



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 209 T2 2007.10.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 024 827 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 209.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/21897**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 953 617.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/020306**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.10.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/08 (2006.01)**

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

954302 20.10.1997 US

(73) Patentinhaber:

**Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pa.,
US**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SIMPSON, Lance, Blason Woods, Moorestown, NJ
08057, US; KIYATKIN, Nikita, Cherry Hill, NJ 08003,
US; MAKSYMOWYCH, Andrew, Gulph Mills, PA
19428, US**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN UND METHODEN ZUR SYSTEMISCHEN VERABREICHUNG VON ORALEN IMPFSTOFFEN UND THERAPEUTISCHEN WIRKSTOFFEN**

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

Einleitung

[0001] Diese Erfindung wurde im Rahmen von Forschung gemacht, die vom National Institutes of Health gefördert wurde. Die US-Regierung kann gewisse Anrechte auf diese Erfindung haben.

Bereich der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung hat die Herstellung von Zusammensetzungen zur systemischen Verabreichung von oral angewendeten Impfstoffen und therapeutischen Wirkstoffen mittels eines modifizierten Botulinum-Toxins zum Gegenstand, wobei das Toxin seine Fähigkeit, durch die Darmwand zu gelangen, beibehält, jedoch so verändert wurde, dass es nicht toxisch ist.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Neurotoxine von Clostridium sind die wirksamsten Protein-Toxine, die bekannt sind. Das von Clostridium tetani produzierte Neurotoxin (Tetanus-Toxin) wird beim Menschen als Erscheinung von offenen Wunden angetroffen. Eine Tetanus-Vergiftung stellt mittlerweile jedoch, zumindest in den industrialisierten Ländern, keine übermäßige Gefahr für die öffentliche Gesundheit mehr dar, dank der Verfügbarkeit und weitverbreiteten Verwendung von sicheren, effektiven und kostengünstigen Impfstoffen. Diese Impfstoffe stellen im Wesentlichen einen durch Formalin inaktivierten Kulturüberstand von in Fermentern gezüchtetem C. tetani dar.

[0004] Botulinum-Neurotoxin (BoNT), welches von den Organismen Clostridium botulinum, Clostridium butyricum und Clostridium baratii gebildet wird, ist das potente ursächliche Mittel, das mit der Krankheit Botulismus in Verbindung steht (Simpson, L. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26 (1986), 427-453). Der Mensch ist diesem Neurotoxin im Allgemeinen durch eine Lebensmittelvergiftung ausgesetzt, obwohl auch einige seltene Fälle von Wund-Botulismus aufgetreten sind. Eine dem Tetanus-Impfstoff ähnlicher Impfstoff wurde entwickelt, um gegen die Vergiftung mit Botulinum-Toxin zu schützen. Da es jedoch sieben verschiedene Serotypen des Botulinum-Toxins gibt, kann ein vollständiger Schutz mit diesen inaktivierten Toxinen nur dadurch gewährleistet werden, indem sieben verschiedenen Impfstoffe herstellt und zur Verabreichung miteinander kombiniert werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind nur fünf der sieben Serotypen im Botulinum-Toxin-Impfstoff vertreten. Ferner bestehen einige der Serotypen aus Stämmen, die in Kultur keine hohen Toxinkonzentrationen produzieren. Demnach sind Kultivierung, Aufreinigung und Inaktivierung der Toxine zur Verwendung in Impfstoffen infolge des hohen Risikos, das mit der Handhabung voll aktiver Toxine einhergeht, sowohl zeitaufwendig als auch kostspielig (Clayton et al. Infection and Immunity 63 (7) (1995), 2738-2742). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist dieser Impfstoff ausschliesslich über das Center of Disease Control zu hauptsächlich experimenteller Verwendung verfügbar.

[0005] Im typischen Falle ist Botulismus die Folge der Aufnahme von Nahrung, die durch das Toxin verdorben wurde, oder der Aufnahme von Nahrung, die mit Organismen, welche das Toxin im Darm herzustellen im Stande sind, infiziert wurde. Ungeachtet seines Ursprungs wird das Botulinum-Toxin als relativ ungiftiges, einzelkettiges Polypeptid synthetisiert, mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa. Um vollständig toxisch zu werden, muss es einer posttranslationalen Prozessierung unterzogen werden, wobei das Molekül von einer Protease gespalten wird. Dabei entsteht eine zweikettige Struktur, in welcher die schwere Kette (etwa 100.000 Dalton) über eine Disulfidbindung mit einer leichten Kette (etwa 50.000 Dalton) verbunden ist. Das zweikettige Molekül ist das Holotoxin, das für die biologische Aktivität verantwortlich ist. BoNT gelangt vom Darm in die allgemeine Blutbahn (Lymphe und Blut) und wird so zu den cholinergen Nervenendigungen hinverteilt, welche die Zielorte der Giftwirkung darstellen. Das Toxin dringt in diese Nerven ein, wo es als Zink-abhängige Endoprotease fungiert und zur Exocytose unentbehrliche Polypeptide spaltet (Montecucco, C. und Schiavo, G. Mol. Microbiol. 13 (1994), 1-8). Das Spalten dieser Polypeptide führt zu einer Unterbindung der Transmitterausschüttung und zur Lähmung.

[0006] Von der schweren Kette des Toxins wird angenommen, dass sie zur Bindung und zum Transport des Toxins von der Außen- zur Innenseite der cholinergen Nervenendigungen unentbehrlich ist, während die leichte Kette die Zink-abhängige Endoprotease-Aktivität aufweist, welche für die Fähigkeit des Toxins, die cholinergen Nervenendigungen zu vergiften, verantwortlich ist (Neimann et al. Behring Inst. Mitt. 89 (1991), 153-162). Dementsprechend sind Impfstoffe gegen Botulismus, die ein ungiftiges carboxyterminales 50 kDa-Fragment von Clostridium botulinum umfassen, beschrieben worden. LaPenotiere et al. Toxicon 33 (10) (1995), 1383-6 und Clayton et al. Infection and Immunity 63 (7) (1995) 2738-2742. Ferner wurde vorgeschlagen, dass dieses

hoch selektive Neurotoxin und Tetanustoxin in ein nicht toxisches therapeutisches Werkzeug umgewandelt werden kann, welches zur Verabreichung von Arzneistoffen, Hormonen, Enzymen oder antiviralen Wirkstoffen in das Zentralnervensystem eingesetzt werden kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein modifiziertes Botulinum-Toxin bereitzustellen, welches seine Fähigkeit, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen, beibehält, dabei jedoch nicht toxisch ist, und welches somit als oraler Impfstoff für antigene Peptide, einschließlich des Botulinum-Toxins, sowie zur oralen Verabreichung von anderen therapeutischen Mitteln in die allgemeine Blutbahn verwendet werden kann.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0008] [Fig. 1](#) stellt ein Diagramm des nativen Botulinum-Toxins dar. Diese Figur zeigt die leichte Kette mit dem Zink-bindenden Motiv, die über eine Disulfidbindung mit der schweren Kette des nativen Toxins verbunden ist.

[0009] [Fig. 2](#) stellt ein Diagramm dar, das ein Beispiel eines modifizierten Botulinum-Toxins der vorliegenden Erfindung aufzeigt. Diese Figur zeigt die leichte Kette mit einem modifizierten Zink-bindenden Motiv, die mit der intakten schweren Kette des Botulinum-Toxins verbunden ist.

Genauere Beschreibung der Erfindung

[0010] Eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin ist die Entwicklung von Arzneistoffen, die auf oralem Wege verabreicht werden können. Die Entwicklung von oralen Peptidimpfstoffen, welche systemische Immunität hervorrufen, hat sich als besonders problematisch erwiesen. Schwierigkeiten, die bei der Entwicklung von oralen Peptidimpfstoffen auftreten, umfassen: Abbau, wenn sie Bedingungen wie niedrigem pH-Wert und der Einwirkung von proteolytischen Enzymen im menschlichen Darm ausgesetzt sind; wenn die antigene Domäne des die Krankheit auslösenden Erregers zu groß ist, um eine signifikante nicht-spezifische Diffusion vom Darmlumen in die allgemeine Blutbahn zu ermöglichen; außerdem erscheint es unmöglich, Peptidimpfstoffe zu entwerfen, die ausbeuterisch an Rezeptoren im Darm binden und einen aktiven Transport in die allgemeine Blutbahn durchlaufen. Trotz dieser Schwierigkeiten wurden hinsichtlich der Suche nach oralen Impfstoffen beträchtliche Anstrengungen unternommen. So wurde beispielsweise vor kurzem die Idee, manipulierte Nahrungsmittel wie zum Beispiel Karoffeln oder Bananen als Vektoren für breitgefächerte Impfungen zu verwenden, vorgeschlagen. Das Manipulieren eines Nahrungsmittels, welches sodann verdaut wird, mit dem antigenen Peptid überwindet diese Schwierigkeiten jedoch nicht. Dementsprechend besteht ein Bedarf an Verabreichungsmitteln für Arzneistoffe, welche zuverlässig und reproduzierbar ein antigenes Peptid oder andere therapeutische Mittel vom Darm in die allgemeine Blutbahn einschleusen.

