



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 11 560 T2** 2005.08.18

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 112 747 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 560.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 204 630.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **19.12.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.07.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.08.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 39/112**

**A61P 31/04, C12N 1/20**

(30) Unionspriorität:

**99204564 28.12.1999 EP**

(73) Patentinhaber:

**Akzo Nobel N.V., Arnheim/Arnhem, NL**

(74) Vertreter:

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

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Nuijten, Petrus Johannes Maria, 5831 RD  
Boxmeer, NL; Witvliet, Maarten Hendrik, 5807 BW  
Oostrum, NL**

(54) Bezeichnung: **Salmonella Impfstoff, der keinen Antikörper gegen Flagellin oder gegen Flagella induziert**

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

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

### Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Salmonella Bakterien zur Verwendung in einem Impfstoff, Impfstoffe basierend auf diesen Bakterien, die Verwendung solcher Impfstoffe zur Herstellung eines Impfstoffes und Verfahren zur Herstellung solcher Impfstoffe.

**[0002]** Bakterien des Genus Salmonella sind berüchtigt für ihre Pathogenität in sowohl Menschen wie auch Tieren. Alleine in den USA übersteigt auf einer Jahresbasis die Zahl der Menschen, die an Salmonella Infektionen leiden, zwei Millionen Fälle. In den meisten Fällen wird die Infektion durch kontaminierte Nahrung verursacht. Wohlbekannte Infektionsquellen sind Eier (von sowohl Enten wie auch Hühnern), Eier-enthaltende Produkte und nicht ausreichend erhitztes Geflügel- und Schweinefleisch. Vor allem in Säuglingen, Kleinkindern, älteren Leuten und immukompromittierten Patienten ist die Fähigkeit solche Infektionen zu bewältigen gering. Vor allem in diesen Gruppen ist die jährliche Todesrate aufgrund von Salmonella Infektionen hoch. Während der letzten Jahrzehnte führte die effizientere Grosstierhaltung zu einer gewaltigen Zunahme in Tierdichte. Als Folge davon wird eine Zunahme in der Zahl von durch infizierte Nahrung verursachten Infektionen in Tieren und anschliessend von Infektionen in Menschen beobachtet. Es ist offensichtlich, dass Tiere die Hauptquelle von Salmonella Infektionen sind. Diese Quelle ist äusserst schwer zu kontrollieren. Zuallererst verursachen Salmonella Infektionen in den meisten Fällen in gesunden, ausgewachsenen Tieren keine ernsthafte Krankheit; diese Tiere können das Bakterium für einen längeren Zeitraum tragen. Während dieser Zeit scheiden sie das Bakterium in ihrem Mist aus. Dies macht es schier unmöglich, eine Infektion in den verletzlicheren, jüngeren Tieren zu verhindern. Zweitens kolonisieren viele Salmonella Spezies mehrere verschiedene Wirtstierspezies. Gewisse Salmonella Spezies verursachen Primärinfektionen in spezifischen Wirten, während andere Salmonella Spezies gar nicht restriktiv sind. *S. typhi* und *paratyphi* werden oft als primäres infektiöses Mittel mit Infektionen im Mensch assoziiert. *S. typhi* verursacht Diarrhoe und als Folge davon Dehydrierung. Diese Infektion wird sehr oft in tropischen Gebieten gefunden. *S. dublin* wird mit Rindern, vor allem Jungtieren, in Verbindung gebracht, wo es in über 50% der Fälle tödliche Infektionen verursacht. *S. abortusequi* verursacht Aborte in Pferden. *S. abortus-ovi* verursacht Aborte in Schafen. *S. choleraesuis* ist die Ursache von tödlicher Diarrhoe in jungen Schweinen. *S. typhimurium* und *S. enteritidis* verursachen Salmonellosis in Geflügel, Schweinen, Rinder und Säugetieren. *S. arizonae* verursacht ebenso Erkrankung in Truthähnen. Auch nicht-essbare Tiere wie zum Beispiel Reptilien leiden an Salmonella Infektionen, wie zum Beispiel *S. arizonae*.

**[0003]** Es besteht offensichtlich ein Bedarf an effizienten Salmonella Impfstoffen. Impfstoffe werden benötigt, um Menschen vor Salmonella Infektionen, die von Mensch zu Mensch übertragen werden, zu schützen. Ebenso werden Impfstoffe benötigt, um Menschen vor Nahrungsmittel-übertragenen Salmonella Infektionen zu schützen. Und schliesslich werden Impfstoffe benötigt, um Tiere vor Salmonella Infektionen zu schützen.

**[0004]** Gegenwärtig sind einige Impfstoffe gegen verschiedene Salmonella Spezies kommerziell erhältlich. Diese Impfstoffe teilen jedoch einen ernsten Nachteil, obwohl sie als Impfstoff betrachtet manchmal effizient sind. Sie induzieren im allgemeinen eine Antikörper Population, die derjenigen einer Infektion mit Wildtyp Bakterien gleichkommt, da sie die gleiche antigene Ladung wie das Wildtyp Bakterium besitzen. Deshalb sagt eine Analyse der Antikörper im Serum eines Salmonella-positiven Tieres nicht aus, wieso das Tier positiv ist. Dies kann aufgrund der Impfung sein, kann aber genauso durch eine Infektion mit einem virulenten Feldstamm verursacht sein. Deshalb wird ein Tier, falls es Salmonella-positiv ist, als infiziert betrachtet.

**[0005]** Demzufolge wäre es wünschenswert einen sogenannten Marker-Impfstoff zu haben. Ein Marker-Impfstoff ist ein Impfstoff, der von einer Wildtyp-Infektion unterschieden werden kann, z. B. aufgrund eines charakteristischen Antikörper Panels, das von einem durch eine Wildtyp-Infektion induzierten Antikörper-Panel verschieden ist. Ein unterschiedlicher Antikörper-Panel wird z. B. induziert wenn ein immunogenes Protein, das auf einem Wildtyp-Bakterium vorhanden ist, in einer Mutante, die zur Impfung verwendet wird, nicht vorhanden ist: der Wirt wird dann nach der Impfung keine Antikörper gegen das Protein herstellen.

**[0006]** Ein Markerantigen hat mindestens folgende Charakteristika:

- es kann ohne die Lebensfähigkeit des Bakteriums ernsthaft zu beeinträchtigen gelöscht werden.
- es induziert Antikörper falls vorhanden.
- es trägt, falls vorhanden, nicht zur Immunogenität des Bakteriums bei.
- seine Abwesenheit trägt vorzugsweise zur Attenuierung bei.

**[0007]** Auf der Suche nach geeigneten Markerantigenen, sollten alle bekannten Salmonella Antigene in Betracht gezogen werden. Ein bekanntes Antigen, das bei allen Wildtyp Salmonella Spezies mit Ausnahme gewisser *S. pullorum* und *gallinarum* Unterspezies gefunden wird, ist das Flagellum. Beispiele von Salmonella

Spezies, die Flagella in ihrer Wildtyp-Form tragen, sind *S. typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, *dublin*, *typhi*, *abortus-ovi*, *abortusequi*, *paratyphi A* und *B*, *derby*, *hadar*, *heidelberg*, *agona* und *arizonae*. Flagella sind lange Strukturen, die von der Zelloberfläche hervorrage, und die eine wichtige Rolle in der Motilität und Invasion gewisser Wirtszellen spielen. Flagella bestehen aus langen Polymeren des Proteins genannt Flagellin. Es ist bekannt, dass diese Flagella hohe Antikörperrniveaus induzieren. Es ist ebenso bekannt, dass die Abwesenheit von Flagella die Lebensfähigkeit des Bakteriums ausserhalb des Wirtes nicht wesentlich beeinträchtigt: Flagella-lose Mutanten sind von praktisch allen *Salmonella* Spezies bekannt und können in vitro gezüchtet werden. Nichtsdestotrotz wurden flagellare Proteine von *Salmonella* nie als geeignete Marker in Betracht gezogen, da sie nicht oder nur teilweise drei der vier Marker-Voraussetzungen erfüllen:

- obwohl für das Überleben ausserhalb des Wirtes nicht wesentlich, spielen sie eine bedeutende Rolle im Überleben und Persistenz der Bakterien in Wirt-Makrophagen, die in der Induktion von Immunität involviert sind. (Methner, U. und Barrow, P. A., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110: 391–396 (1997), Weinstein et al., Infect. Immun. 46: 819–825 (1984)).
- sie tragen bedeutend zu der Immunogenität des Bakteriums bei, ein Grund wieso sie sogar als Trägerproteine für kurze heterologe Aminosäuresequenzen verwendet werden (Joys, T. M., SAAS Bulletin: Biochem & Biotech. 4: 56–59 (1991), Newton, S. M. C. et al., Science 244: 70–72 (1989)).
- ihre Abwesenheit trägt nicht zur Attenuierung bei (Lockman, H. A. und Curtiss, R., Infect. & Immun. 58: 137–143 (1990), Methner, U. und Barrow, P. A., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110: 391–396 (1997)).
- flagellierte *Salmonella* Bakterien hemmen die Bindung von anderen flagellierten *Salmonellas*. Flagella-lose *Salmonella* Bakterien zeigen jedoch ein herabgesetztes Hemmpotential gegenüber anderen flagellierten *Salmonellas* und erhöhen deshalb sogar den insgesamten Grad der *Salmonella* Infektion (Methner, U. und Barrow, P. A., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110: 391–396 (1997), Weinstein et al., Infect. Immun. 46: 819–825 (1984)).

