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

(10) **DE 696 36 544 T2** 2007.06.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 832 093 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 36 544.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB96/00633**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 918 793.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/040718**
(86) PCT-Anmeldetag: **05.06.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.04.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.09.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.06.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07H 21/04*** (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

475781	**07.06.1995**	**US**
486373	**07.06.1995**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Sanofi Pasteur, Inc., Swiftwater, Pa., US

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(72) Erfinder:
HUEBNER, C., Robert, Stroudsburg, PA 18960-1941, US; ERDILE, F., Lorne, Stroudsburg, PA 18360, US; WARAKOMSKI, J., Donald, Tannersville, PA 18372, US; BECKER, S., Robert, Henryville, PA 18332, US; GRAY, Maryanne B., Cresco, Pennsylvania 18326, US; PYLE, L., Derek, East Stroudsburg, PA 18301, US

(54) Bezeichnung: **EXPRESSION VON LIPOPROTEINEN**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft gentechnische Verfahren zur Bewirkung der Expression von OspC-Lipoproteinen einer Borrelia-Art aus Vektoren, die die Nukleinsäuremoleküle, welche die Lipoproteine codieren, enthalten. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Expression eines rekombinanten OspC-Lipoproteins einer Borrelia-Art, wobei dessen Lipidierung von der Expression einer ersten Nukleinsäuresequenz, die eine OspA-Leadersequenz einer Borrelia-Art codiert, herrührt, und dessen Protein aus der Expression einer zweiten Nukleinsäuresequenz herrührt, wobei die erste und zweite Nukleinsäuresequenz, die in der Natur nicht gemeinsam vorkommen, aneinander angrenzen. Die Erfindung betrifft auch rekombinante lipidierte OspC-Proteine einer Borrelia-Art, die unter Verwendung der Nukleinsäuresequenz, welche die OspA-Leadersequenz einer Borrelia-Art codiert, exprimiert wurden, Verfahren zur Herstellung und Verwendung der gleichen Zusammensetzungen davon und Verfahren zur Verwendung der Zusammensetzungen. Die Erfindung betrifft außerdem Nukleinsäuresequenzen, die rekombinante OspC-Lipoproteine einer Borrelia-Art codieren, Vektoren, die die Sequenzen enthalten und/oder exprimieren, Verfahren zur Expression der Lipoproteine und Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen und Vektoren, Zusammensetzungen, in denen die Lipoproteine verwendet werden, einschließlich Immunogene oder Impf-Zusammensetzungen, wobei solche Zusammensetzungen vorzugsweise eine verbesserte Immunogenität aufweisen, und Verfahren zur Verwendung solcher Zusammensetzungen, um eine immunologische oder Schutzreaktion auszulösen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Lyme-Borreliose ist die am häufigsten vorkommende, durch Zecken übertragene Krankheit in den Vereinigten Staaten sowie eine der bedeutendsten, durch Zecken übertragenen infektiösen Erkrankungen weltweit. Die Spirochäte Borrelia burgdorferi ist der Verursacher der Lyme-Krankheit. Die Infektion mit B. burgdorferi manifestiert sich örtlich und systemisch. Die örtlichen Symptome, die früh nach der Infektion auftreten, sind eine Hautläsion an der Stelle des Zeckenbisses, die als Erythema migrans bezeichnet wird. Wochen bis Monate nach der Infektion treten systemische Manifestationen auf, die rheumatische, kardiale und neurologische Symptome umfassen. Die frühe örtliche Phase der B. burgdorferi-Infektion läßt sich leicht mit Antibiotika behandeln. Allerdings hat sich herausgestellt, daß die späteren systemischen Phasen gegenüber Antibiotika widerstandsfähiger sind.

[0003] Im Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffs gegen die Lyme-Krankheit wurden beachtliche Anstrengungen unternommen. Für die Impfstoffentwicklung wurden zwei voneinander verschiedene Ansätze verfolgt. Ein Ansatz besteht darin, einen Impfstoff zu verwenden, der aus ganzen, inaktivierten Spirochäten zusammengesetzt ist, wie es von Johnson in dem US-Patent mit der Nummer 4,721,617 beschrieben wird. Für einen inaktivierten Vollimpfstoff konnte gezeigt werden, daß er Hamster gegenüber der Herausforderung schützt, und dieser wurde für die Verwendung bei Hunden zugelassen.

[0004] Aufgrund der Besorgnis über kreuzreaktive Antigene in einer Vollzell-Zubereitung konzentrierte sich die Forschung nach einem humanen Impfstoff auf die Identifizierung und Entwicklung von nicht-kreuzreaktiven schützenden Antigenen, die von B. burgdorferi exprimiert werden. Bis heute wurden eine Reihe von Antigenkandidaten identifiziert. Ein Großteil dieser Bemühungen konzentrierte sich auf die am häufigsten vorkommenden äußeren Oberflächenproteine von B. burgdorferi, nämlich das äußere Oberflächenprotein A (OspA), wie es in der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO 92/14488 beschrieben wird, die für den hiesigen Anmelder angemeldet wurde.

[0005] Für mehrere Versionen dieses Proteins konnte in Studien unter Herausforderung von Mäusen, Hamstern und Hunden gezeigt werden, daß sie eine schützende Immunität induzieren. Die klinischen Versuche mit Menschen haben gezeigt, daß die Formulierungen von OspA sicher sind und bei Menschen Immunität hervorrufen [Keller et al., JAMA (1994) 271:1764-1768]. In der Tat durchläuft eine der Formulierungen, die rekombinantes lipidiertes OspA, wie in der zuvor genannten WO 92/14488 beschrieben, enthält, derzeit die Phase III der Untersuchungen der Sicherheit/Wirksamkeit beim Menschen.

[0006] Während OspA bei der großen Mehrheit der klinischen Isolate von B. burgdorferi aus Nordamerika exprimiert wird, ergab die Untersuchung von klinischen Borrelia-Isolaten in Europa ein abweichendes Bild. In Europa wird die Lyme-Krankheit durch drei Genospezies von Borrelia verursacht, nämlich B. burgdorferi, B. garinii und B. afzelli. In ungefähr der Hälfte der europäischen Isolate ist OspA nicht das am häufigsten vorkommende äußere Oberflächenprotein. Ein zweites äußeres Oberflächenprotein C (OspC) ist das Hauptoberflächenanti-

gen, das bei diesen Spirochäten zu finden ist. Tatsächlich wurden einer Reihe von europäischen klinischen Isolaten gefunden, die OspA nicht exprimieren. Die Immunisierung von Wüstenrennmäusen und Mäusen mit aufgereinigtem rekombinanten OspC führt zu einer schützenden Immunität gegenüber B. burgdorferi-Stämmen, die das homologe OspC-Protein exprimieren [V. Preac-Mursic et al., INFECTION (1992) 20:342-349, W. S. Probert et al., INFECTION AND IMMUNITY (1994) 62:1920-1926]. Das OspC-Protein wird gegenwärtig als eine mögliche Komponente einer zweiten Generation einer Lyme-Impfstoff-Formulierung angesehen.

[0007] Rekombinante Proteine sind vielversprechende Kandidaten für Impfstoffe oder immunogene Zusammensetzungen, da sie in hohen Ausbeuten und mit hoher Reinheit hergestellt werden können und manipuliert werden können, um die gewünschten Aktivitäten zu optimieren und die ungewünschten Aktivitäten zu minimieren. Da sie jedoch eine schwach immunogene Wirkung aufweisen können, sind Verfahren zur Verstärkung der Immunantwort gegenüber rekombinanten Proteinen bei der Entwicklung von Impfstoffen oder immunogenen Zusammensetzungen wichtig.

[0008] Ein sehr vielversprechender Immunstimulator ist der Lipidrest N-Palmitoyl-S-(2RS)-2,3-bis-(palmitoyloxy)propylcystein, abgekürzt Pam_3Cys. Dieser Rest ist an dem Amino-Ende der bakteriellen Lipoproteine zu finden, welche mit einer Signalsequenz synthetisiert werden, die die Lipidanlagerung spezifiziert und die Spaltung durch die Signalpeptidase II. Synthetische Peptide, die selbst nicht immunogen sind, induzieren eine starke Antikörperantwort, wenn sie mit Pam_3Cys kovalent verknüpft sind [Bessler et al., Research Immunology (1992) 143:548-552].

[0009] Zusätzlich zu einer Antikörperantwort ist es oft notwendig, eine zelluläre Immunantwort zu induzieren, insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs). Die mit Pam_3Cys gekoppelten synthetischen Peptide sind äußerst potente Induktoren von CTLs, bisher hat jedoch niemand von einer CTL-Induzierung durch große rekombinante Lipoproteine berichtet.

[0010] Die Nukleinsäuresequenz und die von dieser codierte Aminosäuresequenz für OspA sind für mehrere klinische Isolate von B. burgdorferi bekannt und beispielsweise beschrieben in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 90/04411 (Symbicom AB) für den B31-Stamm von B. burgdorferi und in Johnson et al., Infect. Immun. 60:1845-1853 für einen Vergleich der OspA-Operons von drei B.-burgdorferi-Isolaten verschiedenen geographischen Ursprungs, nämlich B31, ACA1 und Ip90.

[0011] Wie in WO 90/04411 beschrieben, zeigt die Analyse der DNA-Sequenz des B31-Stamms, daß das OspA von einem offenen Leseraster aus 819 Nukleotiden codiert wird, beginnend in Position 151 der DNA-Sequenz und endend in Position 970 der DNA-Sequenz (siehe **Fig. 1** hierin). Die ersten 16 Aminosäurereste des OspA konstituieren eine hydrophobe Signalsequenz des OspA. Das primäre Translationsprodukt des B.-burgdorferi-Gens in gesamter Länge enthält eine hydrophobe N-terminate Signalsequenz, die ein Substrat für die Anlagerung eines Diacylglycerols an die Sulfhydrylseitenkette des benachbarten Cysteinrests ist. Im Anschluß an diese Anlagerung erfolgt die Spaltung durch die Signalpeptidase II und die Anlagerung einer dritten Fettsäure an den N-Terminus. Die komplette Lipidgruppe wird mit Pam_3Cys bezeichnet. Es wurde gezeigt, daß die Lipidierung von OspA für dessen Immunogenität erforderlich ist, da das OspA-Lipoprotein mit einem N-terminalen Pam_3Cys-Rest eine starke Antikörperantwort stimulierte, während OspA ohne das angeheftete Lipid keine detektierbaren Antikörper induzierte [Erdile et al., Infect. Immun., (1993), 61:81-90).

[0012] Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 91/09870 (Mikrogen Molekularbiologische Entwicklungs-GmbH) beschreibt die DNA-Sequenz des ospC-Gens des B.-burgdorferi-Stamms Pko und das hierdurch codierte OspC- (in dieser Referenz mit pC bezeichnet) Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. Diese Sequenz offenbart, daß OspC ein Lipoprotein ist, welches eine Signalsequenz verwendet, die derjenigen ähnlich ist, die für OspA verwendet wird. Auf der Grundlage der Erkenntnisse im Hinblick auf OspA könnte man erwarten, daß die Lipidierung von rekombinantem OspC geeignet sein würde, um dessen Immunogenität zu verbessern, aber, wie weiter unten erläutert wird, hatten die Anmelder jedoch Probleme, eine detektierbare Expression von rekombinantem OspC zu detektieren.

[0013] Das US-Patent Nr. 4,624,926 für Inouye betrifft Plasmid-Klonierungsvektoren, die eine DNA-Sequenz umfassen, die ein gewünschtes Polypeptid codiert, welches mit einem oder mehreren funktionellen Fragmenten verknüpft ist, welches) aus einem Gen für ein äußeres Membranlipoprotein eines gram-negativen Bakteriums abgeleitet wurde. Das von den transformierten E.-coli-Wirtszellen exprimierte Polypeptid umfaßt das Signalpeptid des Lipoproteins, gefolgt von den ersten acht Aminosäureresten des Lipoproteins, welche wiederum gefolgt werden von der Aminosäuresequenz des gewünschten Proteins. Das Signalpeptid kann dann in natürlicher Weise über die Zytoplasmamembran transloziert werden, und die ersten acht Aminosäuren des Lipopro-

teins können dann weiterverarbeitet werden und in die äußere Membran der Zelle auf eine Weise inseriert werden, die analog zu der normalen Insertion des Lipoproteins in die äußere Membran ist. Die Immunogenität der exprimierten Proteine wurde nicht demonstriert. Allerdings war Inouye nicht mit der rekombinanten Lipidierung beschäftigt, insbesondere nicht mit der Verstärkung der Immunogenität.

[0014] Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 91/09952 beschreibt Plasmide für die Exprimierung von lipidierten Proteinen. Solche Plasmide umfassen eine DNA-Sequenz, die ein Lipoproteinsignalpeptid codiert, welches mit den Codons für eine der Haarnadelbiegungs-Tetrapeptide QANY oder IEGR verknüpft ist, welches wiederum mit der DNA-Sequenz, die das gewünschte Protein codiert, verknüpft ist. Wiederum wurde die Immunogenität der exprimierten Proteine nicht demonstriert.

[0015] Streptococcus pneumoniae verursacht mehr tödliche Infektionen weltweit als jeder andere Pathogene. In den USA kommen die durch S. pneumoniae verursachten Todesfälle an Zahl denjenigen gleich, die durch Aids verursacht wurden. Die meisten tödlich verlaufenden Pneumokokken-Infektionen in den USA treten bei Individuen mit einem Alter von über 65 Jahren auf, bei denen S. pneumoniae die häufigste Ursache von in Personengemeinschaft erworbener Lungenentzündung ist. In der entwickelten Welt treten die meisten Todesfälle durch Pneumokokken bei älteren oder bei immungeschwächten Patienten auf, einschließlich derjenigen mit der Sichelzellenkrankheit. In den weniger entwickelten Bereichen der Welt ist die Pneumokokken-Infektion eine der häufigsten Todesursachen unter Kindern, die weniger als fünf Jahre alt sind. Die Zunahme der Häufigkeit von Antibiotika-Mehrfachresistenzen unter Pneumokokken und die abschreckend hohen Kosten der medikamentösen Behandlung in armen Ländern lassen die gegenwärtige Perspektive im Hinblick auf die Kontrolle von Pneumokokkenerkrankungen problematisch erscheinen.

[0016] Das Reservoir an Pneumokokken, die Menschen infizieren, wird primär über den Transport im menschlichen Nasopharynx aufrechterhalten. Menschen akquirieren Pneumokokken zunächst über Aerosole oder durch unmittelbaren Kontakt. Die Pneumokokken besiedeln zunächst die oberen Atemwege und können über Wochen oder Monate in der Nasenschleimhaut verweilen. 50 % oder mehr der jungen Kinder und der Älteren sind besiedelt. In den meisten Fällen führt diese Besiedlung zu keiner offensichtlichen Infektion. Bei manchen Individuen kann der in dem Nasopharynx getragene Organismus symptombezogen zu Sinusitis oder Mittelohrinfektion führen. Wenn Pneumokokken in die Lunge aspiriert werden, insbesondere mit Nahrungspartikeln oder Schleim, können sie eine Lungenentzündung verursachen. Die Infektionen in diesen Bereichen geben im allgemeinen einige Pneumokokken in das Blut ab, wo sie zu Sepsis führen können, insbesondere wenn sie kontinuierlich in großer Zahl vom ursprünglichen Infektionsherd abgegeben werden. Pneumokokken im Blut können bis zum Gehirn reichen, wo sie zu Meningitis führen können. Obwohl die Pneumokokken-Meningitis weniger verbreitet ist als andere Infektionen, die durch diese Bakterien verursacht werden, ist sie besonders verheerend, dergestalt, daß etwa 10 % der Patienten sterben und mehr als 50 % der übrigen Patienten ihr Leben lang unter den neurologischen Folgeerkrankungen leiden.

[0017] Bei älteren Erwachsenen ist der gegenwärtige 23-wertige Kapsel-Polysaccharidimpfstoff zu etwa 60 % wirksam gegen eine invasive Pneumokokkenerkrankung mit Stämmen der kapsulären Sorten, die in dem Impfstoff eingeschlossen sind. Der 23-wertige Impfstoff ist nicht wirksam bei Kindern, die weniger als zwei Jahre alt sind, da sie nicht dazu fähig sind, auf die meisten Polysaccharide adäquate Antworten auszubilden. Verbesserte Impfstoffe, die Kinder und Erwachsene gegen invasive Infektionen mit Pneumokokken schützen können, würden dabei helfen, einige der gesundheitsschädlichsten Aspekte dieser Krankheit zu verringern.

[0018] Das Zelloberflächenprotein PspA von S. pneumoniae erwies sich als ein Virulenzfaktor und als ein schützendes Antigen. In der veröffentlichten internationalen Patentanmeldung WO 92/14488 werden die DNA-Sequenzen des pspA-Gens aus S. pneumoniae Rx1, die Herstellung einer gestutzten Form des PspA durch gentechnische Bearbeitung und die Demonstration, daß solche gestutzten Formen des PspA in Mäusen Schutz verleihen gegenüber der Herausforderung mit lebenden Pneumokokken, beschrieben.