[0011] Die vorliegende Erfindung hat die Verwendung eines Botulinum-Toxins zur Herstellung eines oralen Impfstoffs zum Gegenstand, wobei mindestens beide His-Aminosäuren und die Glu-Aminosäure des Zink-bindenden Motivs His-Glu-X-X-His der leichten Kette des Toxins mutiert sind und wobei das Botulinum-Toxin nicht toxisch und in der Lage ist, aus dem Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen.

[0012] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein modifiziertes Botulinum-Toxin, das die oben erwähnten Mutationen aufweist und das als orales Verabreichungsmittel für antigene Peptide, umfassend, aber nicht darauf beschränkt, Botulinum-Toxin und andere therapeutische Mittel, zum Einschleusen in die allgemeine Blutbahn verwendet werden kann. Es wurde inzwischen erkannt, dass das Botulinum-Toxin vom Darm in die allgemeine Blutbahn gelangt, indem es an serospezifische Rezeptoren an der mukosalen Seite der in einer einzelligen Schicht wachsenden polarisierten Darmzellen bindet. Gebundenes Toxin wird aktiv durch die Zellen hindurch transportiert und intakt und unverändert auf der serosalen Seite der einzelligen Schicht abgeliefert. Es wurde vorgeschlagen, dass zusätzliche Proteine wie zum Beispiel Hämagglutinin, welches ein Bestandteil des nicht kovalenten Komplexes von Proteinen, zu denen von Clostridium ausgeschiedene Botulinum-Toxin gehört, ist, möglicherweise die Bindung und den Transport des Toxins durch die Darmwand hindurch vermitteln. Versuche, die mit einer rekombinanten Form des Holotoxins durchgeführt wurden, haben jedoch gezeigt, dass das Botulinum-Toxin selbst die bindende Domäne besitzt, die die Rezeptoren an der Oberfläche der Darmzellen erkennt. Des Weiteren konnte nun gezeigt werden, dass die oben beschriebenen Modifikationen am Zink-bindenden Motiv His-Glu-X-X-His der leichten Kette des Toxins ausgeführt werden können, um es nicht toxisch zu machen, ohne dabei die Fähigkeit des Proteins, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen, zu verändern. Dementsprechend wird im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "modifiziertes Botuli-

num-Toxin" ein Botulinum-Toxin verstanden, das die oben beschriebenen Modifikationen aufweist und das seine Fähigkeit, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen, beibehält, aber nicht toxisch ist.

[0013] Unter dem Begriff "nicht toxisch" im Sinne dieser Erfindung wird folgendes verstanden: Wird eine cholinerge Nervenendigung dem modifizierten Botulinum-Toxin ausgesetzt, so führt dies nicht zu einer Blockade der Transmitterausschüttung in den Nervenendigungen und zur Lähmung. Die Auswirkungen von Veränderungen am Botulinum-Toxin, welche dieses nicht toxisch machen, auf seine Fähigkeit, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen, können routinemäßig gemäß den hierin gelieferten Methoden durchgeführt werden, so dass Fachleute die in der vorliegenden Erfindung zu verwendenden modifizierten Botulinum-Toxine zu identifizieren vermögen. In dieser Definition von modifizierten Botulinum-Toxinen sind Botulinum-Toxine enthalten, die zusätzlich ein ausgewähltes Antigen für ein Protein, welches nicht das Botulinum-Toxin ist, oder ein therapeutisches Mittel umfassen.

[0014] Es wurden Mittel hergestellt, die ein Botulinum-Neurotoxin umfassen, in welchem das Zink-bindende Motiv der leichten Kette des Holotoxins inaktiviert worden war. Das derart modifizierte Toxin ist nicht toxisch, da das Holotoxin die Fähigkeit, eine neuromuskuläre Blockade auszulösen, nicht beibehält; diese Veränderung an der leichten Kette hat jedoch keine negative Auswirkung auf die Fähigkeit des Restes des Toxin-Moleküls, vom Darmlumen in die allgemeine Blutbahn zu entweichen. Im Besonderen wurden mindestens drei Aminosäuren, die das Zink-bindende Motiv der leichten Kette umfassen, modifiziert. Im Einzelnen wurden die Aminosäuren His (an Position 229), Glu (an Position 230) und His (an Position 233) der nativen Sequenz durch die Aminosäuren Gly, Thr beziehungsweise Asn ersetzt, was in SEQ ID No: 1 resultierte. Die Nucleinsäuresequenz, die dieses modifizierte Botulinum-Toxin codiert, ist als SEQ ID No: 2 dargestellt. Diese Aminosäuresubstitutionen unterbinden die Fähigkeit des Holotoxins, katalytisches Zink oder andere divalente Kationen zu binden.

[0015] In weiteren Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass ungeschnittenes oder einzelkettiges Botulinum-Toxin ebenso bindet und durch die Darmwand hindurch transportiert wird. Dementsprechend umfassen gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende modifizierte Botulinum-Toxine auch Zusammensetzungen, in denen die Spaltstelle entfernt wurde.

[0016] Die biologische Aktivität eines modifizierten Botulinum-Toxins, so wie es in der vorliegenden Erfindung zu verwenden ist, wurde mittels eines in vivo-Toxizitätstests, mittels der in vitro-Aktivität eines Nervus phrenicus-Hemidiaphragma-Präparats der Maus sowie mittels der enzymatischen Aktivität in rohen Synaptosomenpräparationen bestimmt. Für diese Versuche wurde das modifizierte Botulinum-Toxin, hierin als modifiziertes rekombinantes oder modifiziertes rBoNT/C bezeichnet, mit Hilfe stellengerichteter Mutagenese aus Botulinum-Toxin Serotyp C erzeugt, um so das Zink-bindende Motiv der leichten Kette des Holotoxins, welches für die Endoprotease-Aktivität unentbehrlich ist, zu deaktivieren. Es können jedoch auch andere Methoden der Peptidsynthese verwendet werden, welche folgende Techniken umfassen, jedoch nicht auf diese beschränkt sind: biochemische Methoden wie zum Beispiel enzymatisches Schneiden der Peptide und Quervernetzen der daraus resultierenden Fragmente, wie sie routinemäßig von Fachleuten durchgeführt werden. Angesichts der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der Botulismus-Serotypen können Fachleute ferner routinemäßig modifizierte Botulinum-Toxine aus anderen Serotypen, nicht nur dem Botulinum-Serotyp C, herstellen. Alle Serotypen des Botulinum-Toxins werden beispielsweise als relativ inaktive Vorläufersubstanzen mit einem Molekulargewicht von etwa 150.000 synthetisiert. In jedem Fall muss die Vorläufersubstanz durch eine Protease „gespalten“ werden, um ein zweikettiges Molekül zu erzeugen, das eine schwere Kette (100.000 kDa) enthält, welche über eine Disulfidbindung mit der leichten Kette (50.000 kDa) verbunden ist. Jeder Serotyp des Botulinum-Toxins wirkt vorzugsweise auf cholinerge Nervenendigungen und blockiert die Ausschüttung des Transmitters, wobei die schwere Kette hauptsächlich als eine auf Gewebe abzielende Domäne fungiert, die das Toxin zu den cholinergischen Nervenendigungen leitet, die leichte Kette dagegen im Inneren der Nervenendigungen wirkt und die Ausschüttung des Transmitters blockiert. Dabei ist es die leichte Kette eines jeden Serotyps, welche als Zink-abhängige Metallo-Endoprotease fungiert und ein oder mehrere Mitglieder einer Polypeptidfamilie spaltet, die zur Transmitterausschüttung unentbehrlich sind. In jedem Serotyp ist ein Zink-bindendes Motiv His-Glu-X-X-His (SEQ ID No: 3) vorhanden, welches für die enzymatische Aktivität unerlässlich ist. Eine Modifikation des bindenden Motivs führt unweigerlich zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Ferner zeigt das Alignment der Nucleinsäure- und der Aminosäuresequenzen für einen Teilbereich eines jeden Serotyps, der den Bereich des Zink-bindenden Motivs umfasst, ein hohes Maß an identischen Sequenzen in den Bereichen, die zu dem Zink-bindenden Motiv benachbart sind und dieses umfassen. Demnach sind Beispiele, in denen Botulinum Serotyp C verwendet wurden, stellvertretend für die gesamte Klasse.

[0017] In vivo-Toxizitätstests des modifizierten rBoNT/C-Holotoxins zeigten, dass das modifizierte Botuli-

num-Toxin mit Mutationen im Zink-bindendem Motiv während einer der Verabreichung folgenden 16 Wochen langen Beobachtungsphase keinerlei akute Toxizität in Mäusen hervorrief, nicht einmal in hohen Dosen (10 µg pro Tier, i.p.). In keinem der Tiere konnte eine sichtbare Neurotoxizität oder andere offensichtlich schädliche Wirkungen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu starben Mäuse, denen 100 ng natives BoNT/C i.p. injiziert worden war, innerhalb von 2 bis 2,5 Stunden nach der Injektion.