**[0008]** Im Englischen Patent GB 1,109,179 beschrieb Ephraim Saul Anderson Impfstoffe auf der Basis von inaktivierten *Salmonella typhi* oder *paratyphi*, die frei von Flagella sind. Diese Impfstoffe wurden ohne Adjuvans gegeben. Wie von Anderson einige Jahre später beschrieben wurde (Wandan, M. et al., 1975, Bull. World Health Organisation), stellen diese Impfstoffe keinerlei Schutz bereit. Zudem betonte dieses Schriftstück einmal mehr die Wichtigkeit von Flagella in Impfstoffen.

**[0009]** Aufgrund dieser kombinierten Gründe, wurde das Flagellum nie als geeignetes, lösches Markerantigen für *Salmonella* Impfstoffe in Betracht gezogen.

**[0010]** Überraschend wurde nun gefunden, dass die Abwesenheit von Flagella im Gegensatz zur allgemeinen Annahme das Impfpotential von *Salmonella* nicht beeinträchtigt. Dies ist besonders überraschend hinsichtlich der Tatsache, dass in Wildtyp *Salmonella* infizierten Tieren grosse Mengen an Antikörper gegen Flagella gefunden werden, was einmal mehr deren Antigenität beweist.

**[0011]** Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Bakterien des Genus *Salmonella* bereitzustellen, die, wenn sie in inaktiver Form zusammen mit einem Adjuvans vorkommen, in ihrer Wildtyp-Form Flagella tragen aber nicht mehr fähig sind, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren, zur Verwendung in einem Impfstoff für den Schutz von Menschen oder Tieren gegen *Salmonellosis*.

**[0012]** Flagelline sind Proteine von ungefähr 500 Aminosäuren, die mehrere antigenen Determinanten umfassen, d. h. es bestehen mehrere Regionen auf den Flagellinen gegen welche Antikörper im Wirtstier hervorgerufen werden. Diese antigenen Determinanten wurden von T. M. Joys (Joys, T. M., SAAS Bulletin: Biochem & Biotech. 4: 56–59 (1991) identifiziert und lokalisiert. Zwecks der vorliegenden Erfindung werden Bakterien, die nicht mehr fähig sind, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren, als Bakterien betrachtet, die Flagellin oder Flagella, welches nach wie vor alle antigenen Determinanten besitzt, nicht umfassen. Es ist nicht notwendig, alle antigenen Determinanten zu entfernen: es genügt, eine der antigenen Determinanten zu löschen. Ein Screening nach Antikörper gegen diese antigene Determinante im Serum von seropositiven Tieren würde dann eine Diskriminierung zwischen Marker-geimpften und Wildtyp-infizierten Tieren erlauben. Solche Antikörper würden in geimpften Tieren nicht gefunden werden, während sie in natürlich infizierten Tieren vorhanden wären.

**[0013]** Ein Screening kann leicht mittels einfacher diagnostischer Hilfsmittel routinemässig wie im folgenden beschrieben durchgeführt werden.

**[0014]** Viel ist gegenwärtig über die Synthese von Flagellin und die anschliessende Reifung zu Flagella be-

kannt. (Z. B. in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*. Kapitel 10: Flagella and motility. Hrsg. Frederick C. Neidhardt et al. 2te Ausgabe ISBN 1-55581-084-5 (1996) und in Macnab, R. M.; Genetics and biogenesis of bacterial flagella (Annual Review of Genetics 26: 131–158 (1992)). Der flagellare Biogeneseprozess benötigt die konzertierte Wirkung einer grossen Zahl von Genen, nicht nur des Flagellin-kodierenden Gens, aber ebenso einer grossen Zahl von Genen, die in der Synthese des Flagellums und des flagellaren Motors involviert sind. Prinzipiell gibt es zwei Vorgehen um Bakterien gemäss der vorliegenden Erfindung herzustellen. Zuerst können Mutationen im Gen, das das Flagellin-Protein kodiert, erstellt werden, um eine oder mehrere antigenen Determinanten zu mutieren. Zweitens können ein oder mehrere Gene, die in der Biogenese des Flagellums involviert sind, mutiert werden. Dies verhindert die Biosynthese von Flagellin oder sogar des gesamten Flagellums und in vielen Fällen sogar den Transport des Flagellins durch die bakterielle Membran. Im Falle dass keine Flagella hergestellt werden, sind die antigenen Determinanten, die durch die spezifische Faltung des Flagellins in Flagella bestimmt werden, nicht vorhanden. Falls das Flagellin selber nicht durch die Membran transportiert wird und demzufolge innerhalb des Bakteriums verbleibt, wird keine Induktion von Antikörpern gegen Flagellin auftreten. Alle Arten von Genen oder Gen-Clustern, von denen bekannt ist, dass sie im Zusammenbau und Export, wie zum Beispiel dem morphologischen Assembly Pathway und einem Flagellum-spezifischen Export Pathway, involviert sind, können Ziele für eine Mutation darstellen. Diese führen alle entweder zu Bakterien, denen Flagellin oder zumindest Flagella fehlen. Der Klarheit halber werden alle Wege, die im gesamten Syntheseprozess der endgültigen Flagella involviert sind, im weiteren als flagellare Biogenese Wege bezeichnet.

**[0015]** Demzufolge ist das Bakterium in einer bevorzugten Variante aufgrund einer Mutation in einem Gen des flagellaren Biogenese Weges nicht fähig, Antikörper gegen mindestens eine antigenen Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren.

**[0016]** Von einem praktischen Standpunkt her, kann es jedoch wünschenswert sein, das ganze (oder Teil des) Flagellin-Gen(s) von den im Impfstoff zu verwendenden Bakterien, einfach mittels Löschung des das flagellare Protein kodierenden Gens, zu löschen. Die Gene, die die flagellaren Proteine der verschiedenen *Salmonella* Spezies kodieren, sind bekannt. Sie sind alle eng verwandt und demzufolge in höchstem Masse homolog. Flagellin Gene wurden u. a. für *Salmonella enterica* (Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 2552–2556 (1994)), *Salmonella enteritidis* (Selander, R. K. et al., J. Bacteriol. 174, 3587–3592 (1992)), *Salmonella dublin* (Masten, B. J. and Joys, T. M., J. Bacteriol. 175, 5359–5365 (1993)), *Salmonella typhimurium* (de Vries, N. et al., Appl. Environ. Microbiol. 64, 5033–5038 (1998)), *Salmonella abortus-equi* (Hanafusa, T. et al., Mol. Gen. Genet. 236, 260–266 (1993)) beschrieben. Flagellin Gene von neuen *Salmonella* Spezies können leicht basierend auf ihrer Homologie mit allen existierenden und bekannten *Salmonella* Flagellin Genen gefunden werden: Standard Hybridisierungs-Methoden genügen, um das Flagellin-Gen zu lokalisieren.

**[0017]** Es gibt zwei Flagellin Gene in Wildtyp Flagellum tragenden *Salmonella* Bakterien. Nur eines dieser Gene wird angeschaltet, d. h. produziert Flagellin zu jeder Zeit. Aufgrund eines Mechanismus genannt flagellare Phasenvariation tauschen die Gene auf einer Zeitskala in der Grössenordnung von  $10^3$  bis  $10^5$  Generationen die Rollen sodass das nicht-exprimierte exprimiert wird und umgekehrt. ((Z. B. beschrieben in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*. Kapitel 10: Flagella and motility. Hrsg. Frederick C. Neidhardt et al. 2te Ausgabe ISBN 1-55581-084-5 (1996)). Um zu vermeiden, dass Stämme gemäss der Erfindung, nach einer gewissen Generationenzahl Flagellin zu exprimieren beginnen, müssen beide Flagellin-Gene nicht funktionstüchtig gemacht werden. Andererseits genügt es das Flagellin Gen, das zu der Zeit exprimiert wird, auszuschalten, falls der Phasen-Umschalt-Mechanismus nicht funktionstüchtig gemacht wird.

