmid	mIL2-Produktion	mIL6-Produktion
pT1HBcIL2	410 ng/ml	-
pT1PM2HBcIL2	481 ng/ml	-
pT1M2HBcIL2	359 ng/ml	-
pT1HBcIL6	-	1020 ng/ml
pT1PM2HBcIL6	-	772 ng/ml
pT1M2HBcIL6	-	802 ng/ml

#### 11. Anpassung der kodierenden Sequenz von M2e an die Expression in *L. lactis*

**[0161]** Da die zwei Fusionsproteine IPM2HBcm und IM2HBcm in einem Western-Blot kaum nachgewiesen werden konnten gingen wir dazu über, die Produktion dieser zwei Fusionsproteine durch Adaption der Kodonnutzung des extrazellulären Teils des M2-Proteins an *L. lactis* (van de Guchte et al., 1992) zu verstärken.

**[0162]** Am 5'-Ende des extrazellulären Teils des M2-Proteins beobachteten wir zwei konsekutive Leucinkodons (CUG CUG), die für die Expression in *E. coli* (68%) optimal waren, aber für die Translation in *L. lactis* schlecht waren (8%, Prozentsätze beschrieben in van de Guchte et al., 1992). Daher wurden diese Kodons in UUA umgeändert. Die Gene für ipm2hbc und im2hbc wurden mittels PCR von pPLcIPM2HBcm oder beziehungsweise von pPLcIM2HBcm mit einem neuen Sense-Primer, M2Ls, der die zwei veränderten Leucinkodons enthält (siehe [Fig. 13](#)), amplifiziert. Als Antisense-Primer verwendeten wir wieder HBca (siehe [Fig. 13](#)). Das Klonieren der Gene war analog wie in [Fig. 14](#) abgebildet. Die so geschaffenen Vektoren wurden pT1PM2LHBc und pT1M2LHBc genannt.

**[0163]** Das Expressionsniveau der mutierten M2HBc-Proteine wurde im Vergleich zu den ursprünglichen Fu-

sionsproteinen in einem Western-Blot analysiert (siehe [Fig. 16](#)). Das Expressionsniveau der M2HBc-Fusionsproteine mit den an *L. lactis* angepassten Leucinkodons war in der Tat viel höher. Man schlussfolgerte, dass die Anpassung der Kodonnutzung an die *L. lactis* Translationsmaschinerie einen positiven Effekt auf das Niveau an produziertem Protein hatte. Auf ähnliche Weise wie oben beschrieben wurde das Interleukin-6-Gen der Maus in pT1PM2LHBc und pT1M2LHBc eingesetzt, was zu pT1PM2LHBcIL6 bzw. pT1M2LHBcIL6 führte.

## 12. Herstellung von M2C3d in *Lactococcus lactis*

**[0164]** Ein zweites Trägerprotein, C3d, ist auch ein attraktives Molekül für die Präsentation des extrazellulären Teils des M2-Proteins. Dempsey et al. (1996) zeigten, dass die Anlagerung eines Antigens an die drei konsekutiven C3d-Moleküle sehr viel effizienter bei der Bewirkung einer hohen Antikörperreaktion war, als wenn das Antigen im vollständigen Freud'schen Adjuvans verabreicht wurde.

**[0165]** Die Universalsequenz des extrazellulären Teils des M2-Proteins mit den angepassten Leucinkodons wurde für die Herstellung einer Fusion an den Amino-Terminus des ersten C3d-Moleküls verwendet. Die kodierende Sequenz für die drei verschiedenen Fusionsproteine wurde hergestellt. In dem ersten Beispiel wird das M2C3d3-Fusionsprotein im Zytoplasma von *L. lactis* (cM2C3d3) ähnlich wie die M2HBc-Fusionsproteine exprimiert. Im zweiten Fall wird das M2C3d3-Protein in das Wachstumsmedium sekretiert durch das Einführen einer Fusion im Leseraster mit der usp45-Signalsequenz (sM2C3d3), und das letzte Konstrukt, das ein Derivat der sekretierten Form ist, enthält zusätzlich eine Ankersequenz (spaX) nach dem letzten C3d-Molekül, um das Fusionsprotein kovalent an die Zellwand anzulagern (SM2C3d3X).

**[0166]** Das amplifizierte C3d3-Fragment wurde als erstes in ein Derivat von pUC18 subkloniert, nämlich pUCB/S. pUC18 wurde mit HindII linearisiert und ein BglII Linker wurde eingesetzt. Das resultierende Plasmid wurde dann mit SmaI geöffnet und ein SpeI Linker wurde eingesetzt, was zum Plasmid pUCB/S (siehe [Fig. 18](#)) führte. Drei nachfolgende Kopien des C3d wurden von pSG5.C3d3.YL (ein Geschenk von Dr. D. Fearon) mittels PCR mit den Oligonukleotiden C3ds und C3da (siehe [Fig. 17](#)) amplifiziert. Dieses amplifizierte Fragment wurde mit BglII und SpeI geschnitten. Das resultierende 2830 bp lange BglII-SpeI-Fragment wurde in den BglII und SpeI geöffneten Vektor pUCB/S (siehe [Fig. 18](#)) kloniert. Die Gene cm2 und sm2 wurden mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation von cm2 verwendeten wir das Sense-Oligonukleotid M2Ls (siehe [Fig. 13](#)) und den Antisense-Linker M2Ca, der für unsere Zwecke eine BamHI-Stelle im richtigen Leseraster enthielt (siehe [Fig. 17](#)). Der selbe Antisense-Linker wurde für die Amplifikation von sm2 verwendet. Das Sense-Oligonukleotid für die Amplifikation von sm2, M2Lss, begann am ersten Kodon des reifen M2-Proteins.

**[0167]** Für die Synthese der zytoplasmatischen Form von M2C3d3 wurde die Information, die für den extrazellulären Teil des M2-Proteins kodiert in pTREX1 analog wie oben für das m2hbc-Gen beschrieben eingesetzt (siehe ebenfalls [Fig. 18](#)). Das amplifizierte cm2-Fragment wurde mit BamHI geschnitten (77 bp), mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den mit SphI und BamHI geöffneten pTREX1 eingesetzt, was pT1cm2L schuf. Für die Synthese der sekretierten und verankerten Form von M2C3d3 wurde der kodierende Bereich für den extrazellulären Teil des M2-Proteins in pT1NX eingesetzt. Der Vektor pT1NX trägt die usp45-Signalsequenz (usp45-ss) und die von *Staphylococcus aureus* Protein A (spaX) abgeleitete Ankersequenz. Das Plasmid pT1NX wurde mit NaeI korrekt am Ende der usp45-ss und BamHI geschnitten. Das amplifizierte Fragment sm2 wurde mit BamHI geschnitten und mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. Dieses 73 bp lange sm2-Fragment wurde in den mit NaeI und BamHI geöffneten pT1NX eingesetzt, was zum Plasmid pT1sm2LX führte (siehe [Fig. 18](#)). Ein einzelnes C3d Fragment, das aus pUCC3d isoliert wurde, kann dann in die BamHI-Stelle am Ende der cm2 oder sm2-Sequenz eingesetzt werden. Danach können ein oder zwei zusätzliche C3d-Kopien eingesetzt werden.

## 13. Herstellung von M2TTFC in *Lactococcus lactis*

**[0168]** Ein drittes Trägerprotein, Fragment C des Tetanustoxins (TTFC), kann auch verwendet werden. TTFC ist schon in *L. lactis* unter Kontrolle des P1-Promotors, pT1TT (Wells und Schofield, 1996) exprimiert worden. *L. lactis*, die TTFC in Kombination mit mIL2 oder mIL6 exprimieren, um die Antikörperherstellung anzuheben, war erfolgreich in Immunisierungsexperimenten verwendet worden (Patent GB 9521568.7). Als Positivkontrolle für die Analyse der Antikörperreaktion in den vorliegenden Immunisierungsexperimenten mit *L. lactis*, die I(P)M2HBcm exprimieren, wurde eine Fusion zwischen dem extrazellulären Teil des M2-Proteins und dem Amino-Terminus von TTFC gemacht.

**[0169]** Das ttfc-Gen wurde mittels PCR (siehe Material und Methoden) von pT1TT amplifiziert. Das Sense-Oligonukleotid (TTFCs) stellte eine BamHI-Stelle zur Verfügung, die im richtigen Leseraster vor dem zweiten Ko-

don von tffc, das einem Threonin entspricht, positioniert ist. Der Antisense-Linker (TTFCa) stellte eine Spel und eine BamHI-Stelle nach dem Stoppkodon (siehe [Fig. 19](#)) zur Verfügung. Die Amplifikationsreaktion, die unter den stringentesten Bedingungen eine ausreichende Fragmentmenge produzierte, wurde für das weitere Klonieren verwendet (siehe Material und Methoden). Das amplifizierte tffc-Fragment wurde mit BamHI geschnitten, mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den BclI geöffneten pATIPM2m1 eingesetzt (siehe [Fig. 20](#)). Dieses Plasmidkonstrukt wurde pATIPM2TT genannt. Von diesem Plasmid wurde das m2ttfc-Gen mittels PCR (siehe Material und Methoden) mit M2Ls und TTFCa (siehe [Fig. 19](#)) amplifiziert. Das amplifizierte m2ttfc-Fragment wurde mit BamHI geschnitten, mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den mit SphI und BamHI geöffneten pTREX1 eingesetzt (siehe [Fig. 20](#)). Das neue Plasmid wurde pT1PM2LTT genannt. In diesem Konstrukt stammt der extrazelluläre Teil des M2-Proteins vom Virus A/PR/8/34 mit den zwei für die Verwendung in *L. lactis* angepassten Leucinkodons. Die Sequenz des eingesetzten Fragments wurde auf einem Modell 373A-Sequenzierer bestimmt (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA) und erwies sich als korrekt.

**[0170]** Die Interleukin-Gene der Maus, mIL2 und mIL6, wurden in dasselbe Operon wie m2ttfc eingesetzt. Das Interleukin 2-Gen der Maus wurde als ein 572 bp langes XbaI-Spel-Fragment aus Plasmid PL2MIL2 (Steidler et al., 1995) isoliert. Dieses Fragment wurde in den Spel geöffneten pT1PM2LTT eingesetzt, was zu pT1PM2LTTIL2 (siehe [Fig. 20](#)) führte. In analoger Weise wurde das Interleukin 6-Gen der Maus als ein 687 bp langes XbaI-Spel-Fragment aus pL2MIL6 (Steidler et al., 1996) isoliert und in den Spel geöffneten Vektor pT1PM2LTT eingesetzt, um pT1PM2LTTIL6 zu schaffen (siehe [Fig. 20](#)).

#### 14. Expression von TTFC und M2TTFC in *L. lactis*

**[0171]** *Lactococcus lactis* Stamm MG1363 (Gasson, 1983), der die Plasmide für die Expression des Antigens alleine (pT1PM2LTT) oder in Kombination mit Interleukin 2 der Maus (pT1PM2LTTIL2) oder in Kombination mit Interleukin 6 der Maus (pT1PM2LTTIL6) enthielt, wurde wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert. MG1363 [pT1TT] wurde als Kontrolle verwendet. Ein Äquivalent zu  $10^9$  Bakterien wurde mittels einer 10%-igen SDS-PAGE analysiert. Die Expression des IPM2TTFC-Fusionsproteins wurde mittels Western-Immunoblots analysiert (siehe [Fig. 21](#)), der wie in Material und Methoden beschrieben ausgeführt wurde. Die Herstellung und Sekretion der Interleukine in das Wachstumsmedium wurde mittels eines biologischen Assays analysiert. *L. lactis* [pT1PM2LTTIL2] produzierte ungefähr 500 ng/ml mIL2 und *L. lactis* [pT1PM2LTTIL6] ungefähr 1 µg/ml mIL6. Diese Resultate sind vergleichbar mit den Expressionsniveaus, die mit I(P)M2HBcm in Kombination mit den zwei Interleukinen erhalten werden.

#### 15. Herstellung von pACsgpM2C3d3 und Erzeugung des entsprechenden rekombinanten Bakulovirus

**[0172]** Die amplifizierte Sequenz des Bakulovirus gp67-Sekretionssignals wurde mit Spel und HindIII geschnitten und dann in das Spel-HindIII-Vektorfragment von pUCC3d subkloniert, was zu pUCsgp führte. Nach Verdau von pUCsgp mit HindIII und NaeI wurde das gp67-Sekretionssignal mit einem HindIII behandelten M2e-Fragment (universelle Sequenz), die aus einer PCR-Amplifikation erhalten wurde (Primer M2Ss und UM2ECa) ligiert. Dieses Konstrukt, als pUCsgpM2 bezeichnet, wurde mit BamHI verdaut und anschließend durch Ligation mit dem BglII-BamHI pUCC3d3-Fragment, das drei konsekutive C3d-Fragmente enthält, rezirkularisiert, was pUCsgpM2C3d3 ergab.

**[0173]** Letzteres Fragment wurde nach der Ligation des BamHI (dephosphoryliert) EcoRI pUCC3d-Fragment, des BglII (dephosphoryliert)-EcoRI pUCC3d-Fragments und des BglII-BamHI pUCC3d-Fragments ausgeschnitten. Das Spel-Fragment des pUCsgpM2C3d3, das die sgpM2C3d3-Fusionssequenz enthielt, wurde dann hinter den Polyhedrinpromotor durch Austausch des Spel-XbaI-Fragments des Bakulovirustransfervektors pACGP67A eingesetzt. Der resultierende Transfervektor, pACsgpM2C3d3 genannt, wurde dann verwendet, um rekombinantes AcNPV/sgpM2C3d3 Bakulovirus mittels Kalziumphosphatkotransfektion von Sf9 Insektenzellen mit BakuloGold Bakulovirus DNA (Pharmingen, San Diego, CA, USA), entsprechend dem von King und Possee (1992) beschriebenen Verfahren, zu erzeugen. Die Anwesenheit der sgpM2C3d3 Fusionssequenz hinter dem Polyhedrinpromotor im Genom des korrespondierenden rekombinanten AcNPV/sgpM2C3d3 Bakulovirus wurde mittels PCR-Analyse bestätigt.

#### 16. Expression des sekretierten M2C3d3 durch Sf9-Insektenzellen

**[0174]** Sf9-Insektenzellen in der Log-Phase wurden mit rekombinantem AcNPV/sgpM2C3d3 Bakulovirus bei hoher Multiplizität der Infektion (m.o.i. > 10) inokuliert. Die Zellen wurden anschließend in serumfreies TC100 Medium überführt und weiter für 48 h inkubiert, bevor der Überstand geerntet wurde. Die Proteine wurden durch Zusatz eines gleichen Volumens an Aceton (präequilibriert auf -20°C) präzipitiert und anschließend mit-

tels Western-Blots analysiert.

**[0175]** In einer bevorzugten Herstellung gehen drei oder mehr Kopien des C3d-Proteins der extrazelluläre Domäne des M2-Proteins voran.

#### 17. Passive Immunisierung

**[0176]** Das Überleben ist in [Fig. 28](#) gezeigt. In beiden Kontrollgruppen überlebte nur eine von 12 Mäusen die letale Influenza Exposition, während 11 von 12 Mäusen, die mit  $3 \times 10^6$  pg IM2HBcm immunisiert worden waren, oder alle passiv immunisierten Mäuse geschützt waren. Das Experiment zeigt, dass Anti-M2-Antikörper, die während der Vakzinierung hergestellt wurden, für den beobachteten Schutz verantwortlich sind.

#### 18. DNA-Vakzinierung

**[0177]** Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse eines DNA-Vakzinierungsexperiments, in dem 12 Mäuse, denen  $3 \times 10^6$  µg pCIM2 injiziert worden waren, mit einer Kontrollgruppe, der  $3 \times 10^6$  µg pCDNA3 injiziert worden waren, bezüglich des Überlebens nach einer lethalen Exposition ( $5 \text{ LD}_{50}$ ) mit m.a. X47 verglichen wurden. Ein Teilschutz gegenüber einer heterologen (immunisierendes Antigen = universelles M2, Exposition = A/PR/8/34 abgeleitet von M2) Influenza Exposition konnte gezeigt werden.