[0019] In der Bemühung, einen Impfstoff oder eine immunogene Zusammensetzung auf der Basis von PspA zu entwickeln, wurde PspA in E. coli rekombinant exprimiert. Es wurde herausgefunden, daß es für das effiziente Exprimieren von PspA nützlich ist, das reife PspA-Molekül des Rx1-Stamms von seiner normalen Menge von 589 Aminosäuren auf eine Länge von 314 Aminosäuren, die die Aminosäuren 1 bis 314 umfaßt, zu stutzen. Dieser Bereich des PspA-Moleküls enthält die meisten, wenn nicht alle, protektiven Epitope des PspA. Allerdings haben Untersuchungen der Immunogenität und der Schutzwirkung in Mäusen gezeigt, daß die gestutzte rekombinante Form von PspA in naiven Mäusen nicht immunogen ist. Es wäre daher nützlich, die Immunogenität von rekombinanten PspA und von Fragmenten davon zu verbessern.

[0020] Viele bakterielle und virale Pathogene, wie z.B. S. pneumoniae und Helicobacter pylori und HIV, Herpes- und Papillom-Viren erhalten Zugang über die Schleimhautoberflächen. Die grundsätzliche Determinante der spezifischen Immunität auf Schleimhautoberflächen ist sekretorisches IgA (S-IgA), welches physiologisch und funktionell von den Komponenten des zirkulierenden Immunsystems separat ist. Die mukosalen S-IgA-Antworten werden überwiegend von dem allgemeinen mukosalen Immunsystem (CMIS) generiert [Mestecky, J. Clin. Immunol. (1987), 7:265-276], bei welchem die Immunogene von spezialisierten lymphoepithelialen Strukturen aufgenommen werden, die kollektiv als mit der Schleimhaut assoziiertes lymphoides Gewebe (MALT) bezeichnet werden. Der Begriff allgemeines mukosales Immunsystem bezieht sich auf den Umstand, daß die Immunisierung an jeder beliebigen Schleimhautstelle eine Immunantwort an allen anderen Stellen der Schleimhaut auslösen kann. Die Immunisierung in den Eingeweiden kann demzufolge eine mukosale Immunität in den oberen Atemwegen auslösen und umgekehrt. Darüber hinaus ist es wichtig, zur Kenntnis zu nehmen, daß die orale Immunisierung zusätzlich zu den mukosalen IgA-Antikörpern eine Antigen-spezifische IgG-Antwort in dem systemischen Kompartiment induzieren kann [McGhee, J. R. et al., (1993), Infect. Agents and Disease 2:55-73].

[0021] Die meisten löslichen und nicht-replizierenden Antigene sind schwache mukosale Immunogene, insbesondere über den peroralen Weg, wahrscheinlich weil sie durch Verdauungsenzyme abgebaut werden und wenig oder gar keine Affinität für das mit den Eingeweiden assoziierte lymphoide Gewebe (GALT) aufweisen. Dementsprechend wäre ein Verfahren zur Herstellung von wirksamen mukosalen Immunogenen und von Impfstoffen und immunogenen Zusammensetzungen, die diese enthalten, wünschenswert.

[0022] Von besonderem Interesse ist H. pylori, das schraubige Bakterium, welches selektiv die gastrischen Mucin-sekretierenden Zellen des Menschen besiedelt und welches in den meisten Fällen der nicht erosiven Gastritis des Menschen die Ursache ist. Jüngere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß H. pylori, das eine hohe Urease-Aktivität zeigt, verantwortlich ist für die meisten peptischen Ulcera sowie für viele Magenkrebsfälle. In vielen Studien wurde vorgeschlagen, daß die Urease, ein Komplex aus den Produkten der ureA- und ureB-Gene, ein schützendes Antigen sein könnte. Bis jetzt war es allerdings nicht bekannt, wie eine hinreichende mukosale Immunoantwort auf Urease erzeugt werden könnte.

[0023] Antigene, wie z.B. OspC, PspA, UreA, UreB oder immunogene Fragmente davon, stimulieren eine Immunantwort, wenn sie einem Wirt verabreicht werden. Solche Antigene können, insbesondere wenn sie rekombinant hergestellt werden, eine stärkere Antwort auslösen, wenn sie in Verbindung mit einem Hilfsstoff verabreicht werden. Gegenwärtig ist Alaun der einzige Hilfsstoff, der für die Anwendung beim Menschen zugelassen ist, obwohl Hunderte von experimentell ermittelten Hilfsstoffen, wie z.B. das Choleratoxin B untersucht werden. Allerdings haben diese Hilfsstoffe Nachteile. Zum Beispiel besteht ein allgemeines Unbehagen bei der Verabreichung eines Toxins, das mit einer so schädlichen Krankheit wie der Cholera verbunden ist, insbesondere wenn auch nur noch die geringste Chance besteht, daß eine minimale Verunreinigung vorliegt, obwohl das Choleratoxin B nicht in dem Sinne toxisch ist, daß es Cholera verursacht.

[0024] Demzufolge wäre es wünschenswert, die Immunogenität von Antigenen durch Verfahren zu verbessern, die anders sind als die Anwendung eines Hilfsstoffs, insbesondere bei monovalenten Zubereitungen, und bei multivalenten Zubereitungen wäre es wünschenswert, die Möglichkeit zu haben, solche Mittel für eine verbesserte Immunogenität mit einem Hilfsstoff anzuwenden, um so eine noch stärkere immunologische Antwort zu erhalten.

[0025] Im Hinblick auf die Expression von rekombinanten Proteinen wird davon ausgegangen, daß der Fachmann mit den verschiedenen Vektorsystemen, die für diese Expression zur Verfügung stehen, z.B. Bakterien, wie z.B. E. coli und dergleichen, vertraut ist.

[0026] Es wird angenommen, daß vordem im Stand der Technik die Expression eines rekombinanten OspC-Lipoproteins von einer Borrelia-Art nicht gelehrt oder nahelegt wurde, bei dem dessen Lipidierung von der Expression einer ersten Nukleinsäuresequenz, die eine OspA-Leadersequenz einer Borrelia-Art codiert, herrührt, bei dem dessen Protein aus der Expression einer zweiten Nukleinsäuresequenz herrührt, wobei die erste und die zweite Sequenz, die in der Natur nicht gemeinsam vorkommen, aneinander angrenzen, noch Gene, die solche Sequenzen enthalten, noch Vektoren, die solche Sequenzen enthalten, noch Verfahren für eine solche Expression, noch solche rekombinanten Lipoproteine, noch Zusammensetzungen, die solche rekombinanten Lipoproteine enthalten, noch Verfahren zur Verwendung solcher Zusammensetzungen, noch Verfahren zur Verbesserung der Immunogenität eines Proteins durch Lipidierung aus einer Nukleinsäuresequenz, die in der Natur nicht mit der Nukleinsäuresequenz vorkommt, die den Proteinanteil des Lipoproteins codiert.

AUFGABEN UND ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0027] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein rekombinantes OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art bereitzustellen, wobei dessen Lipidierung aus der Expression einer ersten Nukleinsäuresequenz herrührt, die eine OspA-Leadersequenz einer Borrelia-Art codiert, und dessen Proteinanteil aus der Expression einer zweiten Nukleinsäuresequenz herrührt, und die erste und zweite Sequenz in der Natur nicht gemeinsam vorkommen.

[0028] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, die Expression eines Gens und/oder einer Sequenz bereitzustellen, die ein solches rekombinantes Lipoprotein codiert, Vektoren hierfür und Verfahren zur Bewirkung einer solchen Expression.

[0029] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, immunogene Zusammensetzungen bereitzustellen, einschließlich Impfstoffe, die die rekombinanten OspC-Lipoproteine einer Borrelia-Art enthalten, und/oder Vektoren für deren Expression.

[0030] Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß ein immunogenes rekombinantes lipidiertes OspC-Protein einer Borrelia-Art aus einem Vektorsystem exprimiert werden kann, vorzugsweise aus E. coli, ohne die Toxizität, die gegenüber dem Vektorsystem offenkundig ist, wenn der die native Lipoproteinsignalsequenz codierende Bereich präsent ist. Dieses Ergebnis wurde erzielt, indem man die die native Leader- oder Signalsequenz eines Lipoproteins codierende Nukleotidsequenz durch die Nukleotidsequenz austauscht, die ein Leader oder ein Signal des OspA-Lipoproteins einer Borrelia-Art codiert. Für diese rekombinanten lipidierten Proteine konnte gezeigt werden, daß sie eine Immunantwort auslösen, einschließlich einer mukosalen Immunantwort.

[0031] Es ist überraschend, daß die Fusion von DNA, welche eine OspA-Lipoprotein-Leadersequenz einer Borrelia-Art codiert, unmittelbar mit der DNA, die ein OspC-Protein einer Borrelia-Art codiert, ohne irgendwelche dazwischenliegenden Nukleotidsequenzen zur Expression eines immunogenen rekombinanten Lipoproteins in signifikanten Mengen führen kann, ohne die Toxizität, die für die native Leadersequenz evident ist, da vorherige Versuche, rekombinante lipidierte Proteine zu exprimieren, erfolglos waren. Zum Beispiel berichten Fuchs et al., daß rekombinant gebildetes OspC (in dieser Referenz als pC bezeichnet) mit dessen nativem Leaderprotein in E. coli lediglich schwach exprimiert wurde [Mol. Microbiology (1992) 6(4):503-509]. Außer Fuchs versuchten auch die Anmelder, ein lipidiertes rekombinantes OspC durch Expression der OspC-codierenden Sequenzen in E. coli zu erreichen, indem sie das pET-Vektorsystem, welches in der zuvor genannten WO 92/14488 für die Expression von OspA beschrieben wird, verwendeten und indem sie die beschriebenen pDS12-Plasmidsysteme verwendeten. Allerdings war OspC durch Immun-Blotting der Extrakte von Zellen, bei denen diese Systeme verwendet wurden, um OspC zu exprimieren, kaum detektierbar.

[0032] Darüber hinaus nahm man, wie oben besprochen, an, daß eine zusätzliche Nukleotidsequenz, vorzugsweise eine, die eine Peptidsequenz codiert, die eine Haarnadelschleife ausbildet, für die Expression eines rekombinanten Lipoproteins notwendig ist, und die Immunogenität von zuvor exprimierten rekombinanten Lipoproteinen wurde nicht aufgezeigt.

[0033] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ermöglicht daher, daß man große Mengen an reinen, rekombinanten, immunogenen, lipidierten OspC-Proteinen einer Borrelia-Art erhält, was vordem nicht möglich war. Die rekombinant gebildeten lipidierten Proteine, die hier bereitgestellt werden, sind signifikant stärker immunogen als ein nicht-lipidiertes rekombinantes Analogon.

[0034] Es wird davon ausgegangen, daß die vorliegende Erfindung das erste Beispiel dafür repräsentiert, daß die Expression eines heterologen lipidierten OspC-Proteins einer Borrelia-Art bewirkt wird, indem man die nicht-native OspA-Leadersequenz verwendet. Die Erfindung umfaßt demzufolge die Verwendung einer nicht-nativen OspA-Leadersequenz, um OspC-Proteine, die zu der Leadersequenz heterolog sind, zu exprimieren.

[0035] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung bei einer Ausführungsform ein isoliertes hybrides Nukleinsäuremolekül, vorzugsweise DNA, bereit, das/die eine erste Nukleinsäuresequenz umfaßt, die die Signalsequenz eines OspA-Proteins einer Borrelia-Art codiert, welche in einem Verhältnis eines für eine Translation offenen Leserasters mit einer zweiten Nukleinsäuresequenz verbunden ist, die ein reifes OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art codiert, welche zu der Signalsequenz heterolog ist.

[0036] Vorzugsweise grenzen die erste und zweite Sequenz aneinander, wenn das reife Protein natürlich li-

pidiert ist, und werden durch ein Codon, welches eine Aminosäure codiert, vorzugsweise Cystein, getrennt, wenn das reife Protein nicht natürlich lipidiert ist.

[0037] Das reife OspC-Lipoprotein, welches durch die zweite Nukleinsäuresequenz codiert wird, ist vorzugsweise ein antigenes Lipoprotein, und noch bevorzugter ein Stamm von B. burgdorferi, insbesondere bevorzugt ein Stamm von B. burgdorferi, welcher aus der OspC-Subtyp-Familie ausgewählt ist.

[0038] Das hier bereitgestellte Hybridgen kann gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung in einen Expressionsvektor eingebaut werden, vorzugsweise unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors für die Expression eines reifen OspC-Lipoproteins einer Borrelia-Art, welcher in einem geeigneten Wirtsorganismus, wie z.B. E. coli, die initiale Translation eines chimären Moleküls, welches die OspA-Leadersequenz einer Borrelia-Art und das gewünschte heterologe OspC-Protein in lipidierter Form umfaßt, veranlaßt, gefolgt von der Spaltung des chimären Moleküls durch die Signalpeptidase II und der Anlagerung von Lipidresten an das neue Ende des Proteins, wobei das reife OspC-Lipoprotein in dem Wirtsorganismus exprimiert wird.

[0039] Die vorliegende Erfindung stellt zum ersten Mal ein hybrides Nukleinsäuremolekül bereit, welches die Produktion eines rekombinanten lipidierten OspC-Proteins einer Borrelia-Art erlaubt.

[0040] Dementsprechend wird gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ein hybrides Nukleinsäuremolekül bereitgestellt, welches eine erste Nukleinsäuresequenz umfaßt, die ein OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art umfaßt, besonders bevorzugt einen Stamm von B. burgdorferi, noch bevorzugter einen Stamm von B. burgdorferi, welcher aus der OspC-Subtyp-Familie ausgewählt ist, und eine zweite Nukleinsäuresequenz, die eine OspA-Signalsequenz eines exprimierten Proteins einer Borrelia-Art codiert, welche in einem Verhältnis eines für eine Translation offenen Leserasters mit der ersten Nukleinsäuresequenz verbunden ist.

[0041] Wie oben beschrieben, kann das hybride Gen in einen Expressionsvektor unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors für die Expression des OspC-Lipoproteins, welcher in einem geeigneten Wirt, wie z.B. E. coli, die Expression des OspC-Lipoproteins aus dem Wirtsorganismus verursacht, eingebaut werden.

[0042] Es wurde außerdem überraschenderweise festgestellt, daß eine verbesserte Immunogenität erreicht werden kann durch ein rekombinantes OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art, wenn das OspC-Lipoprotein durch ein hybrides oder chimäres Gen exprimiert wird, welches eine erste Nukleinsäuresequenz umfaßt, die eine OspA-Leader- oder Signalsequenz einer Borrelia-Art codiert, und eine zweite Nukleinsäuresequenz, die den Proteinteil des OspC-Lipoproteins codiert, wobei die erste und die zweite Sequenz in der Natur nicht gemeinsam vorkommen.

[0043] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art bereit, welches durch ein hybrides oder chimäres Gen exprimiert wird, welches eine erste Nukleinsäuresequenz umfaßt, die eine OspA-Leader- oder -Signalsequenz einer Borrelia-Art codiert, welche an eine zweite Nukleinsäuresequenz angrenzt, die einen Proteinteil des OspC-Lipoprotein codiert, und wobei die erste und die zweite Sequenz in der Natur nicht gemeinsam auftreten. Die zweite Sequenz kann ein OspC-Antigen codieren. Die erste und die zweite Sequenz können in einem Gen vorliegen und das Gen und/oder die erste und die zweite Sequenz können in einem geeigneten Vektor für die Expression vorliegen.

[0044] Der Vektor kann eine Nukleinsäure sein in der Form von z.B. Plasmiden, Bakteriophagen und integrierter DNA in einem Bakterium, besonders bevorzugt in einem, das für die Expression verwendet wird, z.B. E. Coli, Bacillus subtilis, Salmonella, Staphylococcus, Streptococcus, etc., oder in einem, das als ein Lebendvektor verwendet wird, z. B. Lactobacillus, Mycobakterium, Salmonella, Streptococcus, etc. Wenn ein Expressionswirt verwendet wird, kann das rekombinante Lipoprotein erhalten werden, indem man das exprimierte Produkt in vitro erntet, z.B. indem man das rekombinante Lipoprotein aus einem Bakterienextrakt isoliert. Das Gen kann vorzugsweise unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors stehen und daher funktionsfähig mit diesem verknüpft sein, und der Promotor kann für den Vektor entweder endogen sein, oder er kann in den Vektor mit dem Gen inseriert werden.

[0045] Die Erfindung stellt des weiteren Vektoren bereit, die die Nukleinsäure enthalten, welche das rekombinante OspC-Lipoprotein codiert, und Verfahren, mit denen man das rekombinante OspC-Lipoprotein erhält und Verfahren zur Herstellung des Vektors.

[0046] Wie bereits erwähnt, kann das rekombinante Lipoprotein eine verbesserte Immunogenität aufweisen. Daher stellen weitere Ausführungsformen der Erfindung immunogene oder Impfstoff-Zusammensetzungen

zum Induzieren einer immunologischen Antwort bereit, welche das isolierte rekombinante OspC-Lipoprotein umfassen, oder einen geeigneten Vektor für die Expression in vivo davon in einem nicht-tierischen Wirt oder beides und einen geeigneten Träger und die Verwendung dieser Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Arzneimittels für die Prophylaxe gegen oder die Behandlung von Borreliose.

