



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 38 268 T2 2008.05.08

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 449 922 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 38 268.4

(96) Europäisches Aktenzeichen: 04 076 605.7

(96) Europäischer Anmeldetag: 01.04.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 25.08.2004

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 15.08.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 08.05.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/31 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

37697 02.04.1997 DK

44624 P 18.04.1997 US

127797 10.11.1997 DK

70488 P 05.01.1998 US

(73) Patentinhaber:

Statens Serum Institut, Copenhagen, DK

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Andersen, Peter, 2700 Brönshøj, DK; Florio,  
Walter, Carrara (MS), IT; Oettinger, Thomas, 2900  
Hellerup, DK; Rasmussen, Peter Birk, 2000  
Frederiksberg, DK; Rosenkrands, Ida, 3500  
Vaerløse, DK; Skjöt, Rikke Louise Vinther, 2640  
Hedehusene, DK; Weldingh, Karin, 3500 Vaerløse,  
DK

(54) Bezeichnung: Immunologisch aktiven, neuen Polypeptidefragmenten

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 eingelebt, 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 bezieht sich auf eine Anzahl von immunologisch aktiven, neuen Polypeptidfragmenten, die von dem CFP7-Antigen des Mycobacterium tuberculosis, Vaccinen und anderen immuno- logischen Zusammensetzungen abgeleitet sind, die Fragmente, wie immunogene Komponenten, enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung und Verwendung von Polypeptiden. Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf neue Nukleinsäurefragmente, die vom CFP7-Antigen des M. tuberculosis abgeleitet sind, die bei der Zubereitung der Polypeptidfragmente der Erfindung oder bei der Diagnose einer Infektion mit M. tuberculosis nützlich sind.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Menschliche Tuberkulose (nachstehend bezeichnet als „TB“), die von Mycobacterium tuberculosis verursacht wird, ist ein ernsthaftes globales gesundheitliches Problem, das nach Aussage der WHO für ungefähr 3 Millionen Todesfälle jährlich verantwortlich ist. Das weltweite Vorkommen von neuen TB-Fällen ist in den letzten zehn Jahren progressiv gesunken, doch dieser Trend hat sich in den letzten Jahren aufgrund des Vorkommens von AIDS und des Auftretens von gegen Multimedikamente resistenten Stämmen von M. tuberculosis deutlich geändert.

**[0003]** Die einzige gegenwärtig für den klinischen Einsatz verfügbare Vaccine ist BDG, eine Vaccine, deren Wirksamkeit weiterhin Anlass zu Kontroversen gibt. BCG induziert allgemein einen hohen Grad an erworbener Resistenz in Tiermodellen von TB, mehrere menschliche Versuche in Entwicklungsländern haben jedoch den Nachweis eines signifikanten Schutzes nicht erbracht. BCG ist insbesondere von der FDA nicht für eine Verwendung in den Vereinigten Staaten zugelassen.

**[0004]** Dadurch wird die Entwicklung einer neuen und verbesserten Vaccine gegen TB zu einer dringenden Angelegenheit, der von der WHO eine sehr hohe Priorität eingeräumt wurde. Es wurden viele Versuche zur Definition von schützenden mycobakteriellen Substanzen unternommen, und zwischen 1950 und 1970 haben mehrere Forscher über eine steigende Resistenz nach experimentellen Impfungen berichtet. Der Nachweis einer spezifischen langfristigen schützenden immunologischen Reaktion mit der BCG-Potenz wurde jedoch durch die Verabreichung von löslichen Proteinen oder Zellwandfragmenten noch nicht erreicht, obwohl derzeitig Fortschritte basierend auf Polypeptiden erzielt wurden, die von Kurzzeitkulturfiltraten abgeleitet wurden, siehe nachstehende Diskussion.

**[0005]** Die Immunität gegen M. tuberculosis wird durch drei Grundmerkmale gekennzeichnet; i) Lebende Bakterien induzieren effizient eine schützende immunologische Reaktion im Gegensatz zu abgetöteten Zubereitungen; ii) Spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten vermitteln diesen Schutz; iii) Das wichtigste Vermittlungsmolekül scheint Interferon-Gamma (INF- $\gamma$ ) zu sein.