[0018] Die in vitro-Toxizität des modifizierten BoNT/C-Holotoxins wurde ebenfalls mit der des nativen BoNT/C in Nervus phrenicus-Hemidiaphragma-Präparaten der Maus verglichen. Es stellte sich heraus, dass der Zusatz von modifiziertem Botulinum-Toxin zu den Nervus phrenicus-Hemidiaphragma-Präparaten keine neuromuskuläre Blockade hervorrief (1×10^{-10} M; n = 4). Im Gegensatz dazu rief der Zusatz von nativem BoNT/C (1×10^{-12} M; n = 8) ausnahmslos Übertragungslähmung hervor (Mittelwert \pm Standardfehler = 152 ± 17 min.).

[0019] Die Fähigkeit dieses modifizierten Botulinum-Toxins, eine Immunreaktion hervorzurufen, wurde auch nach oraler (p.o.) Verabreichung sowie subkutaner (s.c.) Injektion getestet. Wie mittels Immunblotanalyse bestimmt werden konnte, riefen sowohl die p.o. als auch die s.c. Verabreichung von modifiziertem rBoNT/C-Holotoxin eine systemische Antikörperbildung hervor. Dementsprechend behielt das modifizierte Botulinum-Toxin der vorliegenden Erfindung seine Fähigkeit bei, den Durchgang durch den Darm zu überstehen sowie eine aktive Translokation aus dem Darm heraus zu durchlaufen. Dies wird weiterhin durch die Erkenntnis untermauert, dass eine s.c. Verabreichung einer nicht-homogenen Aufbereitung des modifizierten Botulinum-Toxins, welche kleine Mengen fremder Proteine enthielt, dazu fähig ist, eine Immunantwort gegen diese Fremdproteine hervorzurufen, während eine p.o. Verabreichung nur Antikörper gegen das modifizierte Botulinum-Toxin hervorruft.

[0020] Der Schutzeffekt der Antikörper, der durch die p.o. und s.c. Verabreichungen des modifizierten Botulinum-Toxins ausgelöst wird, wurde daraufhin sowohl in Serumneutralisations- als auch in in vivo-Toxizitätstests bewiesen. Unabhängig vom Verabreichungsweg ist Serum von mit modifiziertem Botulinum-Toxin immunisierten Tieren fähig, eine hohe Dosis (~ 10.000 LD₅₀) von nativem BoNT/C zu inaktivieren. In ähnlicher Weise bewirkten eine Immunisierung mit dem modifizierten Botulinum-Toxin, entweder auf dem p.o. oder dem s.c. Weg, in in vivo-Toxizitätstests eine drastische Abschwächung der Wirkung einer nachfolgenden Injektion von nativem Toxin. Tiere, denen das modifizierte Botulinum-Toxin auf oralem Wege verabreicht wurde, hatten mindestens drei Monate lang nachweisbare Antikörper im Serum. Ferner waren Tiere, die das modifizierte Botulinum-Toxin entweder p.o. oder s.c. erhalten hatten, drei Monate nach der dritten Wiederholungsimpfung gegen natives BoNT/C geschützt.

[0021] Die Ergebnisse aus diesen Versuche beweisen demnach, dass in Übereinstimmung mit den hierin gelieferten Lehren ein modifiziertes Botulinum-Toxin hergestellt werden kann, welches nicht toxisch ist, jedoch seine Fähigkeit, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen und schützende Antikörper hervorzurufen, beibehält. Ferner sind Zusammensetzungen, die ein modifiziertes Botulinum-Toxin, wie oben beschrieben, umfassen, als orale Impfstoffe gegen Botulismus in Tieren eindeutig wirksam.

[0022] Da diese oben beschriebenen modifizierten Botulinum-Toxine ihre Fähigkeit beibehalten, aus dem Darm zu translozieren und intakt in die allgemeine Blutbahn abgegeben zu werden, können diese modifizierten Botulinum-Toxine darüberhinaus als Verabreichungsvehikel bei der oralen Verabreichung von Antigenen für andere Proteine, außer Botulinum-Toxin, und von therapeutischen Mitteln in die allgemeine Blutbahn verwendet werden. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, in denen das modifizierte Botulinum-Toxin als Träger von oralen Impfstoffen verwendet werden könnte. Da die Inaktivierung des Zink-bindenden Motivs der leichten Kette die Fähigkeit des Toxins, vom Darm zu translozieren, nicht negativ beeinträchtigt, kann beispielsweise das Zink-bindende Motiv des nativen Botulinum-Toxins durch ein ausgewähltes Antigen für ein anderes Protein ersetzt werden, d. h. ein anderes Protein als das Botulismus-Protein, um so einen oralen Impfstoff gegen dieses andere Protein herzustellen. Alternativ dazu können hinlänglich bekannte Methoden der Proteinchemie und der Molekularbiologie verwendet werden, um das ausgewählte Antigen oder einen Teil davon an ein modifiziertes Botulinum-Toxin anzuhängen. Das daraus resultierende modifizierte Botulinum-Toxin wäre nicht nur nicht toxisch, sondern würde obendrein seine Fähigkeit, vom Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen, beibehalten, so dass das ausgewählte Antigen, sofern es oral verabreicht wird, die allgemeine Blutbahn erreichen und eine systemische Immunantwort gegen das Protein hervorrufen würde. Beispiele von Impfstoffen, die mit dem modifizierten Botulinum-Toxin oral verabreicht werden können, schließen ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Impfstoffe gegen Bacille Calmette-Guerin, Cholera, Diphtherie, Hepatitis B, Masern, Meningitis, Mumps, Keuchhusten, Pest, Polio, Tollwut, Röteln, Wundstarrkrampf, Typhus und Gelbfieber. Der orale Impfstoff kann entweder einzeln oder in Kombination verabreicht werden, wie zum Beispiel DTP (Diphtherie, Wundstarrkrampf, Keuchhusten). Die Möglichkeit, orale Impfstoffe zu verabreichen, ist insbesondere in geo-

graphischen Regionen wichtig, in denen medizinisches Personal nicht jederzeit zur Verfügung steht. Darüber hinaus würde ein oraler Impfstoff gemäß der vorliegenden Erfindung außer dem geringeren Bedarf an Fachpersonal einen weiteren wichtigen ökonomischen Vorteil darstellen, indem er die in Verbindung mit Spritzen zur Injektion und/oder mit der Entsorgung von gebrauchten Spritzen auftretenden Kosten minimieren würde.

[0023] Rezepturen von oralen Impfstoffen, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden, umfassen das modifizierte Botulinum-Toxin in einem pharmakologisch verträglichen Träger wie zum Beispiel steriler physiologischer Kochsalzlösung, steriler Kochsalzlösung mit 0,1% Gelatine oder steriler Kochsalzlösung mit 1,0 mg/ml Rinderserumalbumin. Alternativ dazu kann das hierin beschriebene modifizierte Botulinum-Toxin gentechnisch in eine Pflanze hinein manipuliert werden, so dass die von diesen Pflanzen hervorgebrachten Nahrungsmittel wie zum Beispiel eine Kartoffel oder eine Banane als Vektoren für breit angelegte Impfungen dienen. Methoden der gentechnischen Manipulation von Pflanzen zur Expression von Fremdpeptiden sind unter Fachleuten hinlänglich bekannt, wie unter PCT/US96/09558, eingereicht am 6. Juni 1996, beispielhaft dargestellt.

[0024] Die modifizierten Botulinum-Toxine, wie sie hierin beschrieben werden, sind auch zur Herstellung von chimären oralen Therapeutika nützlich. In dieser Ausführungsform kann ein therapeutisches Mittel an ein modifiziertes Botulinum-Toxin gekoppelt werden, um zwei breitgefächerte Gruppen von oral verabreichten Molekülen zu erhalten: (1) neue Arzneistoffe mit biologisch stabilen Verbindungen, und (2) Konjugat-Prodrugs mit biologisch oder chemisch instabilen Verbindungen, welche sich nach Erreichen der Blutbahn vom Träger ablösen. Beispiele von chimären therapeutischen Techniken werden allgemein in Lautenslager, G.T. und Simpson, L.L., "Chimeric Molecules Constructed with Endogenous Substances," *Advances in Molecular and Cell Biology*, Bd. 9 (1994), S. 233-262, JAI Press, Inc. beschrieben. Beispielsweise kann ein therapeutisches Peptid an ein modifiziertes Botulinum-Toxin gekoppelt werden, um somit ein Mittel zu erzeugen, welches die Eigenschaften des Substituenten besitzt, jedoch oral verabreichbar ist. Ein Beispiel dafür wäre die Erzeugung eines oral verabreichten thrombolytischen Mittels. Ein Fusionsprotein, das durch die Kombination von P-Selektin und Gewebe-Plasminogen-Aktivator (TPA) hergestellt wurde, ist eine viel versprechende Chimäre, welche thrombolytische Aktivität exprimiert und auf die Thromben zielt. Diese Chimäre muß in die Blutbahn eingeführt werden. Unter Verwendung von entweder molekularbiologischen Methoden oder Methoden der Proteinchemie könnte dieses chimäre Molekül 'erster Ordnung' jedoch an ein modifiziertes Botulinum-Toxin, wie hierin beschrieben, gekoppelt werden, um so eine Chimäre höherer Ordnung zu erzeugen, welche den zusätzlichen Vorteil besäße, dass sie mittels oraler Verabreichung in die allgemeine Blutbahn verabreicht werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die Konstruktion von oral verabreichten antineoplastischen Arzneistoffen. Verschiedene antineoplastische Arzneistoffe wurden offenbart, welche die cytotoxischen Eigenschaften eines einzigen Moleküls ausnutzen und gleichzeitig mit einem Teil eines anderen Moleküls fusioniert sind, dessen Funktion spezifisch auf das Toxin gerichtet ist. Ein jüngeres Beispiel verwendet den Aminoterminus des Pseudomonas-Exotoxins (PE), das mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) fusioniert ist, wobei die Chimäre EGF-PE entsteht, welche als cytotoxisches Mittel gegenüber EGF-Rezeptor tragende Krebszellen verwendet werden kann. Die Bindung dieser Chimäre an ein modifiziertes Botulinum-Toxin, wie hierin beschrieben, würde die Erzeugung einer Chimäre höherer Ordnung zur Folge haben, die oral verabreicht werden kann.