[0047] Die in dieser Offenbarung zitierten Druckschriften, einschließlich der Anmeldungen, auf die oben Bezug genommen wurde, bieten typische zusätzliche Inhaltsstoffe für solche Zusammensetzungen, so daß keine unzumutbaren Versuche erforderlich sind für den Fachmann, um eine Zusammensetzung aus dieser Offenbarung zu formulieren. Solche Zusammensetzungen sollten vorzugsweise eine Menge des rekombinanten OspC-Lipoproteins einer Borrelia-Art enthalten, die ausreichend ist, um eine geeignete Antwort auszulösen, oder einen Vektor, der dieses ausreichend exprimiert. Eine solche Menge an rekombinantem OspC-Lipoprotein oder Vektor kann bestimmt werden auf der Grundlage von bekannten Mengen für verabreichte Antigene. Wenn es beispielsweise eine für das erfindungsgemäße rekombinante OspC-Lipoprotein bekannte Menge für die Verabreichung eines Antigens gibt, welches mit der zweiten exprimierten Sequenz korrespondiert, so kann die Menge des rekombinanten Lipoproteins auf diese bekannte Menge bemessen werden, und die Menge des Vektors kann beispielsweise so sein, daß sie eine ausreichende Zahl von koloniebildenden Einheiten (cfu) erzeugt, so daß dies zu einer Expression in vivo in einem nicht-tierischen Wirt des rekombinanten OspC-Lipoproteins in ungefähr der bekannten Menge führt. Gleichsam kann die Menge an rekombinantem Lipoprotein gewählt werden auf der Grundlage der Menge an Antigen, welche Tiere in den unten stehenden Beispielen und in den hier zitierten Druckschriften verabreicht werden, ohne das hierfür unzumutbare Versuche durchgeführt werden müßten.

[0048] Die vorliegende Erfindung umfaßt in einem weiteren Aspekt auch Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten OspC-Lipoproteins einer Borrelia-Art, bei denen man einen Expressionsvektor zusammenbaut, das Lipoprotein aus einem nicht-tierischen Wirtsorganismus, der den Expressionssektor enthält, exprimiert und wahlweise das exprimierte OspC-Lipoprotein isoliert und/oder aufreinigt. Die Isolierung/Aufreinigung kann so geschehen, daß rekombinantes Lipoprotein erhalten wird, welches frei von Verunreinigungen, wie z.B. Lipopolysacchariden und anderen bakteriellen Proteinen, ist. Die vorliegende Erfindung umfaßt weiterhin immunogene Zusammensetzungen zum Induzieren einer immunologischen Antwort, wie z.B. Impfstoffe, welche das rekombinante Lipoprotein enthalten, sowie die Verwendung dieser Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe gegen oder die Behandlung von Borreliose.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0049] Bei der folgenden ausführlichen Beschreibung wird auf die begleitenden Figuren Bezug genommen, wobei:

[0050] Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Verfahrens für den Zusammenbau des Plasmids pLF100 ist,

[0051] Fig. 2 eine schematische Darstellung eines Verfahrens für den Zusammenbau des Plasmidvektors pPko9a (Stamm Pko) und pB319a (Stamm B31) ist,

[0052] Fig. 3 eine schematische Darstellung des Verfahrens ist, das angewendet wird für die Isolierung und Aufreinigung des lipidierten OspC,

[0053] Fig. 4 eine schematische Darstellung des Verfahrens ist, welches angewendet wird für die Isolierung und Aufreinigung des nicht-lipidierten OspC für Vergleichszwecke,

[0054] Fig. 5 eine SDS-PAGE-Analyse des lipidierten OspC zeigt, welches hier in verschiedenen Stufen des Aufreinigungsverfahrens, welches in Fig. 3 schematisch dargestellt ist, erzeugt wurde,

[0055] Fig. 6 eine SDS-PAGE-Analyse von nicht-lipidiertem OspC zeigt, welches hier in verschiedenen Stufen des Aufreinigungsverfahrens, wie es in der WO 91/09870 beschrieben ist, erzeugt wurde,

[0056] Fig. 7 eine graphische Darstellung der Immunantwort in Mäusen ist, die mit OspC-Formulierungen immunisiert wurden, welche Antigen aus zwei OspC-Subtypen enthielten, wie sie in einem Anti-OspC-ELISA-Assay gemessen wurde,

[0057] Fig. 8 eine graphische Darstellung der Immunantwort in Mäusen ist, die mit zwei Subtypen OspC-For-

mulierung immunisiert wurden, die den Hilfsstoff Alaun enthält, wie sie in einem Anti-OspC-ELISA-Assay gemessen wurde,

[0058] Fig. 9 eine schematische Darstellung eines Verfahrens für den Zusammenbau des Plasmidvektors pPA321-L ist,

[0059] Fig. 10 eine schematische Darstellung eines Verfahrens für den Zusammenbau des Plasmidvektors pPA321-NL ist,

[0060] Fig. 11 eine schematische Darstellung des Verfahrens ist, das angewendet wird für die Isolierung und Aufreinigung des lipidierten PspA,

[0061] Fig. 12 eine schematische Darstellung des Verfahrens ist, welches verwendet wird für die Isolierung und Aufreinigung des nicht-lipidierten PspA für Vergleichszwecke,

[0062] Fig. 13 eine SDS-PAGE-Analyse des lipidierten PspA zeigt, welches hier in verschiedenen Stufen der Expression und des Wirtszellfraktionierungsverfahrens, welches in Fig. 11 schematisch dargestellt ist, erzeugt wurde,

[0063] Fig. 14 eine SDS-PAGE-Analyse von nicht-lipidiertem PspA zeigt, welches hier in verschiedenen Stufen der Expression und des Wirtszellfraktionierungsverfahrens, welches schematisch in Fig. 12 dargestellt ist, erzeugt wurde, und

[0064] Fig. 15 eine SDS-PAGE-Analyse des Ergebnisses der Säulenchromatographie von PspA zeigt, die in den Fig. 11 und Fig. 12 schematisch dargestellt ist.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0065] Wie bereits oben angemerkt wurde, beschäftigt sich die vorliegende Erfindung mit der Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die OspA-Signalsequenz codiert, um ein lipidiertes OspC-Protein einer Borrelia-Spezies zu exprimieren, die mit dem OspA-Protein heterolog ist, und mit der Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die OspA-Signalsequenz eines Borrelia-Art-Proteins codiert, welches mit dem OspC-Protein, welches exprimiert werden soll, heterolog ist, um das lipidierte OspC-Protein einer Borrelia-Spezies zu exprimieren.

[0066] Die Leader-Aminosäuresequenz und die codierende DNA-Sequenz für den ACA-Stamm vom B. burgdorferi sind wie folgt:
M K K Y L L G I G L I L A L I A C
(SEQ ID Nr. 1)
ATG AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GGT CTA ATA TTA GCC TTA ATA GCA TGC
(SEQ ID Nr. 2)

[0067] Die korrespondierenden Leader-Aminosäuresequenzen und codierenden DNA-Sequenzen für das OspA anderer Stämme von B. burgdorferi sind auf dem Gebiet bekannt und können bei der vorliegenden Erfindung ausgehend von dieser Offenbarung verwendet werden, ohne daß übermäßige Versuche erforderlich wären.

[0068] Ein hybrides Genmolekül wird zusammengebaut, welches die Sequenz enthält, die den OspA Leader codiert, und das Gen, welches das heterologe Protein, das exprimiert werden soll, codiert, vorzugsweise das ospC- oder pspA-Gen, wobei diese in einem Verhältnis eines für eine Translation offenen Leserasters mit dem ospA-Genfragment angeordnet sind.

[0069] Für die Herstellung des lipidierten Proteins kann das geeignete hybride Genmolekül in einen geeigneten Expressionsvektor inkorporiert werden, und das hieraus hervorgehende Plasmid kann in einem Expressionsstamm von E. coli oder in einen anderen geeigneten Wirtsorganismus inkorporiert werden. Der Vektor kann auch ein Bakteriophage oder eine integrierte DNA sein.

[0070] Das lipidierte Protein wird durch die Zellen während des Wachstums des Wirtsorganismus exprimiert. Das lipidierte Protein kann aus dem Wirtsorganismus in aufgereinigter Form gewonnen werden durch jedes gut durchzuführende Verfahren, welches das lipidierte Protein in einer nicht denaturierten Form abtrennt. Ein

Schema eines Verfahrens in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung ist in Fig. 3 dargestellt.

[0071] Im Anschluß an das Zeltwachstum und die Induzierung von Proteinen werden die Zellen einer Lyse durch Einfrieren und Auftauen und einer Behandlung mit DNase I unterworfen. Das Lysat wird mit einem Detergens behandelt, welches für die Lösung des rekombinanten lipidierten Proteins selektiv ist und dieses gegenüber anderen bakteriellen Proteinen in dem Lysat bevorzugt. Obwohl die vorliegende Erfindung vorzugsweise Polyethylenglykol-tert-octylphenyl, welches die Formel t-Oct-$C_6H_4(OCH_2CH_2)_xOH$ aufweist, wobei x = 7–8 ist, als das Detergens anwendet (im Handel erhältlich als und im folgenden bezeichnet als TRITON™ X-114) können auch andere Materialen verwendet werden, die eine ähnliche selektive Löslichkeit für das Lipidierungsprotein aufzeigen sowie die Eigenschaft der Phasentrennung unter milden Bedingungen, wie es unten besprochen wird.

[0072] Im Anschluß an die Zugabe von TRITON™ X-114 wird das Gemisch auf eine mäßige Temperatur von vorzugsweise etwa 35°C bis 40°C erwärmt, wobei die Lösung trüb wird, da die Phasentrennung eintritt. Das Aufreinigungsverfahren für diese Phasentrennung sollte unter Bedingungen erfolgen, bei denen eine wesentliche Denaturierung oder eine beliebige andere wesentliche Beeinträchtigung der immunologischen Eigenschaften des rekombinanten Lipoproteins vermieden wird.

[0073] Das Zentrifugieren des trüben Gemischs führt zur Trennung des Gemischs in drei Phasen, nämlich eine Detergensphase, die etwa 50 % oder mehr des rekombinanten lipidierten Proteins und eine kleine Menge (ungefähr 5 Gew.-%) anderer Proteine enthält, eine wäßrige Phase, die die entsprechende Menge an anderen Proteinen enthält, und einen festen Niederschlag der Zellrückstände. Die Detergensphase wird von der wäßrigen Phase und dem festen Niederschlag für die weitere Verarbeitung abgetrennt.

[0074] Die abschließende Aufreinigung des Proteins wird vorzugsweise bewirkt, indem man die Detergensphase so bearbeitet, daß sie ein rekombinantes lipidiertes Protein liefert, welches eine Reinheit von wenigstens etwa 80 Gew.-% aufweist und welches im wesentlichen frei von anderen kontaminierenden Stoffen, wie z.B. bakteriellen Proteinen und Lipopolysacchariden (LPS), ist und welches Endotoxingehalte aufweist, die mit der Verabreichung an einen Menschen vereinbar sind.

[0075] Die Aufreinigung wird einfach durch Säulenchromatographie bewirkt. Die chromatographische Aufreinigung kann eine erste chromatographische Aufreinigung umfassen, bei der eine erste chromatographische Säule verwendet wird, die einen pH-Wert, eine Ionenstärke und eine Hydrophobizität aufweist, die geeignet ist, um bakterielle Proteine zu binden, nicht jedoch das rekombinante lipidierte Protein.

[0076] Eine solche erste chromatographische Aufreinigung kann bewirkt werden, indem man die Detergensphase auf die erste chromatographische Säule lädt und den Durchfluß, der das aufgereinigte lipidierte Protein enthält, sammelt. Die gebundene Fraktion enthält im wesentlichen alle bakteriellen Proteinverunreinigungen aus der Detergensphase. Das Chromatographiemedium, das für diesen ersten Aufreinigungsarbeitsgang verwendet wird, kann eine DEAE-Sephacel oder eine DEAE-Sepharose-Säule sein.

[0077] Der Durchfluß dieses ersten chromatographischen Aufreinigungsarbeitsgangs kann einer weiteren Aufreinigung auf einer zweiten chromatographischen Säule unterworfen werden. Der Durchfluß wird auf die Säule aufgeladen, die einen pH-Wert, eine Ionenstärke und eine Hydrophobizität aufweist, welche das rekombinante lipidierte Protein selektiv an die zweite chromatographische Säule binden wird, während bakterielle Kontaminanten und LPS die Säule passieren. Das Chromatographiemedium für die zweite chromatographische Säule kann S-Sepharose sein.

[0078] Vorzugsweise wird das rekombinante OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Art bis zu einer Reinheit von 80 % oder mehr als 80 % aufgereinigt, z.B. bis zu einer Reinheit von 85 bis 90 % oder sogar von 90 bis 95 % oder mehr als 95 %. Das lipidierte proteinartige Material kann dann in immunogene Zusammensetzungen formuliert werden, vorzugsweise in Impfstoffe.

[0079] Die Impfstoff- oder immunogene Zusammensetzung löst in einem Wirtssubjekt eine Immunantwort aus, die zu einer immunologischen Reaktion führt, wie z.B. zu Antikörpern, die opsonisierend oder bakterizid sein können. Sollte ein mit einem rekombinanten Lipoprotein der Erfindung immunisiertes Subjekt dann herausgefordert werden, kann eine solche immunologische Reaktion den herausfordernden Organismus inaktivieren. Darüber hinaus können die opsonisierenden und bakteriziden Antikörper auch über andere Mechanismen Schutz liefern.

[0080] Die immunogenen Zusammensetzungen, einschließlich die Impfstoffe, können als Mittel für die Injektion zubereitet werden, als flüssige Lösungen oder Emulsionen oder als eine Formulierung für die orale oder nasale Verabreichung oder für die Verabreichung über andere Körperöffnungen, z.B. für die vaginale, rektale, etc. Verabreichung. Orale Formulierungen können flüssige Lösungen, Emulsionen und dergleichen sein, z.B. Elixiere oder Feststoffzubereitungen, z. B. Tabletten, Kaplets, Kapseln, Pillen, mit Flüssigkeit gefüllte Kapseln, Gelatine und dergleichen. Nasale Zubereitungen können flüssig sein und können verabreicht werden über ein Aerosol, über Druck-, Spray- oder Pump-Spray-Verteiler. Die hierin zitierten Dokumente liefern beispielhafte Formulierungsarten und die Bestandteile hierfür, einschließlich der oben aufgezählten Applikationsformen.

[0081] Die Immunogene können mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen vermischt werden, die mit den Immunogenen vereinbar sind. Solche Trägerstoffe können Wasser, Salzlösung, Dextrose, Glycerol, Ethanol und Kombinationen davon umfassen. Die immunogenen Zusammensetzungen und die Impfstoffe können weiterhin Hilfssubstanzen enthalten, wie z.B. Benetzungs- oder emulgierende Mittel, pH-Puffer oder Adjuvantien, um die Wirksamkeit davon zu verstärken. Die immunogenen Zusammensetzungen und Impfstoffe können parenteral verabreicht werden durch subkutane oder intramuskuläre Injektion. Die immunogenen Zubereitungen und Impfstoffe werden in einer Weise verabreicht, die mit der Dosierungsformulierung vereinbar ist, und in einer Menge, die therapeutisch wirksam sein wird, sei es immunogen oder schützend. Die Menge die zu verabreichen ist, hängt von dem zu behandelnden Subjekt ab, einschließlich beispielsweise der Kapazität des Immunsystems des Individuums, Antikörper zu synthetisieren und, falls dies erforderlich ist, eine Zell-vermittelte Immunantwort zu erzeugen. Die genauen Mengen des aktiven Inhaltsstoffes, die für die Verabreichung erforderlich sind, hängen von der Beurteilung des Anwenders ab, wobei solche Faktoren zu berücksichtigen sind wie das Alter, das Gewicht, das Geschlecht, der Zustand des Wirts oder Patienten, der die Verabreichung erhalten soll. Allerdings sind die geeigneten Dosierungsbereiche für den Fachmann leicht zu bestimmen und können im Mikrogrammbereich des Immunogens liegen. Die geeigneten Therapiepläne für die initiale Verabreichung und für Auffrischdosierungen sind ebenfalls variabel, können jedoch eine initiale Verabreichung umfassen, die gefolgt ist von aufeinanderfolgenden Verabreichungen. Die Dosierung kann auch von dem Verabreichungsweg abhängen und wird mit der Größe des Wirts variieren.

[0082] Die Konzentration des Immunogens in einer Zusammensetzung, welche das OspC-Lipoprotein gemäß der Erfindung zum Induzieren einer immunologischen Reaktion umfaßt, liegt im allgemeinen etwa bei 1 bis etwa 95 %. Ein Impfstoff oder eine immunogene Zusammensetzung, die antigenes Material von lediglich einem Pathogen enthält, ist ein monovalenter Impfstoff. Impfstoffe oder Zusammensetzungen, die das OspC-Lipoprotein der vorliegenden Erfindung zum Induzieren einer immunologischen Reaktion umfassen, die multivalent sind oder die antigenes Material von mehreren Pathogenen enthalten (auch bekannt als kombinierte Impfstoffe oder kombinierte immunogene Zusammensetzungen), fallen auch unter die vorliegende Erfindung. Solche kombinierten Impfstoffe oder kombinierten immunogenen Zusammensetzungen enthalten beispielsweise Material aus verschiedenen Pathogenen oder aus verschiedenen Stämmen des gleichen Pathogens oder aus verschiedenen Kombinationen aus verschiedenen Pathogenen.