**[0006]** Ein Kurzzeitkulturfiltrat (ST-CF) ist eine komplexe Mischung von Proteinen, die während des ersten Tages des Wachstums in einem flüssigen Medium von M. tuberculosis freigesetzt werden (Andersen et al., 1991). Kulturfiltrate wurden vorgeschlagen, um schützende Antigene vorzuhalten, die vom Wirt in der ersten Phase der TB-Infektion erkannt werden (Andersen et al. 1991, Orme et al. 1993). Jüngere Daten aus mehreren Labors haben gezeigt, dass experimentelle Teileinheitsvaccinen, die auf Kulturfiltratantigenen basieren, ein höheres Niveau der erworbenen Resistenz gegen TB bieten können (Pal und Horwitz, 1992; Roberts et al., 1995; Andersen, 1994; Lindblad et al., 1997). Kulturfiltrate sind jedoch komplexe Proteinmischungen und bis heute sind sehr begrenzte Angaben über die Moleküle verfügbar, die für diese schützende immunologische Reaktion verantwortlich sind. In dieser Hinsicht wurden nur zwei Kulturfiltrate beschrieben, die in die schützende Immunität involviert sind, und zwar das Antigen niedriger Masse ESAT-6 (Andersen et al., 1995 und EP-A-0 706 571) und das Molekül 31 kDa Ag85B (EP-0 432 203).

**[0007]** Daher besteht ein Bedarf nach der Feststellung von weiteren Antigenen, die in die Induktion einer schützenden Immunität gegen TB involviert sind, um letztendlich eine wirkungsvolle Teileinheitsvaccine herzustellen.

**[0008]** WO97709428 (Corixa Corp.) vom 13. März 1997 und WO97/09429 (Corixa Corp.) vom 13. März legen beide Nukleinsäuresequenzen und ihre entsprechenden Polypeptide offen, u. a. ESAT6, das von Mycobacterium tuberculosis abgeleitet wurde, sowie deren Verwendung zur Immunisierung und Diagnose von M-Tuber-

kuloseinfektionen. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung weisen eine allgemeine Sequenzidentität von 29,2% mit dem Polypeptid ESAT6 auf. Die höchste Sequenzidentität, und zwar 71,4%, wurde in einer Überlappung von 7 Aminosäuren festgestellt.

#### GEGENSTAND DER ERFINDUNG

**[0009]** Ein Gegenstand der Erfindung ist es, neue Antigene zu bieten, die als Komponenten in einer Teileinheitsvaccine gegen TB nützlich sind oder die als Komponenten in diagnostischen Zusammensetzungen für die Feststellung von Infektionen mit Mycobakterien, insbesondere virulenz-assoziierten Mycobakterien, nützlich sind. Die neuen Antigene können ebenfalls wichtige Medikamentenziele sein.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die vorliegende Erfindung basiert i.a. auf der Feststellung und Charakterisierung einer Reihe von zuvor nicht charakterisierten Kulturfiltratantigenen von M. tuberculosis. In Tiermodellen fokussieren eine Immunität vermittelnde T-Zellen vornehmlich auf Antigene in den Regionen 6–12 und 17–30 kDa des STCF. In der vorliegenden Erfindung wurde ein Antigen in der Region mit niedrigem Molekulargewicht (CFP7) festgestellt.

**[0011]** Das kodierende Gen für das Antigen wurde bestimmt, die Verteilung des Antigens in verschiedenen mycobakteriellen Stämmen untersucht und die biologische Aktivität des Produkts gekennzeichnet. Das Antigen weist ein Potenzial für Vaccinezwecke sowie für diagnostische Zwecke auf, da das Antigen durch Verstoffwechselung von Mycobakterien sekretiert wird.