[0025] Das allgemeine Konzept von der Verwendung eines modifizierten Botulinum-Toxins als Träger von Impfstoffen oder anderen therapeutischen Mitteln ist dasselbe für Mensch oder nicht-humanes Tier – mit einer Ausnahme. Es ist unwahrscheinlich, dass alle Serotypen des Botulinum-Toxins als Träger für Arzneistoffe in allen Arten gleich wirksam sind. Hinweise aus klinischen Untersuchungen lassen vermuten, dass der Mensch auf die Wirkung der Serotypen A, B und E besonders empfindlich reagiert. Dies mag mit der Wirksamkeit zusammenhängen, mit der diese drei Serotypen aus dem gastrointestinalen System absorbiert werden. Dementsprechend wären die Serotypen A, B und E die bevorzugten Träger von therapeutischen Mitteln für den Mensch.

[0026] Im Gegensatz dazu reagieren die meisten nicht-humanen Tiere besonders empfindlich auf den Serotyp C. Dies läßt vermuten, dass in der Veterinärmedizin der bevorzugte Träger eines therapeutischen Mittels zur Verwendung in nicht-humanen Tieren der Serotyp C sein würde. Beispiele von Tierimpfstoffen, welche mit dem modifizierten Botulinum-Toxin oral verabreicht werden könnten, schliessen folgende Impfungen ein, sind aber nicht auf diese beschränkt: Impfung gegen Adenovirus Typ 2, Bordetella bronchiseptica, Botulismus, Calicivirus, Chlamydia psittaci, Clostridien-Erkrankungen wie zum Beispiel Clostridium Perfringens Typ C, Coronavirus, Staupe, Pferde-Encephalomyelitis, Escherichia coli, feline infektiöse Peritonitis, felines Leukämievirus, feline Panleukopenie, Hepatitis, Leptospirose, Parainfluenzavirus, Parvoviren, Tollwut, Rhinotracheitisvirus und Wundstarrkrampf.

[0027] Folgende Beispiele sind ausschließlich zu erläuternden Zwecken aufgeführt, und die Erfindung soll in keiner Weise auf sie beschränkt sein.

Beispiele

[0028] Restriktionsendonucleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, MA) bezogen. Der Expressionsvektor pQE-30 und die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose wurden von QIAGEN (Chatsworth, KA) bezogen. Monoclonale Antikörper (mAb), die spezifisch für den 6xHis-Affinitätsmarkt waren, wurden von QIAGEN bezogen. Anti-Syntaxin-mAb (S-0664; anti-HPC-1) wurden von SIGMA (St. Louis, MO) bezogen, und Pferde-anti-BoNT/C-Antikörper wurden von den Centers for Disease Control (CDC, Atlanta, GA) erhalten. Die Plasmide pCL8 und pCH3, die die EcoRI-Fragmente der BoNT/C-DNA tragen, sind schon früher von Kimura et al. (BBRC 171 (1990), 1304-1311) beschrieben worden.

Beispiel 1: Herstellung eines Expressionsvektors zur Synthese des rBoNT/C-Holotoxins

[0029] [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Darstellung des nativen Botulinum-Toxins. [Fig. 2](#) zeigt eine schematische Darstellung eines modifizierten Botulinum-Toxins rBoNT/C. Die Nucleinsäuresequenz und Proteinsequenz des modifizierten Botulinum-Toxins rBoNT/C sind in SEQ ID NO: 2 beziehungsweise SEQ ID NO: 1 dargestellt.

[0030] Methoden zur DNA-Fragment-Isolierung, zur Reparatur von überhängenden Enden mittels des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I sowie zur Ligierung mit T4-Ligase sind in Fachkreisen bekannt und wurden beispielsweise in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, beschrieben. Alle Clonierungsschritte und die Expression wurden im Escherichia coli-Stamm M-15 (QIAGEN), der das Repressorplasmid pREP4 enthielt, durchgeführt.

[0031] Das ein rekombinantes modifiziertes Botulinum-Toxin codierende Gen wurde aus drei einzelnen Toxin-Fragmenten (Fragmente I, II und III) zusammengebaut, die unter Verwendung von PCR erzeugt worden waren, und in den Vektor pQE-30 ligiert, woraus das Plasmid pQE-TC1 entstand. Zunächst wurde ein DNA-Fragment, das das amino-terminale Teilstück von BoNT/C (Fragmente I und II) codiert, aus dem Plasmid pCL8 in zwei aufeinanderfolgenden Schritten amplifiziert, um so pBot C2 zu erzeugen. Das DNA-Fragment I (nt 4-689) wurde unter Verwendung des folgenden Oligonucleotidprimerpaares amplifiziert: (vorwärts) 5'-CCCAATAACAATTAACAACCTTTAAT-3' (SEQ ID NO: 4)

KpnI

(rückwärts) 5'-TTTGGTACCCATTAATAATTAGTATTGGATCCAT-3' (SEQ ID NO: 5)

[0032] An das 5'-Ende des Vorwärts-Primers wurde ein Cytosin angelagert, um die Rekonstruktion der BamHI-Restriktionsstelle zu gewährleisten, sowie um die rBoNT/C-DNA im Rahmen mit dem pQE-30-Translations Initiations-Methionin zu clonieren.

[0033] Eine KpnI-Restriktionsstelle wurde in den Rückwärts-Primer eingebaut, um die Aminosäuremutationen His²²⁹→Gly und Glu²³⁰→Thr am 3'-Ende von Fragment I zu erzeugen. Das amplifizierte Fragment I wurde der Behandlung mit Polymerase T4 unterzogen, mit KpnI geschnitten und zwischen der mit Klenow gefüllten BamHI-Stelle und KpnI-Stelle des Expressionsvektors pQE-30 eingefügt, was die Entstehung von Plasmid pBot C1 zur Folge hatte. Das DNA-Fragment II (nt 689-1633) wurde daraufhin unter Verwendung der folgenden Oligonucleotidprimer amplifiziert:

KpnI

(vorwärts) 5'-TTTGGTACCCCTTAATAATGCAATGCATAATTTATATGGA-3' (SEQ ID NO: 6)

EcoRI

(rückwärts) 5'-GAATTCCAATAATCAACATTTTGAG-3' (SEQ ID NO: 7)

[0034] Im Vorwärtsprimer wurden Veränderungen in den Nucleotiden eingeführt, um eine KpnI-Stelle zu schaffen, sowie die Aminosäuremutationen His²²⁹→Gly, Glu²³⁰→Thr und His²³³→Asn am 5'-Ende von Fragment

II zu erzeugen. Der Rückwärtsprimer war zur BoNT/C-Sequenz komplementär und enthielt eine interne EcoRI-Stelle an der Nucleotidposition 1633. Das amplifizierte Fragment II wurde der Behandlung mit Polymerase T4 unterzogen, mit KpnI geschnitten und zwischen der KpnI-Stelle und der mit Klenow gefüllten Sall-Stelle von pBot C1 eingefügt. Das so entstandene Plasmid pBot C2 enthielt das 5'-terminale Fragment von BoNT/C (nt 4-1633) im Rahmen mit dem ATG-Codon und der 6xHis-Affinitätssequenz von pQE-30.