Tabelle 3

Vektor	überlebende Mäuse/Gesamtzahl
pCDNA3 (Kontrolle)	1/12
pCIM2 (vollständiges <i>m2</i> -Gen)	7/12

#### 19. Expression in HEKT-Zellen

**[0178]** Das Expressionsniveau des vollständigen M2-Proteins ist sowohl in der löslichen Fraktion als auch im Pellet zu niedrig, um nachgewiesen zu werden (siehe [Fig. 30](#)). Es ist möglich, dass die Expression aufgrund der Ionenkanalaktivität des M2-Proteins, die für HEKT-Zellen toxisch sein kann, niedrig gehalten wird. Die zwei Fusionsproteine, IM2HBcm und IP3M2HBcm, werden jedoch gut exprimiert. Dieses Experiment zeigt, dass die Vektoren, die in den DNA-Vakzinierungsuntersuchungen verwendet wurden, das Protein mit Ausnahme vielleicht von pCIM2 exprimieren können.

#### 20. Analyse des Serums

**[0179]** Eine spezifische Antikörperreaktion, die gegen den extrazellulären Teil des M2-Proteins gerichtet ist, konnte gezeigt werden, obwohl diese Reaktion schwach ist. In Feld B von [Fig. 31](#) wird pCIM2 mit dem Kontrollvektor verglichen. In diesem ELISA wird das in Insektenzellen exprimierte M2-Protein auch als Beschichtung verwendet (siehe Material und Methoden). Eine spezifische Anti-M2-Reaktion konnte insbesondere nach der dritten Immunisierung gezeigt werden. Die stärkere Anti-M2-Reaktion mit pCIM2 könnte aufgrund des zusätzlichen Epitops, das sich in der zytoplasmatischen Domäne des M2-Proteins befindet, erfolgen.

### DISKUSSION

**[0180]** Das vorliegende Dokument beschreibt mehrere Systeme für die Präsentation des hochkonservierten extrazellulären Teils des M2-Proteins des Influenza A-Virus dem Immunsystem gegenüber. Das M2-Fragment wurde an den Amino-Terminus des Trägerproteins fusioniert, um einen freien N-Terminus der M2-Domäne beizubehalten und um auf diese Weise die Wildtypstruktur des M2-Proteins nachzuahmen. Das erste Fusionsprotein, M2 verbunden mit dem humanen  $\beta 2$ -Mikroglobulin (IPM2hB2Mm), wurde verwendet, um monoklonale Antikörper herzustellen. Ein zweites Fusionsprotein, M2 verbunden mit dem Hepatitis B Core-Protein (IPM2HBcm), wurde für Vakzinierungsuntersuchungen verwendet. Beide Proteine könnten auch für den Nachweis einer spezifischen Antikörperreaktion gegen den extrazellulären Teil des M2-Proteins verwendet werden, da eine Korrektur hinsichtlich der Antikörper, die gegen das Trägerprotein gerichtet sind und die ebenfalls während des Immunisierungsprozesses hergestellt werden, gemacht werden muss.

**[0181]** Die Vakzinierungsuntersuchungen mit IPM2HBcm zeigten, dass die verabreichte Dosis innerhalb der

verwendeten Bandbreite offensichtlich kein sehr kritischer Parameter für den Erhalt einer Schutzwirkung war, weil eine Dosis von 5 bis 50 µg die Mäuse schützte, obwohl die immunisierten Mäuse immer noch eine hohe Morbidität zeigten. Das könnte auf die hohe Dosis des Virus (5 LD<sub>50</sub>) zurückzuführen sein, die für die Exposition verwendet wurde, um ein eindeutiges Ergebnis für das Ausmaß des Schutzes zu erhalten. Bei einer natürlichen Influenza-Infektion ist die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln sehr viel niedriger, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Morbidität entsprechend zurückgehen würde.

**[0182]** Die Analyse des Serums immunisierter Mäuse zeigte eine wesentliche Antikörperreaktion gegenüber dem extrazellulären Teil des M2-Proteins, insbesondere nach viraler Exposition. Diese letztere, starke Reaktion könnte auf eine weitere Art der Verabreichung, intraperitoneal gegenüber intranasal, zurückzuführen sein. Oder es kann aufgrund eines komplizierteren Verteidigungsmechanismus gegen den eindringenden Virus erklärt werden.

**[0183]** Slepishkin et al. (1995) beschrieben eine Vakzinierungsstrategie für homologe und heterologe Virus-exposition, die auf einem Membranextrakt, der das vollständige natürliche M2-Protein enthält, aufbaut. Aber sie verwendeten ein sehr starkes Adjuvans, unvollständiges Freund'sches Adjuvans, das nicht für die medizinische Verwendung geeignet ist.

**[0184]** Im Gegensatz dazu können die erfindungsgemäßen Fusionen der M2-extrazelluläre Domäne in reiner Form (wenigstens 95% Reinheit) erhalten werden, und können in Kombination mit sicheren Adjuvantien verabreicht werden. Ein hohes Ausmaß an Schutz wurde trotz der Tatsache, dass die Exposition verhältnismäßig schwer war, erhalten. In Anbetracht der nahezu invarianten Sequenz der extrazellulären Domäne von M2 (siehe Tabelle 1, die einen Überblick über die Aminosäuresequenzen der extrazelluläre Domäne des Influenza A M2-Proteins zeigt) kann erwartet werden, dass der erreichte Schutz ähnlich gegen alle bis dato bekannten humanen Influenza A-Stämme sein wird. Das Vakzin kann durch die Einbeziehung eines Influenzaspezifischen T-Helfer-Epitops sowie eines CTL-Epitops in das Fusionsprotein, z. B. intern oder verknüpft mit dem C-Terminus des Hepatitis B Core-Proteins, verbessert werden. Andere Immunisierungswege sind ebenfalls möglich, beispielsweise intraperitoneal gegenüber intranasal.

**[0185]** Für die Expression des M2HBcm-Fusionsproteins wurde neben dem Gram-negativen Organismus *E. coli* auch *L. lactis* verwendet, ein Gram-positiver Organismus. In *L. lactis* ist es nicht notwendig, das exprimierte Fusionsprotein aufzureinigen. Die Bakterien können direkt entweder intranasal oder oral verabreicht werden.

**[0186]** Ein drittes, viel versprechendes Trägerprotein ist auch beschrieben, nämlich das Fragment d des dritten Komplementproteins (C3d)(Dempsey et al., 1996). In einer bevorzugten Konstruktion gehen drei Kopien des C3d-Proteins der extrazelluläre Domäne des M2-Proteins voran. Dieses M2C3d3-Fusionsprotein kann entweder in intrazellulärer Form, verankert in der Zellwand, oder in ins Wachstumsmedium sekretierter Form, mittels genetischer Fusion an geeignete regulatorische Sequenzen, exprimiert werden.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- Allen et al. (1980) *Virology* 107, 548–551  
 Baez et al. (1980) *J. Infect. dis.* 141, 362–365  
 Belshe et al. (1988) *J. Virol.* 62, 1508–1512  
 Birnboim and Doly (1979) *N. A. R.* 7, 1513–1523  
 Black et al. (1993a) *J. Gen. Virol.* 74, 143–146  
 Black et al. (1993b) *J. Gen. Virol.* 74, 1673–1677  
 Borisova et al. (1983) *FEBS Lett.* 259, 121–124  
 Casadaban and Cohen (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 179–207  
 Clarke et al. (1987) *Nature* 330, 381–384  
 Cohen and Richmond (1982) *Nature* 296, 677–678  
 Cox et al. (1983) *Virology* 167, 554–567  
 Dempsey et al. (1996) *Science* 271, 348–350  
 Deng and Nickolov (1992) *Anal. Biochem.* 200, 81–88  
 Gasson (1983) *J. Bact.* 154, 1–9  
 Gillis et al. (1978) *J. Immunol.* 120, 2027–2032  
 Hirst (1941) *Science* 94, 22–23  
 Holsinger and Lamb (1991) *Virology* 183, 32–43  
 Kahn et al. (1979) *Methods Enzymol.* 68, 268–280  
 Kendal et al. (1982) *Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance.* p. B7–B12, B17–19

- King and Possee (1992) *The Baculovirus Expression System*. Chapman & Hall, University Press, Cambridge, UK
- Klimov et al. (1992) *Virology* 186, 795–797
- Köhler and Milstein (1975) *Nature* 256, 495–497
- Laemmli (1970) *Nature* 227, 680–685
- Lamb and Lai (1981) *Virology* 112, 746–751
- Lamb et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4170–4174
- Lamb et al. (1985) *Cell* 40, 627–633
- Levi and Arnon (1996) *Vaccine* 14, 85–92
- Markushin et al. (1988) *Virus Res.* 10, 263–272
- Miller (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY p. 431
- Min Jou et al. (1980) *Cell* 19, 683–696
- Nakamaye and Eckstein (1986) *N. A. R.* 14, 9679–9638
- Nassal (1988) *Gene* 66, 279–294
- Neu and Heppel (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3685–3692
- Ortin et al. (1983) *Gene* 23, 233–239
- Parker and Wiley (1989) *Gene* 83, 117–124
- Remaut et al. (1981) *Gene* 15, 81–93
- Remaut et al. (1983a) *N. A. R.* 11, 4677–4688
- Remaut et al. (1983b) *Gene* 22, 103–113
- Schöder et al. (1992) *J. Virol.* 66, 106–114
- Slepishkin et al. (1995) *Vaccine* 13, 1399–1402
- Stanssens et al. (1989) *N. A. R.* 17, 4441–4454
- Steidler et al. (1994) *Biotechn. Bioeng.* 44, 1074–1082
- Steidler et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1627–1629
- Steidler et al. (1996) *NATO ASI Series H* 98 p 63–79. eds. Bozoglu, T. F. and Ray, B. Springer, Berlin Struhl (1985) *Biotechniques* 3, 452–453
- Sugrue et al. (1990) *Virology* 179, 51–56
- Sugrue and Hay (1991) *Virology* 180, 617–624
- Treanor et al. (1990) *J. Virol.* 64, 1375–1377 van Asseldonk et al. (1990) *Gene* 95, 155–160 van de Guchte et al. (1992) *FEMS Microbiol. Rev.* 88, 73–92
- Van Snick et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9679
- Vogelstein and Gillespie (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615–619
- Wells et al. (1993) *J. Appl. Bact.* 74, 629–636
- Wells and Schofield (1996) *NATO ASI Series H* 98 p 37–62. eds. Bozoglu, T. F. and Ray, B. Springer, Berlin
- Winter and Fields (1980) *N. A. R.* 8, 1965–1974
- Zebedee and Lamb (1988) *J. Virol.* 62, 2762–2772
- Zebedee and Lamb (1989) *N. A. R.* 17, 2870
- Zell and Fritz (1987) *EMBO J.* 6, 1809–1815

## ANHANG

<110> Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnol

<120> immunschützendes Influenza-Antigen und dessen Verwendung zur Impfung

<130> VIB-08-WM/M2

<140> PCT/EP98/05106

<141> 1998-08-05

<160> 43

<170> Patentin Ver. 2.1

<210> 1  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus

<400> 1

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

<210> 2  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus

<400> 2

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp  
 20

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus

<400> 3

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Lys Asn Glu Trp Glu Cys  
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 4

tttactgttt tcgtaacagt ttg

24

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz



<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 5

caacaacgca cagaatctag

20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 6

gattccgtctc tgctgaccga agttgaaacc

30

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 7

gcagagacga ctggcttcaa ctttgg

26

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 8

cggttcaagt gatcatctcg c

21

<210> 9

<211> 69

<212> DNA

<213> Influenza virus

<400> 9



tctctgctga ccgaagttga aaccctatc agaaacgaat gggggtgcag atgcaacggt 60  
tcaagtgat 69

<210> 10  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Influenza virus

<400> 10

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp  
20

<210> 11  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> artifizielle Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 11

gcgcaggcct tccagcg 17

<210> 12  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artifizielle Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 12

gcgcaggccc tgcagcgtag tcc 23

<210> 13  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> artifizielle Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 13

cctcagatct tctgca

16

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 14

ggagtctaga ag

12

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 15

ccgtagcgca ggcctctctg ctgaccg

27

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 16

ggatccatat ccatggc

17

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 17

cggtcagcag agacatgggt aatcc

25

<210> 18  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid  
 <400> 18

ccagaccgtt cagctggata ttacgg 26

<210> 19  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Influenza virus  
 <400> 19

atgtctctgc tgaccgaagt tgaa 24

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus  
 <400> 20

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 1 5

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Aminoterminus des Fusionsproteins IPM2HBcm  
 <400> 21

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 1 5

<210> 22  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid  
 <400> 22

ggatcacttg aatcggtaca tctgcaccc

29

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 23

ccagaccgtt cagctggata ttacgg

26

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 24

catggatatg gatccttata aagaatt

27

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 25

catgtctctg ctgaccgaag ttg

23

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 26

catgtcttta ttaaccgaag ttgaaaccc

29

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 27

cgtgatcaac tagttcacta acattgagat tcccagat

39

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 28

cgggatcccc acttgaatcg ttacatctgc acc

33

<210> 29

<211> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 29

tctttattaa ccgaagttga aaccctatc

30

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 30

ccgcgcccac ccgacgagat ctccgatcta ccccc

35

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

&lt;400&gt; 31

gcactagttc aaggatccga tccgaactct tcagatcc

38

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

&lt;400&gt; 32

cgggatccga caccaattcc attttcttat tctaa

35

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

&lt;400&gt; 33

ggggatccac tagtttaatc atttg

25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artifizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

&lt;400&gt; 34

catgtcttta ttaaccgaag ttgaaaccc

29

<210> 35  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 35

gctactagta aatcagtcac accaa

25

<210> 36  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 36

cgaagcttgc cggcaaaggc agaatgcgcc gcc

33

<210> 37  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 37

tctctgctga ccgaagttga aac

23

<210> 38  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> artifizielle Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 38

cgaagcttac tagttcacgg atccccactt gaatcgttgc atctgcaccc

50

<210> 39  
 <211> 18  
 <212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 39

ggtagatatt gaaagatg

18

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 40

cgtctagatt actccagctc tatgctgaca aaa

33

<210> 41

<211> 57

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 41

cgagatctat gagtcttcta accgaggtcg aaacgcctat cagaaacgaa tgggggt

57

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 42

catgtcttta ttaaccgaag ttgaaaccc

29

<210> 43

<211> 38

<212> DNA

<213> artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 43

cgtgatcaac tagttcacta acattgagat cccgagat

38



### Patentansprüche

1. Ein Influenza-Antigen umfassend ein Fusionsprodukt aus
  - (i) einem immunogenen extrazellulären Teil eines Influenza-M2-Membranproteins des Influenza-A-Virus und
  - (ii) einem präsentierenden Trägermolekül.
2. Das Influenza-Antigen nach Anspruch 1, worin das Fusionsprodukt einen immunogenen extrazellulären Teil eines Influenza-M2-Membranproteins des Influenza-A-Virus umfasst.
3. Das Influenza-Antigen nach Anspruch 2 umfassend die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NR. 1, 2 oder 3.
4. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das präsentierende Trägermolekül ein präsentierendes (Poly-)Peptid ist.
5. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das präsentierende Trägermolekül eine nicht aus Peptiden bestehende Struktur ist, wie Glycane, Peptidmimetika, oder synthetische Polymere.
6. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, weiter umfassend eine zusätzliche Domäne zur Verstärkung der Immunogenizität des Antigens in der zellulären Immunantwort.
7. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das präsentierende (Poly-)Peptid ausgewählt ist aus Hepatitis B-Kernprotein, C3d-Domänen und Tetanustoxin-Fragment C.
8. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin das präsentierende Trägermolekül nicht die Tertiärstruktur des besagten Teils des Proteins verändert.
9. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin das Antigen aus Laktokokken-Zellen besteht, die ein Fusionsprodukt in oder auf ihrer Zellmembran exprimieren.
10. Das Influenza-Antigen nach Anspruch 9, worin die Zellen das Fusionsprodukt ausscheiden.
11. Das Influenza-Antigen nach Anspruch 6, worin die zusätzliche Domäne ein Influenzaspezifisches Epitop einer T-Helferzelle oder zytotoxischen T-Zelle ist.
12. Ein Gen-Konstrukt kodierend für ein Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 11, erhältlich durch Herstellung eines Gen-Konstrukts nach Anspruch 12, umfassend eine erste kodierende Sequenz kodierend für einen immunogenen extrazellulären Teil des Influenza-Membranproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3, und eine zweite kodierende Sequenz für ein präsentierendes (Poly-)Peptid, das funktional verbunden daran geknüpft ist.
14. Das Influenza-Antigen nach Anspruch 13, worin das Gen-Konstrukt außerdem geeignete transkriptions- und/oder translationsregulierende Sequenzen umfasst.
15. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 14 zur Verwendung in der Herstellung eines Vakzins gegen Influenza für Menschen und/oder Tiere.
16. Das Influenza-Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 14 zur Verwendung in der Herstellung eines Vakzins gegen Influenza-A für Menschen und/oder Tiere.
17. Ein Vakzin gegen Influenza, umfassend ein Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 14.
18. Das Vakzin nach Anspruch 17, zusätzlich umfassend einen Hilfsstoff.
19. Das Vakzin nach Anspruch 17, worin das Antigen in isolierter Form vorliegt.
20. Das Vakzin nach Anspruch 17, worin das Antigen Teil eines Membranfragments ist.
21. Das Vakzin nach Anspruch 17, worin das Antigen in der Membran einer Akzeptorzelle verankert ist, die

das Antigen exprimiert.