**[0018]** Ein nicht funktionstüchtiges Gen ist ein Gen, das nicht mehr ein Flagellin kodiert. Dies kann ein Gen sein, von dem ein Teil der Kodierungssequenz, die eine antigenen Determinante kodiert, entfernt wurde.

**[0019]** Ein möglicher Weg, das Flagellin-Gen oder jegliches der anderen bekannten Gene, die in der Flagellin-Biosynthese involviert sind, nicht-funktionstüchtig zu machen, geschieht mittels klassischer Verfahren wie zum Beispiel Behandlung der Wildtyp-Bakterien Flagella-produzierenden Bakterien mit mutagenen Wirkstoffen, wie zum Beispiel Basenanalogen, Behandlung mit ultraviolett Licht oder Temperaturbehandlung (Anderson, P. 1995. Mutagenesis, S. 31–58 in Methods in Cell Biology 48. H. F. Epstein and D. C. Shakes (Hrsg)). Andere Verfahren zur Herstellung von Flagella-losen Mutanten verschiedener Bakterien, von welchen der Wildtyp Flagella besitzt, wurden u. a. von Liu, S. L. et al. (Infect. Immun. 1988 Aug; 56(8): 1967–73), Haas, R. et al., (Mol. Microbiol. 1993 May; 8(4): 753–60) und Graf, J. et al. (J. Bacteriol. 1994 Nov; 176(22): 6986–91) beschrieben.

**[0020]** Die Selektion für Flagella-lose Bakterien kann sehr leicht mittels lichtmikroskopischer Analyse auf die

Absenz oder Präsenz von Flagella erfolgen. Die Selektion für Bakterien, denen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella fehlt, kann mittels Bindungsassays mit monoklonalen Antikörpern gegen Flagellin oder Flagella erfolgen. Solche anti-flagellaren oder anti-flagellinen monoklonalen Antikörper können gemäss Standardmethoden, u. a. durch Immunisieren (mit Flagella) von Inzucht Mäusen mittels wohlbekannter Verfahren (Kohler und Milstein, Nature, 256, 495–497, 1975) hergestellt werden. So erhaltene Monoklonale können in Bindungsassays mit den mutierten Bakterien verwendet werden und diese Bakterien, die nicht an ein spezifisches Monoklonal binden, sind die Bakterien, denen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella fehlt.

**[0021]** Die Beschaffenheit der mittels klassischer Mutationsverfahren verursachten Mutation ist unbekannt. Dies kann eine Punktmutation sein, die, obwohl dies unwahrscheinlich geschieht, möglicherweise zum Wildtyp revertieren kann. Deshalb stellt eine Transposon Mutagenese eine gute Alternative dar. Mutation mittels Transposon Mutagenese ist ebenso ein in Fachkreisen wohlbekanntes Mutagenese-Verfahren. Dies ist eine Mutation, die an einer lokalisierten Stelle im Chromosom vollzogen wird.

**[0022]** Eine Möglichkeit, eine Mutation an einer vorbestimmten Stelle eher vorsätzlich als zufallsmässig einzuführen, wird durch die rekombinante DNA-Technologie angeboten. Solch eine Mutation kann eine Insertion, eine Deletion, eine Ersetzung eines Nukleotides durch ein anderes oder eine Kombination davon darstellen, mit dem Vorbehalt, dass das mutierte Gen nicht mehr funktionstüchtiges Flagellin kodiert. Solch eine Mutation kann z. B. durch Deletion einer Zahl von Basenpaaren hergestellt werden. Sogar sehr kleine Deletionen wie zum Beispiel Strecken von 10 Basenpaaren können Flagellin bereits nicht-funktionstüchtig machen. Sogar die Deletion eines einzigen Basenpaares kann bereits zu einem nicht-funktionstüchtigen Flagellin führen, da als Folge solch einer Mutation die anderen Basenpaare nicht mehr im korrekten Leserahmen sind. Jede Deletion oder Insertion einer durch drei unteilbaren Anzahl von Basenpaaren verursacht eine Verschiebung des Leserahmens (Frameshift). Mehr bevorzugt wird eine längere Strecke entfernt, z. B. 100 Basenpaare. Noch mehr bevorzugt wird das ganze Flagellin Gen gelöscht. Es ist klar ersichtlich, dass insbesondere Mutationen, die ein Stop-Codon im offenen Leserahmen einführen, oder Mutationen, die einen Frameshift im offenen Leserahmen verursachen, äusserst geeignet sind, einen Stamm, der nicht mehr Flagellin kodiert, zu erhalten. Orstspezifische Mutagenese ist das ausgewählte Verfahren um ein Flagellin-Gen, dem eine oder mehrere spezifische antigene Determinanten fehlt, herzustellen. Aufgrund der von Joys (Joys, T. M., SAAS Bulletin Biochem & Biotech. 4: 56–59 (1991)) erstellten Karten der antigenen Determinanten können mutante Flagellin-Gene erstellt werden, von denen eine oder mehrere spezifische antigene Determinanten entfernt wurden. Alle rekombinanten DNA-Methoden zur Konstruktion von Flagellin-negativen Mutanten sind wohlbekannte Standardverfahren. Diese betreffen das Klonieren der Flagellin-Gene, Modifikation der Gensequenz mittels ortsspezifischer Mutagenese, Restriktionsenzym-Abbau gefolgt von Religation oder PCR-Vorgehen und den anschliessenden Ersatz des Wildtyp Flagellin-Gens mit dem mutierten Gen (Allelen-Austausch oder Allelen-Ersatz). Standard rekombinante DNA-Methoden wie zum Beispiel das Klonieren des Flagellin Gens in ein Plasmid, die Verdauung des Gens mit einem Restriktionsenzym gefolgt von Behandlung mit einer Endonuklease, Religation und homologe Rekombination im Wirtstamm, sind alle in Fachkreisen bekannt und u. a. beschrieben in Maniatis/Sambrook (Sambrook J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6). Orstspezifische Mutationen können z. B. mittels in vitro ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des von Clontech verkauften Transformer® Kits hergestellt werden. PCR-Verfahren sind ausführlich in Dieffenbach & Drexler; PCR Primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995) beschrieben.

**[0023]** Demzufolge betrifft diese Variante der Erfindung in einer mehr bevorzugten Form ein Bakterium, das aufgrund einer Mutation im Flagellin Gen nicht fähig ist, ein Flagellin zu exprimieren.

**[0024]** Am meisten bevorzugt sind die Bakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *S. typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, *dublin*, *typhi*, *abortus-ovi*, *abortus-equi*, *paratyphi A* und *B*, *derby*, *hadar*, *heidelberg*, *agona* und *arizonae*.

**[0025]** Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, geeignete Marker-Impfstoffe für den Schutz von Menschen und Tieren gegen Salmonellosis bereitzustellen. Das charakteristische Merkmal der erfindungsgemässen Impfstoffe ist, dass sie die hierin zuvor definierten Bakterien sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Der Hauptvorteil der erfindungsgemässen Impfstoffe ist, dass damit geimpfte Menschen und Tiere von sowohl nicht-geimpften Menschen und Tieren wie auch Wildtyp *Salmonella* infizierten Menschen und Tieren aufgrund ihrer Antikörper Panel unterschieden werden können.

**[0026]** Erfindungsgemässe Impfstoffe können in einer lebenden attenuierten oder einer inaktivierten Form vorkommen. In beiden Fällen führt die Abwesenheit von mindestens einer antigenen Determinante von Flagel-

la oder Flagellin nach der Impfung zu einem Antikörper Panel, der leicht von demjenigen, der nach einer Wildtyp Infektion induziert wurde, unterschieden werden kann.

**[0027]** Inaktivierte Impfstoffe haben den Vorteil gegenüber Lebendimpfstoffen, dass sie inhärent sicher sind. Demzufolge betrifft eine bevorzugte Form der Erfindung Impfstoffe, in welchen die Bakterien in einer inaktivierten Form vorliegen.