**[0012]** Die folgende Tabelle listet das Antigen der Erfindung durch den hierin verwendeten Namen sowie durch Bezugnahme auf die relevanten SEQ ID Nummern der vollständigen Aminosäuresequenz und der Sequenz der das Antigen kodierenden DNA auf:

Antigen	N-Terminal-Sequenz	Nukleotidsequenz	Aminosäuresequenz
	SEQ ID Nr:	SEQ ID Nr:	SEQ ID Nr:
CFP7		1	2

**[0013]** Es ist nach dem Stand der Technik bekannt, dass T-Zellen-Epitope für das Auslösen der erworbenen Immunität gegen TB verantwortlich sind, wogegen B-Zellen-Epitope ohne einen signifikanten Einfluss auf die erworbene Immunität und das Erkennen von Mycobakterien in vivo sind. Da solche T-Zellen-Epitope linear sind und dafür bekannt sind, eine minimale Länge von 6 Aminosäureresten aufzuweisen, betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere die Feststellung und Verwendung von solchen T-Zellen-Epitopen.

**[0014]** Daher bezieht sich die Erfindung in ihrem weitesten Aspekt auf ein im Wesentlichen reines Polypeptidfragment, das

- a) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NR: 2 gezeigt, umfasst
  - b) eine Teilsequenz des in a) definierten Polypeptidfragments umfasst, das eine Länge von mindestens 12 Aminosäureresten hat, wobei die Teilsequenz mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Flexibilität, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostische signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierungen mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind, oder
  - c) eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine Sequenzidentität zu dem in a) definierten Polypeptid oder der in b) definierten Teilsequenz von mindestens 80% hat und gleichzeitig mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Fähigkeit, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostisch signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind,
- wobei das Präparat höchstens 5 Gewichtsprozent eines anderen Polypeptidmaterials enthält, mit dem das Polypeptidfragment ursprünglich verknüpft ist, mit der Maßgabe, dass, wenn das Polypeptidfragment aus der Aminosäuresequenz 1–96 mit der SEQ ID Nr.: 2 besteht, das Polypeptidfragment frei von irgendeinem anderen Antigen aus Bakterien, die zum Tuberkulose-komplex gehören, ist.

**[0015]** Weitere Teile der Erfindung beziehen sich auf DNA-Fragmente, die ein Polypeptid mit den obigen Definitionen sowie DNA-Fragmente kodieren, die für die Bestimmung des Vorhandenseins von solche Polypeptide kodierender DNA nützlich sind.

#### DETAILLIERTE OFFENLEGUNG DER ERFINDUNG

**[0016]** In der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen bezeichnet der Begriff „Polypeptidfragment“ sowohl kurze Peptide mit einer Länge von mindestens zwei Aminosäureresten und mindestens 10 Aminosäureresten, Oligopeptide (11-100 Aminosäurereste) und längere Peptide (die übliche Auslegung von „Polypeptid, d. h. mehr als 100 Aminosäurereste in der Länge) sowie Proteine (wobei die funktionale Einheit mindestens ein Peptid, Oligopeptid oder Polypeptid umfasst, das chemisch modifiziert werden kann, indem es glycosyliert, lipidisiert ist oder es prothetische Gruppen umfasst). Die Definition von Polypeptiden umfasst ebenfalls ursprüngliche Formen von Peptiden/Proteinen in Mycobakterien sowie rekombinante Proteine oder Peptide in jedem Typ von Vektorexpressionen, die jede Art von Wirt transformieren, sowie chemisch synthetisierte Peptide.