[0035] Das DNA-Fragment III (nt 1633-3873), das die carboxy-terminale Domäne von BoNT/C codiert, wurde aus Plasmid pCH3 unter Verwendung folgender Oligonucleotid-Primer amplifiziert:

EcoRI

(vorwärts) 5'-TTTGAATTCTTATTATTACCTAGAATC-3' (SEQ ID NO:8)

SacI

(rückwärts) 5'-TTTGAGCTCTTATTCACTTACAGGTACAAAAC-3' (SEQ ID NO: 9)

[0036] Der Vorwärtsprimer war zur BoNT/C-Sequenz komplementär und enthielt eine interne EcoRI-Stelle an der Position 1632. Im Rückwärtsprimer wurde unmittelbar stromabwärts des Stopcodons eine SacI-Restriktionsstelle eingefügt. Das amplifizierte Fragment III wurde mit EcoRI und SacI verdaut und einzeln in mit EcoRI und SacI verdautes Plasmid pQE-30 cloniert, wodurch Plasmid pBot C3 erzeugt wurde. Schließlich wurde die DNA, die ein modifiziertes Botulinum-Toxin von vollständiger Größe codiert, rekonstruiert; dazu wurde das EcoRI-EcoRI-Fragment (nt -88 bis +1632) aus Plasmid pBot C2 in ein mit EcoRI verdautes, von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliertes Plasmid pBot C3 eingefügt, wodurch das Plasmid pQE-TC1 entstand. Alle PCR-Fragmente wurden mittels DNA-Sequenzierung nochmals analysiert.

[0037] Die Oligonucleotidprimer wurden entworfen, um eine KpnI-Restriktionsstelle in dem DNA-Abschnitt zu konstruieren, der das Zink-bindende Motiv codiert. Die Erzeugung einer KpnI-Restriktionsstelle in diesem DNA-Abschnitt ermöglichte die Mutation von drei Aminosäuren (His²²⁹→Gly; Glu²³⁰→Thr und His²³³→Asn), welche zur Zink-Bindung unentbehrlich sind, und gewährleistet die Rekonstruktion einer DNA, die das modifizierte Botulinum-Toxin codiert, ohne vorhergehendes Clonieren von Wildtyp-BoNT/C-DNA. Das rekombinante modifizierte Botulinum-Toxin, das aus dem Plasmid pQE-TC1 synthetisiert worden war, enthielt elf zusätzliche Aminosäuren, Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-His-Gly-Ser (SEQ ID NO: 10), am Aminoterminus.

Beispiel 2: Optimierung der Expression von Neurotoxin

[0038] Um eine Sequenz des pQE-30-Vektors, die dem das modifizierte rBoNT/C codierende Strukturgen vorausgeht, zu modifizieren, wurde PCR verwendet. Zur Reamplifizierung eines DNA-Fragments, das das amino-terminale Teilstück von rBoNT/C codiert, wurden ein neuer Vorwärtsprimer, 5'-CGGTACCATGCCAATAACAATTAACAACCTTT-3' (SEQ ID NO: 11), der zehn zusätzliche Nucleotide an 5'-Ende enthielt, und ein neuer Rückwärtsprimer,

BglII

5'-AGCTATAGATCTATAATAATCCAA-3'

[0039] (SEQ ID NO: 12), der die BglII-Restriktionsstelle in Position 892 der BoNT/C-Sequenz (Kimura et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 171 (1990), 1304-1311) abdeckt, verwendet. Das amplifizierte Fragment wurde mit Polymerase T4 behandelt, mit BglII geschnitten und zwischen der mit Klenow gefüllten BamHI-Stelle und BglII-Stelle von pQE-TC1 eingefügt, um so das Plasmid pQE-TC2 zu erzeugen.

Beispiel 3: Expression und Reinigung des modifizierten rBoNT/C-Holotoxins

[0040] Die Kulturen wurden in Lennox L-Brühe bei 37°C unter Schütteln gezüchtet, bis zu einer A₆₀₀ von 0,6-0,8. Zu 1,0 mM Endkonzentration wurde Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid zugegeben und die Inkubation über weitere fünf Stunden fortgesetzt. Aus 1 Liter induzierter Kultur wurden Bakterien mittels Zentrifugieren bei 4°C gewonnen und in 20 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers, pH 7,4, mit 300 mM NaCl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mittels Ultraschall mit 2 Impulsen von je 1 Minute Dauer bei 75 % Leistung unter Verwendung eines Model 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Malvern, PA), auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bei 20.000 × g 30 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden mit 1 ml ge-

packtem Ni-NTA-Harz gemischt, 1 Stunde lang bei 4°C in einem Rotator inkubiert und schließlich auf eine 25 ml-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 Volumina Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 6,0, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Eluierungspuffer eluiert (50 mM Natriumphosphat, pH 4,5, 300 mM NaCl). Die gereinigten Proteine wurden auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) analysiert.

Beispiel 4: Immunblot-Analyse

[0041] Die Fähigkeit von *E. coli*, die Expression eines rekombinanten modifizierten Botulinum-Toxins von Plasmid pQE-TC1 zu steuern, wurde durch die Immunblot-Analyse von Zellextrakt untersucht. Proteine zur Analyse durch Western-Blotverfahren wurden auf 10 % Polyacrylamidgelen gemäß der Methode nach Laemmli, U.K. *Nature* 22 (1970), 680-685 aufgetrennt, auf Nitrocellulose überführt und zum Nachweis von immunreaktiven Proteinen, die das 6xHis-Affinitätsmarker enthielten, weiter verarbeitet. Die Inkubationen mit den Hauptantikörpern wurden eine Stunde lang bei 37°C mit einer 1:2000-fachen Verdünnung des Anti-6xHis-Affinitätsmarker-mAb oder mit anti-BoNT/C-Antikörpern durchgeführt. Die Membranen wurden unter Verwendung von verstärkter Chemolumineszenz gemäß den Angaben des Herstellers (ECL; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) entwickelt. Die Synthese von rekombinanten Proteinen wurde durch IPTG herbeigeführt, und Aliquote von solubilisierten Zellen wurden auf einer SDS-PAGE laufen gelassen.

[0042] Die Western-Blot-Analyse mit einem anti-6xHis-Markierungs- oder mit anti-BoNT/C-Antikörpern offenbarte ein extrem niedriges Expressionsniveau. Dementsprechend wurde ein neues Plasmid konstruiert, welches den Abschnitt mit den vier Cytosinnukleotiden, welche aus dem Clonieren der Neurotoxin-DNA in die BamHI-Stelle des pQE-30 Vektors stammen, nicht enthielt. Dieses Plasmid wurde pQE-TC2 genannt. Die Western-Blot-Analyse mit dem anti-6xHis-Markierungs-Antikörper offenbarte, dass pQE-TC2 wirksamer war, die Synthese von modifiziertem rBoNT/C Holotoxin zu betreiben. So konnten tatsächlich 1-2 mg modifiziertes rBoNT/C Holotoxin aus einem Liter Lennox-Brühe gereinigt werden.

[0043] Modifiziertes rBoNT/C-Holotoxin wurde in löslicher Form synthetisiert, ohne sichtbaren Abbau, doch im Gegensatz zu *Clostridium botulinum* konnte *E. coli* ein wirksames Schneiden von modifiziertem rBoNT/C-Holotoxin nicht gewährleisten. Mittels Coomassie-Färbung oder Western-Blot-Verfahren konnten nur Spuren der L-Kette im modifizierten rBoNT/C-Holotoxin nachgewiesen werden. Modifiziertes rBoNT/C-Holotoxin wurde jedoch mit immobilisiertem TPCK-Trypsin (Pierce, Rockford, IL) wirksam geschnitten und produzierte schwere und leichte Ketten von korrektem Molekulargewicht. Modifiziertes rBoNT/C-Holotoxin, das von pQE-TC2 synthetisiert wurde, enthielt 14 zusätzliche Aminosäuren (Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-Gly-Ser-Gly-Thr (SEQ ID NO: 13)) am Aminoterminus. Die 6xHis-Sequenz innerhalb dieses aus 14 Aminosäuren bestehenden Segments wurde zur Reinigung und zum nachfolgenden Nachweis von synthetisiertem Protein verwendet. Das rekombinante Protein, das in dieser Weise produziert wurde, wurde mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Harz unter Verwendung der 6xHis-Affinitäts-Markierung, gereinigt. Spezifisch gebundenes Protein wurde bei einem niedrigen pH-Wert (Eluierungspuffer pH 4,5) eluiert und durch SDS-PAGE analysiert. Die Analyse des aus dem Affinitätsharz eluierten Protein offenbarte, dass das Toxin zu einer Homogenität von 80 %-90 % gereinigt werden konnte. In allen hierin vorliegenden Studien wurden entweder das gereinigte modifizierte rekombinante BoNT/C oder das modifizierte rBoNT/C verwendet.

Beispiel 5: Biotest von rekombinanten Proteinen

[0044] Wie in den folgenden Beispielen beschrieben wird, wurden die gereinigten rekombinanten Proteine auf ihre biologische Aktivität unter Verwendung eines *in vivo*-Toxizitätstests, ihre *in vitro*-Aktivität an Nervus phrenicus-Hemidiaphragma-Präparaten der Maus sowie ihre enzymatische Aktivität in rohen Synaptosomenpräparationen hin untersucht.