[0083] Über viele Jahre wurden immunstimulierende Mittel oder Adjuvantien verwendet, um die Wirtsimmunantworten auf beispielsweise Impfstoffe oder immunogene Zusammensetzungen zu verbessern. Intrinsische Adjuvantien, wie z.B. die Lipopolysaccharide, sind normalerweise Komponenten der abgetöteten oder abgeschwächten Bakterien, die als Impfstoffe oder immunogene Zusammensetzungen verwendet werden. Extrinsische Adjuvantien sind Immunmodulatoren, die typischerweise nicht-kovalent mit den Antigenen verknüpft sind und formuliert sind, um die Wirtsimmunantworten zu verstärken. Allerdings sind einige dieser Adjuvantien toxisch und können ungewünschte Nebenwirkungen verursachen, wodurch sie für die Verwendung in Menschen und vielen Tieren ungeeignet wären. Tatsächlich wird lediglich Alaun routinemäßig als ein Adjuvans in humanen und veterinärmedizinischen Impfstoffen verwendet.

[0084] Angesichts der Schwierigkeiten, die mit der Verwendung von Adjuvantien verbunden sind, ist es daher ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, daß die rekombinanten lipidierten OspC-Proteine einer Borrelia-Art die am stärksten immunogenen Formen sind, und daß sie in der Lage sind, Immunantworten sowohl ohne jegliches Adjuvans als auch mit Alaun auslösen zu können.

[0085] Die folgenden Beispiele beschreiben den Umfang der in dieser Spezifikation offenbarten Erfindung, ohne diesen jedoch zu beschränken.

BEISPIELE

Beispiel 1

Konstruktion eines Vektors, der ein Gen enthält, welches die OspA-Leadersequenz codiert

[0086] Das Plasmid pBluescript KS+ (Stratagene) wurde mit XbaI und BamHI verdaut und mit einem XbaI-BamHI-DNA-Fragment mit 900 bp, welches den vollständigen codierenden Bereich des ospA-Gens aus dem B.-burgdorferi-Stamm ACA1 enthält, ligiert unter Ausbildung eines Lipoprotein-Fusionsvektors pLF100. Dieses Verfahren ist in Fig. 1 schematisch wiedergegeben.

[0087] Der Vektor pLF100 wurde am 02. Februar 1995 unter der Zugangsnummer 69750 bei der American Type Culture Collection 10801 University Blvd. Mansas, Va. 20110-2209 hinterlegt. Diese Hinterlegung wurde in Übereinstimmung mit dem Budapester Vertrag vorgenommen.

Beispiel 2

Herstellung eines Expressionsvektors, der ein hybrides ospA-ospC Gen enthält

[0088] In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden speziell gestaltete Oligonukleotidprimer verwendet, um den Anteil des ospC-Gens zu amplifizieren, der downstream von dem Cystein-codierenden Codon liegt, welches die Sequenz terminiert, die die Signalpeptid-Kennung codiert, bis zu dem C-terminalen Ende des codierenden Bereichs aus den Pko- und B31-Stämmen von B. burgdorferi.

[0089] Der 5'-Ende-Primer hatte für die Pko- und B31-Stämme jeweils die folgenden Nukleotidsequenzen:
5'-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG G-3' (Pko) (SEQ ID Nr. 3)
5'-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG A-3' (B31) (SEQ ID Nr. 4)
, ährend der 3'-Ende-Primer die Nukleotidsequenz:
5'-CGC GGA TCC TTA AGG TTT TTT TGG-3' (B31 & Pko) (SEQ ID Nr. 5)
hatte.

[0090] Die PCR-Amplifizierung wurde erwirkt in einem DNA-Thermal Cycler (Perkins-Elmer Cetus) über 25 Zyklen mit Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, Annealing bei 37°C für 1 Minute und Extension bei 72°C für 1 Minute. Eine letzte Extension wurde bei Komplettierung der Zyklen bewirkt bei 72°C für 5 Minuten. Das Produkt wurde aufgereinigt unter Verwendung eines Gene Clean II-Kit (B10 101) und das aufgereinigte Material wurde verdaut mit SphI und BamHI. Dieses Verfahren führte eine stille Mutation in dem Pko-ospC-Gen ein, welche das Codon für die Aminosäure 60 des reifen Proteins von ATT in ATA verändert.

[0091] Die Materialien, die für die Pko- und B31-B.-burgdorferi-Stämme erzeugt wurden, wurden von diesem Punkt an identisch behandelt und daher wird lediglich die weitere Behandlung des OspC-Materials des Pko-Stamms beschrieben.

[0092] Das Plasmid pLF100 (Beispiel 1) wurde mit SphI und BamHI verdaut und die amplifizierte Pko-Sequenz wurde in das Plasmid ligiert unter Ausbildung des Plasmids pPko 100 (pB31 100 für den B31-Stamm), welches ein hybrides ospA/ospC-Gen enthält. Das hybride Gen wurde aus dem Plasmid pPko 100 durch Verdauen mit NdeI und BamHI herausgeschnitten und in die NdeI- und BamHI-Stellen des Plasmidvektors pET9 kloniert, um das ospA/ospC-hybride Gen unter die Kontrolle eines T7-Promotors und die effizienten Translations-Initiationssignale des bakteriophagen T7 zu stellen, wie in Fig. 2 zu sehen ist. Das hieraus hervorgehende Plasmid wird mit pPko9a bezeichnet (pB319a für den B31-Stamm).

Beispiel 3

Expression und Aufreinigung des lipidierten OspC

[0093] Das Plasmid pPko9a, welches wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt wurde, wurde verwendet, um die E. coli-Stämme BL21(DE3)(pLysS) und HMS174(DE3)(pLysS) zu transformieren. Die transformierten E. coli wurden in LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycinsulfat und 25 µg/ml Chloramphenicol in einem Verhältnis von 12 ml Kultur für jeden hergestellten Liter inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht in einem Flaschenschüttler bei 37°C angezogen.

[0094] Am nächsten Morgen wurden 10 ml Medium der Übernachtkultur in 1 l LB-Medium übertragen, welches 30 µg/ml Kanamycinsulfat enthielt, und die Kultur wurde in einem Flaschenschüttler bei etwa 37°C bis zu einem Niveau von OD_{600} = 0,6–1,0 angezogen (obwohl ein Wachstum bis zu OD_{600} = 1,5 bewirkt werden kann) in ungefähr 3–5 Stunden.

[0095] Zu dem Kulturmedium wurde Isopropylthiogalactosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, und das Kulturmedium wurde für weitere zwei Stunden bei etwa 30°C angezogen. Die Kulturen wurden geerntet und die Proben wurden auch mit Coomassiegefärbten SDS-PAGE-Gelen analysiert (Fig. 5). Das Kulturmedium wurde auf etwa 4°C abgekühlt und bei 10.000 xG für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet gesammelt wurde. Aufgereinigtes lipidiertes OspC wurde aus dem Pellet gewonnen, indem man das Verfahren durchführte, welches in Fig. 3 schematisch dargestellt ist und unten beschrieben wird.

[0096] Das Zellpellet wurde zunächst in 1/10 des Volumens PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde eingefroren und bei –20°C oder weniger gelagert, falls dies gewünscht war. Im Anschluß an das Einfrieren der Zellsuspension wurden die Zellen auf Raumtemperatur (etwa 20°C bis 25°C) aufgetaut, was zu der Lyse der Zellen führt. Es wurde DNase I bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml zu dem aufgetauten Material zugegeben, und das Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer Abnahme in der Viskosität des Materials führte.

[0097] Das inkubierte Material wurde auf Eis bis zu einer Temperatur unter 10°C gekühlt, und es wurde TRITON™ X-114 als Stammlösung mit 10 Gew.-% bis zu einer Endkonzentration von 0,3 bis 1 Gew.-% zugegeben. Das Gemisch wurde für 20 Minuten auf Eis gehalten. Als nächstes wurde das gekühlte Gemisch auf etwa 37°C erwärmt und bei dieser Temperatur für 10 Minuten gehalten.

[0098] Die Lösung wurde sehr trüb, als sich die Phasentrennung einstellte. Das trübe Gemisch wurde dann bei etwa 20°C für 10 Minuten bei 12.000 xG zentrifugiert, was zu einer Trennung des Gemischs in eine untere Detergensphase, eine obere, klare, wäßrige Phase und ein festes Pellet führte. Die Analyse der mittels SDS-PAGE fraktionierten Phasen (Fig. 5) ergab, daß sich das OspC in der Detergensphase verteilte, was aufzeigte, daß es in der lipidierten Form vorliegt. Die Detergensphase wurde von den beiden anderen Phasen abgetrennt, ohne das Pellet aufzuwirbeln, und bei 4°C gekühlt.

[0099] Puffer A, nämlich 50 mM Tris, pH-Wert 7,5, 2 mM EDTA und 10 mM NaCl und 0,3 % Polyehtylenglycol-tert-octylphenylether mit der Formel t-Oct-C_6H_4-$(OCH_2CH_2)_xOH$, wobei x = 9–10 beträgt, als das Detergens (im Handel erhältlich als TRITON™ X-100 und in der Folge auch so bezeichnet) wurde zu der gekühlten Detergensphase zugegeben, um 1/3 des ursprünglichen Volumens wiederherzustellen. Die hieraus hervorgehende Lösung kann eingefroren werden und für die spätere Verarbeitung wie unten beschrieben gelagert werden, oder kann unmittelbar einer solchen Verarbeitung unterworfen werden.

[0100] Eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule wurde präpariert in einem Volumen von 1 ml/10 ml der Detergensphase und wurde gewaschen mit 2 Volumina Puffer C, nämlich 50 mM, Tris pH-Wert 7,5, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,3 Gew.-% TRITON™ X-100, und dann mit 4 Volumina Puffer B, nämlich 50 mM Tris pH-Wert 7,5, 2 mM EDTA, 0,3 Gew.-% TRITON™ X-100.

[0101] Die Detergensphase wurde dann auf die Säule geladen und der Durchfluß, welcher das OspC enthält, wurde gesammelt. Die Säule wurde mit 2 Volumina Puffer B gewaschen und der Durchfluß wurde wieder gesammelt. Der vereinigte Durchfluß war eine wäßrige Lösung von aufgereinigtem OspC, welche für die Lagerung eingefroren werden kann.

[0102] Die Säule kann zum Zwecke der Wiederverwendung von bakteriellen Proteinen befreit werden, indem man sie mit 4 Volumina Puffer C eluiert.

[0103] Eine weitere und letzte Aufreinigung des Durchflusses aus der DEAE-Sepharose-Säule wurde bewirkt durch Chromatographie auf S-Sepharose Fast Flow. Der Durchfluß aus der DEAE-Sepharose-Säule wurde zunächst angesäuert bis zu einem pH-Wert von 4,3, indem man 1 M Zitronensäure zusetzte, und das sauergemachte Material wurde auf eine S-Sepharose-Säule geladen. Die S-Sepharose-Fast-Flow-Säule war mit 3 Säulenvolumina Puffer A gewaschen worden und dann mit 5 Säulenvolumina Puffer A, welcher auf einen pH-Wert von 4,3 eingestellt worden war. Das OspC bindet an die Säule. Die beladene Säule wurde mit 4 Säulenvolumina Puffer A mit einem pH-Wert von 4,3 gewaschen, gefolgt von 4 Säulenvolumina Puffer A mit einem pH-Wert von 5,5.

[0104] Hochaufgereinigtes OspC wurde von der Säule unter Verwendung von Puffer A, mit 1 N HCl auf einem pH-Wert von 6,0 eingestellt, eluiert. Ein Schema des in diesem Beispiel beschriebenen Aufreinigungsverfahrens ist in Fig. 3 dargestellt.

[0105] Die wäßrige Lösung des hochaufgereinigten lipidierten OspC, welches durch die Chromatographieverfahren erhalten wurde, wurde mit Coomassie-gefärbten Gelen analysiert (Fig. 5), und mit Immunoblot-Analyse unter Verwendung von polyklonalem Kaninchen-Anti-OspC-Antiserum wurde bestätigt, daß es sich um OspC in hoch aufgereinigter Form handelt. Es wurde bestimmt, daß die Reinheit des Produkts größer 80 % ist.

[0106] Durch dieses Verfahren wurden 2 bis 4 mg reines OspC aus einer Kultur von 1 Liter des BL21-Wirts gewonnen und etwa 1 bis 2 mg reines OspC wurden aus einer Kultur von 1 Liter des HMS 174-Wirts gewonnen.

Beispiel 4

Expression und Aufreinigung von nicht-lipidiertem OspC

[0107] Es wurden Transformanden vom Typ E. coli JM 109 hergestellt, die einen Plasmidvektor enthalten, welcher chromosomale Genfragmente enthält, die nicht-lipidiertes OspC codieren, und wurden, wie in WO 91/09870 beschrieben, angezogen. Die Kultur wurde geerntet, das Kulturmedium wurde bei 10.000 xG für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde gesammelt.

[0108] Das Zellpellet wurde zunächst resuspendiert in Lyse-Puffer A, nämlich 50 nM Tris-HCl pH-Wert 8,0, 2 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 5 % Glycerol und 0,4 mg/ml Lysozym, und die Suspension wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde zu der Zellsuspension TRITON™ X-100 bis zu einer Konzentration von 1 Gew.-% zugegeben, DNase I wurde bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben, und die Suspension wurde bei Raumtemperatur für weitere 20 Minuten gerührt, um die Zellyse zu bewirken. Als nächstes wurde Natriumchlorid zu der Zellsuspension zugegeben bis zu einer Konzentration von 1 M, und die Suspension wurde erneut bei 4°C für weitere 20 Minuten gerührt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert bei 20.000 xG für 30 Minuten, der hieraus hervorgehende Überstand wurde von dem Pellet abgetrennt und das Pellet wurde verworfen.

[0109] Der abgetrennte Überstand wurde gegen einen Puffer, der 50 mM Tris, pH 8, 2 mM EDTA enthält, dialysiert. Als nächstes wurde der Überstand auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule geladen und das nicht-lipidierte OspC wurde mit dem Säulendurchfluß gesammelt. Der Durchfluß wurde gegen einen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0, dialysiert.

[0110] Der dialysierte Durchfluß wurde als nächstes an eine S-Sepharose-Fast-Flow-Säule, die mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0, equilibriert war, gebunden. Dann wurde aufgereinigtes, nicht-lipidiertes OspC von der S-Sepharose-Säule eluiert, indem man den Dialysepuffer verwendete, wobei 0,15 M NaCl zugegeben wurden. Ein Schema des Aufreinigungsprozesses ist in Fig. 4 dargestellt.

[0111] Die wäßrige Lösung des hochaufgereinigten, nicht-lipidierten OspC wurde mit Coomassie-gefärbten Gelen analysiert (Fig. 6). Die Reinheit des Produkts wurde bestimmt und betrug über 80 %.

Beispiel 5

Immunogenität von rekombinantem lipidiertem OspC

[0112] Aufgereinigtes rekombinantes lipidiertes OspC, welches wie in Beispiel 3 hergestellt wurde, wurde auf Immunogenität in Mäusen getestet und verglichen mit nicht-lipidiertem OspC, welches wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt worden war. Für diese Untersuchung wurden 4 bis 8 Wochen alte weibliche C3H/He-Mäuse am Tag 0 immunisiert und an den Tagen 21 und 42 aufgefrischt. Alle Tiere erhielten pro Dosis 1 µg von jeweils dem OspC, welches von den B31- und pKo-Genen exprimiert worden war. Sowohl die lipidierte als auch die nicht-lipidierte Form des Antigens wurden untersucht. Die Formulierungen wurden mit und ohne Alaun als Adjuvans untersucht.

[0113] Repräsentativen Tieren wurde an den Tagen 21, 42, 63 und 91 Blut abgenommen. Ein ELISA-Test wurde mit diesen Seren durchgeführt, wobei man aufgereinigtes, nicht-lipidiertes OspC als das Hüllantigen verwendete.

[0114] Die Versuchsergebnisse der mit Antigen ohne Adjuvans immunisierten Mäuse (Fig. 7) zeigen, daß lediglich Tiere, die mit dem lipidierten Antigen immunisiert wurden, eine detektierbare ELISA-Antwort ausbildeten. Allerdings zeigen die Immunantworten von Tieren, die mit Antigenen immunisiert wurden, welche auf Alaun formuliert waren (Fig. 8), daß zwei Antigen-Typen vergleichbare ELISA-Antworten ergeben, und daß diese Antworten sich schneller entwickeln.

Konstruktion eines pET9a-Expressionsvektors, der ein hybrides ospA/pspA-Gen enthält (lediglich zum Zwecke der Hintergrundinformation)

[0115] Es wurden speziell gestaltete Oligonukleotidprimer in einer PCR-Reaktion verwendet, um den Anteil des interessierenden pspA-Gens (in diesem Fall von Aminosäure 1 bis 321) aus dem S.-pneumoniae-Stamm RX1 zu amplifizieren.

[0116] Der 5'-Ende-Primer hat die Nukleotidsequenz:
5'-GGG ACA GCA TGC GAA GAA TCT CCC GTA GCC AGT-3' (PspN1) (SEQ ID Nr. 6).

[0117] Der 3'-Ende-Primer hat die Nukleotidsequenz:
5'-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TGG TTT-3' (PspC370) (SEQ ID Nr. 7).