22. Das Vakzin nach Anspruch 17, worin das Antigen aus Laktokokken-Zellen besteht, die das Fusionsprodukt in oder auf ihrer Zellhülle exprimieren.

23. Das Vakzin nach einem der Ansprüche 17 bis 22, ferner umfassend ein weiteres Influenza-Antigen.

24. Das Vakzin nach Anspruch 23, worin das weitere Influenza-Antigen ausgewählt wird aus Hämagglutinin, Neuraminidase-Nukleoprotein und/oder nativem M2.

25. Ein DNA-Vakzin umfassend ein Gen-Konstrukt nach Anspruch 12.

26. Ein Vaccinia-basiertes Vakzin umfassend ein Gen-Konstrukt nach Anspruch 12.

27. Verwendung eines Antigens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 13 bis 16 zur Herstellung eines Vakzins gegen Influenza.

28. Verwendung eines Gen-Konstrukts nach Anspruch 12 zur Herstellung eines DNAbasierten oder eines Vaccinia-basierten Vakzins gegen Influenza.

29. Verfahren zur Herstellung eines Antigens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 13 bis 16, umfassend die Schritte:

- (a) Herstellen eines Gen-Konstrukts nach Anspruch 12,
- (b) Einbringen dieser Gen-Konstrukte in eine geeignete Akzeptorzelle,
- (c) Herbeiführen der Expression des Gen-Konstrukts in der Akzeptorzelle, und
- (d) optional Isolieren des Antigens von der Akzeptorzelle oder seinem Kulturmedium.

30. Eine Akzeptorzelle, die ein Antigen exprimiert nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 13 bis 17.

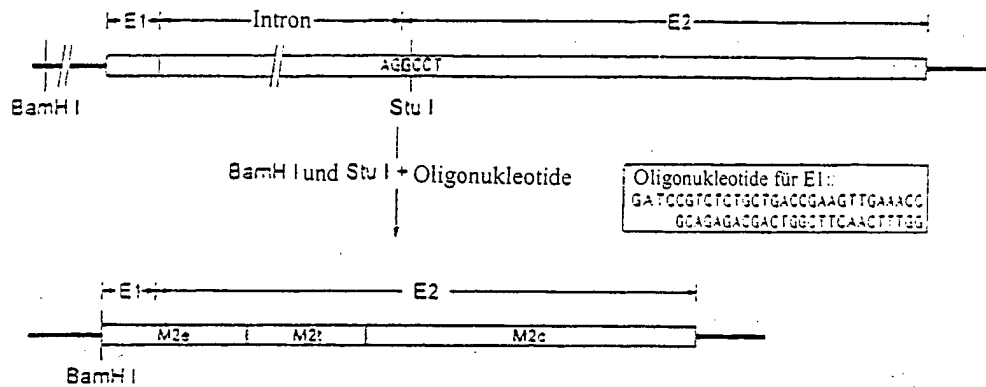
31. Die Akzeptorzelle nach Anspruch 30, worin die Zelle eine Laktokokken-Zelle ist.

Es folgen 35 Blatt Zeichnungen

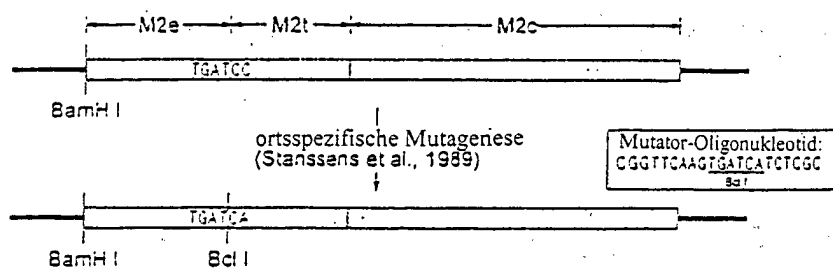
## Anhängende Zeichnungen

Figur 1

A



B



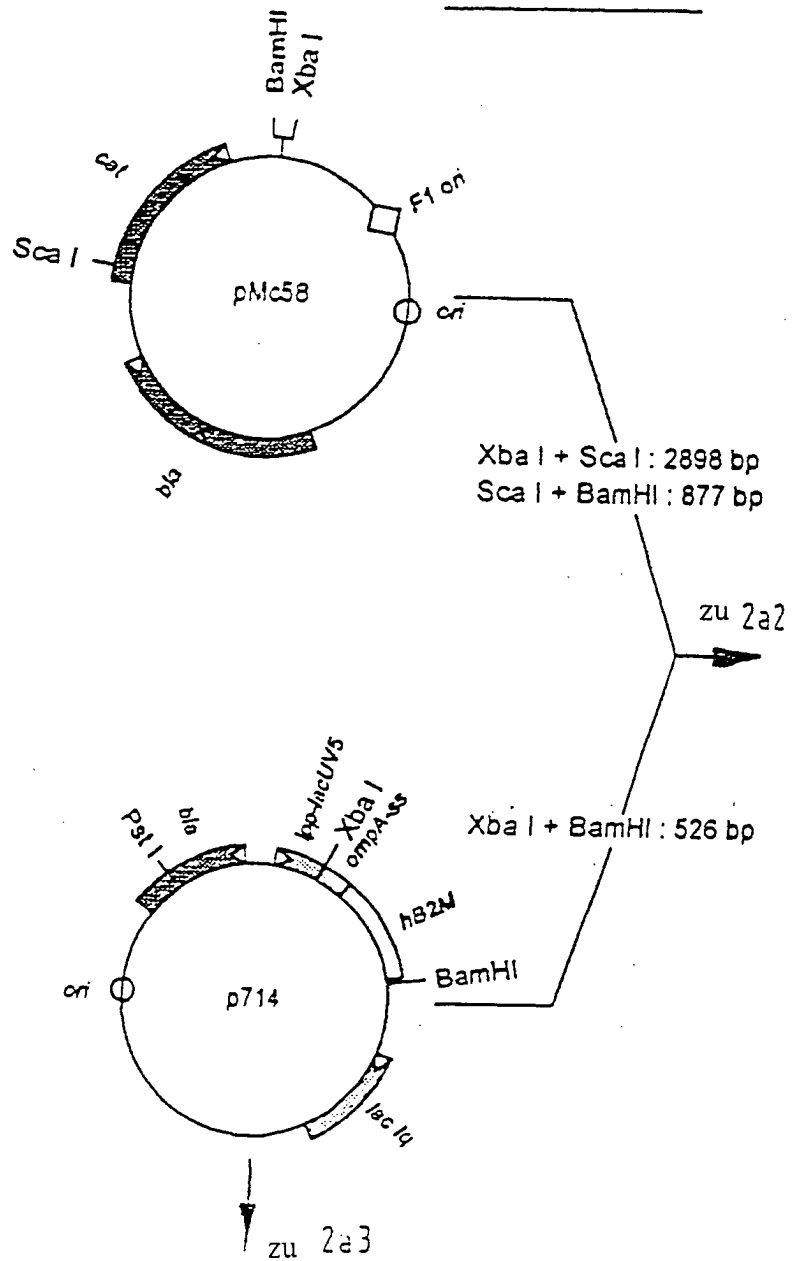
C

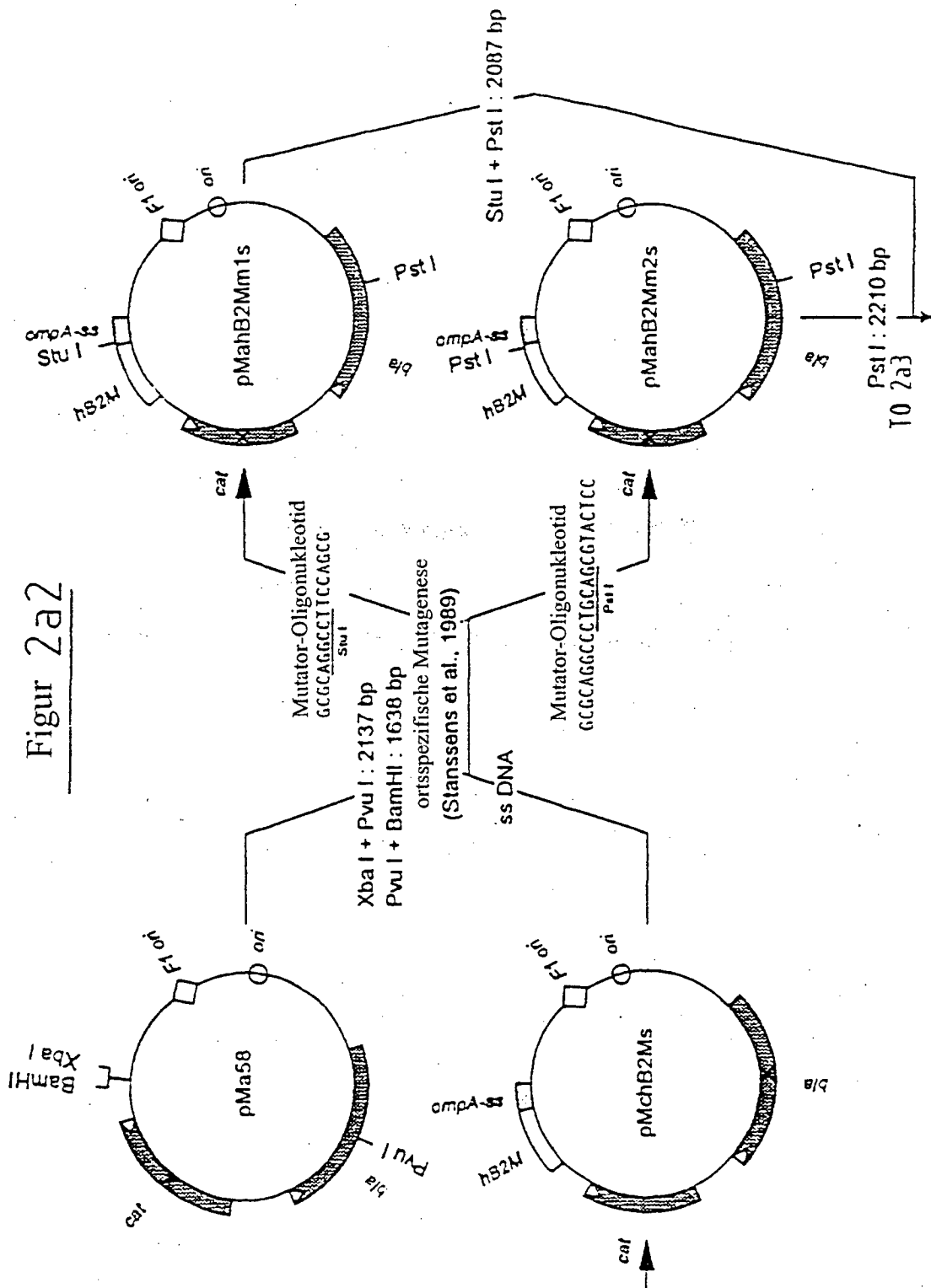
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nukleotidsequenz:	TCT	CTG	CTG	ACC	GAA	GTT	GAA	ACC	CCT	ATC
Aminosäuresequenz:	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile

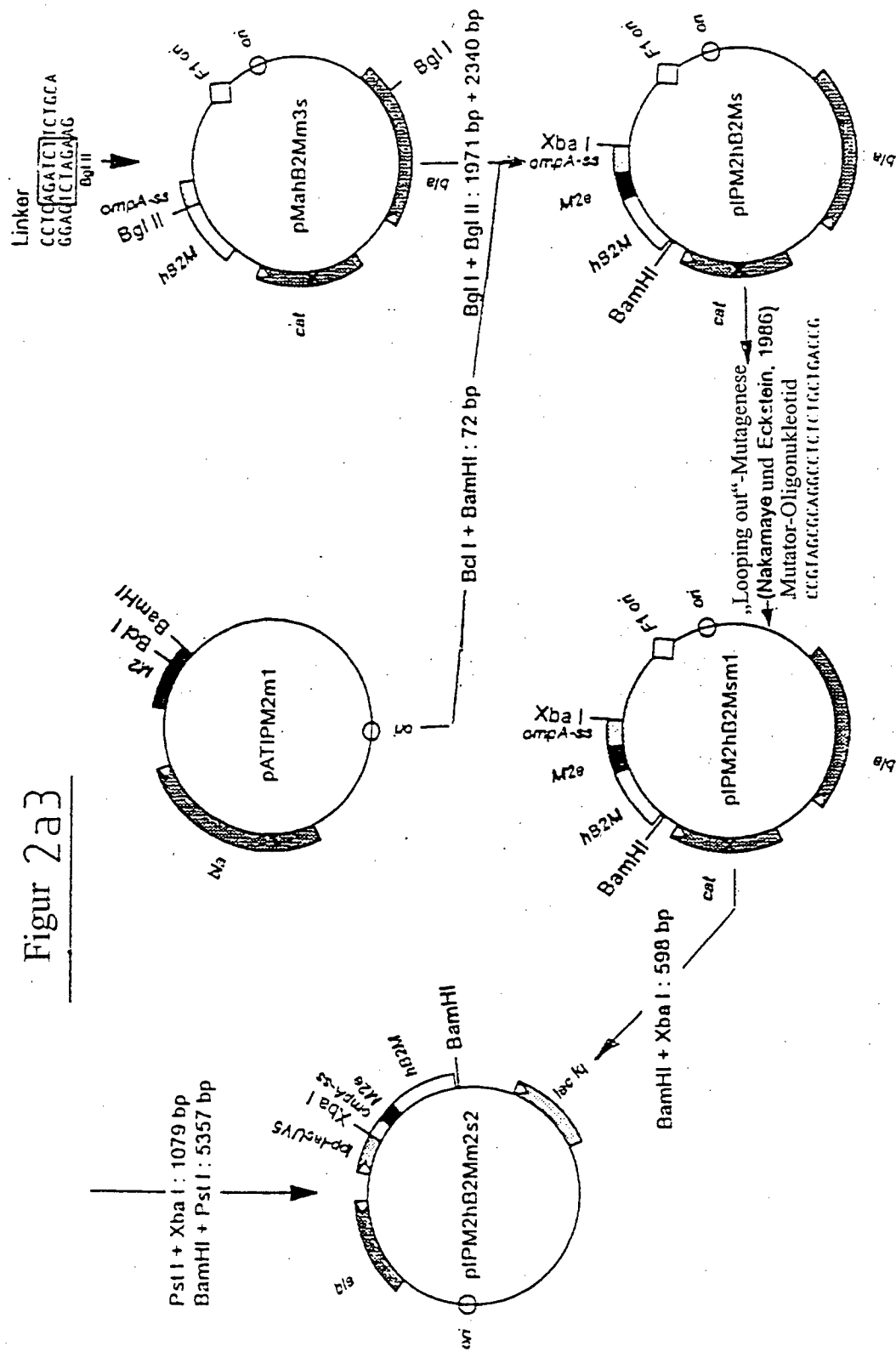
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	AGA	AAC	GAA	TGG	GGG	TGC	AGA	TGC	AAC	GGT	TCA	AGT	GAT
	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp

Figur 2a1

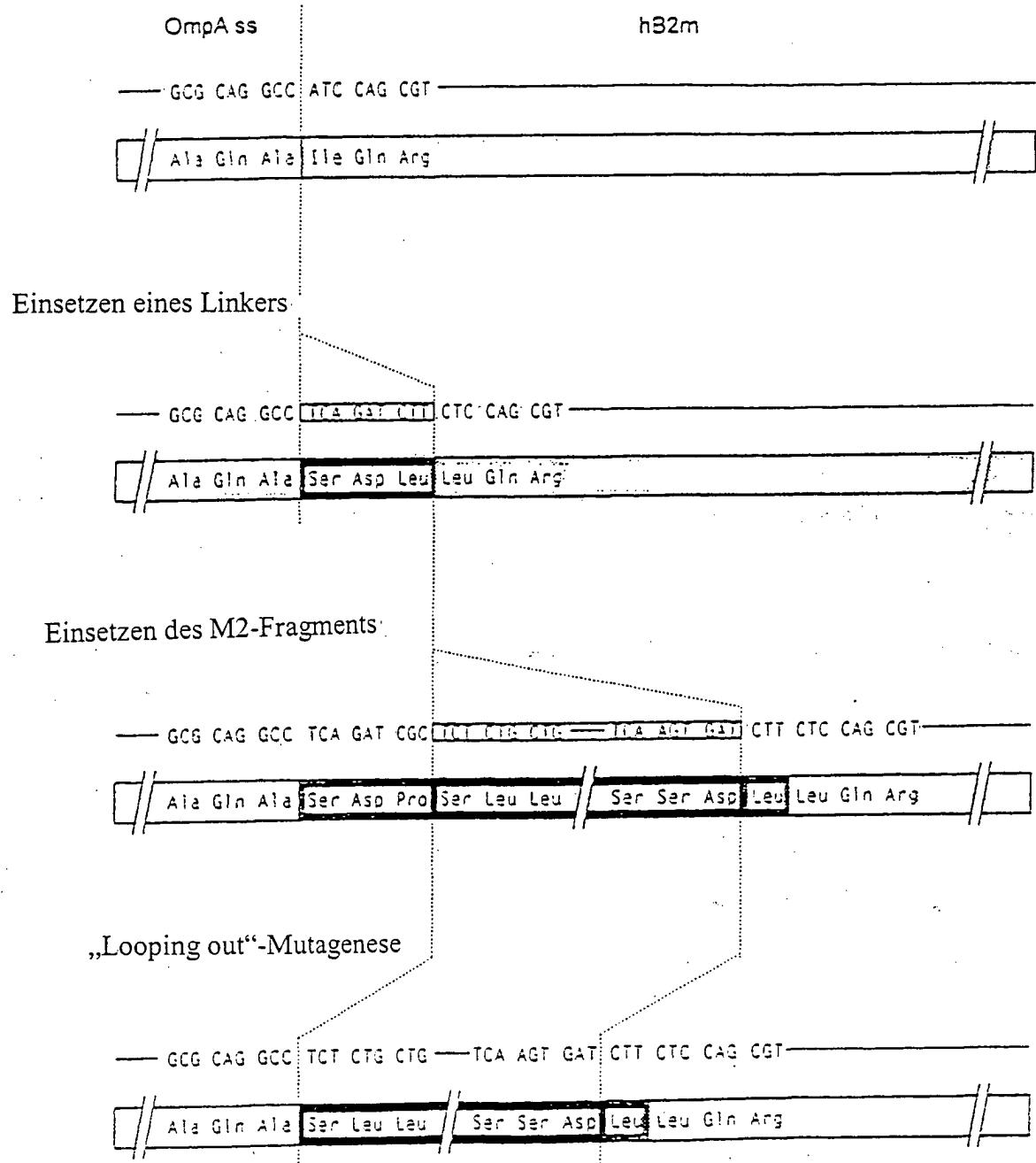




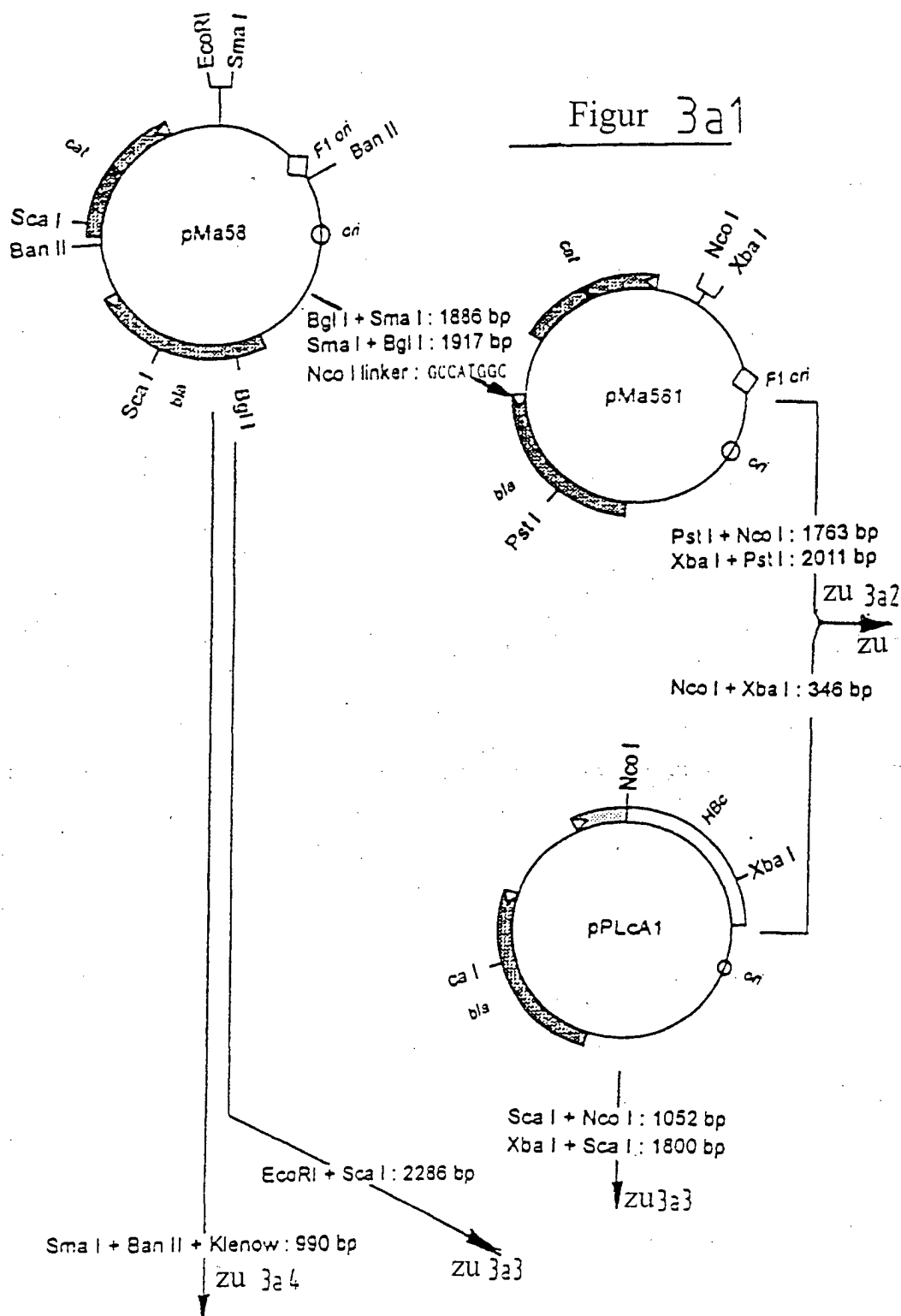
Figur 2a3



Figur. 2b

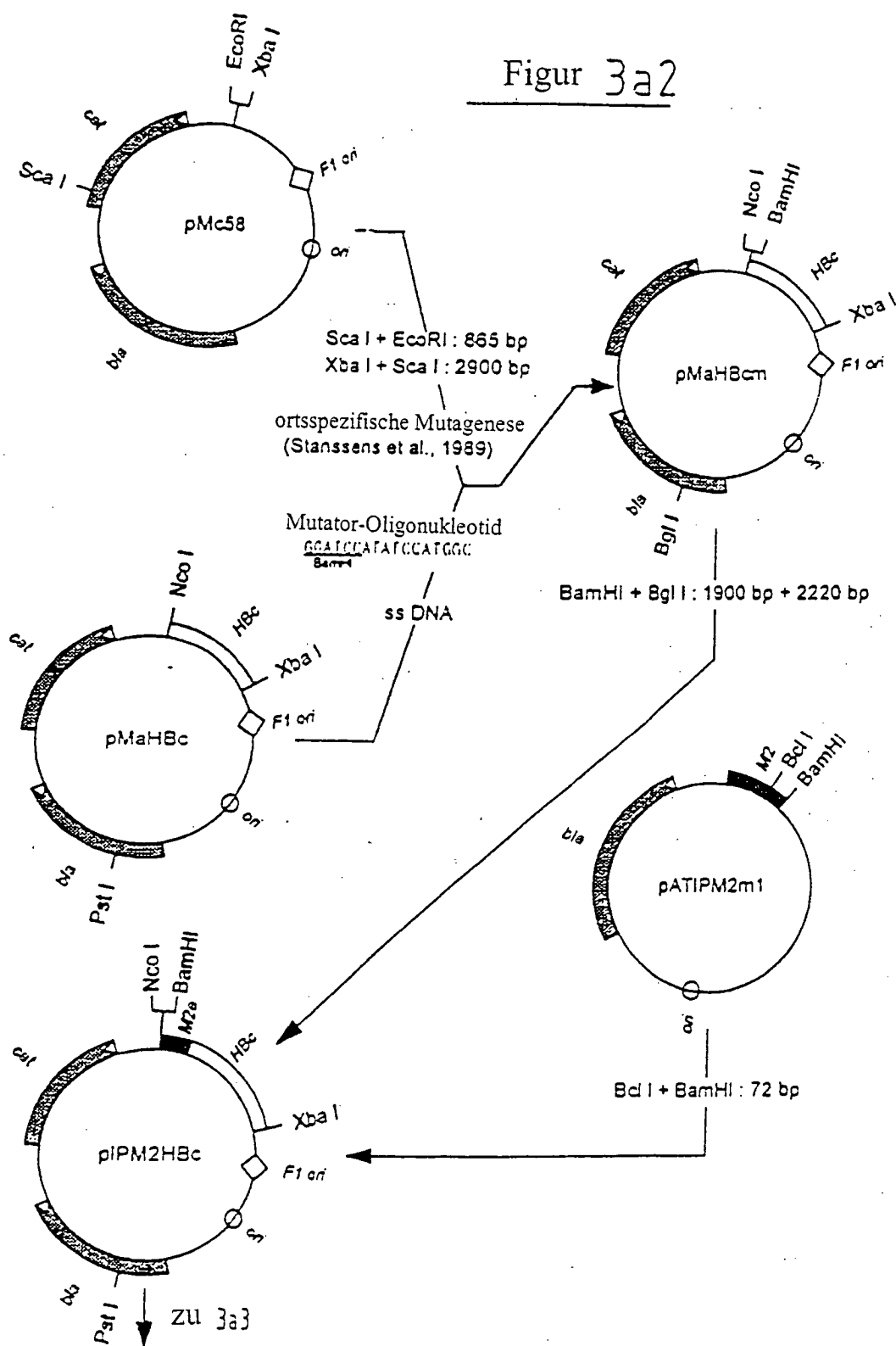


Figur 3a1

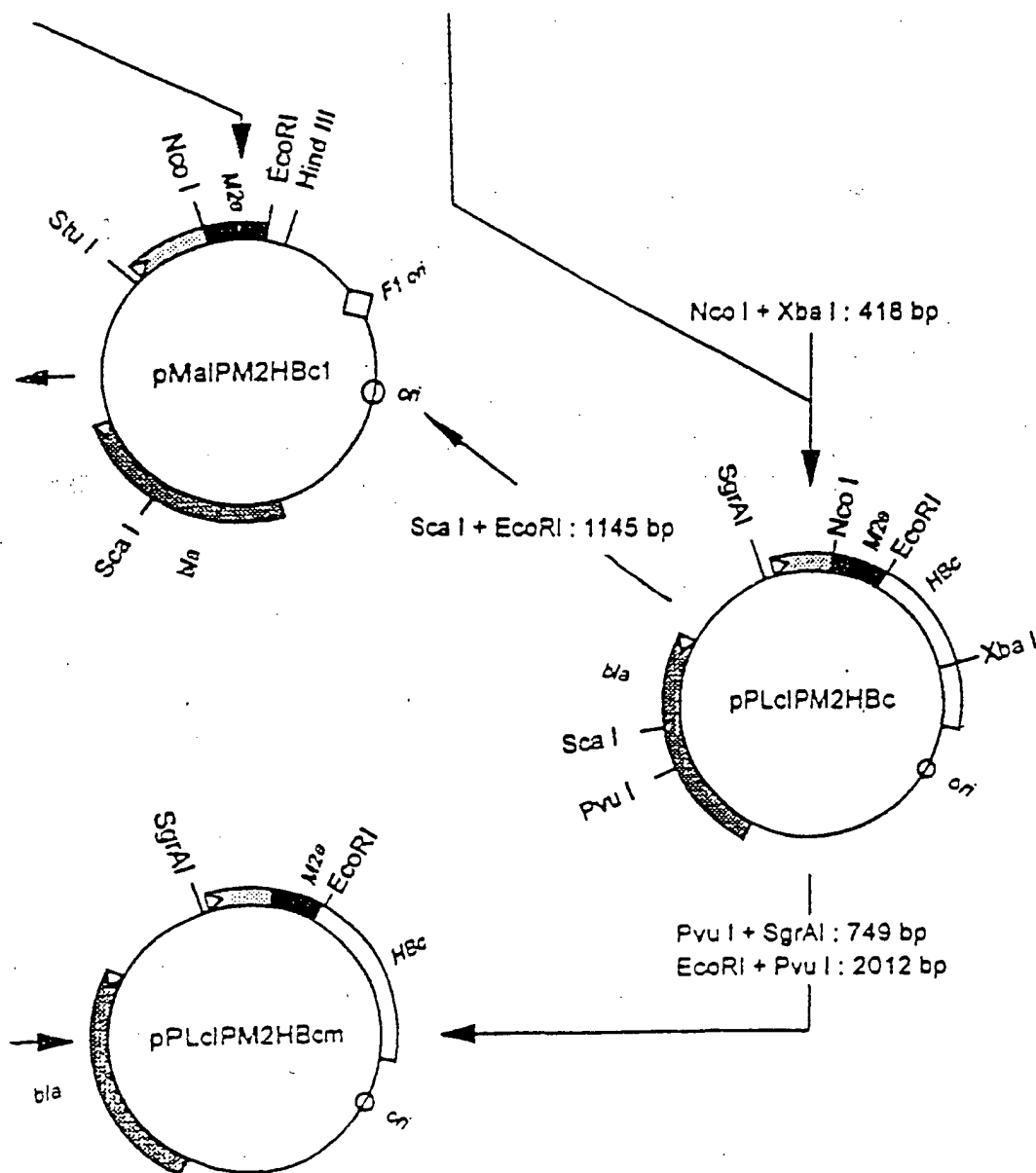




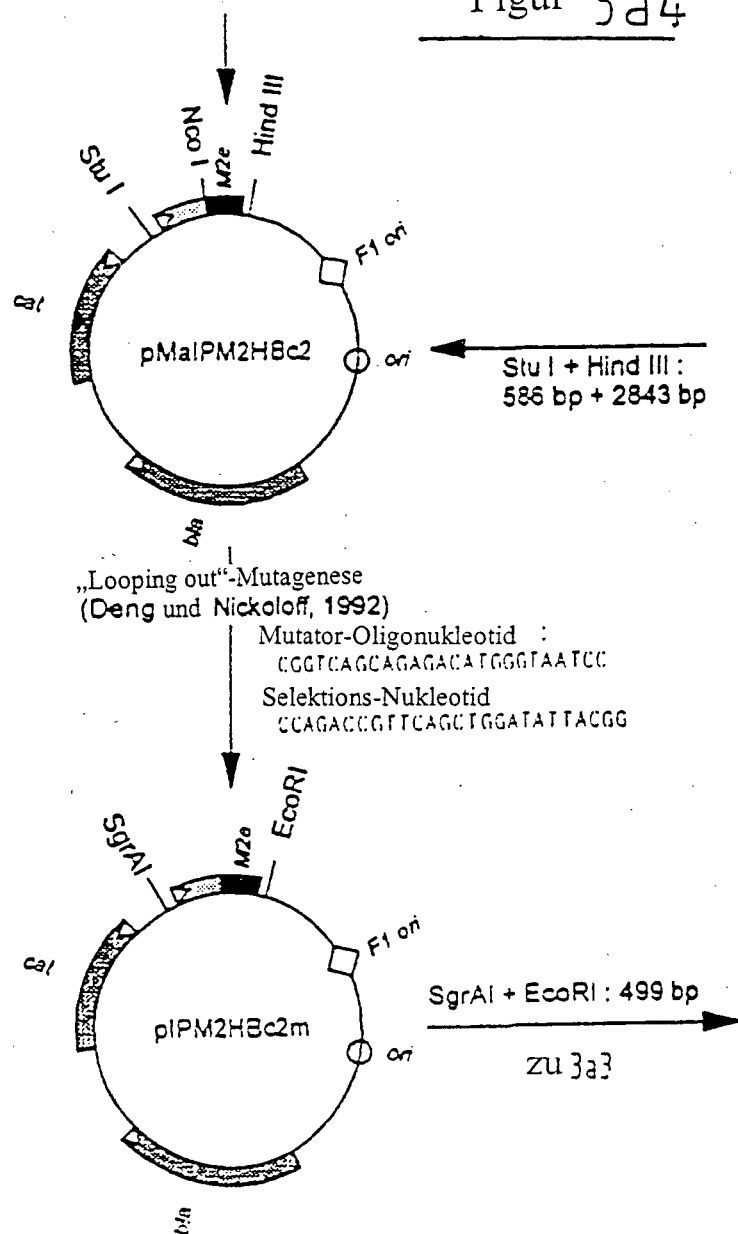
Figur 3a2



Figur 3a3



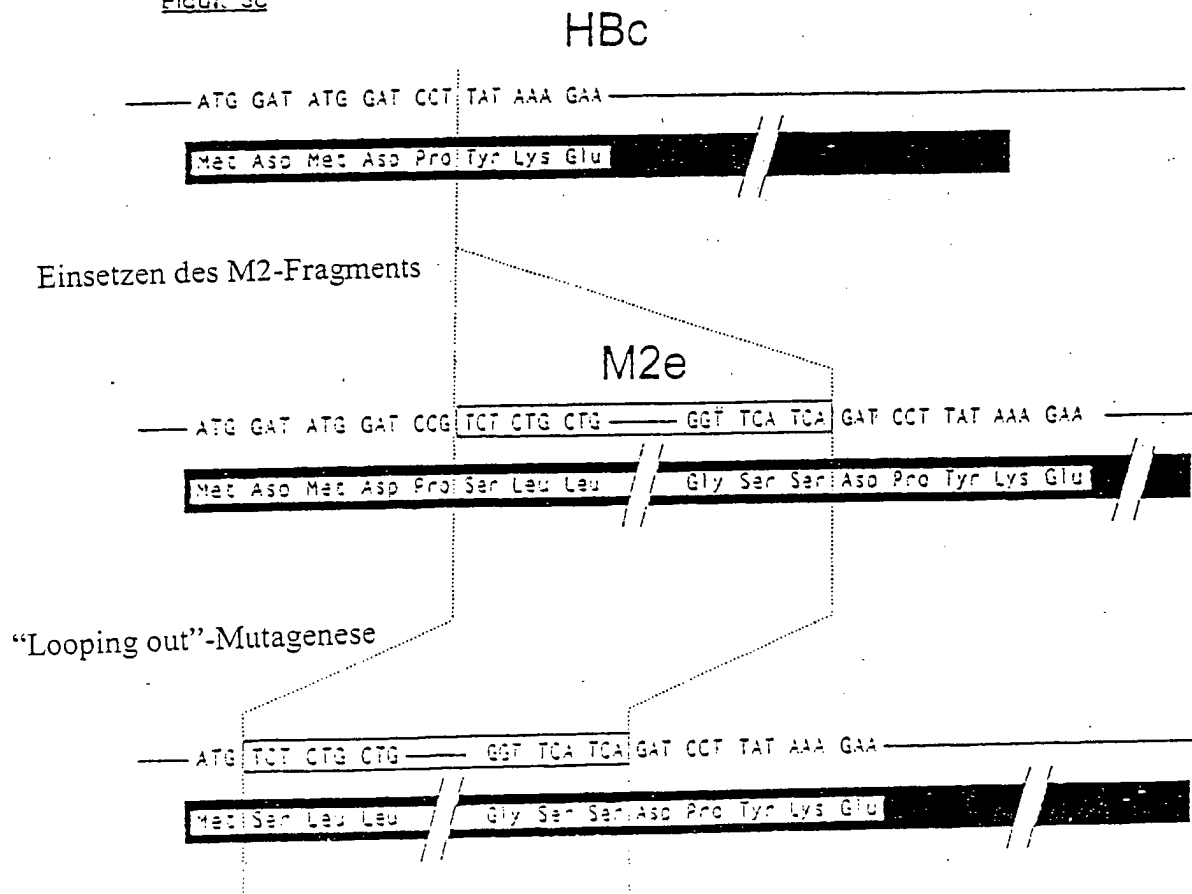
Figur 3a4



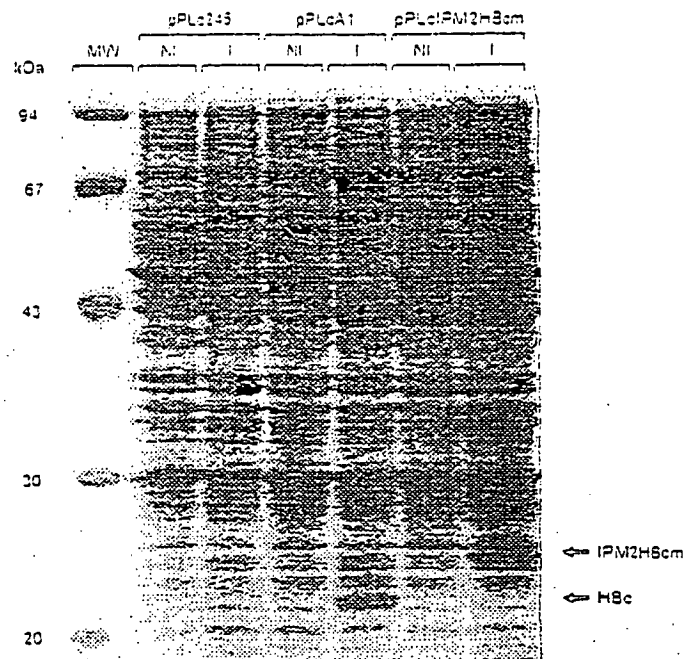
Figur. 3b

Hepatitis B Core						
1	2	3	4	5	6	...
Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	...
ATG	GAT	ATC	GAT	CCT	TAT	...
						Wildtyp
Hepatitis B Core						
Met	Asp	Met	Asp	Pro	Tyr	...