**[0028]** Erfindungsgemässe Impfstoffe, die auf lebenden Salmonella Bakterien basieren, haben jedoch den Vorteil gegenüber Impfstoffen, die inaktivierte Bakterien umfassen, dass sie die natürliche Infektion besser nachahmen können und demzufolge das Immunsystem besser auslösen können. Wie im folgenden erläutert besitzen sie zudem einen zusätzlichen wichtigen Vorteil. Die Entwicklung von lebenden attenuierten Impfstoffen ist im allgemeinen schwierig und zeitaufwendig. Zudem ist die Feineinstellung des Abschwächungsgrades von komplexer Natur: eine hohe Virulenz verursacht Erkrankung und eine geringe Virulenz induziert ungenügenden Schutz. Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemässen Impfstoffe im Vergleich zu ihren Flagella-tragenden Gegenständen keine bedeutungsvollen Unterschiede in der Virulenz. Mit anderen Worten wird der Abschwächungsgrad durch das Entfernen des Flagellin Gens nicht bedeutend geändert. Dies hat den unerwarteten Vorteil, dass sowohl zukünftige wie auch zugelassene existierende lebende attenuierte Salmonella Stämme, die für die Verwendung in Impfstoffen geeignet sind, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können sobald sie unfähig gemacht werden, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren. Deshalb umfassen die erfindungsgemässen Impfstoffe in einer weiteren bevorzugten Form lebende attenuierte Bakterien.

**[0029]** Im Hinblick auf die grosse Anzahl an Impfstoffen, die heutzutage sowohl Haustieren wie auch Landwirtschaftstieren gegeben werden, ist es offensichtlich, dass eine kombinierte Verabreichung von mehreren Impfstoffen wünschenswert wäre, wenn auch nur aufgrund reduzierter Impfkosten. Es ist demnach äusserst verlockend, lebende attenuierte Bakterien als rekombinanten Träger für heterologe Gene zu verwenden, die Antigene ausgewählt von anderen pathogenen Mikroorganismen oder Viren kodieren. Eine Verabreichung solch eines rekombinanten Trägers hat den Vorteil, dass eine Immunität gleichzeitig gegen zwei oder mehrere Krankheiten induziert wird. Lebende attenuierte Bakterien zur Verwendung in einem erfindungsgemässen Impfstoff stellen sehr geeignete Träger für heterologe Gene dar. Prinzipiell können solche heterologen Gene in das bakterielle Genom an jeglicher nicht-wesentlichen Stelle eingefügt werden.

**[0030]** Deshalb betrifft eine andere Variante der Erfindung erfindungsgemässe Bakterien, in welchen ein heterologes Gen eingefügt wurde. Solch ein heterologes Gen kann wie hierin zuvor erwähnt z. B. ein Gen darstellen, das ein Antigen ausgewählt von anderen pathogenen Mikroorganismen oder Viren kodiert. Solche Gene können z. B. von pathogenen Herpesviren (z. B. Genen, die die Strukturproteine der Herpesviren kodieren), Retroviren (z. B. dem gp160 Hüllprotein), Adenoviren und ähnlichen hergeleitet werden.

**[0031]** Ebenso kann ein heterologes Gen von pathogenen Bakterien erhalten werden. Als Beispiel stellen Gene, die bakterielle Toxine wie zum Beispiel Actinobacillus pleuropneumoniae Toxine, Clostridium Toxine, äussere Membranproteine und ähnliche kodieren, äusserst geeignete heterologe Gene dar.

**[0032]** Eine andere Möglichkeit besteht darin, ein Gen, das ein in der Auslösung des Immunsystems involviertes Protein, wie zum Beispiel ein Interleukin, Tumor Nekrosis Faktor oder ein Interferon oder ein anderes in der Immunregulierung involviertes Gen kodiert, einzufügen.

**[0033]** Die Verwendung des Flagellin Gens als eine Insertionsstelle besitzt den Vorteil, dass keine Notwendigkeit besteht, eine neue Insertionsstelle für das heterologe Gen zu finden, und gleichzeitig das Flagellin Gen inaktiviert wird sowie das neu eingefügte heterologe Gen exprimiert werden kann (gemeinsam mit den homologen bakteriellen Genen). Die Konstruktion solcher rekombinanter Träger kann routinemässig unter Verwendung von standardmässigen Molekularbiologie-Methoden wie zum Beispiel dem Allelaustausch, durchgeführt werden.

**[0034]** Deshalb wird in einer bevorzugten Form dieser Variante das heterologe Gen in das Flagellin Gen eingefügt. Das heterologe Gen kann irgendwo in das Flagellin Gen eingefügt werden oder es kann an der Stelle des Flagellin Gens eingefügt werden, während dieses Gen teilweise oder vollständig gelöscht wurde.

**[0035]** Ein erfindungsgemässer Impfstoff enthält ebenso zusätzlich zu dem hierin zuvor beschriebenen Bakterium einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Solch ein Träger kann so einfach wie Wasser sein, aber er kann z. B. ebenso Kulturflüssigkeit, in welcher das Bakterium gezüchtet wurde, umfassen. Ein weiterer geeig-

neter Träger ist z. B. eine Lösung von physiologischer Salzkonzentration.

**[0036]** Die zu verabreichende, nützliche Dosis hängt vom Alter, Gewicht und zu impfenden Tier, dem Verabreichungsmodus und -route und dem Typ des Pathogens gegen welches eine Impfung ersucht wird, ab. Der Impfstoff kann jegliche Dosis an Bakterien umfassen, die ausreichend ist, eine Immunantwort hervorzurufen. Dosen, die zwischen  $10^3$  und  $10^{10}$  Bakterien variieren, sind äusserst geeignete Dosen.

**[0037]** Falls der erfindungsgemässe Impfstoff inaktivierte Bakterien umfasst, müssen eine oder mehrere Verbindungen mit Adjuvansaktivität hinzugefügt werden. Falls der erfindungsgemässe Impfstoff lebende abgeschwächte Bakterien umfasst, ist die Verwendung eines Adjuvans fakultativ. Adjuvantien sind nicht-spezifische Stimulatoren des Immunsystems. Sie verstärken die Immunantwort des Wirts gegenüber dem Impfstoff. Beispiele von in Fachkreisen bekannten Adjuvantien sind das Freund's Komplett und Inkomplett Adjuvans, Vitamin E, nicht-ionische Blockpolymere, Muramyl-dipetide, ISCOMs (immune stimulating complexes, siehe zum Beispiel das Europäische Patent EP 109942), Saponine, Mineralöl, Pflanzenöl und Carbopol. Adjuvantien, die für eine muköse Anwendung besonders geeignet sind, sind z. B. das E. coli hitzelabile Toxin (LT) oder das Cholera Toxin (CT). Andere geeignete Adjuvantien sind zum Beispiel Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat oder Aluminiumoxid, Öl-Emulsionen (z. B. von Bayol F® oder Marcol 52®), Saponine oder Vitamin E Solubilisate.

**[0038]** Andere für die vorliegende Erfindung nützliche Beispiele pharmazeutisch verträglicher Träger oder Verdünnungsmittel umfassen Stabilisatoren wie z. B. SPGA, Carbohydrate (z. B. Sorbitol, Mannitol, Stärke, Sucrose, Glukose, Dextran), Proteine wie zum Beispiel Albumin oder Casein, Protein-enthaltende Wirkstoffe wie zum Beispiel bovines Serum oder fettarme Milch und Puffer (z. B. Phosphatpuffer). Insbesondere wenn solche Stabilisatoren zum Impfstoff hinzugegeben werden, ist der Impfstoff äusserst geeignet zur Gefrier Trocknung oder Sprühtrocknung.

**[0039]** Demzufolge ist der Impfstoff in einer mehr bevorzugten Form in einer gefriergetrockneten oder sprühtgetrockneten Form.

**[0040]** Zur Verabreichung an Tiere oder Menschen kann der erfindungsgemässe Impfstoff unter anderem intranasal, mittels Sprühen, intradermal, subkutan, oral, mittels Aerosol, oder intramuskulär gegeben werden. Zur Anwendung bei Geflügel ist zusätzlich eine Wing-Web- und Augentropfen-Verabreichung geeignet.

**[0041]** Eine weitere Variante der Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterien gemäss der Erfindung zur Herstellung eines Impfstoffes für den Schutz von Menschen und Tieren gegen eine Infektion mit einem Salmonella Bakterium oder den pathogenen Auswirkungen der Infektion.

**[0042]** Die Erfindung betrifft ebenso Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemässen Impfstoffes. Solche Verfahren umfassen das Beimischen von erfindungsgemässen Bakterien und einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

**[0043]** Ein diagnostischer Test zur Überprüfung auf die Abwesenheit/Anwesenheit von Salmonella anti-Flagellin oder anti-Flagella Antikörpern in Seren kann z. B. ein einfacher ELISA-Test sein, in welchem die Wand der Vertiefungen einer Elisa-Platte mit Flagella oder gereinigtem Flagellin oder einem kurzen Polypeptid umfassend ein antigenes Fragment davon beschichtet wird. Inkubation mit Serum von zu testenden Menschen oder Tieren, gefolgt von z. B. Inkubation mit einem markierten Antikörper gegen den relevanten menschlichen oder tierischen Antikörper kann dann die Anwesenheit oder Abwesenheit der Antikörper gegen Flagellin aufzeigen.