[0118] Die PCR-Reaktion lief wie folgt ab: 94°C für 30 Sekunden, um die DNA zu denaturieren, 42°C für eine Minute zum Annealing der DNA und 72°C für eine Minute für die Extension der DNA. Dies wurde über 25 Zyklen durchgeführt, gefolgt von einer 5-minütigen Extension bei 72°C. Dieses Verfahren führte bei Aminosäure 315 ein Stop-Codon ein. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des Gene-Clean-II-Verfahrens (Bio 101) aufgereinigt und mit SphI und BamHI verdaut.

[0119] Das Plasmid pLF100 (Beispiel 1) wurde mit SphI und BamHI verdaut und das amplifizierte pspA-Gen wurde in dieses Plasmid unter Ausbildung des Plasmids pLF321 ligiert, welches das hybride ospA-pspA-Gen enthält. Das hybride Gen wurde aus pLF321 durch Verdauen mit NdeI und BamHI ausgeschnitten und in die NdeI- und BamHI-Stellen des Plasmidvektors pET9a kloniert, um es unter die Kontrolle eines T7-Promotors zu stellen. Das hieraus hervorgehende Plasmid wird pPA321-L genannt. Dieses Verfahren ist in Fig. 9 schematisch dargestellt.

Konstruktion eines pET9a-Expressionsvektors, welcher das pspA-Gen enthält (lediglich zum Zwecke der Hintergrundinformation)

[0120] In einer PCR-Reaktion wurden speziell gestaltete Oligonukleotidprimer verwendet, um den interessierenden Anteil des pspA-Gens (in diesem Fall von Aminosäure 1 bis 321) aus dem S. pneumoniae-Stamm RX1 unter Verwendung des Plasmids pPA321-L aus Beispiel 6 zu amplifizieren.

[0121] Der 5'-Ende-Primer hatte die Nukleotidsequenz:
5'-GCT CCT GCA TAT GGA AGA ATC TCC CGT AGC C-3' (PspNL-2) (SEQ ID Nr. 8).

[0122] sDer 3'-Ende-Primer hatte die Nukleotidsequenz:
5'-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TGG TTT-3' (PspC370) (SEQ ID Nr. 7).

[0123] Die PCR-Reaktion lief wie folgt ab: 94°C für 30 Sekunden zum Denaturieren der DNA und 72°C für eine Minute für das Annealing und die Extension der DNA. Dies wurde über 25 Zyklen durchgeführt, was gefolgt war von einer 5-minütigen Extension bei 72°C. Dieses Verfahren führte bei Aminosäure 315 ein Stop-Codon ein. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des Gene-Clean-II-Verfahrens (Bio 101) aufgereinigt und mit NdeI und BamHI verdaut. Das verdaute PCR-Produkt wurde in die NdeI- und BamHI-Stellen des Plasmidvektors pET9a kloniert, um das pspA-Gen unter die Kontrolle eines T7-Promotors zu stellen. Das hieraus hervorgehende Plasmid wird pPA321-NL genannt. Dieses Verfahren ist in Fig. 10 schematisch dargestellt.

Expression und Aufreinigung von lipidiertem PspA (lediglich zum Zwecke der Hintergrundinformation)

[0124] Das Plasmid pPA321-L wurde verwendet, um den E. coli-Stamm BL21(DE3)pLyS zu transformieren. Die transformierten E. coli wurden in LB-Medium inokuliert, welches 30 µg/ml Kanamycinsulfat und 25 µg/ml Chloramphenicol enthält. Die Kultur wurde in einem Flaschenschüttler bei 37°C über Nacht angezogen.

[0125] Am folgenden Morgen wurden 50 ml der Übernacht-Kultur in 1 l LB-Medium überführt, welches 30

µg/ml Kanamycin-Sulfat enthält, und die Kultur wurde in einem Flaschenschüttler bei 37°C in ungefähr 3–5 Stunden bis zu einem Niveau des OD 600 nm von 0,6–1,0 angezogen. Zu dem Kulturmedium wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, und die Kultur wurde für zusätzliche zwei Stunden bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden durch Zentrifugieren bei 4°C bei 10.000 xG geerntet, und die Zellpellets wurden gesammelt. Lipidiertes PspA wurde aus dem Zellpellet gewonnen.

[0126] Das Zellpellet wurde in PBS mit 30 g nasse Zellpaste pro Liter PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei –20°C eingefroren und gelagert. Die Zellen wurden auf Raumtemperatur aufgetaut, um eine Lyse zu bewirken. Es wurde DNaseI zu dem aufgetauten Material in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben, und das Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was dazu führte, daß die Viskosität des Materials abnahm.

[0127] Das Material wurde dann in einem Eisbad auf unter 10°C gekühlt und es wurde TRITON™ X-114 als eine 10 %-ige Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,3 bis 1 % zugegeben. Das Gemisch wurde für 20 Minuten auf Eis gehalten. Das gekühlte Gemisch wurde dann auf 37°C erwärmt und bei dieser Temperatur für 10 Minuten gehalten. Dies führte dazu, daß die Lösung sehr trüb wurde als die Phasentrennung eintrat. Das Gemisch wurde dann bei 20°C für 10 Minuten bei 12.000 xG zentrifugiert, was zu einer Trennung des Gemischs in eine untere Detergensphase, eine obere klare wäßrige Phase und ein Pellet führte. Das lipidierte PspA verteilte sich in die Detergensphase. Die Detergensphase wurde von den anderen zwei Phasen abgetrennt, 1:10 mit einem Puffer, der 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,5, umfaßte, verdünnt und wurde bei –20°C gelagert.

[0128] Eine Q-Sepharose-Säule wurde in einem Volumen von 1 ml pro 5 ml verdünnter Detergensphase vorbereitet. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina eines Puffers gewaschen, der 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3 % TRITON™ X-100, 1 M NaCl mit einem pH-Wert von 4,0 enthält, und dann mit 5 bis 10 Säulenvolumina 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3 % TRITON™ X-100, 10 mM NaCl mit einem pH-Wert von 4,0 equlibriert. Der pH-Wert des verdünnten Detergensphasenmaterials wurde auf 4,0 eingestellt, zu welchem Zeitpunkt eine Ausfällung erfolgte. Dieses Material ließ man über eine Filtereinheit mit 0,2 µM Zelluloseacetat laufen, um das ausgefällte Material zu entfernen. Die filtrierte, verdünnte Detergensphase wurde auf die Q-Sepharose-Säule aufgebracht und der Durchfluß (enthaltend PA321-L) wurde gesammelt. Die SDS-PAGE-Analyse dieser Stufe ist in Fig. 15 dargestellt. Die Säule wurde mit 1–2 Säulenvolumina an 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3 % TRITON™ X-100, 10 mM NaCl mit einem pH-Wert von 4,0, gewaschen und der Durchfluß wurde mit der vorherigen Durchflußfraktion vereinigt. Der pH-Wert der vereinigten Durchflüsse wurde auf 7,5 eingestellt. Das gebundene Material, die kontaminierenden E. coli-Proteine, wurde von der Q-Sepharose mit 2 Säulenvolumina an 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,3 % TRITON™ X-100, 1 M NaCl mit einem pH-Wert von 4,0 eluiert. Ein Schema des Aufreinigungsprozesses, der in diesem Beispiel beschrieben wird, ist in Fig. 11 dargestellt.

Expression und Aufreinigung von nicht-lipidiertem PspA (lediglich zum Zwecke der Hintergrundinformation)

[0129] Das Plasmid pPA321-NL wurde verwendet, um den E. coli-Stamm BL21(DE3)pLyS zu transformieren. Die transformierten E. coli wurden in LB-Medium inokuliert, welches 30 µg/ml Kanamycinsulfat und 25 µg/ml Chloramphenicol enthält. Die Kultur wurde in einem Flaschenschüttler bei 37°C über Nacht angezogen.

[0130] Am folgenden Morgen wurden 50 ml der Übernachtkultur in 1 l LB-Medium übertragen, welches 30 µg/ml Kanamycinsulfat enthält, und die Kultur wurde über ungefähr 3–5 Stunden bei 37°C in einem Flaschenschüttler bis zu einem Niveau des OD 600 nm von 0,6–1,0 angezogen. Zu dem Kulturmedium wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, und die Kultur wurde für zusätzliche zwei Stunden bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden durch Zentrifugieren bei 4°C bei 10.000 xG geerntet und das Zellpellet wurde gesammelt. Nicht-lipidiertes PspA wurde aus dem Zellpellet gewonnen.

[0131] Das Zellpellet wurde in PBS mit 30 g nasser Zellpaste pro Liter PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei –20°C eingefroren und gelagert. Die Zellen wurden auf Raumtemperatur aufgetaut, um die Lyse zu bewirken. Zu dem aufgetauten Material wurde DNaseI bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben, und das Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer Abnahme der Viskosität des Materials führte. Das Gemisch wurde bei 4°C bei 10.000 xG zentrifugiert, und der Zellüberstand, welcher nicht-lipidiertes PspA enthielt, wurde gesichert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen, bei 4°C bei 10.000 xG zentrifugiert und der Zellüberstand wurde mit dem vorherigen Zellüberstand vereinigt.

[0132] Eine MonoQ-Säule (Pharmacia) wurde in einem Volumen von 1 ml pro 2 ml Zellüberstand präpariert. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumina eines Puffers gewaschen, der 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 M NaCl mit

einem pH-Wert von 7,5 umfaßt, und dann mit 5 bis 10 Säulenvolumina eines Puffers equilibriert, der 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,5 umfaßt. Die vereinigten Zellüberstände wurden auf eine Q-Sepharose-Säule aufgebracht, und der Durchfluß wurde gesammelt. Die Säule wurde mit 2–5 Säulenvolumina an 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,5 gewaschen, und der Durchfluß wurde mit dem vorherigen Durchfluß vereinigt.

[0133] Die Elution von gebundenen Proteinen begann mit der ersten Stufe eines Waschgangs mit 5–10 Säulenvolumina mit 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,5. Die zweite Elutionsstufe war ein Waschgang mit einem 5-10-fachen Säulenvolumen mit 50 mM Tris, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,5. Das nicht-lipidierte PspA war in dieser Fraktion enthalten. Die SDS-PAGE-Analyse dieser Stufe ist in Fig. 15 dargestellt. Die verbleibenden gebundenen kontaminierenden Proteine wurden mit 50 mM Tris und 2 mM EDTA mit einem pH-Wert von 7,5 mit 300 mM-1 M NaCl entfernt.

[0134] Ein Schema des in diesem Beispiel beschriebenen Aufreinigungsprozesses ist in Fig. 12 dargestellt.

(Lediglich zum Zwecke der Hintergrundinformation)

Immunogenität von rekombinantem lipidiertem PapA

[0135] Aufgereinigtes rekombinantes lipidiertes PspA, hergestellt wie in Beispiel 8 beschrieben, wurde auf Immunogenität in Mäusen getestet und verglichen mit nicht-lipidiertem PspA, hergestellt wie in Beispiel 9 beschrieben. Für diese Studie wurden CBA/N-Mäuse subkutan im hinteren Nacken mit 0,5 ml der folgenden Formulierungen mit den angegebenen PspA-Antigenkonzentrationen immunisiert.

Formulierung	PspA-Antigenkonzentration
Natives PspA-Molekül des RX1-Stamms (nativer RX1)	200 ng/ml
Nicht-lipidiertes rekombinantes PspA (pPA-321-NL) alleine in PBS*	200 und 1000 ng/ml
Nicht-lipidiertes rekombinantes PspA (pPA-321-NL) adsorbiert an Alaun	200 und 1000 ng/ml
Lipidiertes rekombinantes PspA (pPA-321-L) alleine in PBS	200 und 1000 ng/ml
Lipidiertes rekombinantes PspA (pPA-321-NL) adsorbiert an Alaun*	200 und 1000 ng/ml
Alaun*	0 ng/ml
PBS	0 ng/ml

*Alaun war ein Hydrogen bei einer Konzentration von 200 µg/ml

[0136] Vier Mäuse wurden an den Tagen 0 und 21 für jede Dosierung der Formulierungen immunisiert. Den Mäusen wurde dann an Tag 35 Blut abgenommen und sie wurden anschließend mit S. pneumoniae des A66-Stamms herausgefordert. Die Tage, an denen die Mäuse nach der Herausforderung überlebten, wurden aufgezeichnet, und den überlebenden Mäusen wurde an den Tagen 36, 37, 42 und 46 Blut abgenommen. Das Blut dieser aufeinanderfolgenden Blutentnahmen wurde auf die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) von S. pneumoniael ml untersucht. Die Seren, die an Tag 35 genommen wurden, wurden mittels ELISA auf Antikörper gegen PspA unter Anwendung von ELISA untersucht. Die Tage bis zum Tod der herausgeforderten Mäuse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Überleben von immunen und nicht-immunen CBA/M-Mäusen							
Gruppe	Immunisierung			Wirksamkeit			
	Antigen	Dosis in µg	Alaun	Tage bis zum Tod	p-Wert-Zeit bis zum Tod*	Lebend:Tot	p-Wert Überleben*
#1A	pPA-321-L	1,0	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#1B	pP-321-L	0,2	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#2A	pPA-321-L	1,0	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#2B	pPA-321-L	0,2	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#3A	pPA-321-NL	1,0	-	1,1,2,2	n. s.	0:4	n. s.
#3B	pPA-321-NL	0,2	-	1,1,2,≥15	n. s.	1:3	n. s.
#4A	pPA-321-NL	1,0	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#4B	pPA-321-NL	0,2	+	4x>14	0,01	4:0	0,01
#5	FL-Rx1	0,2	-	4x>14	0,01	4:0	0,01
#6	kein	0,0	+	1,1,3,6	n. s.	0:4	n. s.
#7	kein	0,0	-	1,1,1,≥15	n. s.	1:3	n. s.
	kein, vereinigt	0,0		5x1,3,6, =15	--	1:7	

Anmerkung: * zeigt die Messung gegen vereinigte Kontrollen an, die Zeit bis zum Tod mittels One-Tailed-Two-Sample-Rank-Test, Überleben durch One-Tailed-Fisher-Exact-Test. Die Berechnungen wurden durchgeführt unter Anwendung des "One-Tail"-Verfahrens, da wir nie beobachtet haben, daß Anti-PspA-Immunität konsistent Empfänglichkeit verursacht.

[0137] Die Anzahl der CFU im Blut der Mäuse ist in der Tabelle unten dargestellt.

Bakterämie in immunen und nicht-immunen CBA/M-Mäusen							
Gruppe	Immunisierung			$Cog_{10}CFU$			
	Antigen	Dosis in µg	Alaun	1 Tag	2 Tage	6 Tage	7 Tage
#1A	pPA-321-L	1,0	-	≤1,6, 1,9, 2,1, 2,5	4x≤1,6	4x≤1,6	n. d.
#1B	pPA-321-L	0,2	-	3x≤1,6, 1,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n. d.
#2A	pPA-321-L	1,0	+	2x≤1,6, 1,7, 2,9	3x≤1,6, 1,7	4x≤1,6	n. d.
#2B	pPA-321-L	0,2	+	2x≤1,6, 1,7, 1,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n. d.
#3A	pPA-321-NL	1,0	-	≤1,6, 1,7, d, d	d,d,d,d	d,d,d,d	d,d,d,d
#3B	pPA-321-NL	0,2	-	2x>7,d,d	≤1,6, d,d,d	≤1,6, d,d,d	n. d.,d,d,d
#4A	pPA-321-NL	1,0	+	2x≤1,6, 6,7, >7	3x ≤1,6, 1,7	4x≤1,6	n. d.
#4B	pPA-321-NL	0,2	+	≤1,6, 1,7, 2,1, 2,4	4x≤1,6	4x≤1,6	n. d.
#5	FL-Rx1	0,2	-	2x≤1,6, 2,6, 2,7	4x≤1,6	4x≤1,6	n. d.
#6	kein	0,0	+	≤1,6, 4,1, >7,d	≤1,6, 5,1, d,d	6,1, d,d,d	d,d,d,d
#7	kein	0,0	-	1,7, >7, >7,d	≤1,6, d,d,d	≤1,6, d,d,d	n.d.,d,d,d
	kein, vereinigt	0,0		≤1,6, 4,1, >7, >7, d	2x≤1,6, 5,1, d,d,d,d,d	≤1,6, 6,1 d,d,d,d,d,d	n.d., d d,d,d,d,d

Anmerkung: Eine Kolonie bei der höchsten Konzentration an Blut berechnete sich als 47 CFU oder Log 1,7. Daher zeigt "≤1,6" an, daß keine Kolonien gezählt wurden, $>10^7$ zeigt an, daß die Maus lebte, daß jedoch die Anzahl der Kolonien in der größten Verdünnung zu hoch war, um sie zu zählen. "d" zeigt an, daß die Mäuse vor der Untersuchung gestorben waren.

[0138] Diese Ergebnisse zeigen an, daß das rekombinante Protein nicht schützend war, wenn es alleine injiziert wurde. Das mit Alaun und/oder durch PAM_3cys-Lipidierung unterstützte rekombinante Antigen war immunogen und protektiv. Das ursprüngliche Gesamtlängen-PspA-Antigen bedurfte keines Adjuvans, um protektiv zu sein. Die CFU-Ergebnisse zeigen an, daß die durch Immunisierung geschützten Mäuse das herausfordernde S. pneumoniae aus dem Blut innerhalb von zwei Tagen eliminierten.