A. *In vivo*-Toxizitätstest

[0045] Die Toxizität von modifiziertem rBoNT/C-Holotoxin wurde getestet. Das durch Eluieren vom Histiidin-Affinitäts-Harz gereinigte modifizierte rBoNT/C-Holotoxin wurde in PBS, welches 1 mg/ml BSA enthielt, verdünnt und Mäusen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das rBoNT/C-Holotoxin wurde in einem 100 µl-PBS-BSA-Aliquot in einer Konzentration von 10 µg pro Tier verabreicht, wobei die Tiere ein Durchschnittsgewicht von 25 g aufwiesen. Die Tiere wurden über einen Gesamtzeitraum von 16 Wochen beobachtet, um jedwede nichtspezifische Toxizität auszuschließen.

B. In vitro-Toxizitätstest

[0046] Die Toxizität wurde in einem Biotest an Nervus phrenicus-Hemidiaphragma-Präparaten der Maus unter Verwendung der Methode nach Simpson et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 254 (1990), 98-103 bestimmt. Gewebe wurde herausgeschnitten und in einem physiologischen Puffer, der mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ belüftet und gleichbleibend bei 35°C gehalten wurde, suspendiert. Die physiologische Lösung hatte folgende Zusammensetzung (millimolar): NaCl, 137; KCl, 5; CaCl₂, 1,8; MgSO₄, 1,0; NaHCO₃, 24; NaH₂PO₄, 1,0; D-Glucose, 11; Gelatine, 0,01%. Die Nervi phrenici wurden kontinuierlich stimuliert (1,0 Hz; Dauer: 0,1-0,3 Millisekunden) und die Muskelzuckungen aufgezeichnet. Die vom Toxin ausgelöste Lähmung wurde als eine 50 %-ige Abnahme in der Antwort in Form von Muskelzuckung auf die neurogene Stimulation gemessen.

C. Spaltung eines Substrats

[0047] Synaptosome wurden gemäß der Methode nach Rosahl et al. Cell 75 (1993) 661-670 präpariert. Die Synaptosome wurden in Gegenwart von modifiziertem rBoNT/C-Holotoxin (100 nM) 90 Minuten lang bei 37°C in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) oder in TBS, die 10 mM Dithiothreitol enthielt, inkubiert. In Parallelversuchen wurden synaptosomale Membranen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von nativem BoNT/C inkubiert. Die Proteine wurden durch 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose überführt und zum Nachweis von immunreaktiven Proteinen mit anti-Syntaxin-mAb weiter verarbeitet.

Beispiel 6: Antikörperantwort im Serum bei mit modifiziertem rBoNT/C-Holotoxin immunisierten Mäusen

[0048] Weibliche Swiss-Webster-Mäuse mit einem ungefähren Gewicht von 25 g (Ace Animals, Boyertown, PA) wurden in Parallelversuchen entweder s.c. oder p.o. mit rBoNT/C-Holotoxin oder TBS immunisiert, um die Fähigkeit dieses Peptids, eine Serum-Immunantwort hervorzurufen, zu bewerten.

A. Immunisierung und Probennahme

[0049] Zur s.c. Injektion erhielt jedes Tier 2 µg Protein in 0,1 ml Eluierungspuffer. Auf dem oralen Verabreichungsweg wurde jedes Tier mit 4 µg Protein in 0,2 ml Eluierungspuffer über eine intragastrale Magensonde gefüttert. Die Mäuse wurden am Tage 0 immunisiert, und Wiederholungsimpfungen wurden an den Tagen 14, 28 und 42 gegeben. Serumproben von identisch immunisierten Mäusen wurden an den Tagen 21, 35 und 49 nach der Immunisierung entnommen und vereinigt. Zur Serumgewinnung wurde den Mäusen unter Isofluran-Betäubung mittels heparinierter Kapillarröhrchen aus dem retroorbitalen Plexus Blut abgenommen.

B. Untersuchung des Serums auf Antikörperbildung

[0050] Die Seren von immunisierten Mäusen oder Kontrollmäusen wurden auf Antikörper unter Verwendung einer Immunoblot-Analyse zur Immunreaktivität gegen ungeschnittenes modifiziertes Botulinum-Toxin untersucht. Rekombinantes Antigen (modifiziertes Botulinum-Toxin; 0,1 µg/Spur) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden mit 5 %-igem fettfreien Milchpulver in TBS blockiert, in Streifen geschnitten und zum Nachweis von immunreaktiven Proteinen unter Verwendung verschiedener Serumproben aufbereitet. Die Hauptinkubationen wurden bei Raumtemperatur über Nacht (18 Stunden) mit einem 1:1000 verdünnten Serum durchgeführt. Ein sekundäres Meerrettich-Peroxidase-markiertes Antimäus-IgG wurde in einer 1:10.000-fachen Verdünnung bei Raumtemperatur für eine Stunde verwendet. Nach ausführlichem Waschen wurden die Membranen unter Verwendung von ECL (Amersham) entwickelt.

Beispiel 7: Neutralisierende Aktivität des Serums von immunisierten Mäusen

[0051] Es wurden Versuche durchgeführt, um die Fähigkeit verschiedener Serumproben, natives BoNT/C zu neutralisieren, zu bewerten. Es wurden drei Seren verschiedener Herkunft wie folgt getestet: 1) nichtimmunes Serum, 2) Serum von Tieren, die modifiziertes rBoNT/C-Holotoxin p.o. erhalten hatten und 3) Serum von Tieren, die modifiziertes rBoNT/C-Holotoxin s.c. erhalten hatten. Natives BoNT/C (10 µl, 100 ng) wurde mit 10 µl Präimmenserum oder Immenserum bei 37°C für 1 Stunde oder mit PBS-BSA inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch mit 80 µl PBS, einschließlich 1 mg/ml BSA, verdünnt und i.p. injiziert. Die Mäuse wurden 48 Stunden lang beobachtet, um jegliche Resttoxizität der verschiedenen Gemische zu bewerten.

Beispiel 8: Schutz von Mäusen gegenüber einer Challenge mit nativem BoNT/C

[0052] Drei Monate nach Verabreichung der dritten Wiederholungsimpfung wurde bei Mäusen, die mit rBoNT/C immunisiert worden waren, mit einer i.p. Dosis von 100 ng nativem BoNT/C pro Tier eine Challenge durchgeführt. Das Überleben der Tiere, bei denen eine Challenge durchgeführt wurde, wurde über 5 Tage beobachtet.

Sequenzprotokoll

<110> SIMPSON, LANCE
KIYATKIN, NIKITA
MAKSYMOWYCH, ANDREW

<120> Zusammensetzungen und Methoden zur systemischen Verabreichung
von oralen Impfstoffen und therapeutischen Wirkstoffen

<130> JEFF-0256

<140>

<141>

<150> 08/954,302

<151> 20.10.1997

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1291

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifiziertes
Botulinum-Toxin

<400> 1

```
Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
  1           5           10           15
Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
      20           25           30
Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Thr Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
      35           40           45
Arg Phe Ser Ara Asn Ser Asn Pro Asn Leu, Asn Lys Pro Pro Arg Val
      50           55           60
Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
      65           70           75           80
Ser Asp Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
      85           90           95
```

Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
 130 135 140
 Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
 165 170 175
 Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
 180 185 190
 Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp
 195 200 205
 Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile
 210 215 220
 Leu Ile Leu Met Gly Thr Leu Asn Asn Ala Met His Asn Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Ala Ile Pro Asn Asr Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile
 245 250 255
 Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala
 260 265 270
 Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr
 275 280 285
 Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Ara Leu
 290 295 300
 Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser
 325 330 335
 Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Asn
 340 345 350

Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn
 355 360 365

Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr
 370 375 380

Ala Asn Ile Leu Asp Aso Asn Val Tyr Aso Ile Gln Asn Gly Phe Asn
 385 390 395 400

Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser
 405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu
 420 425 430

Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn
 435 440 445

Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro
 450 455 460

Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Val Lys Thr Asp Ile Phe Leu Arg Lys
 465 470 475 480

Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Ser
 485 490 495

Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu
 500 505 510

Asp Leu Leu Tyr Pro Ser Ile Asp Ser Glu Ser Glu Ile Leu Pro Gly
 515 520 525

Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
 530 535 540

Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu
 545 550 555 560

Asp Phe Thr Phe Thr Arg Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Ala
 565 570 575

Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Thr Leu Ala Asn Lys Val Asn Ala Gly
 580 585 590

Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp
 595 600 605

Phe Thr Thr Asn Ile Leu Arg Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp
 610 615 620
 Val Ser Ala Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Ser Asn
 625 630 635 640
 Ser Val Arg Arg Gly Asn Phe Thr Glu Ala Phe Ala Val Thr Gly Val
 645 650 655
 Thr Ile Leu Leu Glu Ala Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly
 660 665 670
 Ala Phe Val Ile Tyr Ser Lys Val Gln Glu Arg Asn Glu Ile Ile Lys
 675 680 685
 Thr Ile Asp Asn Cys Leu Glu Gln Arg Ile Lys Arg Trp Lys Asp Ser
 690 695 700
 Tyr Glu Trp Met Met Gly Thr Trp Leu Ser Arg Ile Ile Thr Gln Phe
 705 710 715 720
 Asn Asn Ile Ser Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Asn Tyr Gln Ala Gly
 725 730 735
 Ala Ile Lys Ala Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser
 740 745 750
 Asp Lys Glu Asn Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu
 755 760 765
 Asp Val Lys Ile Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg
 770 775 780
 Glu Cys Ser Val Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile
 785 790 795 800
 Asp Glu Leu Asn Glu Phe Asp Arg Asn Thr Lys Ala Lys Leu Ile Asn
 805 810 815
 Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Lys Leu
 820 825 830
 Lys Ala Lys Val Asn Asn Ser Phe Gln Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile
 835 840 845
 Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr
 850 855 860