ATG	GAT	ATG	GAT	CCT	TAT	...
						Mutante
BamHI						

Figur. 3c

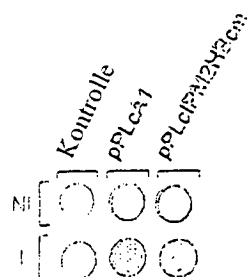


Figur. 4

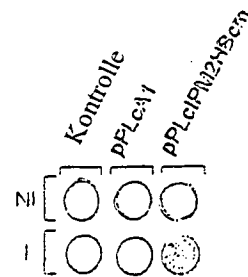


Figur. 7

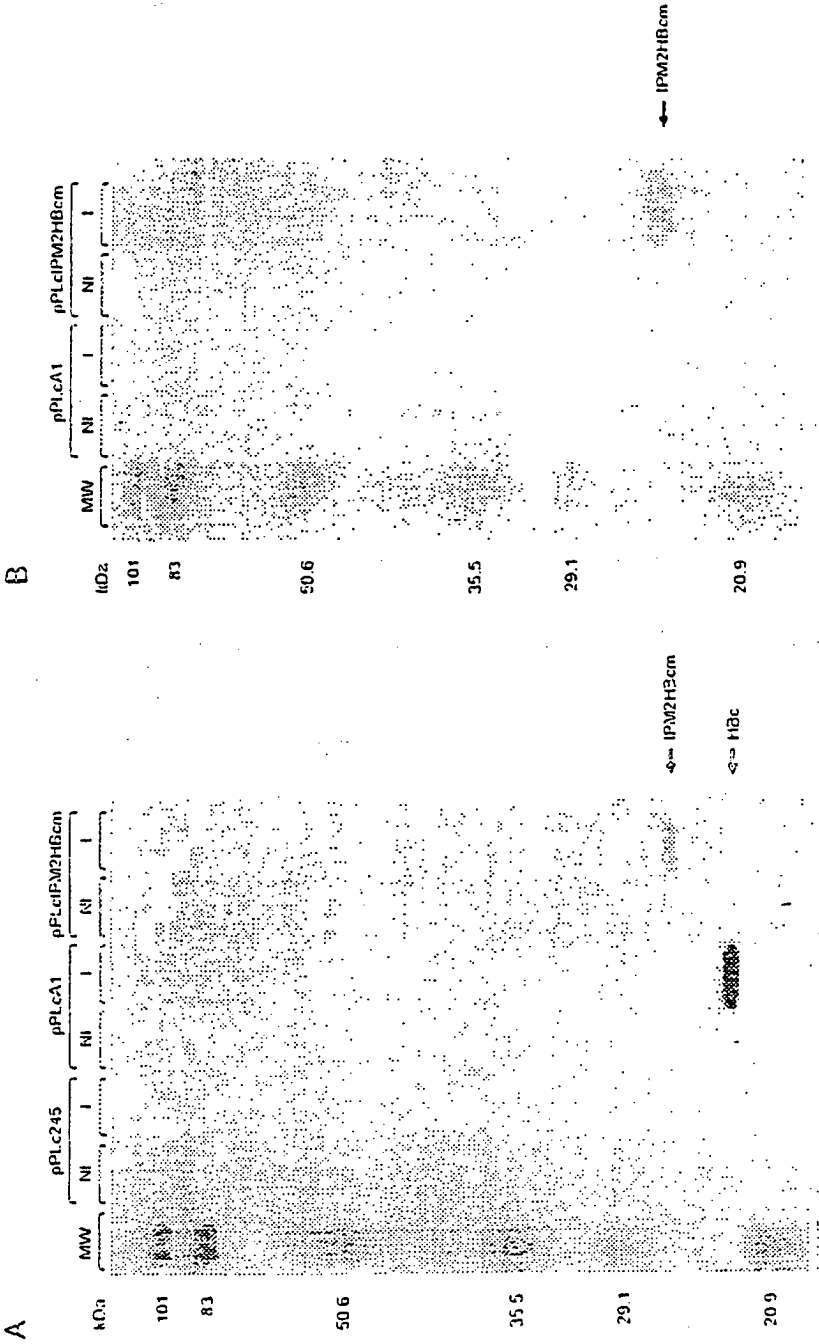
A.



B.



Figur 5



Figur 6

ATG TCT CTG CTG ACC GAA GTT GAA	Nukleotidsequenz von <i>ipm2hbcm</i>
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu	translatierte Aminosäuresequenz
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu	Amino-Terminus des Fusionsproteins IPM2HBcm
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu	Amino-Terminus des M2-Proteins von A/Udorn/72