**[0044]** Ein weiteres Beispiel eines diagnostischen Testsystems ist z. B. die Inkubation eines Western Blots umfassend Flagellin mit Serum von zu testenden Menschen oder Tieren, gefolgt von Analyse des Blots.

**[0045]** Die diagnostischen Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen Salmonella Flagellin sind vorzugsweise in Form eines Kits umfassend Flagellin in gereinigter Form. Das Flagellin könnte z. B. mittels standardmässiger Proteintrennungungsverfahren über eine geeignete Säule gereinigt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Trennung auf einem PAGE Gel gefolgt von Western-Blotting. Auf dem Western Blot wird das Flagellin eine spezifische Bande bilden, die von den anderen Salmonella Proteinbanden getrennt ist und demzufolge ebenso als gereinigt betrachtet wird. Ebenso kann eine reine Form des Proteins durch Expression von Flagellinkodierenden Nukleinsäuresequenzen erhalten werden.

**[0046]** Prinzipiell ist der einfachste Weg zur Herstellung eines solchen diagnostischen Testsystems, die Ver-

wendung von gereinigtem ganzen Flagellin wie hierin zuvor erläutert. Es ist jedoch sehr gut möglich nur Teil des Flagellin zu verwenden. Dies unter der Massgabe, dass das verwendete Fragment immer noch eine antigene Determinante des Proteins umfasst. Alle antigenen Determinanten des Flagellin werden gemäss Definition Antikörper induzieren. Deshalb wird die Verwendung eines Flagellin Fragmentes, das sogar eine einzige antigene Determinante des Flagellin umfasst, fähig sein an anti-Flagellin Antikörper zu binden.

**[0047]** Ein Test, der fähig ist, zwischen Serum von nicht-infizierten, infizierten und geimpften Menschen und Tieren zu unterscheiden, umfasst z. B. eine Vertiefung A beschichtet mit Flagellin und eine Vertiefung B beschichtet mit einem anderen Salmonella Immunogen oder möglicherweise ganze Salmonella Zellen. Serum, das mit den Vertiefungen A und B reagiert, weist auf eine Feldinfektion oder Impfung mit einem klassischem Impfstoff hin, während Serum, das nur mit der Vertiefung B reagiert, darauf hinweist, dass das getestete Tier mit dem Markerimpfstoff geimpft wurde.

#### BEISPIEL 1

**[0048]** Der Salmonella typhimurium Stamm STMP, ein attenuierter Stamm, der als lebender Impfstoff in Geflügel und Schweinen getestet wurde und gute Schutzniveaus bereitstellt, wurde als Ausgangsmaterial für die chemische Mutagenese verwendet.

#### Chemische Mutagenese

**[0049]** S. typhimurium STMP wurde auf Blutagar-Medium gezüchtet und auf eine positive O-Antigen Gruppe B Agglutination und H-Antigen Typ 2 Agglutination geprüft. Eine Kolonie wurde in LB Medium inokuliert und für 20 Std bei 37°C unter Belüftung inkubiert. Zehn µl der über Nacht gehaltenen Kultur wurde in 10 ml LB verdünnt (3 Kulturen) und bei 37°C für 6 Std unter Belüftung inkubiert bis die Kultur eine O. D. bei 600 nm von 0.5 erreichte. Eine Probe wurde entnommen, um die Zahl der lebensfähigen Bakterien zu bestimmen. Zu jeder der drei 10 ml Kulturen wurde 100 µl Trioxalen (chemisches Mutagen von Sigma; 3 mg/ml in DMSO) hinzugegeben und die Suspension wurde in eine 10 cm ø Petrischale gegossen. Die Suspension wurde mit U. V. (Transilluminator UVP; Wellenlänge 365 nm) für 5, 10 oder 15 Min in einer Distanz von 20 cm bestrahlt. Zehn µl wurden in 10 ml 0.9% NaCl übertragen, 1/10 Verdünnungen wurden zubereitet und 100 µl wurden auf Blutagar-Platten plattiert, um die Überlebensrate von Bakterien in mutierten Kulturen zu bestimmen. Kulturen mit Überlebensraten von ungefähr 3% und 20% wurden in 100 ml LB bis zu einem OD bei 600 nm von 0.5 gezüchtet. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation gesammelt, in 5 ml LB resuspendiert und in 30% Glycerol bei -70°C aufbewahrt.

#### Selektion für eine nicht-bewegliche, nicht-flagellierte Mutante

**[0050]** Die mutierten Bakterien (3% Überleben; zwischen 5'000 und 10'000 unabhängige Mutanten) wurden vom Glycerol Stocklösung auf je 3 Blutagar-Platten inokuliert. Die Bakterien wurden in LB gesammelt und die OD bei 600 nm wurde auf 2.17 eingestellt. Sechs 10-fache Verdünnungen wurden in LB gemacht und danach wurden 50 µl H2-Antiserum (Difco) zu 450 µl bakterieller Suspension hinzugegeben. Dieser Selektionsschritt mit H-Antiserum wurde miteingeschlossen, um die Mutanten-Suspension mit nicht-flagellierten Bakterien anzureichern. Diese Suspension wurde bei 37°C für 6 Std unter Rühren (250 rpm) inkubiert und dann für 1 Min bei 1000 rpm in einer Eppendorf Minizentrifuge zentrifugiert, um den Agglutinationskomplex zu entfernen. Vom Überstand wurden 1, 10 und 100 µl auf Blutagar-Platten plattiert und bei 37°C für 20 Std inkubiert.

#### Resultate

##### Identifizierung einer nicht-beweglichen Mutante von S. typhimurium STMP

**[0051]** Die Selektion für nicht-flagellierte Bakterien mittels Inkubation mit H2 Antiserum führte zu Wachstum von ungefähr 40 Kolonien auf Platten (10<sup>6</sup> Verdünnung), die mit der Serum-behandelten Mutanten Suspension (3% Überleben) inokuliert worden waren, während keine Kolonien auf Platten (10<sup>6</sup> Verdünnung) wuchsen, die mit der Serum-behandelten STMP Suspension inokuliert worden waren. Dieses Resultat deutete darauf hin, dass Mutanten vorhanden waren, die mit dem H2-Antiserum nicht agglutinierten, wobei diese möglicherweise nicht-flagelliert sind.

**[0052]** Die 40 Kolonien wurden mittels Lichtmikroskopie auf H2-Agglutination und Motilität getestet. Alle Mutanten waren negativ für H2-Agglutination, jedoch schien wie mittels Lichtmikroskopie beobachtet nur eine Mutante nicht-beweglich zu sein. Diese nicht-bewegliche Mutante war positiv für die Gruppe B O-Antigen Agglu-



tionation. Die Mutante wurde STM2000 benannt.

In vitro Stabilität von STM2000, einer nicht-beweglichen Mutante von *S. typhimurium* STMP

**[0053]** Die phenotypische Stabilität von STM2000 wurde mittels 12 in vitro Passagen auf Blutagar-Platten getestet. Im selben Experiment wurde ebenso der Elternstamm, STMP, 12 mal passagiert. Diese Kulturen wurden mittels Lichtmikroskopie beobachtet und alle Bakterien in der Mutanten-Kultur waren immer noch nicht-beweglich. STMP Bakterien waren beweglich, obwohl nicht alle Zellen denselben Grad an Beweglichkeit zeigten. Ein elektronenmikroskopischer Vergleich von STMP und STM2000 bestätigte, dass keine Flagella auf den mutanten Bakterien vorhanden waren.

In vitro Stabilität von STM2001, einer nicht-beweglichen Mutante von *S. typhimurium* STMP

**[0054]** In einem andersartigen Experiment wurde *S. typhimurium* SL3261 (Hinterlegungsnummer SGSC 439, Salmonella Genetic Stock Centre, University of Calgary, Alberta, Canada) chemisch mit NTG mutiert und nicht-bewegliche Mutanten wurden wie hierin zuvor beschrieben selektiert. Eine Mutante, STM2001, zeigte keine Reaktion mit einem Flagellin-spezifischen monoklonalen Antikörper. Nach 2D Protein Gelelektrophorese zeigte sich, dass STM2001 im Vergleich zu seinem Elternstamm der Flagellin Punkt bei 51 kDa und pI 4.7 fehlte.

**[0055]** Die genetische Stabilität dieses Stammes wurde durch Züchten von mindestens 50 Generationen getestet. Nach dieser Zeitspanne wurden immer noch keine Revertanten gefunden: alle Bakterien waren nach wie vor nicht-beweglich.