[0139] Die ELISA-Analyse der Seren, die am Tag 35 entnommen worden waren, zeigten an, daß es eine gute Korrelation zwischen dem Schutz der Mäuse gegenüber der Herausforderung mit S. pneumoniae gab und der Induktion von meßbaren Antikörperantworten. In den Seren der Mäuse, die mit nicht-lipidiertem Antigen (pPA-321-NL) in Salzlösung immunisiert waren oder bei den Negativkontrollen, die kein PspA-Antigen enthielten, konnten (wie in der Tabelle unten dargestellt ist) keine detektierbaren Antikörperantworten beobachtet werden. Gute Antikörperantworten wurden detektiert gegenüber dem nativen RX1-PspA-Antigen und gegenüber rekombinantem PspA, wenn dieses mit PAM_3cys lipidiert war und/oder auf Alaun adsorbiert war.

ELISA-Analyse der Maus-Seren an Tag 35

PspA-Antigen	Alaun-Adsorption	PspA-Dosis (µg/Maus)	Resultierende OD bei der angegebenen Verdünnung der Antiseren*					
			600	1200	2400	4800	9600	19200
pPA-321-L	Nein	0,1	0,885 (0,082)	0,497 (0,043)	0,271 (0,025)	0,146 (0,017)	0,075 (0,012)	0,039 (0,009)
pPA-321-L	Nein	0,5	1,857 (0,060)	1,437 (0,137)	1,108 (0,150)	0,750 (0,139)	0,459 (0,092)	0,284 (0,009)
pPA-321-L	Ja	0,1	1,373 (0,325)	1,048 (0,376)	0,745 (0,362)	0,490 (0,304)	0,288 (0,197)	0,171 (0,147)
pPA-321-L	Ja	0,5	1,202 (0,162)	0,787 (0,184)	0,472 (0,187)	0,296 (0,102)	0,162 (0,061)	0,087 (0,035)
pPA-321-NL	Nein	0,1	0,022 (0,035)	0,030 (0,060)	0,014 (0,024)	0,007 (0,018)	0,006 (0,005)	0,001 (0,001)
pPA-321-NL	Nein	0,5	0,029 (0,035)	0,014 (0,014)	0,008 (0,007)	0,003 (0,004)	0,002 (0,002)	0,002 (0,002)
pPA-321-NL	Ja	0,1	0,822 (0,181)	0,481 (0,166)	0,287 (0,085)	0,154 (0,051)	0,082 (0,029)	0,042 (0,015)
pPA-321-NL	Ja	0,5	1,017 (0,139)	0,709 (0,128)	0,447 (0,101)	0,253 (0,057)	0,141 (0,034)	0,075 (0,020)
Nativer RX1	Nein	0,1	1,367 (0,084)	1,207 (0,060)	0,922 (0,070)	0,608 (0,077)	0,375 (0,048)	0,209 (0,029)
kein	Nein	0	0,018 (0,003)	0,012 (0,008)	0,009 (0,003)	0,005 (0,002)	0,005 (0,002)	0,005 (0,002)
kein	Ja	0	0,013 (0,006)	0,009 (0,008)	0,004 (0,004)	0,004 (0,003)	0,001 (0,001)	0,000 (0,000)

* Die OD ist das Mittel des Ergebnisses der vier untersuchten Tiere, und die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

[0140] Um zu bestimmen, ob der Schutz wenigstens zum Teil durch die Anti-PspA-Antikörperantworten vermittelt wurde, wurde ein Passiv-Versuch durchgeführt. BALB/c-Mäuse wurden an den Tagen 0 und 21 mit 0,5 µg rekombinantem lipidiertem PspA alleine oder auf Alaun adsorbiert immunisiert oder mit rekombinantem, nicht-lipidiertem PspA, welches auf Alaun adsorbiert war, und ihnen wurde am Tag 35 Blut abgenommen. Die Anti-Seren wurden 1:3 oder 1:5 in Salzlösung verdünnt und 0,1 ml der Verdünnung wurde zwei Mäusen für jede Verdünnung i.p. injiziert. Eine 1/3-Verdünnung von normalem BALB/c-Mäuseserum wurde als Negativkontrolle verwendet. Anschließend wurden eine Stunde nach der passiven Immunisierung die Tiere i.v. mit dem WU2-Stamm von S. pneumoniae (15.000 CFU) herausgefordert. Die mit Anti-PspA-Serum passiv immunisierten Mäuse wurden im Vergleich zu den Mäusen, die Verdünnungen von normalen Mausseren erhielten, geschützt, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist.

Passiver Schutz von BALB/c gegenüber WU2

Immunisierende Formulierung		PspA-Dosis	Verdünnung	Tage bis zum
PspA-Antigen	Alaun	(µg/Tier)	des Serums	Tod nach der Herausforderung
pPA-321-L	Nein	0,5	3	4, >7
			15	2, 4
pPA-321-L	Ja	0,5	3	>7, >7
			15	4, >7
pPA-321-NL	Ja	0,5	3	2, 4
			15	>7, >7
kein	Nein	0	3	2, 2

Patentansprüche

1. Hybrides Nukleinsäuremolekül, welches eine erste Nukleinsäuresequenz, die eine Signalsequenz eines Lipoproteins codiert, und eine zweite Nukleinsäuresequenz, die ein reifes Protein codiert, welches zu dem von der ersten Nukleinsäuresequenz codierten Lipoprotein heterolog ist, umfaßt, wobei die erste Nukleinsäuresequenz an die zweite Nukleinsäuresequenz angrenzt, wenn das reife Protein natürlich lipidiert ist, oder die erste und die zweite Nukleinsäuresequenz durch ein eine Aminosäure codierendes Codon getrennt sind, wenn das reife Protein nicht natürlich lipidiert ist, wobei die Signalsequenz die Signalsequenz eines OspA-Proteins einer Borrelia-Spezies ist und wobei das reife Protein ein OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Spezies ist.

2. Hybrides Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die erste Nukleinsäuresequenz und die zweite Nukleinsäuresequenz in einem Verhältnis eines für eine Translation offenen Leserasters miteinander verbunden sind.

3. Hybrides Molekül nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das OspC-Lipoprotein dasjenige eines Stammes von B. burgdorferi ist.

4. Hybrides Molekül nach Anspruch 3, wobei der Stamm von B. burgdorferi aus den OspC-Subtyp-Familien ausgewählt ist.

5. Hybrides Molekül nach Anspruch 1, wobei das OspA-Protein dasjenige eines Stammes von B. burgdorferi ist.

6. Hybrides Molekül nach Anspruch 5, wobei der Stamm von B. burgdorferi aus den Stamm-Familien B31, ACA1 und Ip90 ausgewählt ist.

7. Expressionsvektor, welcher das hybride Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 unter der Kontrolle eines Promotors für die Expression des reifen Proteins enthält.

8. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, welches folgendes umfaßt:

Einbringen des Expressionsvektors nach Anspruch 7 in einen nicht-tierischen Wirtsorganismus und Bewirken der Expression des reifen Proteins von dem nicht-tierischen Wirtsorganismus.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der nicht-tierische Wirtsorganismus E. coli ist.

10. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Lipoproteins, welches folgendes umfaßt:
Konstruieren eines hybriden Nukleinsäuremoleküls, welches eine erste Nukleinsäuresequenz, die eine Signalsequenz eines Lipoproteins codiert, und eine zweite Nukleinsäuresequenz, die ein reifes Protein codiert, welches zu dem von der ersten Nukleinsäuresequenz codierten Lipoprotein heterolog ist, umfaßt, wobei die zweite Nukleinsäuresequenz an die erste Sequenz angrenzt, wobei die Signalsequenz die Signalsequenz eines OspA-Proteins einer Borrelia-Spezies ist und wobei das reife Protein ein OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Spezies ist,
Bilden eines Expressionsvektors, welcher das hybride Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines Promotors für die Expression des reifen Proteins enthält,
Einbringen des Expressionsvektors in einen nicht-tierischen Wirtsorganismus,
Bewirken der Expression des rekombinanten Lipoproteins durch den nicht-tierischen Wirtsorganismus,
Lysieren der Zellen des nicht-tierischen Wirtsorganismus,
Behandeln der lysierten Zellen mit einem oberflächenaktiven Stoff, welcher das rekombinante Lipoprotein bevorzugt gegenüber bakteriellen und anderen Proteinen selektiv löst und welcher in der Lage ist, eine Phasentrennung einer Detergensphase unter milden Bedingungen zu bewirken,
Bewirken einer Phasentrennung mit einer Detergensphase, welche gelöstes rekombinantes Lipoprotein enthält, einer wäßrigen Phase, die bakterielle und andere Proteine enthält, und einer festen Phase, die Zellrückstände enthält,
Abtrennen und Gewinnen der Detergensphase von der festen Phase und der wäßrigen Phase,
Inkontaktbringen der Detergensphase mit einer ersten Chromatographiesäule unter Bedingungen, die zur Bindung von Proteinen, die nicht das rekombinante Lipoprotein sind, an die Säule führen, um einen Durchfluß von der ersten Chromatographiesäule zu liefern, der das rekombinante Lipoprotein enthält, und Gewinnen des Durchflusses aus der ersten Chromatographiesäule,
Inkontaktbringen des Durchflusses aus der ersten Chromatographiesäule mit einer zweiten Chromatographiesäule unter Bedingungen, die zur Bindung des rekombinanten Lipoproteins an die zweite Chromatographiesäule bevorzugt gegenüber verunreinigenden Proteinen und Lipopolysacchariden, die durch die zweite Chromatographiesäule hindurchströmen, führen,
Eluieren des rekombinanten Lipoproteins aus der zweiten Chromatographiesäule unter Bereitstellung eines Eluats, welches das rekombinante Lipoprotein enthält, das im wesentlichen frei von Lipopolysaccharid und verunreinigenden Proteinen ist, und
Gewinnen aus dem Eluat.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die erste Nukleinsäuresequenz und die zweite Nukleinsäuresequenz in einem Verhältnis eines für eine Translation offenen Leserasters miteinander verbunden sind.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der oberflächenaktive Stoff TRITON^{TM}X-114 ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Behandeln der lysierten Zellen bei einer Temperatur von etwa 0°C bis etwa 10°C bewirkt wird, das resultierende Gemisch bis zu einer leicht erhöhten Temperatur von etwa 35°C bis etwa 40°C behandelt wird, um die Abtrennung der Detergensphase zu bewirken, und die Detergensphase von der wäßrigen Phase und der festen Phase mittels Zentrifugation abgetrennt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die erste Chromatographiesäule weiterhin mit einem Puffermedium bei einem pH-Wert, der eine Flüssigkeit liefert, die das rekombinante OspC-Lipoprotein aus der ersten Chromatographiesäule enthält, in Kontakt gebracht wird, während die anderen Proteine auf der ersten Chromatographiesäule gehalten werden und der Durchfluß aus dem weiteren Inkontaktbringen gesammelt und mit demjenigen von der ersten Stufe des Inkontaktbringens auf der ersten Chromatographiesäule vereinigt wird, und der vereinigte Durchfluß mit der zweiten Chromatographiesäule in Kontakt gebracht wird.

15. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Lyse des nicht-tierischen Wirtsorganismus durch Einfrieren und Auftauen des nicht-tierischen Wirtsorganismus bewirkt wird.

16. Rekombinant erzeugtes, isoliertes und gereinigtes Lipoprotein, hergestellt nach dem Verfahren von Anspruch 10, wobei das Lipoprotein die Signalsequenz eines OspA-Proteins einer Borrelia-Spezies und ein reifes OspC-Lipoprotein einer Borrelia-Spezies umfaßt.

17. Lipoprotein-Fusionsvektor PLF100 mit der ATCC-Hinterlegungsnummer 69750.

18. Verwendung einer Zusammensetzung, welche das Lipoprotein nach Anspruch 16 umfaßt, bei der Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe gegen oder die Behandlung von Borreliose.

19. Zusammensetzung zum Induzieren einer Immunantwort, welche das Lipoprotein nach Anspruch 16 umfaßt.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

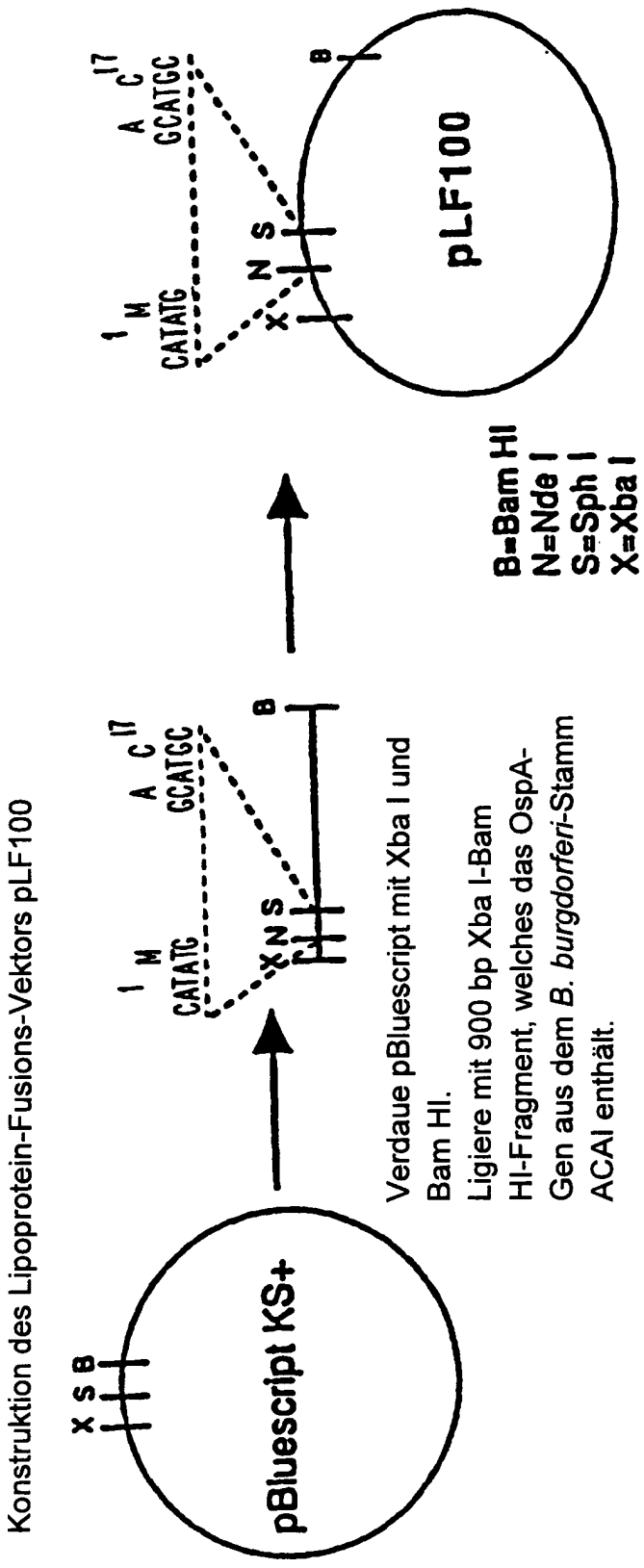
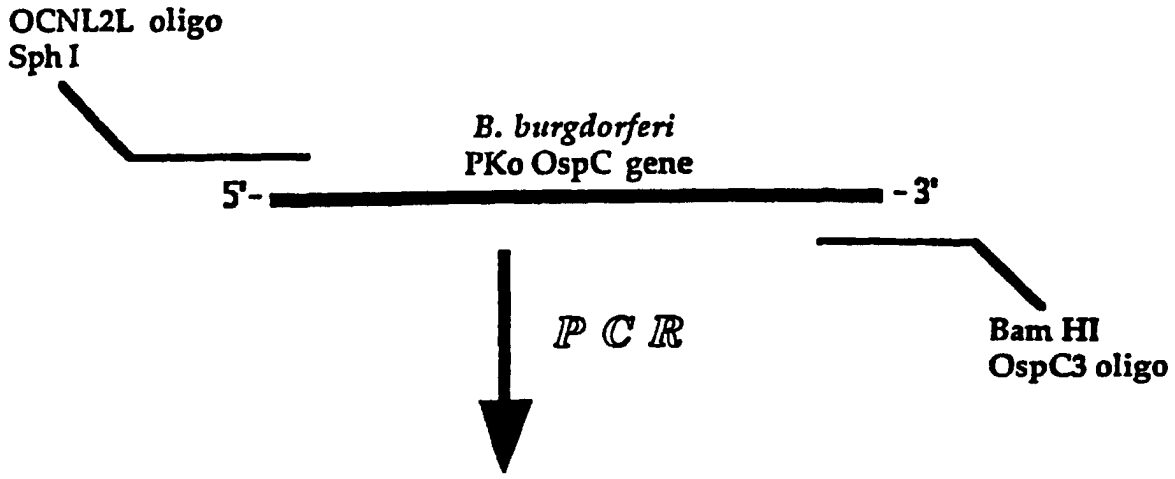
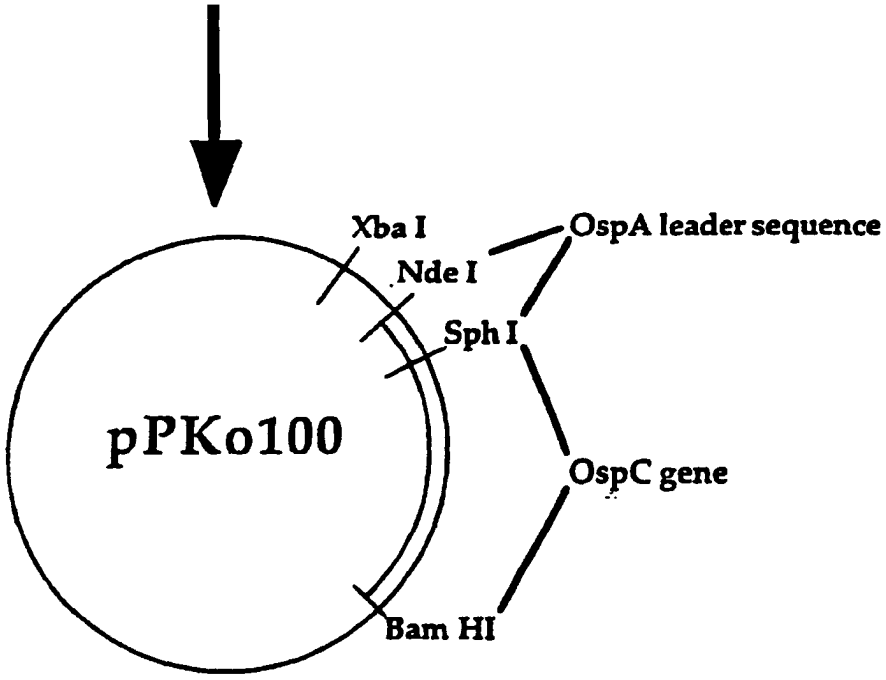