Phe Asn Asn Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Arg Lys
 865 870 875 880
 Asn Thr Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Ser Glu Glu
 885 890 895
 Gly Asp Val Gln Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly
 900 905 910
 Ser Ser Gly Glu Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn
 915 920 925
 Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile
 930 935 940
 Arg Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp
 945 950 955 960
 Ser Val Lys Asn Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe
 965 970 975
 Leu Val Phe Thr Leu Lys Gln Asn Glu Asp Ser Glu Gln Ser Ile Asn
 980 985 990
 Phe Ser Tyr Asp Ile Ser Asn Asn Ala Pro Gly Tyr Asn Lys Trp Phe
 995 1000 1005
 Phe Val Thr Val Thr Asn Asn Met Met Gly Asn Met Lys Ile Tyr Ile
 1010 1015 1020
 Asn Gly Lys Leu Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile
 1025 1030 1035 1040
 Asn Phe Ser Lys Thr Ile Thr Phe Glu Ile Asn Lys Ile Pro Asp Thr
 1045 1050 1055
 Gly Leu Ile Thr Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp
 1060 1065 1070
 Phe Tyr Ile Phe Ala Lys Glu Leu Asp Gly Lys Asp Ile Asn Ile Leu
 1075 1080 1085
 Phe Asn Ser Leu Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp Gly Asn
 1090 1095 1100
 Asp Leu Arg Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Val Asn Ile Asp Tyr Leu
 1105 1110 1115 1120

Asn Arg Tyr Met Tyr Ala Asn Ser Arg Gln Ile Val Phe Asn Thr Arg
 1125 1130 1135

Arg Asn Asn Asn Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys Ile Ile Ile Lys Arg
 1140 1145 1150

Ile Arg Gly Asn Thr Asn Asp Thr Arg Val Arg Gly Gly Asp Ile Leu
 1155 1160 1165

Tyr Phe Asp Met Thr Ile Asn Asn Lys Ala Tyr Asn Leu Phe Met Lys
 1170 1175 1180

Asn Glu Thr Met Tyr Ala Asp Asn His Ser Thr Glu Asp Ile Tyr Ala
 1185 1190 1195 1200

Ile Gly Leu Arg Glu Gln Thr Lys Asp Ile Asn Asp Asn Ile Ile Phe
 1205 1210 1215

Gln Ile Gln Pro Met Asn Asn Thr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gln Ile Phe
 1220 1225 1230

Lys Ser Asn Phe Asn Gly Glu Asn Ile Ser Gly Ile Cys Ser Ile Gly
 1235 1240 1245

Thr Tyr Arg Phe Arg Leu Gly Gly Asp Trp Tyr Arg His Asn Tyr Leu
 1250 1255 1260

Val Pro Thr Val Lys Gln Gly Asn Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr
 1265 1270 1275 1280

Ser Thr His Trp Gly Phe Val Pro Val Ser Glu
 1285 1290

<210> 2

<211> 3950

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifiziertes
 Botulinum-Toxin

<400> 2

ggatattaga aagttaggag atgttagtat tatgccaata acaattaaca actttaatta 60
 ttcagatcct qttgataata aaaatatttt atatttagat actcatttaa atacactagc 120
 taatgagcct gaaaaagcct ttgcgattac aggaaatata tgggtaatac ctgatagatt 180

ttcaagaaat tctaataccaa atttaaatata acctcctcga gttacaaaacc ctaaaagtgg 240
 ttattatgat cctaattatt tgagtactga ttctgacaaa gatacatttt taaaagaaat 300
 tataaagtta tttaaaagaa ttaattctag agaaatagga gaagaattaa tatatagact 360
 ttcgacagat atacctttc ctgggaataa caatactcca attaatactt t tgattttg 420
 tgtagatttt aacagtgtg atgttaaaac tagacaaggt aacaactggg ttaaaactgg 480
 tagcataaat cctagtgtta taataactgg acctagagaa aacattatag atccagaaac 540
 ttctacgftt aaattaacta acaatacttt tgccgcacaa gaaggatttg gtgctttatc 600
 aataatttca ataccaccta gatttatgct aacatatagt aatgcaacta atgatgtagg 660
 agagggtaga ttttctaagt ctgaattttg catggatcca atactaattt taatgggtac 720
 ccttaataat gcaatgcata atttatatgg aatagctata ccaaatgatc aaacaatttc 780
 atctgtaact agtaatattt tttattctca atataatgtg aeattagagt atacagaaat 840
 atatgcattt ggaggctcaa ctatagacct tattcctaaa agtgcaagga aatattttga 900
 ggaaaaggca ttggattatt atagatctat agctaaaaga cttaatagta taactactgc 960
 aaatccttca agctttaata aatatatagg ggaatataaa cagaaactta ttagaaagta 1020
 tagattcgta gtagaattctt caggtgaagt tacagtaaat cgttaataagt ttgttgagtt 1080
 atataatgaa cttacacaaa tatttacaga atttaactac gctaaaatst ataagtaca 1140
 daataggaaa atatatcttt caaatgtata tactccggtt acggcgaata tattagacga 1200
 taatgtttat gatatacaaa atggatttaa tatacctaaa agtaatttaa atgtactatt 1260
 tatgggtcaa aatttatctc gaactccagc attaagaaa gtcaatccto aaaatatact 1320
 ttatttattt acaaaatttt gtcataaagc aatagatggg agatcattat ataataaac 1380
 attagattgt agagagcttt taqttaaaaa tactgactta ccttttatag gtgatattag 1440
 tgatgttaaa actgatatat ttttaagaaa agatattaat gaagaaactg aagttatata 1500
 ctatccggac aatgtttcag tagatcaagt tattctcagt aagaatacct cagaacatgg 1560
 acaactagat ttattatacc ctagtattga cagtgaaggt gaaatattac caggggagaa 1620
 tcaagtcttt tatgataata gaactcaaaa tgttgattat ttgaattctt attattacct 1680
 agaactctca aaactaagtg ataattgtga agattttact ttacagagat caattgagga 1740
 ggctttggat aatagtgcaa aagtatatac ttactttcct acactagcta ataaaataaa 1800
 tgccgggtgt caaggtgggt tatttttaat gtgggcaaat gatytagtgg aagattttac 1860
 tacaatatatt ctaagaaaag atacattaga taaaatatca gatgtatcag ctattattcc 1920
 ctatatagga cccgcattaa atataagtaa ttctgtaaga agaggaaatt ttactgaagc 1980
 atttgacgtt actgggtgtaa ctattttatt agaagcattt cctgaattta caatacctgc 2040
 acttggtgca ttgtgtattt atagtaaggt tcaagaaaga aacgagatta ttaaaactat 2100
 agataettgt ttagaacaaa ggattaaag atggaagat tcatatgaat ggatgatggg 2160
 aacgtggtta tccaggatta ttactcaatt taataatata agttatcaaa tgtatgatto 2220
 tttaaattat caggcaggtg caatcaaagc taaaatagat ttagaatata aaaaatattc 2280
 aggaagtgat aaagaaaata taasaagtca agttgaaaat ttaaaaaata gtttagatgt 2340
 aaaaatttcg gaagcaatga ataatataaa taattttata cgtgaatatt ccgttaacata 2400
 tttattttaa aatatgttac ctaaagtaat tgatgaatta aatgagtttg atcgaataac 2460
 taaagcaaaa ttaattaatc ttatagatag tcaataatatt attctagttg gtgaaataga 2520
 taaattaaaa gcaaaagtaa ataataagctt tcaaaataca ataccttta atatttttc 2580
 atataactaat aattctttat taaaagatat aattaatgaa tatttcaata atattaatga 2640
 ttcaaaaatt ttgagcctac aaaaacagaaa aaatacttta gtggatacat caggetataa 2700
 tgcagaagtg agtgaagaag gcgatgttca gcttaatcca atatttccat ttgactttaa 2760
 attaggtagt tcaggggagg atagaggtaa agttatagta acccagaatg aaaaatattgt 2820
 atataattct atgtatgaaa gttttagcat tagtttttgg attagaataa ataaatgggt 2880
 aagtaattta cctggatata ctataattga taggtttaa aataactcag gttggagtat 2940
 aggtattatt agtaattttt tagtatttac ttaaaaacaa aatgaagata gtgaacaaag 3000
 tataaatttt agttatgata tatcaaatse tgctcctgga tacaataaat ggtttztgt 3060

```

aactgttact aacaatatga tgggaaatat gaagatttat ataaatggaa aattaataga 3120
tactataaaa gttaaagaac taactggaat taatttttagc aaaactataa catttgaat 3180
aaataaaaatt ccagataaccg gtttgattac ttcagattct gataacatca atatgtggat 3240
aagagatttt tatatatttg ctaaagaatt agatggtaaa gatattaata tattatttaa 3300
tagccttgcaa tatactaata ttgtaaaaga ttattgggga atgatttaa gatataataa 3360
agaatattat atggttaata tagattatit aatagatat atgtatgcca actcacgaca 3420
aattgttttt aatacacgta gaaataataa tgacttcaat gaaggatata aaattataat 3480
aaaaagaatc agaggaaata caaatgatc tagagtacga ggaggagata ttttatattt 3540
tgatatgaca attaataaca aagcatataa ttgttttatg aagaatgaaa ctatgtatgc 3600
agataatcat agtactgaag atatatatgc tataggttta agagaacaaa caaaggatat 3660
aaatgataat atttatattc aaatacaacc aatgaataat acttattatt acgcatctca 3720
aatatttaaa tcaaatttta atggagaaaa tatttctgga atatgttcaa taggtactta 3780
tcgttttaga cttggagggtg atfggtatag acacaattat ttgggtgccta ctgtgaagca 3840
aggaaattat gcttcattat tagaatcaac atcaactcat tggggttttg tacctgtaag 3900
tgaataaata atgattaata atataaatta tgttaaatat tttaatatta 3950