**[0056]** Der Stamm STM2001 wurde beim Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, PO.Box 273, 3740 AG Baarn, Niederlande, unter der Zugangsnummer CBS 108955 hinterlegt.

## BEISPIEL 2

### Experimentelles Design

**[0057]** Impfstoffe wurden von einem flagellierten und einem nicht-flagellierten *S. enteritidis* (*S. e.*) Phagentyp 4 Stamm hergestellt. Die Bakterien wurden in Tryptosephosphat Brühe kultiviert, durch die Zugabe von Formalin zu einer Endkonzentration von 0.5% inaktiviert, gefolgt von Ernten der bakteriellen Zellen mittels Zentrifugation. Die Zellen wurden wieder in Phosphatpuffer Salzlösung suspendiert und als Wasser-in-Öl-Emulsions-Impfstoffe mit  $5 \times 10^9$  Bakterien/ml formuliert. Fünf Hühner wurden intramuskulär mit dem *S. e. fla*<sup>+</sup> Impfstoff injiziert und 5 Hühner erhielten den *S. e. fla*<sup>-</sup> Impfstoff. Die Tiere wurden mit 0.5 ml Impfstoff im Alter von 14 und 18 Wochen geimpft. Im Alter von 22 Wochen wurde den Hühnern Blut entnommen und das Serum wurde in einem doppelten Antikörper Sandwich Hemm-ELISA System spezifisch für Antikörper gegen das g, m Flagellin von *S. e.* getestet (Zijderveld, F. G. van et al. (1993) Vet. Quart. 15, 135–137).

### Tiere

**[0058]** Kommerzielle Hennen vom Typ Legehennen im Alter von ungefähr 14 Wochen wurden von einer Salmonella-freien Herde erhalten.

### Resultate

**[0059]** Alle 5 Hühner, die den *S. e. fla*<sup>+</sup> Impfstoff erhalten hatten, serokonvertierten im g, m spezifischen ELISA (Prozent Hemmung > 60%), während die 5 Hühner, die mit dem *S. e. fla*<sup>-</sup> Impfstoff geimpft wurden, seronegativ blieben.

## BEISPIEL 3

### Experiment 1

### Experimentelles Design

**[0060]** Zur Einschätzung der Sicherheit wurden Fleischhühner oral (1 ml), subkutan (0.5 ml) und intramuskulär (0.5 ml) mit Flagella-positivem *Salmonella typhimurium* Stamm STMP, Flagella-negativem *Salmonella ty-*

phimurium Stamm STM2000 oder Wildtyp *S. typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) inokuliert. Die Tiere wurden für eine Woche nach der Inokulation beobachtet gefolgt von einer post-mortem Untersuchung der überlebenden Hühner.

#### Tiere

**[0061]** Kommerzielle Fleischhühner im Alter von drei Wochen wurden von einer *Salmonella*-freien Herde erhalten.

#### Resultate

**[0062]** Nach der Inokulation starben 8 der 10 Tiere, die das Wildtyp *Salmonella typhimurium* erhalten hatten (Tabelle 1). Bei der Nekropsie hatten die 2 überlebenden Hühner, die mit dem Wildtyp Stamm inokuliert worden waren, geschwollene Leber mit nekrotischen Herden, geschwollenen Milzen und perikardiale Ödeme. Eines der STMP inokulierten Hühner hatte eine leicht geschwollene Leber und ein mit STM2000 inokuliertes Huhn hatte eine leicht geschwollene Milz. Keine weitere Abnormalitäten wurden in diesen zwei Gruppen beobachtet.

Tabelle 1

Gruppe	STMP	STM2000	Wildtyp
Dosis (CFU/ml)	$10^{8.0}$	$10^{7.7}$	$10^{8.0}$
Mortalität	0/10 <sup>a</sup>	0/10 <sup>a</sup>	8/10 <sup>b</sup>

**[0063]** Gruppen mit verschiedenen hochgestellten Zeichen in einer Reihe sind verschieden ( $p < 0.5$ , Fisher's exakter Test)

#### Experiment 2

##### Experimentelles Design

**[0064]** Zur Einschätzung von sowohl Sicherheit wie auch Wirksamkeit wurden Fleischhühner im Alter von 3 und 15 Tagen oral mit entweder STMP oder STM2000 inokuliert, gefolgt von einer Challenge Infektion mit einem Tetrazyklin-resistenten Wildtyp *Salmonella typhimurium* Stamm im Alter von 22 Tagen.

**[0065]** Die Sicherheit wurde durch klinische Beobachtung nach der Impfung und Bestimmung der Gewichtszunahme eingeschätzt. Ebenso wurden nach 10 und 22 Tagen Tupferproben der Kloake entnommen, um das Vorhandensein der Impfstoff-Stämme im Verdauungstrakt zu bestimmen. Die Tupferproben wurden verwendet, um Brilliant Green Agar (BGA) direkt und nach Anreicherung in Rappaport Vassiliades Brühe (RVB) zu inokulieren.

**[0066]** Die Tiere wurden für eine Woche nach der Challenge Infektion beobachtet, gefolgt von einer post-mortem Untersuchung der überlebenden Hühner. Die Leber, Milzen, Tupferproben der Kloake und Tupferproben der Blinddarm-Inhalte der überlebenden geimpften Hühner wurden für den Challenge-Stamm durch direkte Inokulation auf Tetrazyklin-enthaltendem BGA (BGAtet) kultiviert. Zusätzlich wurden die Tupferproben in einem Voranreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser enthaltend Tetrazyklin) inkubiert, gefolgt von Plattieren auf BGAtet.

#### Tiere

**[0067]** Kommerzielle Fleischhühner im Alter von drei Tagen wurden von einer *Salmonella*-freien Herde erhalten.

#### Resultate

**[0068]** Keine klinischen Abnormalitäten wurden nach den oralen Impfungen im Alter von 3 und 15 Tagen beobachtet. Ebenso unterschieden sich die durchschnittlichen Gewichtszunahmen in den geimpften Gruppen nicht von der Kontrollgruppe (Tabelle 3). Beide Stämme waren in den Tupferproben der Kloake der geimpften Tiere, die 7 Tage nach der Inokulierung entnommen wurden, vorhanden (Tabelle 2). Die Tatsache, dass ein

grösserer Anteil der Hühner in der STMP inokulierten Gruppe nach direktem Plattieren kulturpositiv war, weist darauf hin, dass dieser Stamm den Verdauungstrakt in grösseren Zahlen kolonisiert als der STM2000 Stamm.

Tabelle 2

Reisolation	STMP postive Tupferproben		STM2000 postive Tupferproben	
	Direkt	Anreicherung	Direkt	Anreicherung
10. Tag	15/15 <sup>a</sup>	nicht durchgeführt	7/15 <sup>b</sup>	14/15
22. Tag	10/15 <sup>a</sup>	15/15 <sup>A</sup>	4/15 <sup>a</sup>	14/15 <sup>A</sup>

[0069] Gruppen mit verschiedenen hochgestellten Zeichen in einer Reihe sind verschieden ( $p < 0.5$ , Fisher's exakter Test)

[0070] Ein Huhn in der STMP Gruppe starb nach der Challenge Infektion (7%), verglichen mit keiner Mortalität in der STM2000 Gruppe und 80% Mortalität in den nicht-geimpften Kontrollen (Tabelle 3). Die überlebenden Hühner in der Kontrollgruppe nahmen ebenso bedeutend weniger Gewicht zu als die Geimpften. Die Gewichtszunahme der STM2000 geimpften Gruppe nach der Challenge Infektion war bedeutend höher als die Gewichtszunahme der STMP geimpften Gruppe.

Tabelle 3

Gruppe	STMP	STM2000	Kontrolle
Dosis T3	$10^{8.8}$	$10^{8.5}$	-
Dosis T15	$10^{8.5}$	$10^{8.5}$	-
Gewichtszunahme T3-T22	$636 \pm 98^a$	$594 \pm 72^a$	$624 \pm 82^a$
S.t. Challenge Dosis T22	$10^{8.0}$	$10^{8.0}$	$10^{8.0}$
Gewichtszunahme T22-T29	$299 \pm 45^a$	$339 \pm 42^b$	$31 \pm 39^c$
Mortalität	1/15 <sup>a</sup>	0/15 <sup>a</sup>	8/10 <sup>b</sup>

[0071] Gruppen mit verschiedenen hochgestellten Zeichen in einer Reihe sind verschieden ( $p < 0.5$ , Fisher's exakter Test (Mortalität) oder Zwei-Proben T-Test (Gewichtszunahme))

[0072] Wie in Tabelle 4 aufgezeigt bestand kein Unterschied in den Resolutionsraten des Challengeorganismus von der Milz und der Leber. Die Kolonisierung im Verdauungstrakt, wie sie durch die Reisolation von Tupferproben der Kloake und der Blinddarm-Inhalte eingeschätzt wurde, war in der mit STM2000 geimpften Gruppe bedeutend geringer.