FIG. 2



-Verdaue PCR mit Sph I und Bam HI
-Verdaue pLF100 mit Sph I und Bam HI
-Inseriere OspC-PCR in pLF100 an der Sph I-Stelle am 3'-Ende der OspA-Signal-Sequen:



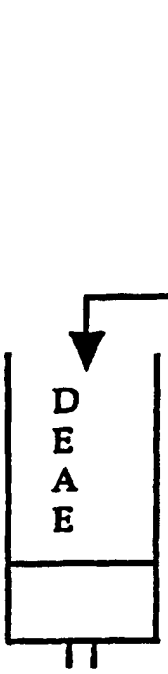
-Verdaue pPKo100 mit Nde I und Bam HI und isoliere das Fragment, welches die OspA-Leadersequenz enthält, die mit dem OspC-Gen fusioniert ist.
-Inseriere in pET9a, verdaut mit Nde I und Bam HI, um pPKo9a zu erzeugen

FIG. 3

-Suspendiere die Zellen in PBS

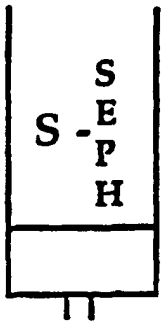
-Friere/taue, um die Zell-Lyse zu bewirken

-OspC-L extrahiert mit 0,3 % Triton X-114



-Geladen auf eine DEAE-Sepharose-CL6B-Säule

-OspC-L im Säulendurchfluß



-DEAE-Sepharose-Durchfluß auf pH 4,3 mit 1 M Zitronensäure

-Geladen auf eine S-Sepharose-Fast-Flow-Säule

-OspC-L bindet an die Säule unter diesen Bedingungen

-Wasche die Säule mit pH 5,5 Puffer

-Eluiere OspC-L mit pH 6,0 Puffer

FIG. 4

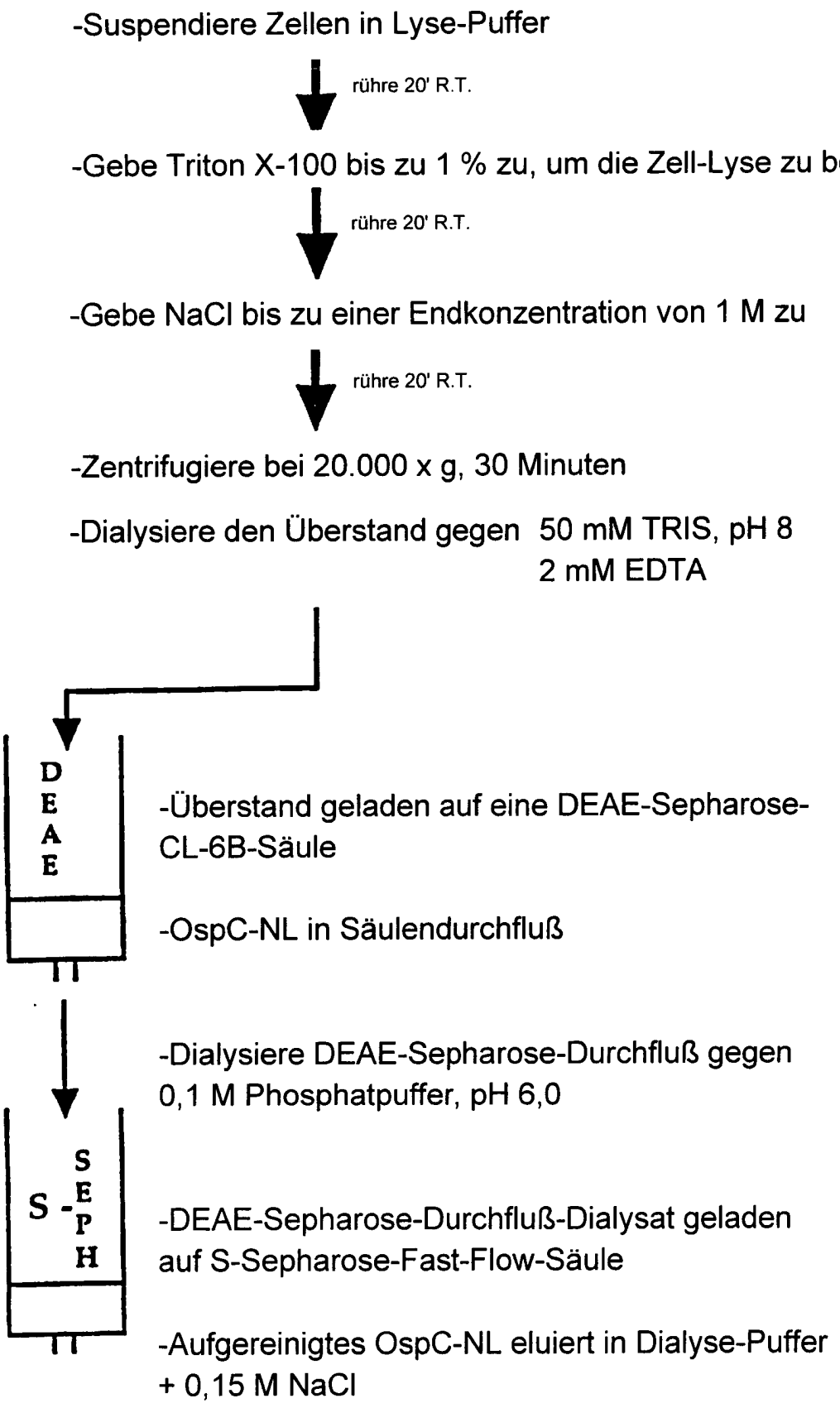
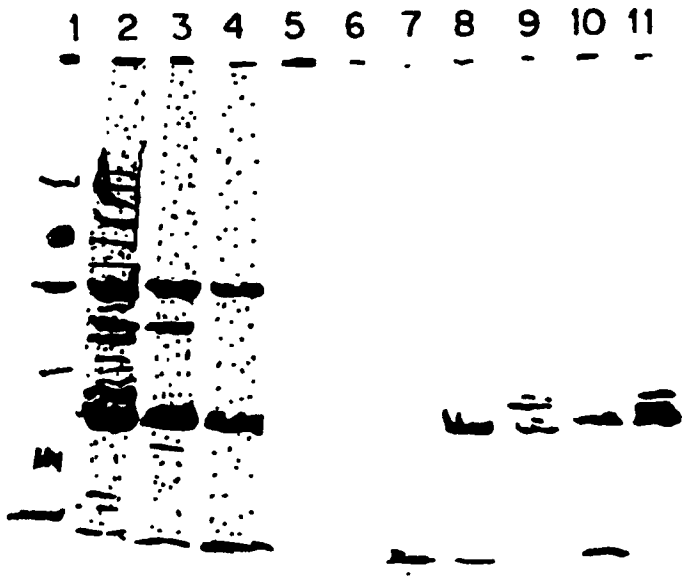
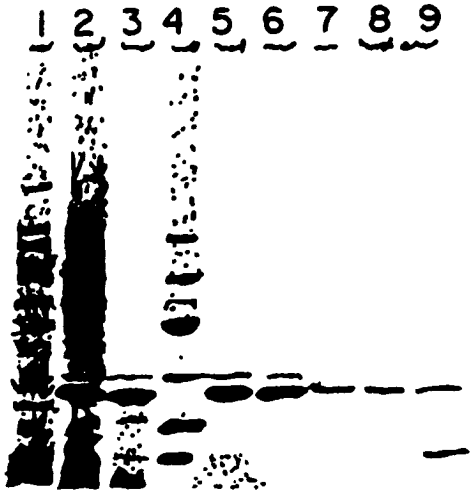

-Suspendiere Zellen in Lyse-Puffer
rühre 20' R.T.
-Gebe Triton X-100 bis zu 1 % zu, um die Zell-Lyse zu bewirken
rühre 20' R.T.
-Gebe NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M zu
rühre 20' R.T.
-Zentrifugiere bei 20.000 x g, 30 Minuten
-Dialysiere den Überstand gegen 50 mM TRIS, pH 8
2 mM EDTA
DEAE
-Überstand geladen auf eine DEAE-Sepharose-CL-6B-Säule
-OspC-NL in Säulendurchfluß
-Dialysiere DEAE-Sepharose-Durchfluß gegen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0
S-SEPH
-DEAE-Sepharose-Durchfluß-Dialysat geladen auf S-Sepharose-Fast-Flow-Säule
-Aufgereinigtes OspC-NL eluiert in Dialyse-Puffer + 0,15 M NaCl

FIG. 5



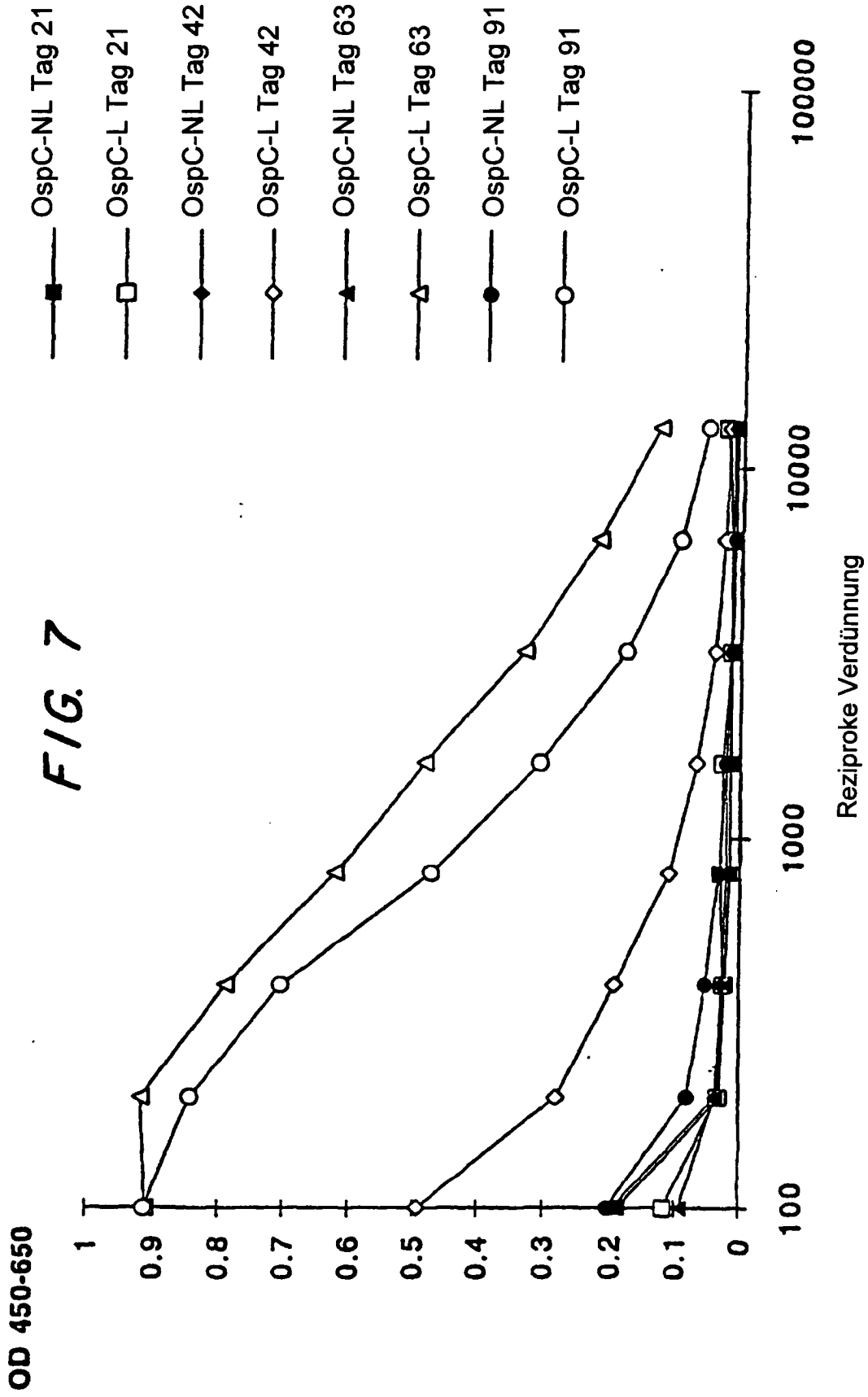
1 - Standards mit niedrigem Molekulargewicht
2 - OspC-L/BL21 Lysat
3 - OspC-L/BL21 Detergensphase
4 - OspC-L/BL21 DEAE Durchfluß/Wasch-Pool
5 - OspC-L/BL21 S-Sepharose-Durchfluß
6 - OspC-L/BL21 S-Sepharose-Waschgang
7 - OspC-L/BL21 S-Sepharose Eluent pH 5,5
8 - OspC-L/BL21 S-Sepharose Eluent pH 6,0
9 - OspC-L/BL21 S-Sepharose Eluent pH 7,5
10 - OspC-L/BL21 S-Sepharose Eluent pH 5,7
11 - OspC-L/BL21 S-Sepharose Eluent pH 7,5

FIG. 6



1 - OspC-NL/JM109 T = 0
2 - OspC-NL/JM109 T = 3 Stunden
3 - OspC-NL/JM109 DEAE Durchfluß/Wasch-Pool
4 - Standards mit niedrigem Molekulargewicht
5 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose-Ladung
6 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose-Durchfluß
7 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose-Waschgang
8 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose Eluent 150 mM NaCl
9 - OspC-NL/JM109 S-Sepharose Eluent 500 mM NaCl

FIG. 7


OspC-NL Tag 21
OspC-L Tag 21
OspC-NL Tag 42
OspC-L Tag 42
OspC-NL Tag 63
OspC-L Tag 63
OspC-NL Tag 91
OspC-L Tag 91
OD 450-650
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
100
1000
10000
100000
Reziproke Verdünnung