**[0017]** In dem vorliegenden Kontext bedeutet der Begriff „im Wesentlichen reines Polypeptidfragment“ eine Polypeptidzubereitung, die höchstens 5 Gewichtsprozent eines anderen Polypeptidmaterials enthält, mit dem es ursprünglich verknüpft ist (niedrigere Prozentsätze des anderen Polypeptidmaterials werden bevorzugt, z. B. höchstens 4%, höchsten 3%, höchstens 2%, höchstens 1% und höchstens ½%). Es wird bevorzugt, dass das im Wesentlichen reine Polypeptid mindestens zu 96% rein ist, d. h., dass das Polypeptid mindestens 96 Gewichtsprozent des gesamten, in der Zubereitung vorhandenen Polypeptidmaterials ausmacht, und höhere Prozentsätze werden bevorzugt, wie z. B. mindestens 97%, mindestens 98%, mindestens 99%, mindestens 99,25%, mindestens 99,5% und mindestens 99,75%. Es wird insbesondere bevorzugt, dass sich das Polypeptidfragment in einer „im Wesentlichen reinen Form“ befindet, d. h., dass das Polypeptidfragment im Wesentlichen frei ist von jeglichen anderen Antigenen, mit denen es ursprünglich verknüpft ist, d. h. frei von jeglichen anderen Antigenen von Bakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören. Dies kann durch Zubereitung des Polypeptidfragments mittels rekombinanter Verfahren in einer nicht mycobakteriellen Wirtszelle, wie nachstehend in weiteren Einzelheiten beschrieben werden wird, oder durch Synthesisieren des Polypeptidfragments durch bekannte Verfahren einer Peptidsynthese in fester oder flüssiger Phase, z. B. durch das von Merrifield beschriebene Verfahren oder Variationen davon erreicht werden.

**[0018]** Der Begriff „Teilsequenz“ bezeichnet bei seiner Verwendung in Verbindung mit einem Polypeptid der Erfindung mit einer SEQ ID NR. 2 jegliche kontinuierliche Strecke von mindestens 12 Aminosäureresten, die aus dem von M. tuberculosis abgeleiteten Polypeptid in SEQ ID NO: 2 entnommen ist und damit immunologisch in Bezug auf die Fähigkeit identisch sind, eine erhöhte Resistenz gegen Infektionen mit Bakterien zu verleihen, die zum Tuberkulosekomplex gehören. Damit ist ebenfalls ein Polypeptid aus unterschiedlichen Quellen inbegriffen, wie z. B. andere Bakterien oder sogar eukaryotische Zellen.

**[0019]** Unter Bezugnahme auf ein „immunologisch äquivalentes“ Polypeptid wird hierin verstanden, dass das Polypeptid, wenn es in einer Vaccine oder einem diagnostischen Mittel formuliert ist (d. h. zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Vehikel oder wahlweise einem Adjuvans) wird

I) bei der Verabreichung (entweder allein oder als ein immunologisch aktiver Bestandteil zusammen mit anderen Antigenen) eine erworbene erhöhte spezifische Resistenz in einer Maus und/oder in einem Meerschweinchen und/oder in einem Primaten, wie z. B. einem Menschen gegen Infektionen mit Bakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, verleihen, die mindestens 20% der erworbenen erhöhten Resistenz beträgt, die durch das Mycobacterium bovis BCG verliehen wird, und ebenfalls mindestens 20% der erworbenen erhöhten Resistenz, die durch das Eltern-Polypeptid mit der SEQ ID NR. 2 verliehen wird (wobei das genannte Eltern-Polypeptid im Wesentlichen denselben relativen Standort und dasselbe Muster in einem 2DE-elektronen-gel aufweist, das als das 2DE-Gel zubereitet wird, das in **Fig. 6** gezeigt wird, siehe Beispiele), wobei die erworbene erhöhte Resistenz durch die beobachtete Reduktion bei mycobakteriellen Zählungen in der Milz, der Lunge oder anderen Organhomogenaten bewertet wird, die von der Maus oder Meerschweinchen isoliert werden, die eine Challenge-Infektion mit einem virulenten Stamm von M. tuberculosis erhalten, oder in einem Primaten, wie z. B. einem Menschen, durch die Bestimmung des Schutzes vor der Entwicklung einer klinischen Tuberkulose in einer geimpften Gruppe gegenüber den Beobachtungen in einer Kontrollgruppe bewertet wird, die ein Placebo oder BCG erhält (die erhöhte Resistenz ist bevorzugt höher und entspricht mindestens 50% der schützenden immunologischen Reaktion, die von M. bovis BCG ausgelöst wird, wie z. B. mindestens 60% oder sogar höher, stärker bevorzugt bis mindestens 80% der schützenden immunologischen Reaktion, die von M. bovis BCG ausgelöst wird, wie z. B. mindestens 90%: in einigen Fällen wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Resistenz die Resistenz ablöst, die von M. bovis BCG ver-

liehen wird, und daher wird bevorzugt, dass die Resistenz mindestens 100% beträgt, wie z. B. mindestens 110% der genannten erhöhten Resistenz); und/oder