Figure 8

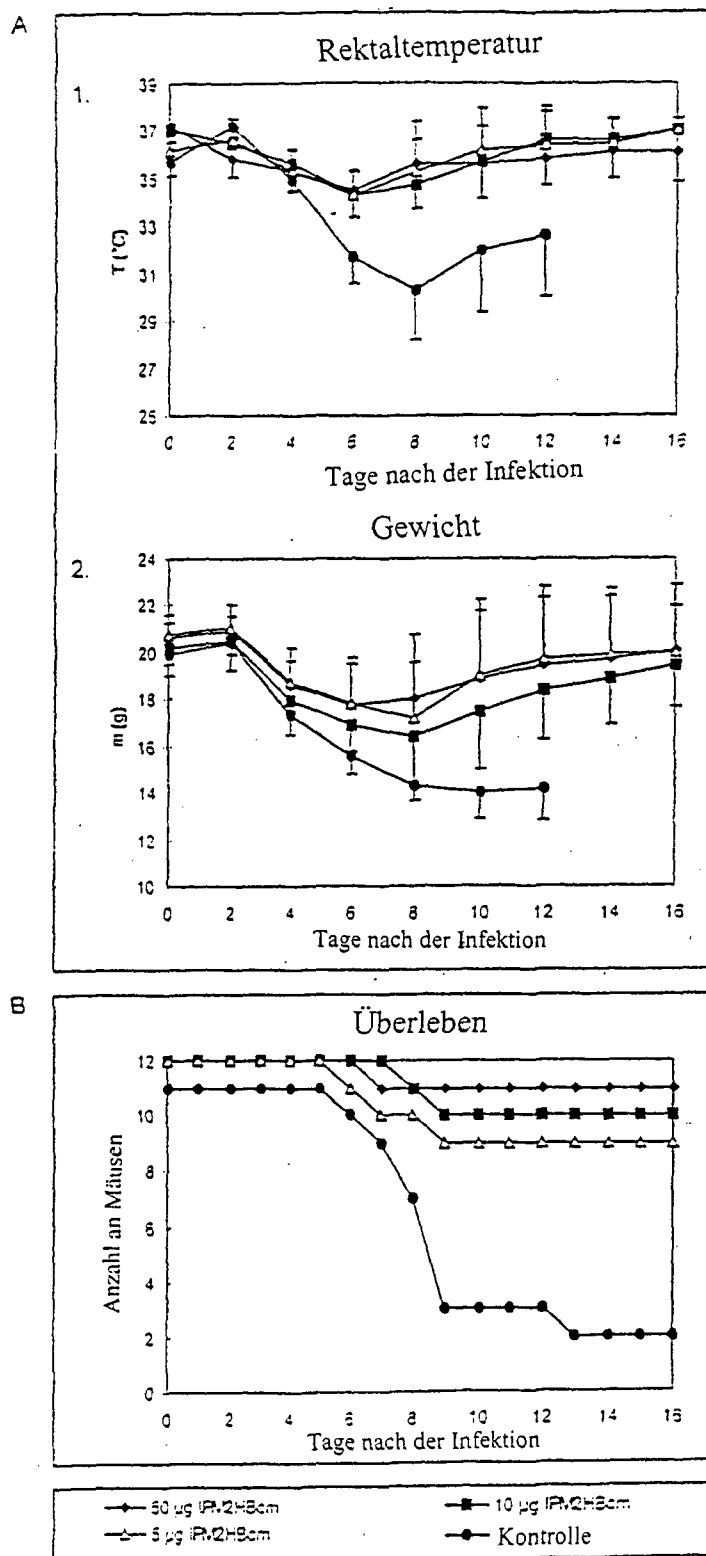




Fig. 8D

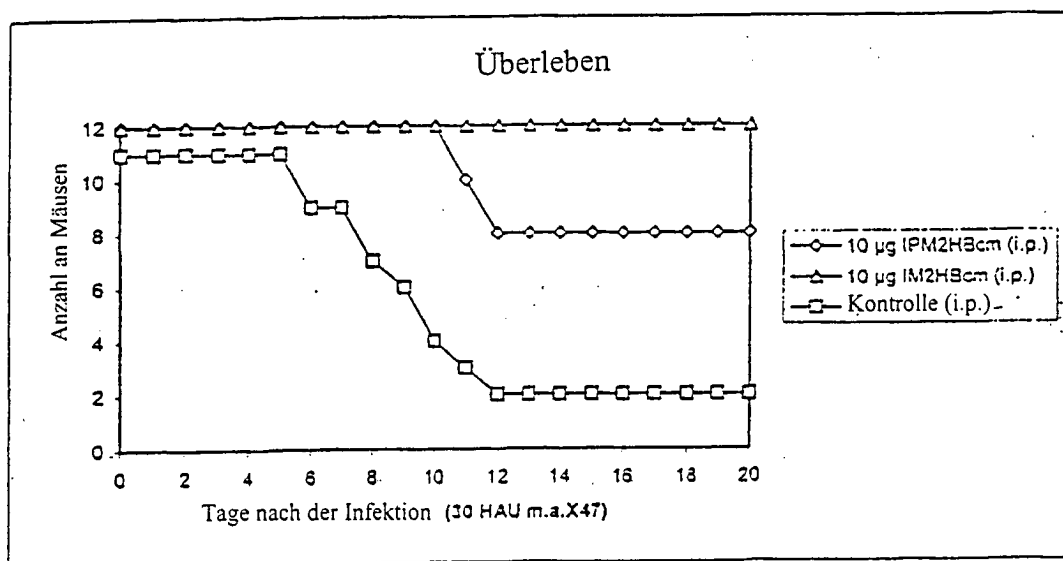
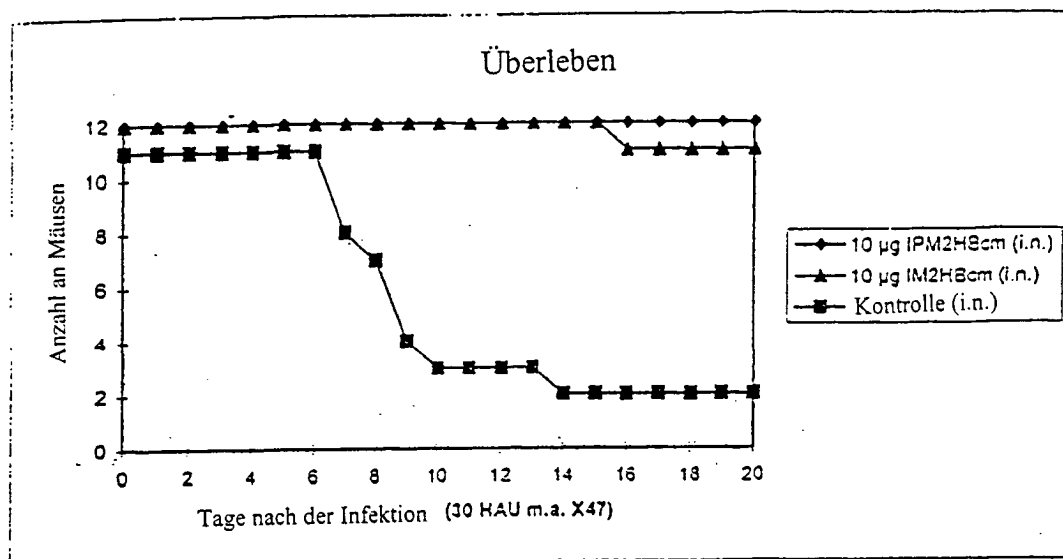
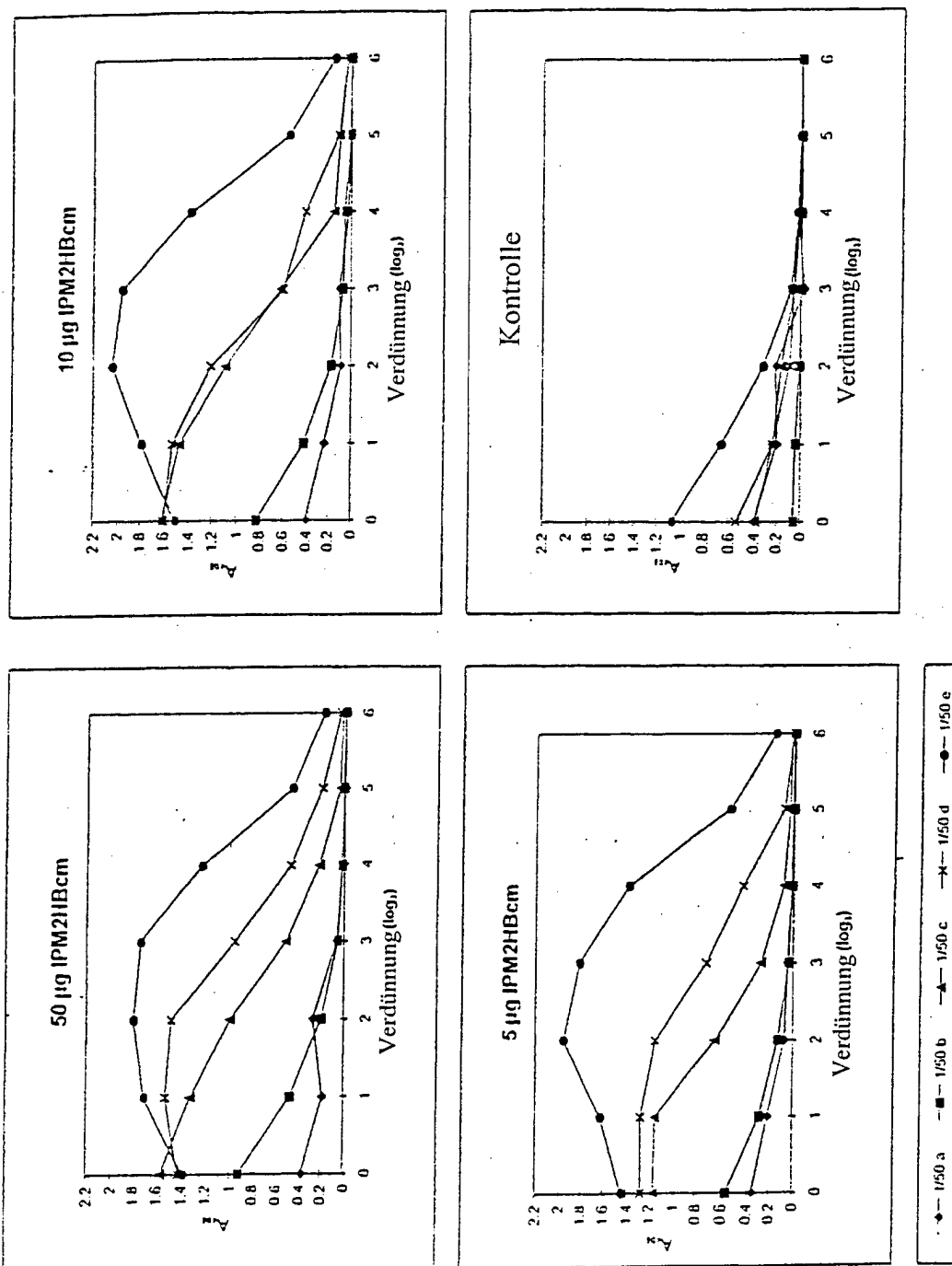


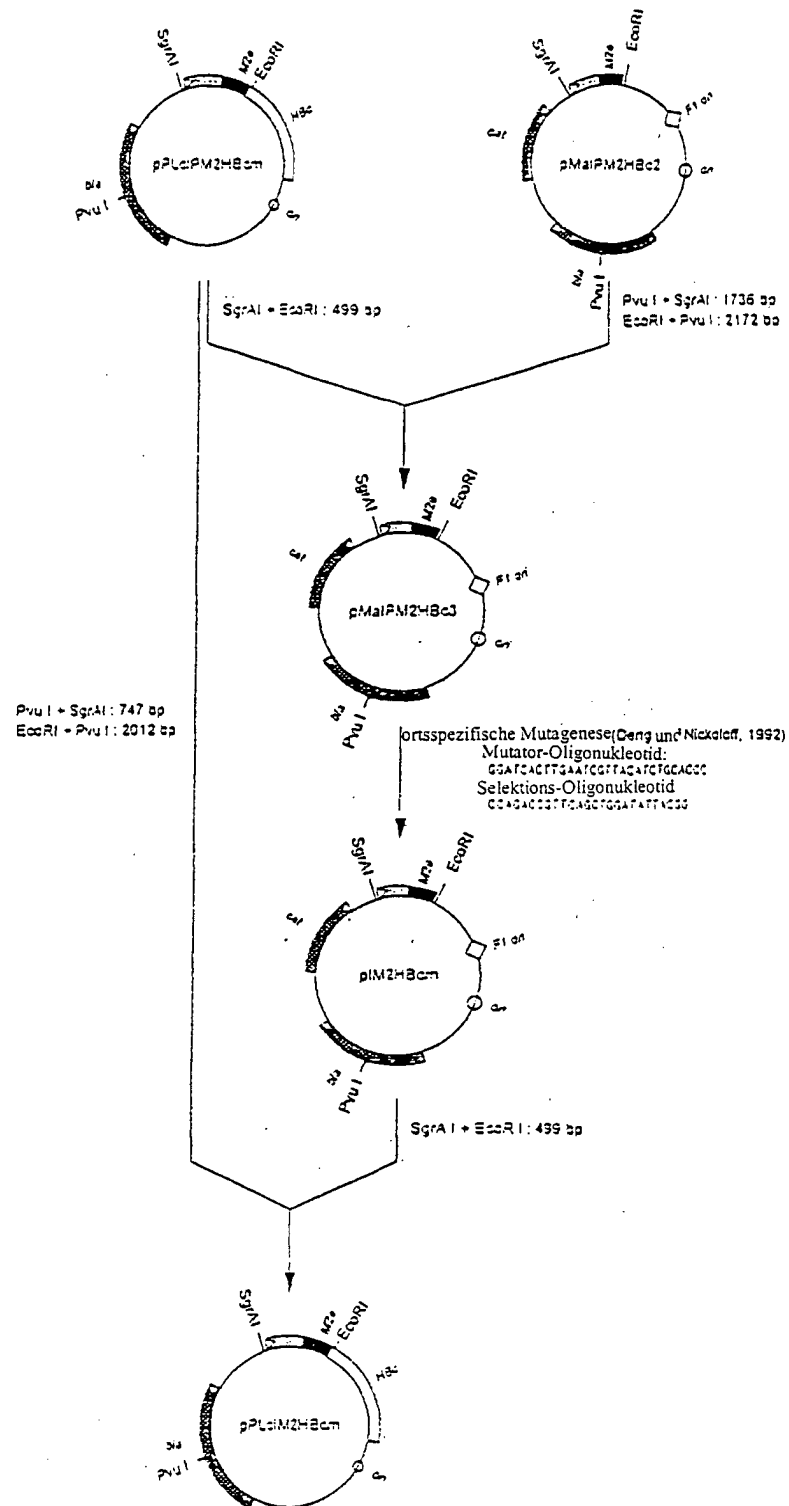
Fig. 8C

	überlebende Mäuse
10 µg IPM2HBcm (i.n.)	12/12
10 µg IM2HBcm (i.n.)	11/12
Kontrolle (i.n.)	2/11
10 µg IPM2HBcm (i.p.)	8/12
10 µg IM2HBcm (i.p.)	12/12
Kontrolle (i.p.)	2/12

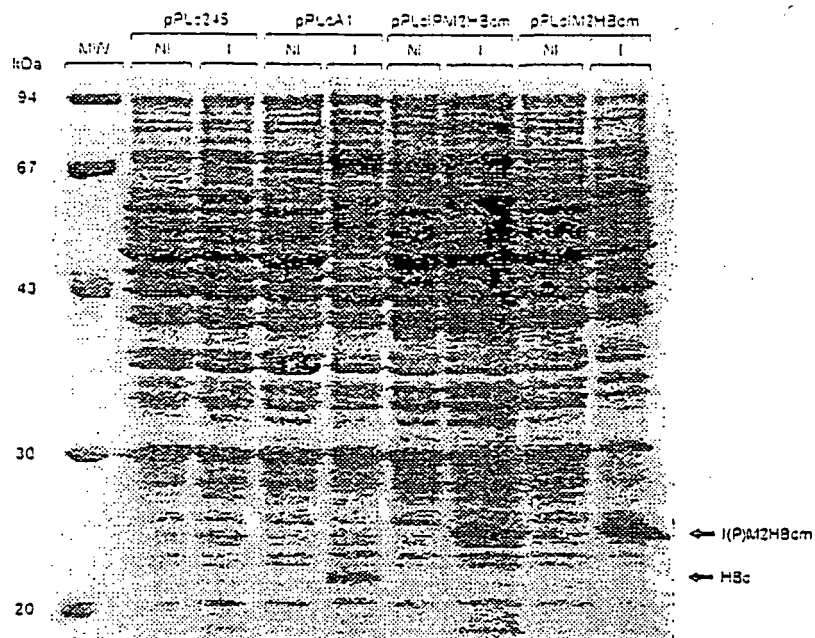
Figur 9



Figur 10



Figur 11



Figur 21

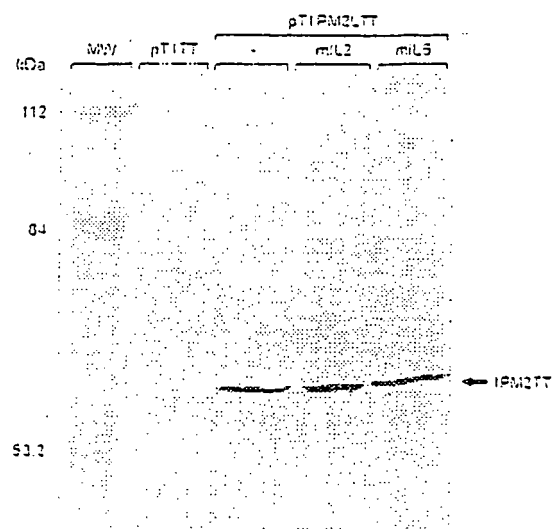
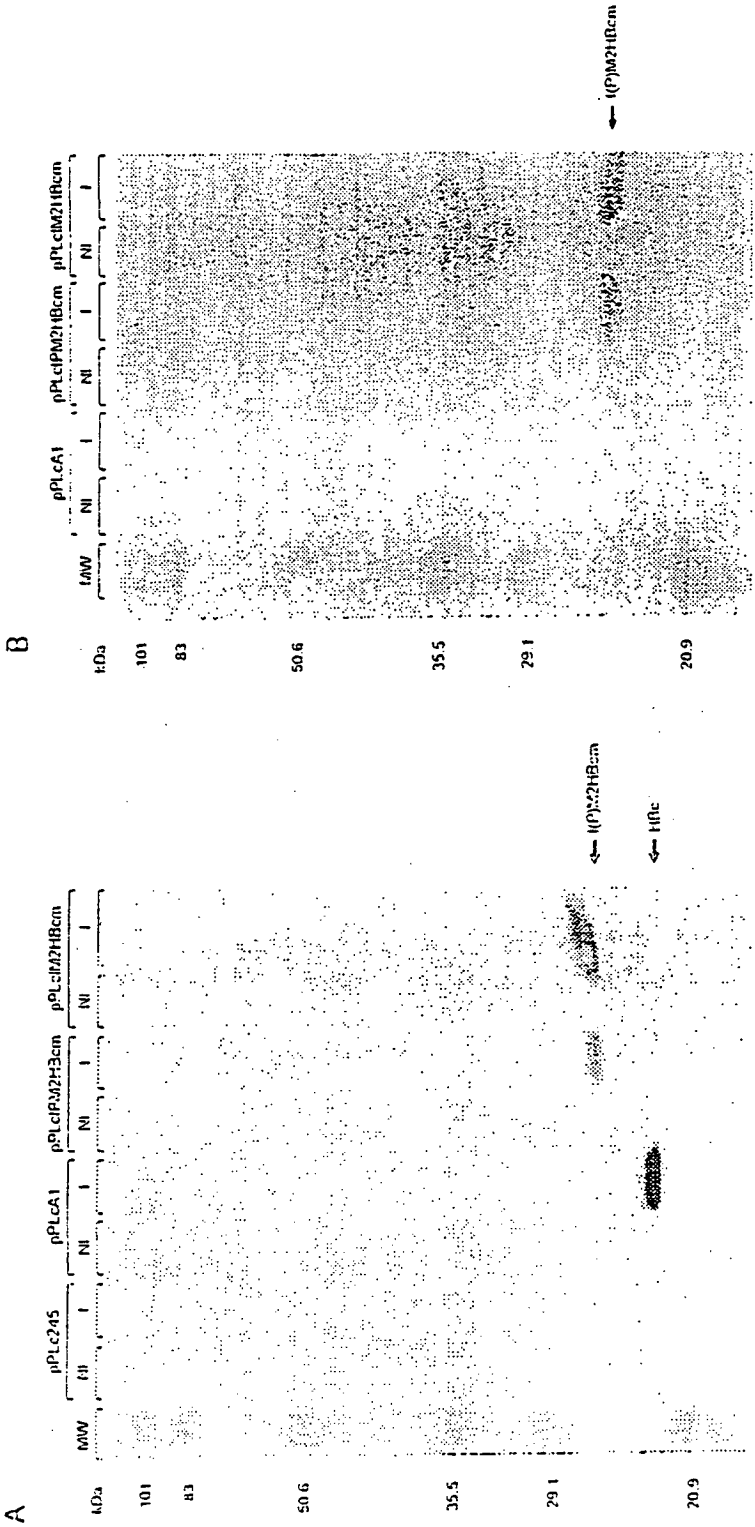


Fig. 12



Figur 13

HBcs (27-mer)

CATGGATATGGATCCTTATAAAGAATT  
start

M2s (23-mer)