```

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte Zink-Bindung

<400> 3

His Glu Xaa Xaa His

1

5

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4

cccaataaca attaacaact ttaat

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5
tttggtagcc attaaaatta gtattggatc cat

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 6
tttggtagcc ttaataatgc aatgcataat ttatatgga

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7
gaattcaaat aatcaacatt ttgag

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 8
tttgaattct tattattacc tagaatc

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9
tttgagctct tattcactta caggtacaaa ac

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifiziertes
 Botulinum-Toxin

<400> 10
 Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 11
 cggtaccatg ccaataacaa ttaacaactt t

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12
 agctatagat ctataataat ccaa

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifiziertes
 Botulinum-Toxin

<400> 13
 Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Thr
 1 5 10

Patentansprüche

1. Verwendung eines Botulinum-Toxins zur Herstellung eines oralen Impfstoffs, wobei mindestens beide His-Aminosäuren und die Glu-Aminosäure des Zink-bindenden Motivs His-Glu-X-X-His der leichten Kette des Toxins mutiert sind, wobei das Botulinum-Toxin nicht toxisch und in der Lage ist, aus dem Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der orale Impfstoff ein oraler Impfstoff gegen Botulismus ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Botulinum-Toxin zusätzlich ein ausgewähltes Antigen umfasst.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der orale Impfstoff ein oraler Impfstoff gegen das ausgewählte Antigen ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der orale Impfstoff ein oraler Impfstoff zur Impfung gegen Bacille Calmette-Guerin, Cholera, Diphtherie, Hepatitis B, Masern, Meningitis, Mumps, Keuchhusten, Pest, Polio, Tollwut, Röteln, Wundstarrkrampf, Typhus oder Gelbfieber ist.

6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der orale Impfstoff ein oraler Impfstoff zur Impfung gegen Adenovirus Typ 2, Bordetella bronchiseptica, Calicivirus, Chlamydia psittaci, Clostridien-Erkrankungen, Coronavirus, Staupe, Pferde-Encephalomyelitis, Escherichia coli, feline infektiöse Peritonitis, felines Leukämievirus, feline Panleukopenie, Hepatitis, Leptospirose, Parainfluenzavirus, Parvovirus oder Rhinotracheitisvirus ist.

7. Verwendung eines Botulinum-Toxins zur Herstellung eines Arzneimittels zur oralen Verabreichung eines therapeutischen Mittels und zur Einschleusung des therapeutischen Mittels in die allgemeine Blutbahn, wobei mindestens beide His-Aminosäuren und die Glu-Aminosäure des Zink-bindenden Motivs His-Glu-X-X-His der leichten Kette des Toxins mutiert sind, wobei das Botulinum-Toxin nicht toxisch und in der Lage ist, aus dem Darm in die allgemeine Blutbahn zu gelangen und wobei das Botulinum-Toxin zusätzlich ein therapeutisches Mittel umfasst.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Botulinum-Toxin den Serotyp A, B, C oder E hat.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

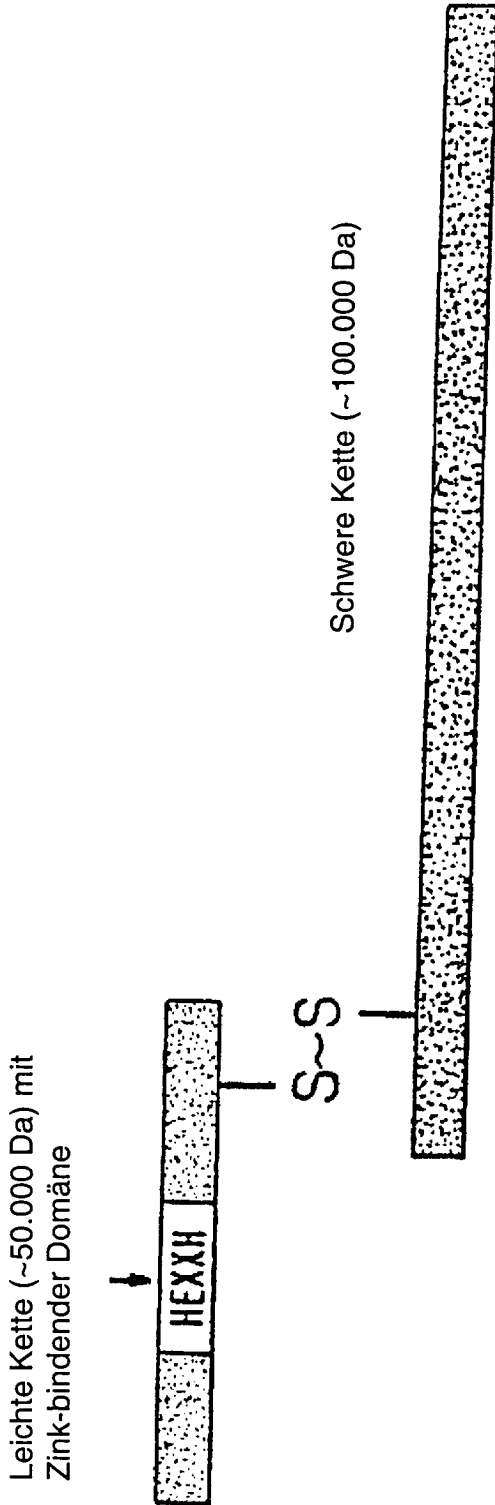


Fig.1

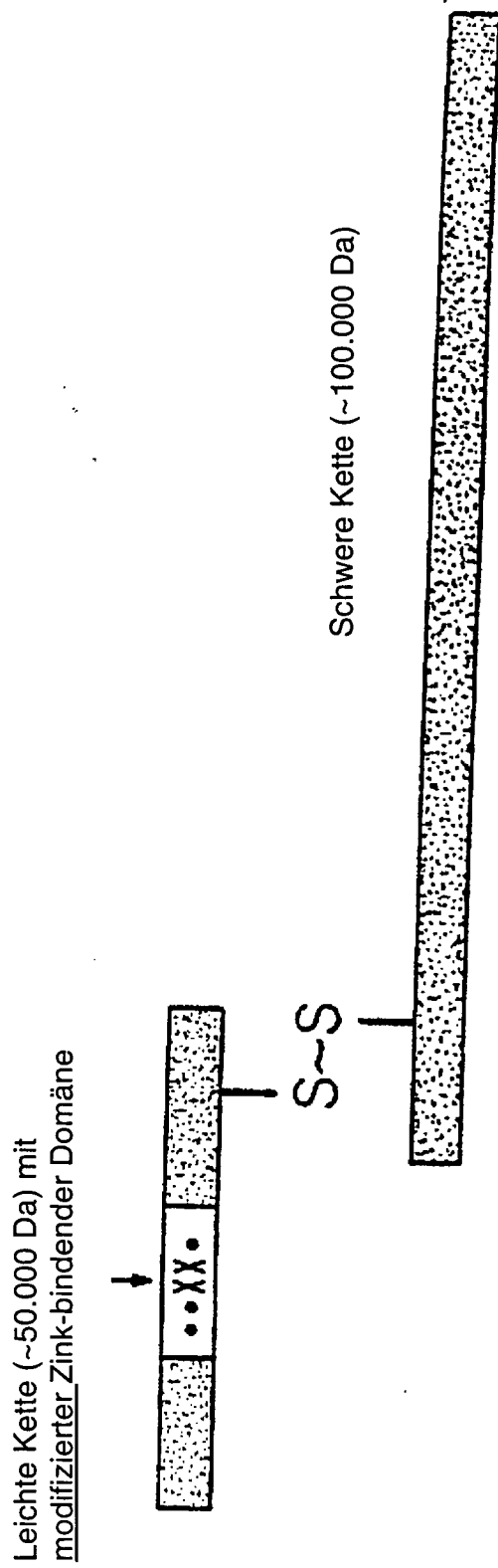


Fig.2