Tabelle 4

	<i>Salmonella typhimurium</i> (tet <sup>r</sup> ) positiv			
Gruppe	STMP geimpft		STM2000 geimpft	
Reisolation	Direkt	Anreicherung	Direkt	Anreicherung
Milz	2/14 <sup>a</sup>	Nicht durch- geführt	1/14 <sup>a</sup>	Nicht durch- geführt
Leber	1/14 <sup>a</sup>	Nicht durch- geführt	0/15 <sup>a</sup>	Nicht durch- geführt
Kloake	7/14 <sup>a</sup>	14/14 <sup>A</sup>	3/15 <sup>a</sup>	7/15 <sup>B</sup>
Blinddarm	13/14 <sup>a</sup>	14/14 <sup>A</sup>	5/15 <sup>b</sup>	9/15 <sup>B</sup>

**[0073]** Gruppen mit verschiedenen hochgestellten Zeichen in einer Reihe sind verschieden ( $p < 0.5$ , Fisher's exakter Test)

## BEISPIEL 4

## Experimentelles Design

**[0074]** Zur Einschätzung der Wirksamkeit wurden Schweine oral mit STMP ( $10^{9.0}$  CFU) oder STM2000 ( $10^{9.0}$  CFU) inokuliert, gefolgt von einer oralen Challenge Infektion mit einem Streptomycin-resistenten Wildtyp *Salmonella typhimurium* Stamm ( $10^{11.0}$  CFU) 2 Wochen später. Das Ausscheiden des Challenge-Stammes wurde durch Kultivieren fäkaler Proben 5 und 8 Tage nach dem Challenge gemessen. Ungefähr 5 Gramm Fäkalien wurden in Peptonwasser gelegt und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden zehnfache Serienverdünnungen in Streptomycin enthaltendem RVB Medium ausgeführt, über Nacht inkubiert, gefolgt von Plattieren in Streptomycin enthaltender Tryptosephosphat Brühe. Die maximale Verdünnung, die den Challenge Stamm enthielt, wurde verwendet, um den Reisolations-Wert (reziprok der maximalen positiven Verdünnung) berechnet.

**[0075]** Acht STMP geimpfte Schweine und 8 nicht-geimpfte Kontrollen wurden in einem ersten Experiment verwendet. In einem zweiten Experiment wurden 9 Schweine mit STM2000 geimpft und 9 nicht-geimpfte Kontrollen verwendet.

## Tiere

**[0076]** Sechs Wochen alte SPF Schweine wurden in beiden Experimenten verwendet.

## Resultate

**[0077]** Wie in Tabelle 5 aufgezeigt waren beide Impfstoff-Stämme fähig, fäkales Ausscheiden des Challenge-Stammes bedeutend zu reduzieren.

Tabelle 5

	Durchschnittl. Resolutions Wert	
	5. Tag	8. Tag
STMP (n=8)	$10^{0.9a}$	$10^{1.0 a}$
Kontrolle (n=8)	$10^{6.4b}$	$10^{3.8b}$
STM2000 (n=9)	$10^{1.0A}$	$10^{1.3A}$
Kontrolle (n=9)	$10^{5.0B}$	$10^{4.9B}$

[0078] Gruppen mit verschiedenen hochgestellten Zeichen sind verschieden ( $p < 0.5$ , Mann-Whitney U-Test)

#### Legende zu den Figuren

[0079] **Fig. 1:** Proteinprofil Analyse von STM2000 und dessen Elternstamm *S. typhimurium* STMP. Bahnen 1, 11 und 12 Molakulargewichtsmarker wie angegeben; Bahnen 2, 5 und 8, *S. typhimurium* STMP 12 × auf Blutagar Medium passagiert; Bahnen 4, 7 und 10, STM2000 2 × auf Blutagar Medium passagiert. Bahnen 2, 3 und 4, totales Proteinprofil; Bahnen 5, 6 und 7, Pellet nach Sonikation und Zentrifugation; Bahnen 8, 9 und 10, Überstand nach Sonikation und Zentrifugation. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

[0080] **Fig. 2:** Photographien von elektronmikroskopischer Untersuchung von *S. typhimurium* STMP (A) und dessen nicht-beweglicher Mutante STM2000 (B).

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Bakteriums des Genus *Salmonella*, das in seiner Wildtyp-Form Flagella trägt, wobei das besagte Bakterium nicht fähig ist, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren, und eines Adjuvans in der Herstellung eines inaktivierten Impfstoffes für den Schutz von Menschen oder Tieren gegen eine Infektion mit einem *Salmonella* Bakterium oder den pathogenen Auswirkungen der Infektion.

2. Verwendung eines Bakteriums des Genus *Salmonella*, das in seiner Wildtyp-Form Flagella trägt, wobei das besagte Bakterium nicht fähig ist, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren, in der Herstellung eines lebenden attenuierten Impfstoffes für den Schutz von Menschen oder Tieren gegen eine Infektion mit einem *Salmonella* Bakterium oder den pathogenen Auswirkungen der Infektion.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin das besagte Bakterium aufgrund einer Mutation in einem Gen des flagellaren Biosyntheseweges nicht fähig ist, Antikörper gegen mindestens eine antigene Determinante von Flagellin oder Flagella zu induzieren.

4. Verwendung gemäß Anspruch 3, worin die besagte Mutation im Flagellin-Gen lokalisiert ist.

5. Verwendung gemäß Ansprüchen 1–4, worin das besagte Bakterium ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *S. typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, *dublin*, *typhi*, *abortus-ovi*, *abortus-equi*, *paratyphi A* und *B*, *derby*, *hadar*, *heidelberg*, *agona* und *arizonae*.

6. Verwendung gemäß Ansprüchen 1–5, worin das besagte Bakterium ferner ein heterologes Gen trägt, wobei das besagte heterologe Gen vorzugsweise im Flagellin-Gen eingefügt ist.

7. Impfstoff für den Schutz von Tieren gegen Salmonellosis, dadurch gekennzeichnet, dass der Impfstoff inaktivierte Bakterien gemäß Ansprüchen 1 oder 3–5, ein Adjuvans und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

8. Impfstoff für den Schutz von Tieren gegen Salmonellosis, dadurch gekennzeichnet, dass der Impfstoff

lebende attenuierte Bakterien gemäss Ansprüchen 2–5 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

9. Impfstoff gemäss Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass er in einer gefriergetrockneten oder sprühgetrockneten Form vorliegt.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

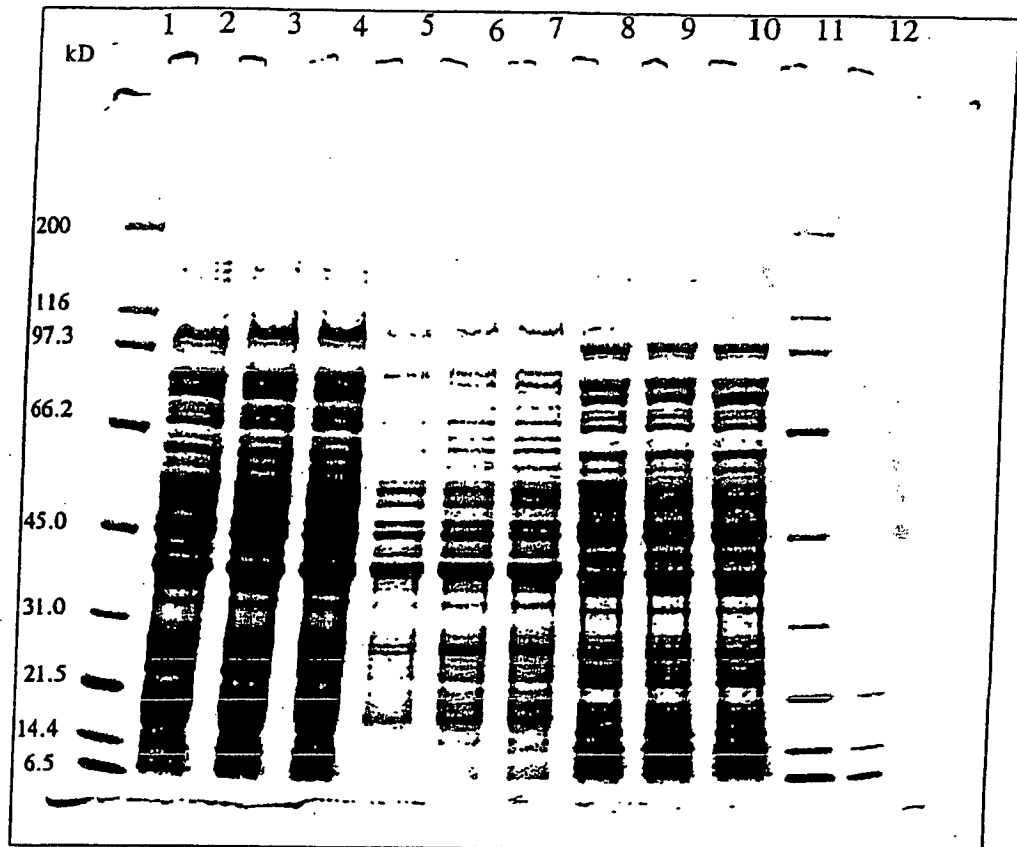


Figure 1.