CATGTCTCTGCTGACCGAAGTTG  
start

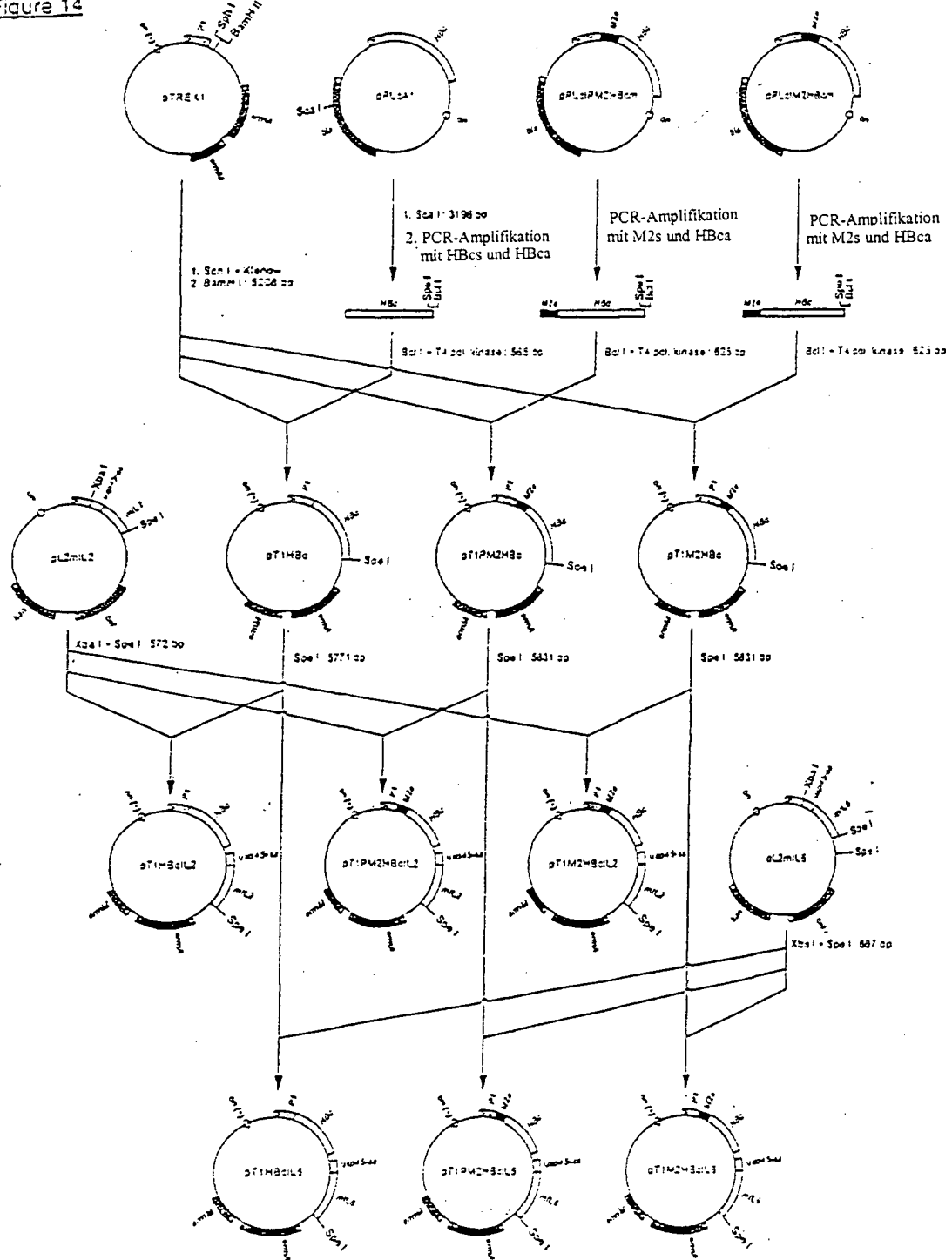
M2Ls (29-mer)

CATGTCTTTATTAAACCGAAGTTGAAACCC  
start

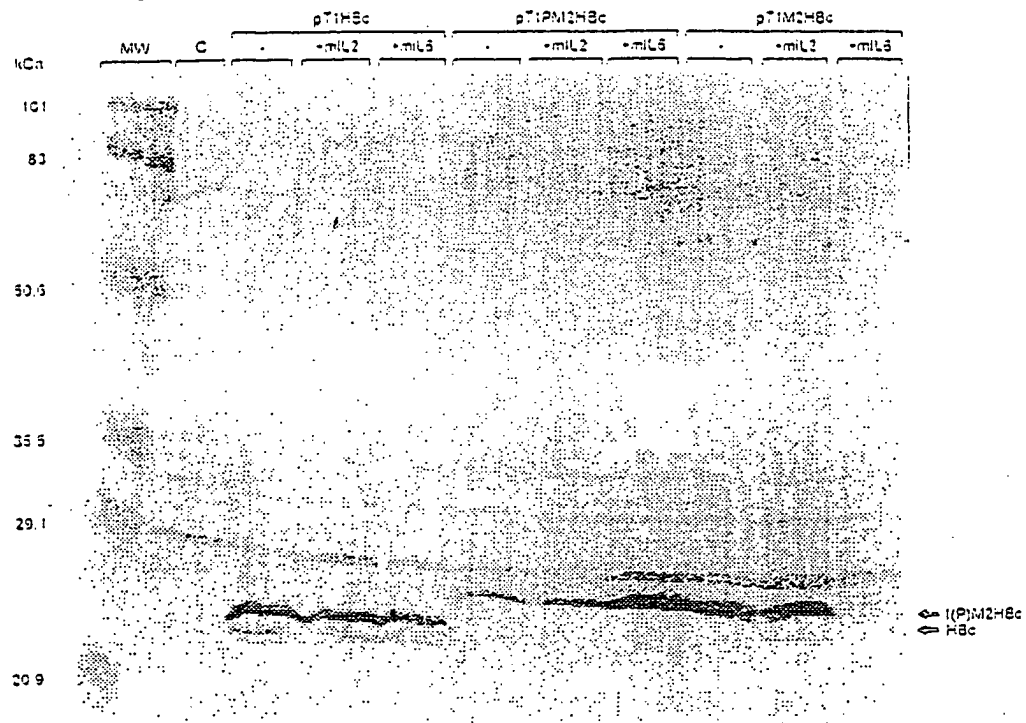
HBca (39-mer)

CGTGATCAACTAGTTCACTAACATTGAGATTCCCGAGAT  
Bcl I Spe I stop

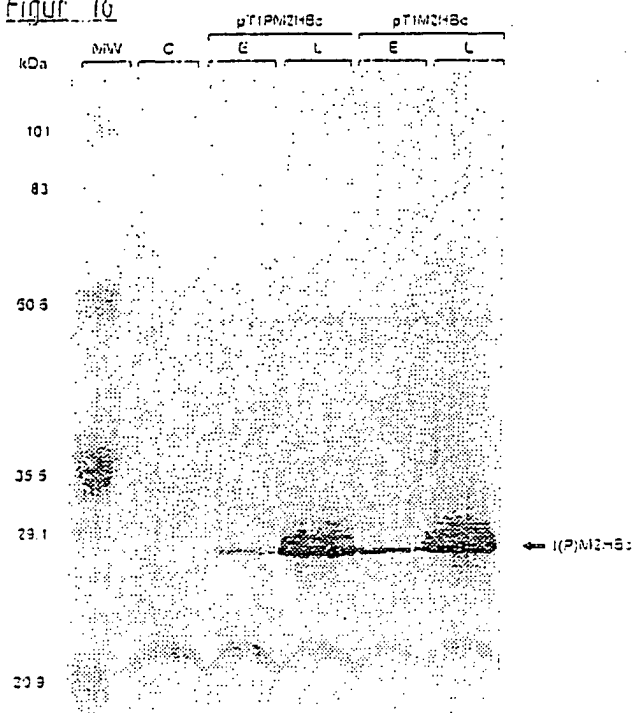
Figure 14



Figur 15



Figur 16





Figur 17

M2Ca (33-mer)

CGGGATCCCCACTTGAATCGTTACATCTGCACC  
BamH I

M2LSs (30-mer)

TCTTTATTAACCGAAGTTGAAACCCCTATC  
Ser

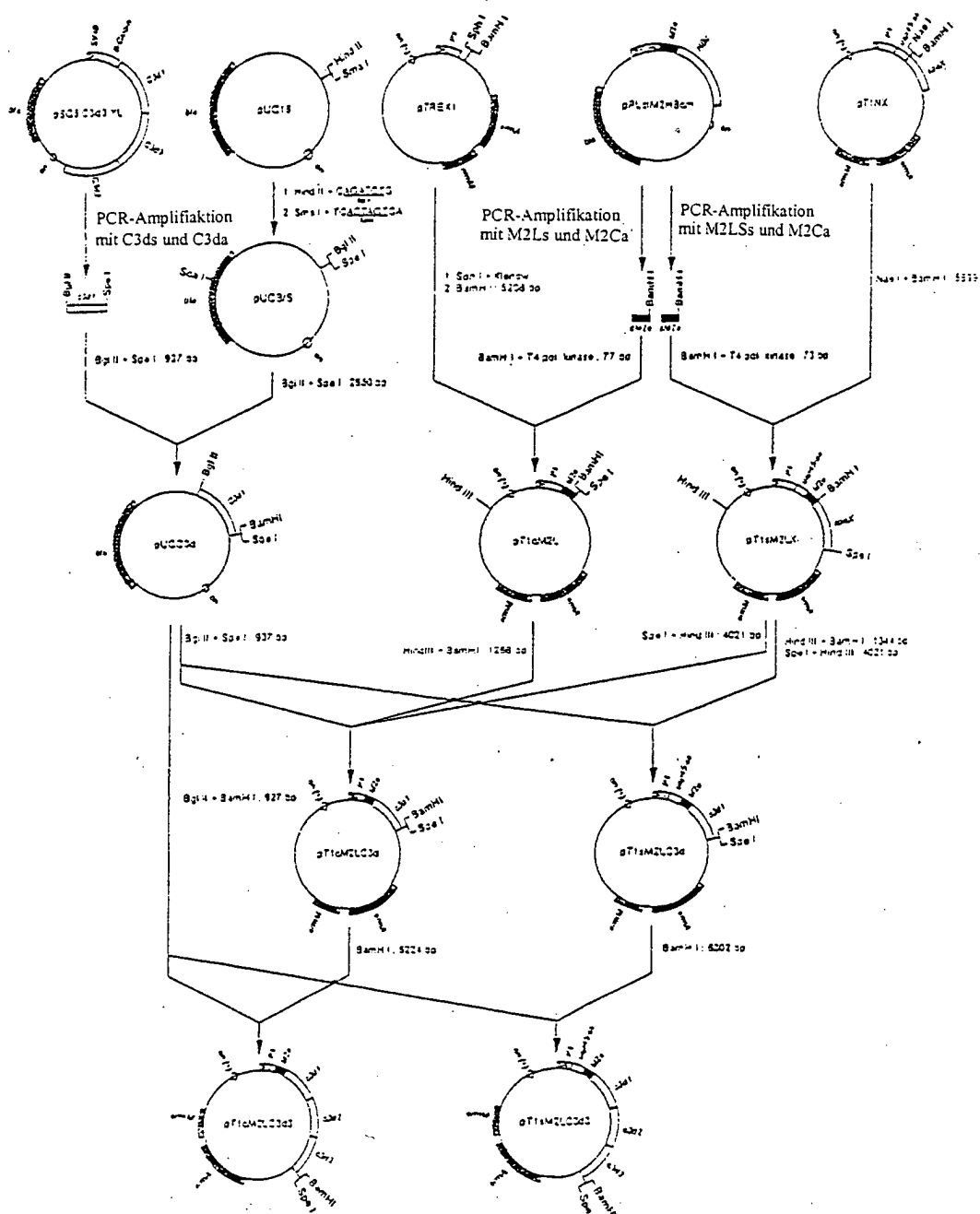
C3ds (35-mer)

CCGCGCCCAACCCGACGAGATCTCGGATCTACCCCC  
Bgl II

C3da (38-mer)

GCACTAGTTCAAGGATCCGATCCGAACTCTTCAGATCC<sup>-</sup>  
Spe I stop BamH I

Figur 18



Figur 19

TTFCs (35-mer)

CGGGATCCGACACCAATTCCATTTTCTTATTCTAA  
BamHI

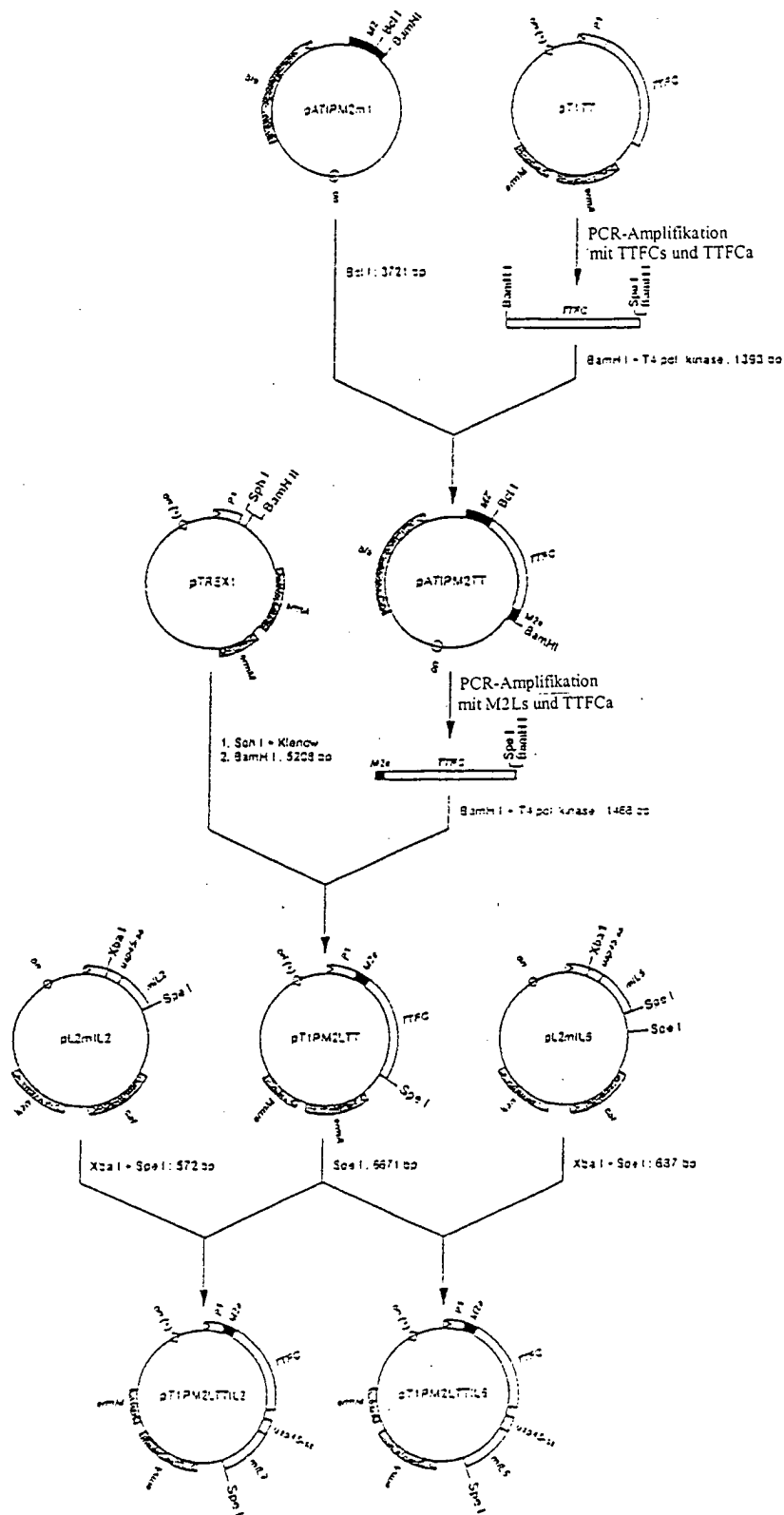
TTFCa (25-mer)

GGGGATCCACTAGTTTAATCATTG  
BclI SpeI stop

M2Ls (29-mer)

CATGTCTTATTAACCGAAGTTGAAACCC  
start

Figur 20



Figur 22

GP67s (25-mer)

GCTACTAGTAAATCAGTCACACCAA  
SpeI

GP67a (33-mer)