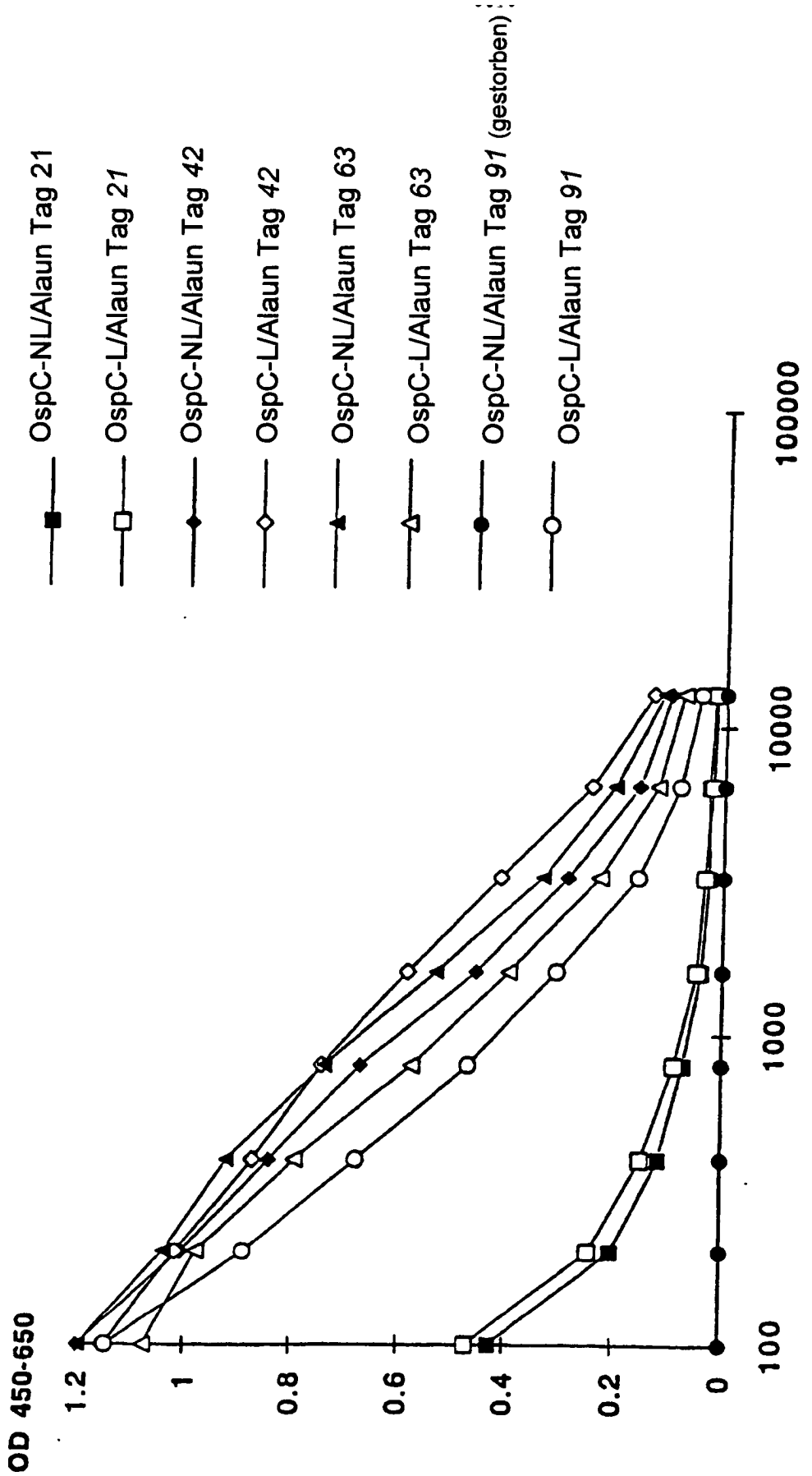
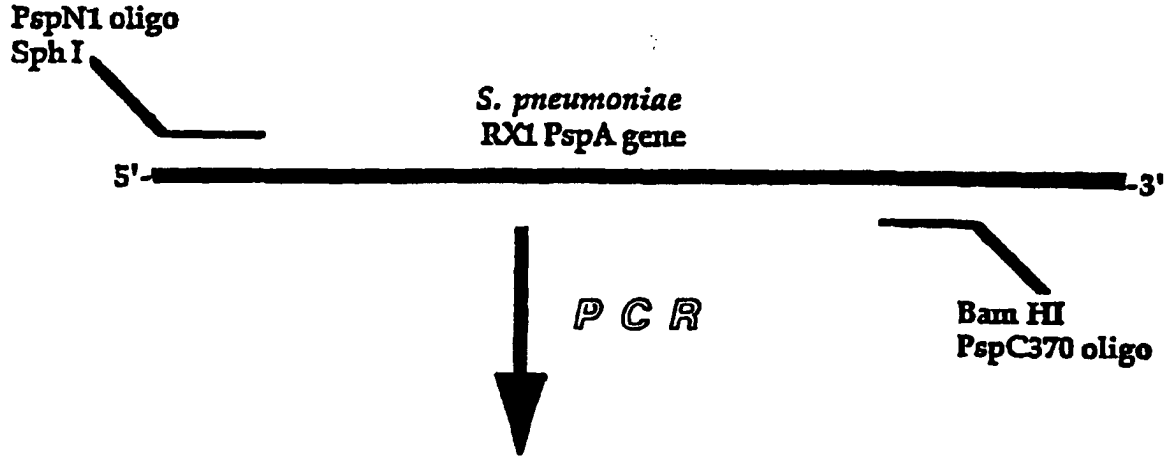
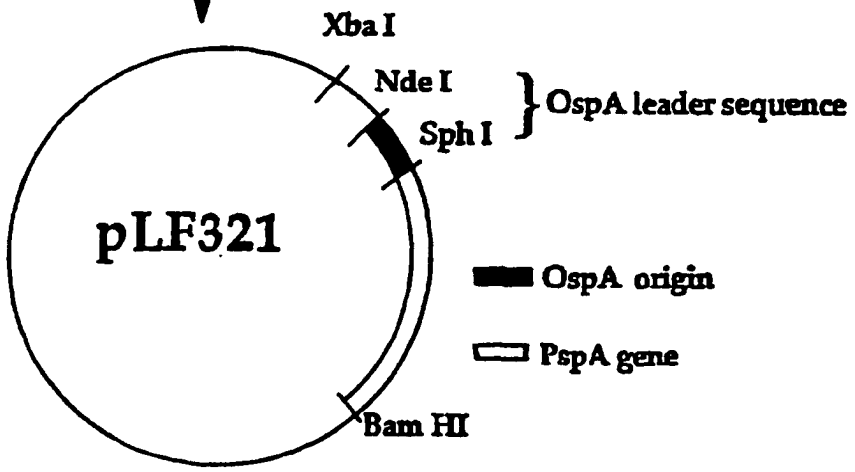

OspC-NL/Alaun Tag 21
OspC-L/Alaun Tag 21
OspC-NL/Alaun Tag 42
OspC-L/Alaun Tag 42
OspC-NL/Alaun Tag 63
OspC-L/Alaun Tag 63
OspC-NL/Alaun Tag 91 (gestorben)
OspC-L/Alaun Tag 91
OD 450-650
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
100
1000
10000
100000
Reziproke Verdünnung

FIG. 8

FIG. 9



-Verdaue PCR mit Sph I und Bam HI
-Verdaue pLF100 mit Sph I und Bam HI
-Inseriere PspA PCR in pLF100 an der Sph I-Stelle am 3'-Ende der OspA-Signal-Sequenz



-Verdaue pLF321 mit Nde I und Bam HI und isoliere das Fragment, das die mit dem PspA-Gen fusionierte OspA Leadersequenz enthält
-Inseriere in pET9a, das mit Nde I und Bam HI verdaut wurde, um pPA321-L zu erzeugen

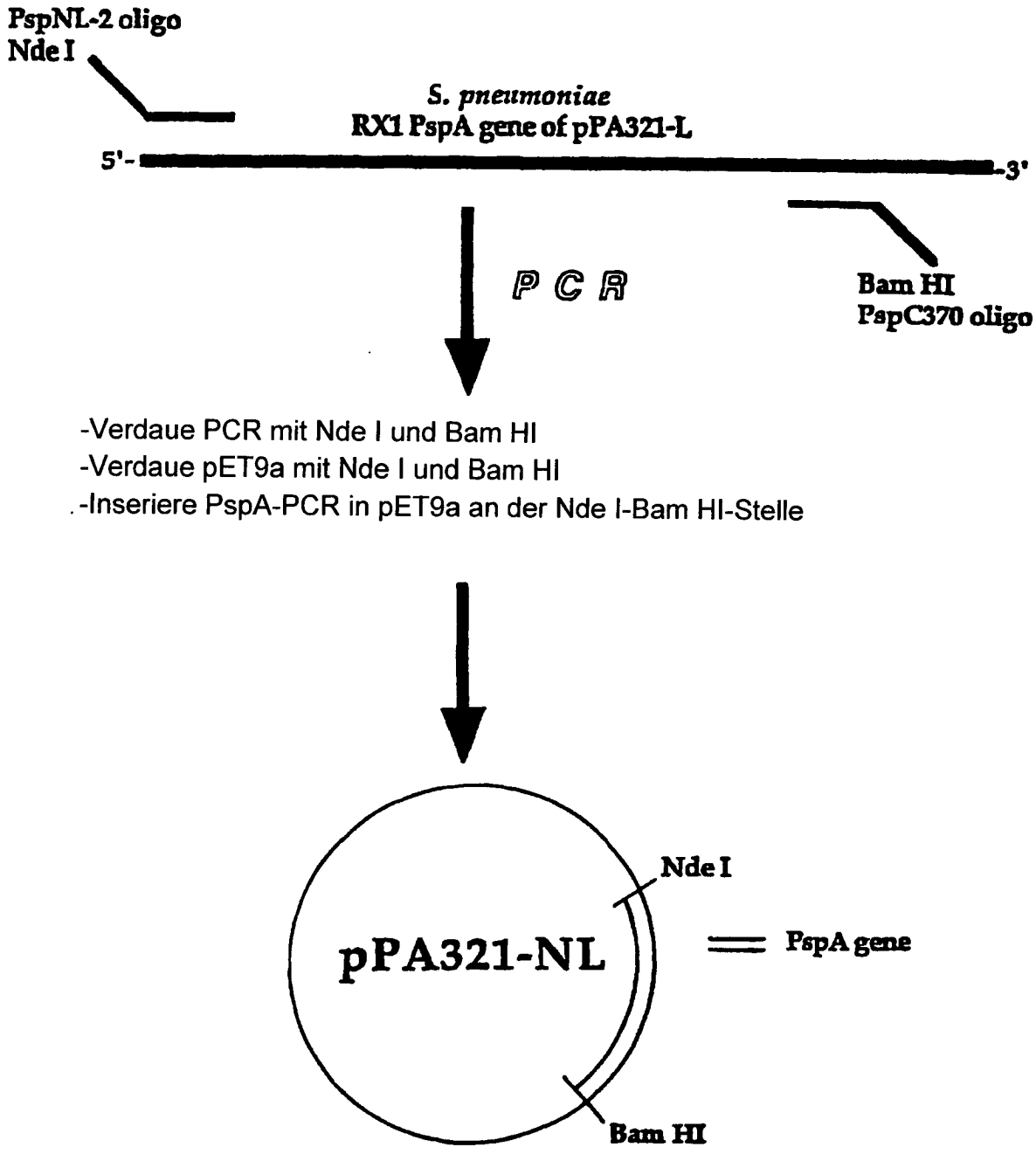

PspNL-2 oligo
Nde I
S. pneumoniae
RX1 PspA gene of pPA321-L
5'-
-3'
P C R
Bam HI
PspC370 oligo
-Verdaue PCR mit Nde I und Bam HI
-Verdaue pET9a mit Nde I und Bam HI
-Inseriere PspA-PCR in pET9a an der Nde I-Bam HI-Stelle
pPA321-NL
Nde I
PspA gene
Bam HI

FIG. 10

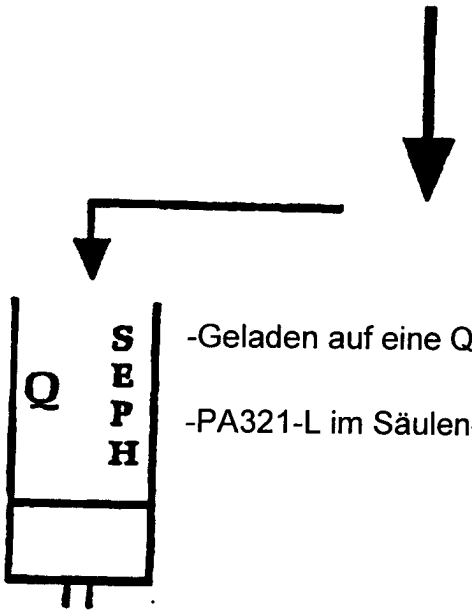
AUFREINIGUNG VON PA321-L

-Suspendiere die Zellen in PBS

-Friere/taue, um die Zell-Lyse zu bewirken

-PA321-L extrahiert mit 0,3 % - 1 % Triton-X-114

-pH ist eingestellt auf 4,0



-Geladen auf eine Q-Sepharose-Fast-Flow-Säule

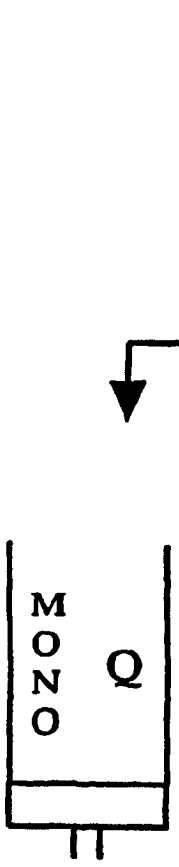
-PA321-L im Säulendurchfluß

FIG. 11

-Suspendiere Zellen in PBS

-Friere/taue, um die Zell-Lyse zu bewirken

-Zell-Lysat wird zentrifugiert; Zellüberstand wird aufbewahrt



- Geladen auf eine MonoQ-Säule bei pH 7,5

-Säule wird mit Ladepuffer gewaschen
(50 mM Tris 2 mM EDTA 10 mM NaCl pH 7,5)

-Säule wird mit Ladepuffer gewaschen, der 100 mM NaCl enthält

-PA321-NL wird mit Ladepuffer eluiert, der 200 mM NaCl enthält

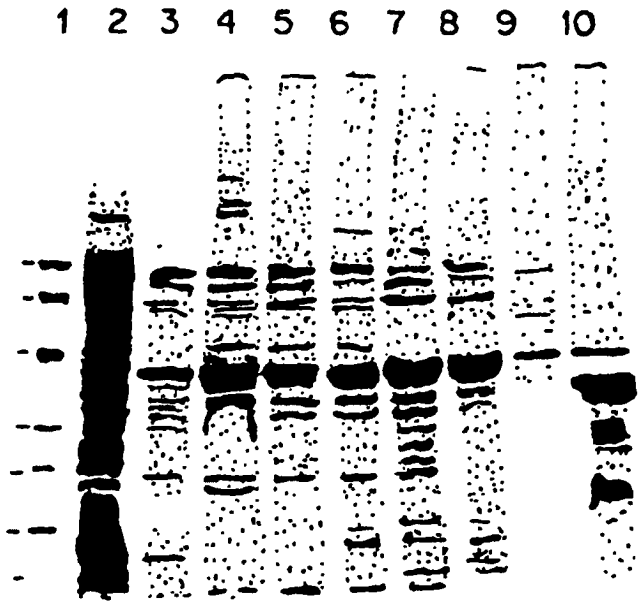
-verbleibende Kontaminanten werden mit Ladepuffer entfernt, der 1 M NaCl enthält

AUFREINIGUNG VON PA321-NL

FIG. 12

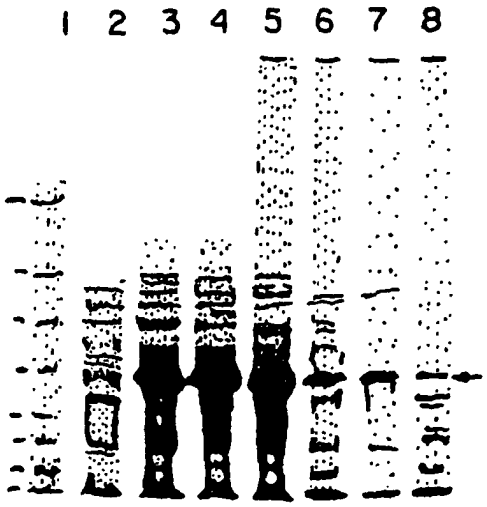
FIG. 13

PA321-L Aufreinigungs-Fraktionen



1 - Vorgefärbte Standards mit niedrigem Molekulargewicht (106, 80, 49,5, 32,5, 27,5 und 18,5 kDa)
2 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; T = 0
3 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; T = 1 Stunde nach der Zugabe von IPTG
4 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; T = 2 Stunden nach der Zugabe von IPTG
5 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; T = 3 Stunden nach der Zugabe von IPTG
6 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; T = 4 Stunden nach der Zugabe von IPTG
7 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; Zell-Lysat
8 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; Wäßrige Phase
9 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; Detergensphase
10 - PA321-L/BL21(DE3)pLysS; Pellet

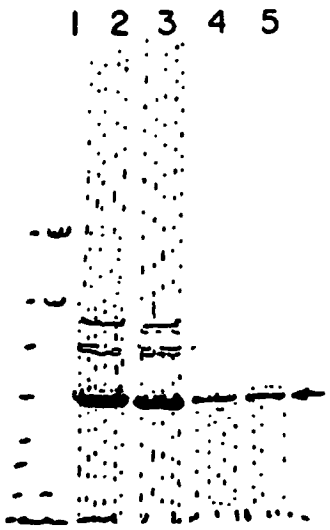
FIG. 14



PA321-NL Aufreinigungs-Fraktionen

1 - Vorgefärbte Standards mit breitem Molekulargewicht (200, 118, 78, 47,1, 31,4, 25,5, 18,8 und 8,3 kDa)
2 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; T = 0
3 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; T = 1 Stunde nach der Zugabe von IPTG
4 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; T = 2 Stunden nach der Zugabe von IPTG
5 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; T = 3 Stunden nach der Zugabe von IPTG
6 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; Zell-Lysat
7 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; Pool aus Zellüberstand und Pelletwaschgang
8 - PA321-NL/BL21(DE3)pLysS; Pellet

FIG. 15



PA321-NL und PA321-L Aufreinigungsproben

1 - Vorgefärbte Standards mit breitem Molekulargewicht (200, 118, 78, 47,1, 31,4, 25,5, 18,8 und 8,3 kDa)
2 - PA321-NL MonoQ 0,2 M NaCl Eluent, lot# 354A-146
3 - PA321-NL MonoQ 0,2 M NaCl Eluent, lot# 354A-147
4 - PA321-L Q-Sepharose pH 4,0 Durchfluß, lot# 354A-148
5 - PA321-L Q-Sepharose pH 4,0 Durchfluß, lot# 354A-150