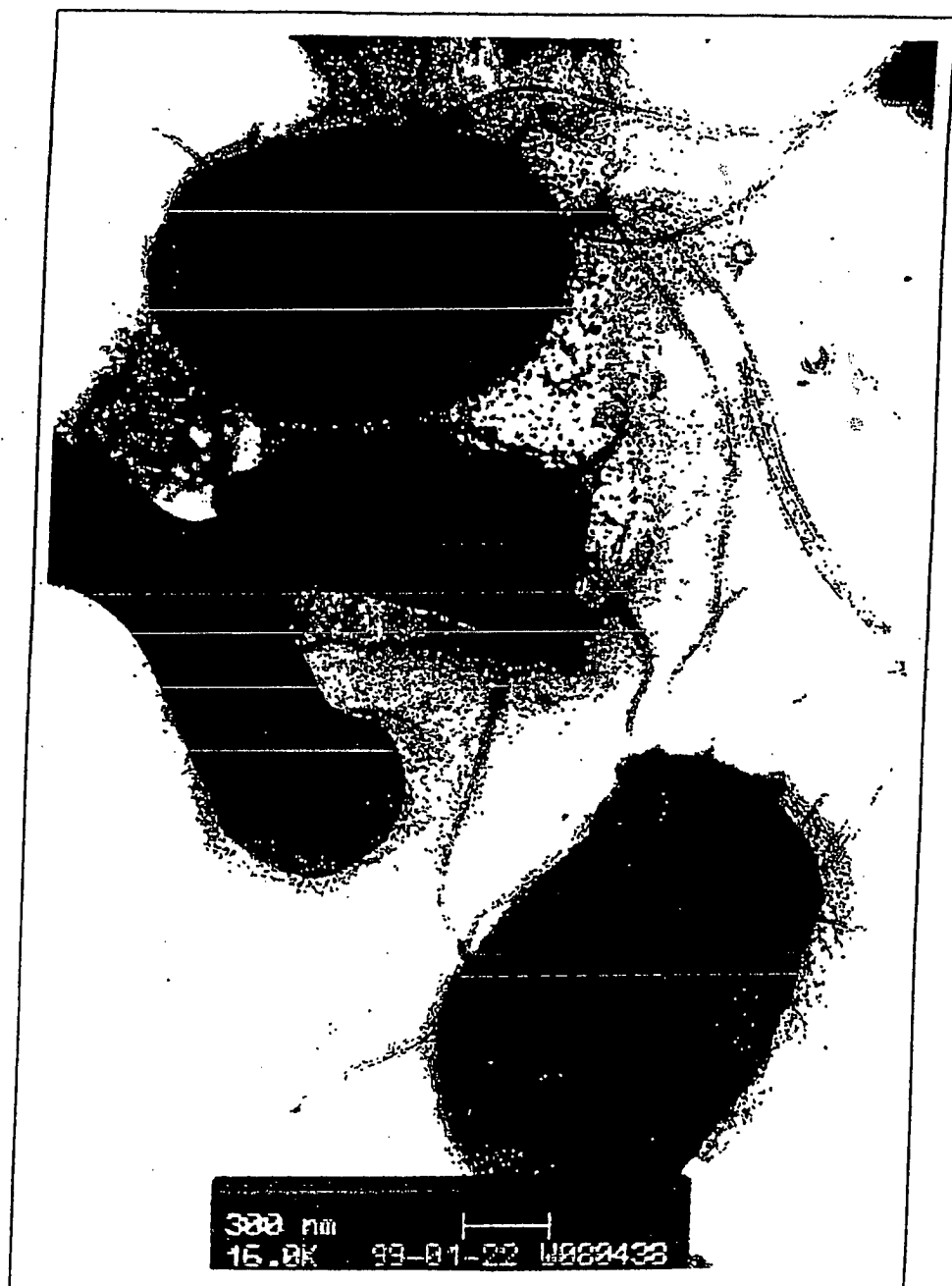


Figure 2 A.



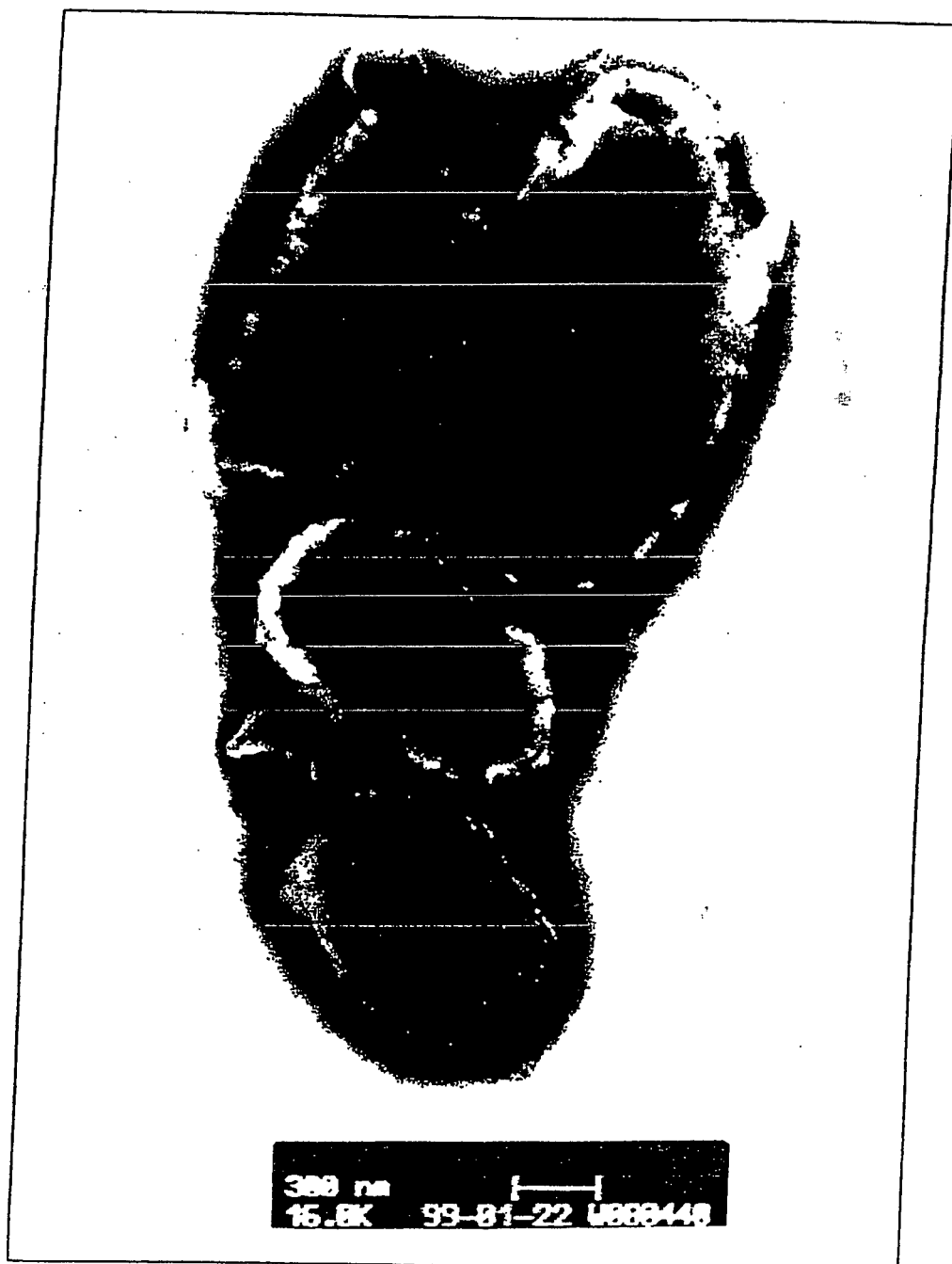


Figure 2 B.