CGAAGCTTGCCGGCAAAGGCAGAATGCGCCGCC  
HindIII NaeI

Figur 23

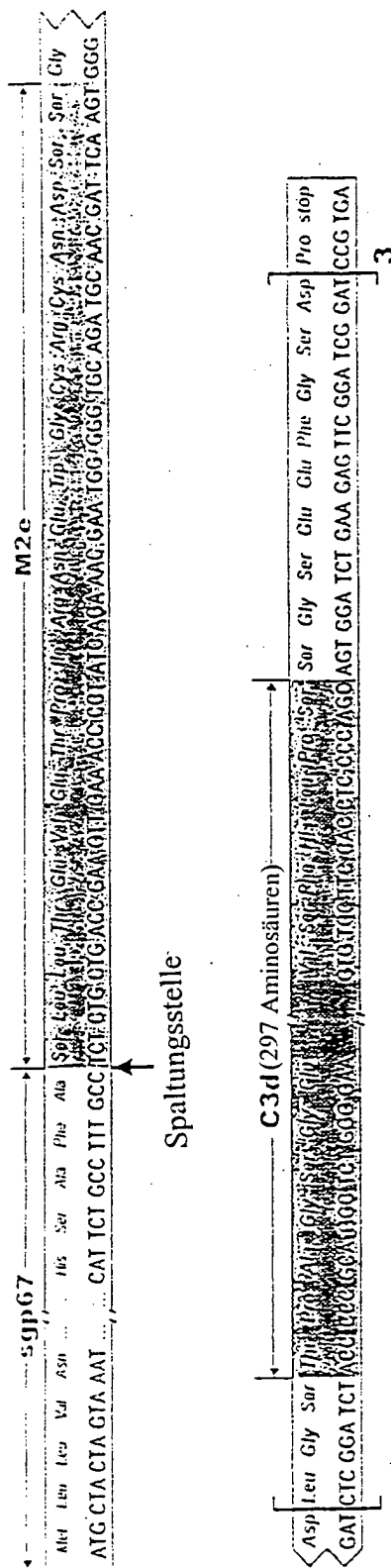
M2Ss (23-mer)

TCTCTGCTGACCGAAGTTGAAAC

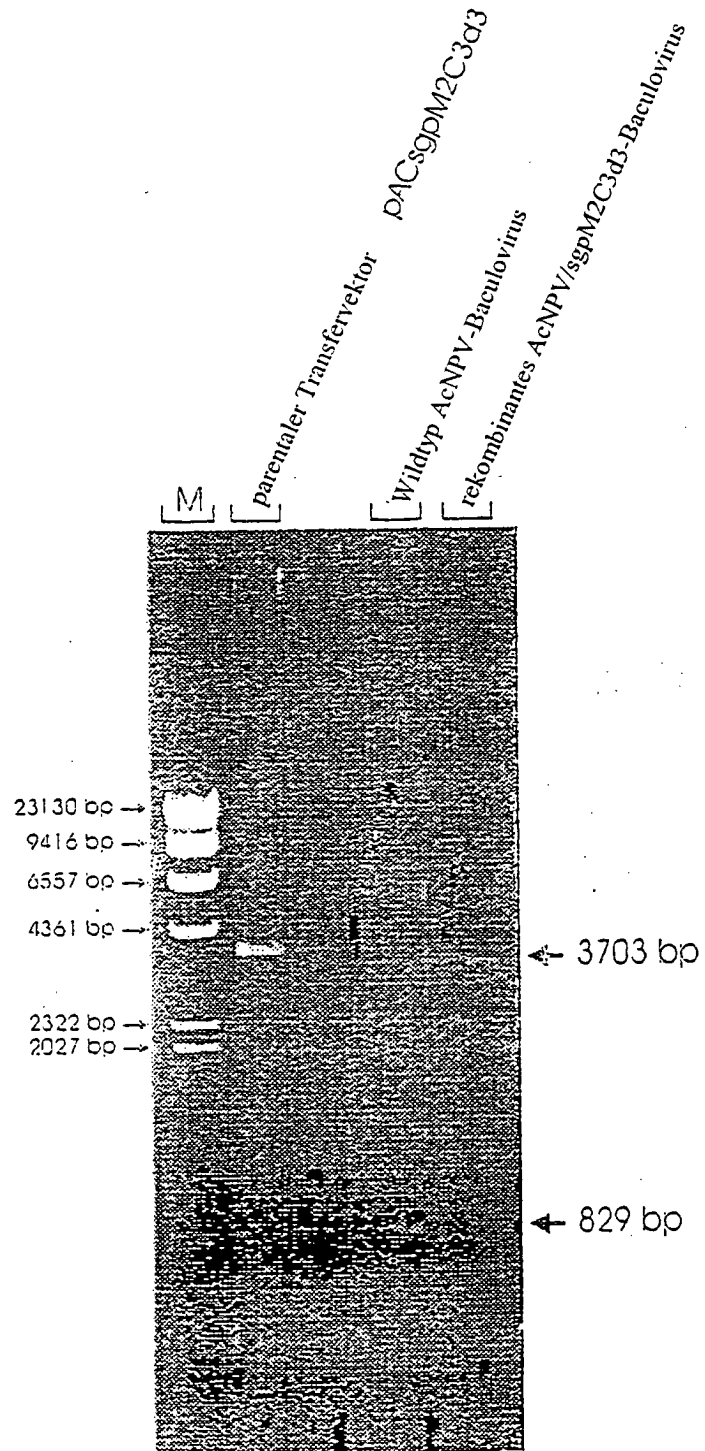
UM2ECa (50-mer)

CGAAGCTTACTAGTTCACGGATCCCACTTGAATCGTTGCATCTGCACCC  
HindIII SpeI stop BamHI

[illegible]

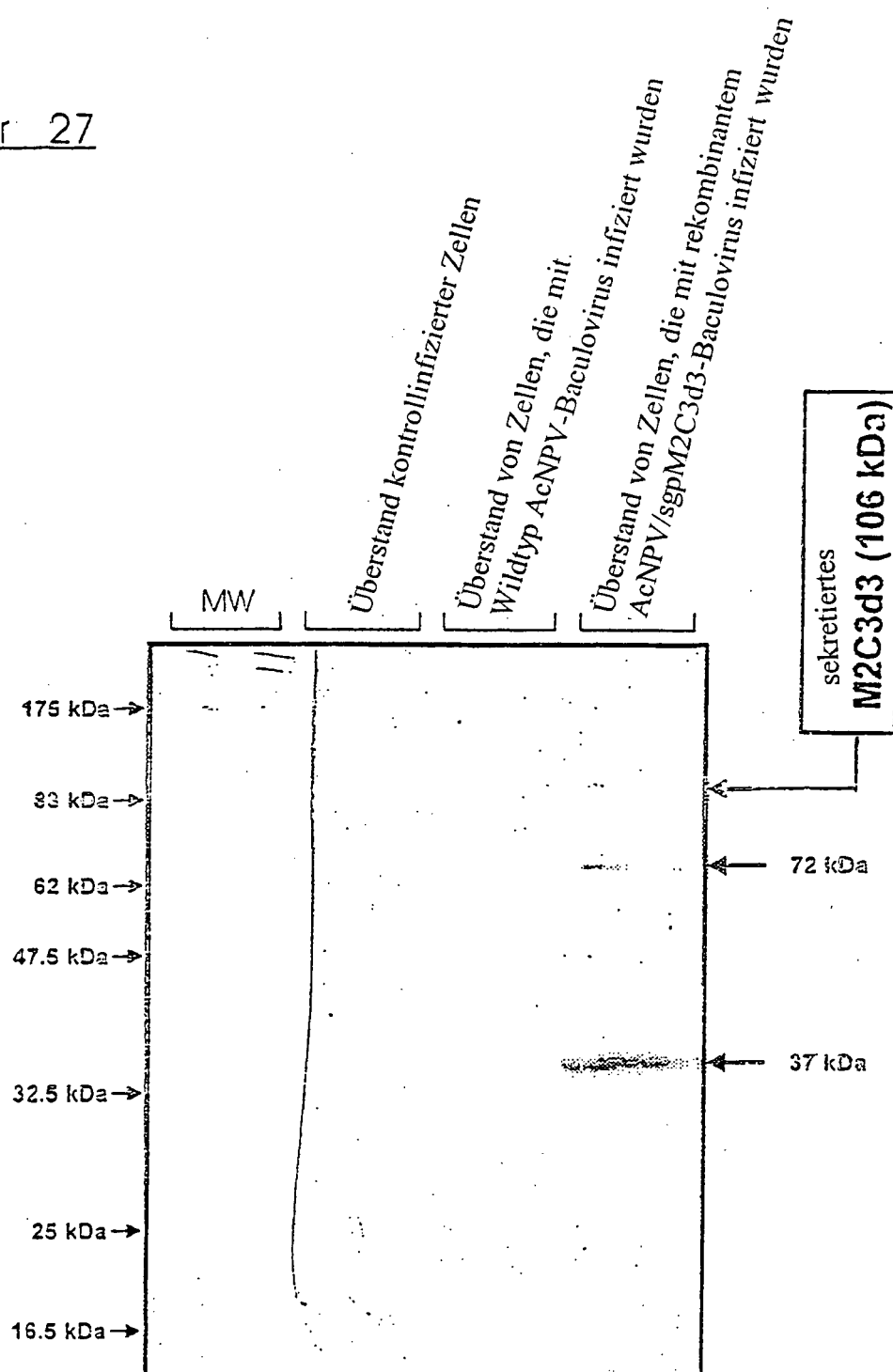


Figur 26

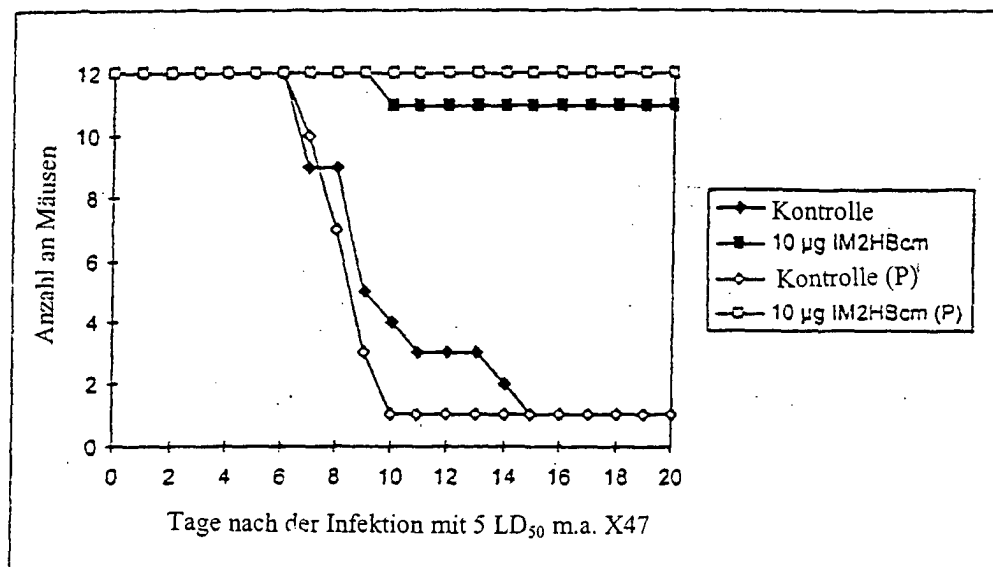




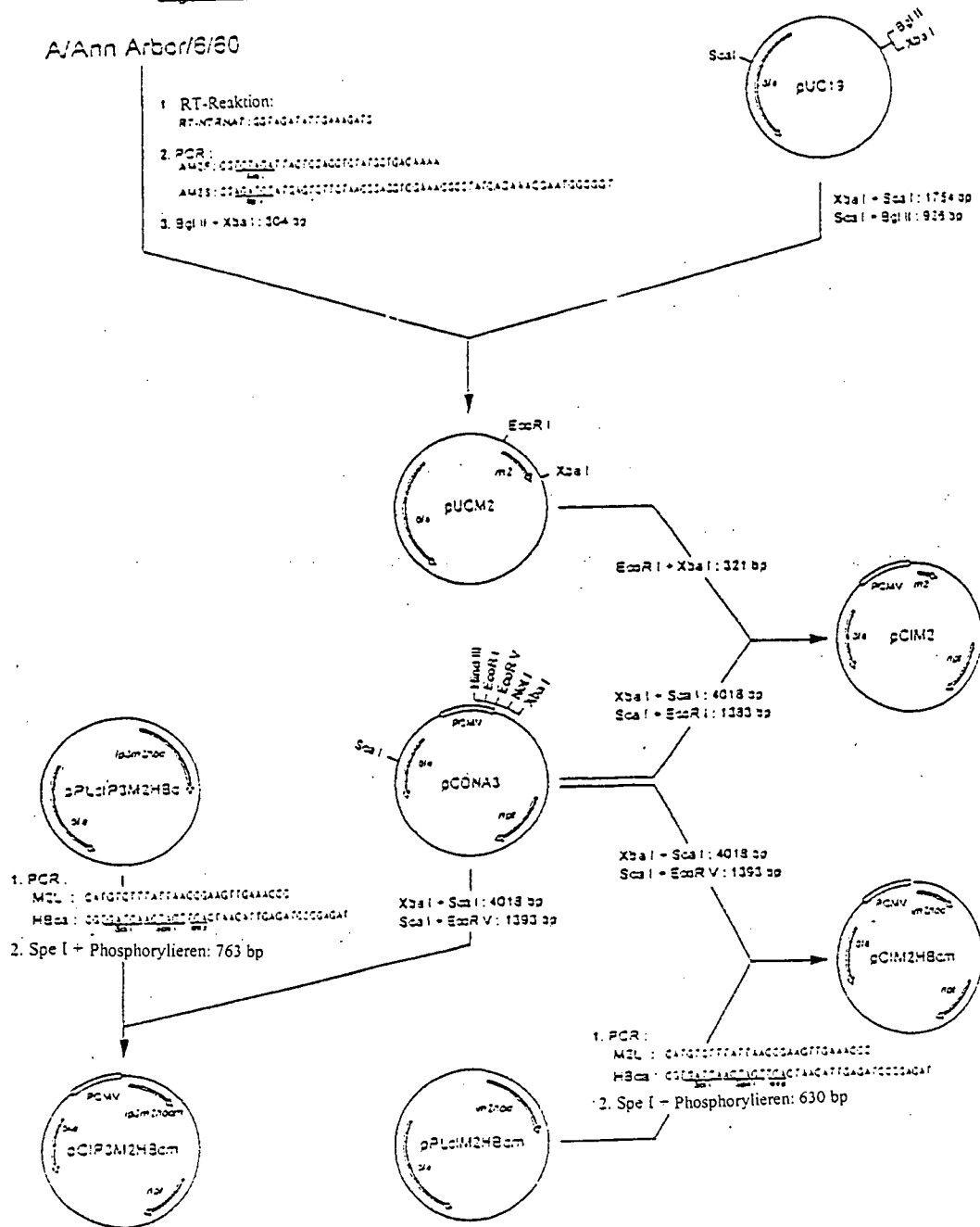
Figur 27



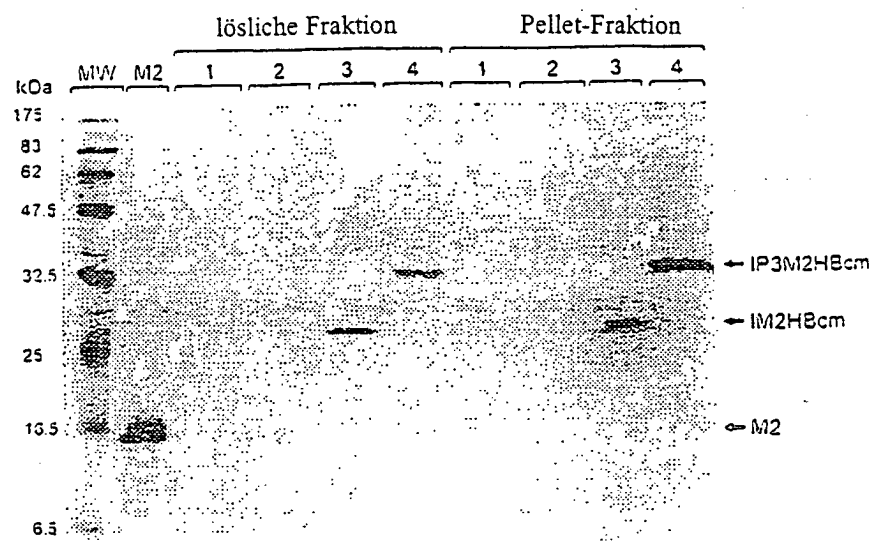
Figur 28



Figur 29



Figur 30



Figur 31