II) eine diagnostisch signifikante immunologische Reaktion in einem Säugetier auslösen, die eine vorherige oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen anzeigt, die von zum Tuberkulosekomplex gehörenden Mycobakterien abgeleitet ist; diese diagnostisch signifikante Abwehrreaktion kann in der Form einer hypersensiblen signifikanten Abwehrreaktion vom verzögerten Typ sein, z. B. von einem Hauttest bestimmt sein oder kann in Form einer IFN- $\gamma$ -Freisetzung, die in einer IFN- $\gamma$ -Versuchsreihe bestimmt wird, sein, wie nachstehend in Einzelheiten beschrieben. Eine diagnostisch signifikante Reaktion in einer Hauttest-Konfiguration wird eine Reaktion sein, die eine Hautreaktion auslöst, die mindestens einen Durchmesser von 5 mm und mindestens 65% (bevorzugt mindestens 75%, wie z. B. mindestens 85%) der Hautreaktion (bewertet als der Hautreaktionsdurchmesser) aufweist, die durch das Eltern-Polypeptid mit der SEQ ID NR. 2 ausgelöst wird.

**[0020]** Die Fähigkeit des Polypeptidfragments, eine erhöhte Immunität zu verleihen, kann damit durch die Messung in einem Versuchstier, wie z. B. einer Maus oder einem Meerschweinchen, der Reduktion in der mycobakteriellen Zählung von der Milz, der Lunge oder anderen Organhomogenaten, die aus dem Versuchstier isoliert wurden, die eine Challenge-Infektion mit einem virulenten Mycobakterienstamm erhalten haben, die zum Tuberkulosestamm gehören, nachdem sie zuvor mit dem Polypeptid immunisiert wurden, im Vergleich zu den mycobakteriellen Zählungen in einer Kontrollgruppe von Versuchstieren, die mit demselben virulenten Stamm infiziert wurden, wobei die Versuchstiere nicht zuvor gegen Tuberkulose immunisiert wurden, bewertet werden. Der Vergleich der mycobakteriellen Zählungen kann mit mycobakteriellen Zählungen aus einer Gruppe von Versuchstieren durchgeführt werden, die eine Challenge-Infektion mit demselben virulenten Stamm erhalten, nachdem sie mit *Mycobacterium bovis* BCG immunisiert worden sind.

**[0021]** Die mycobakteriellen Zählungen bei den mit einem Polypeptidfragment gemäß der vorliegenden Erfindung immunisierten Versuchstiere müssen mindestens die 5-fache Zählung in Mäusen oder Meerschweinchen aufweisen, die mit *Mycobacterium bovis* BCG immunisiert wurden, wie z. B. höchstens die 3-fache Zählung, und bevorzugt höchstens die 2-fache Zählung.

**[0022]** Eine relevantere Bewertung der Fähigkeit des Polypeptidfragments der Erfindung, eine erhöhte Resistenz zu verleihen, ist der Vergleich des Vorkommens von klinischen Tuberkulosefällen in zwei Gruppen von Individuen (z. B. Menschen oder andere Primaten), wobei eine Gruppe eine wie hierin beschriebene Vaccine erhält, die ein Antigen der Erfindung enthält, und die andere Gruppe entweder ein Placebo oder eine andere bekannte TB-Vaccine (z. B. BCG) erhält. In einer derartigen Konfiguration sollte das Antigen eine schützende Immunität auslösen, die signifikant höher ist als die, die durch die Verabreichung von Placebos geboten wird (gemäß Bestimmung durch dem Fachmann bekannte statistische Verfahren).

**[0023]** Der „Tuberkulosekomplex“ hat seine übliche Bedeutung, d. h. der Mycobakterienkomplex, der TB verursacht, und zwar *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG und *Mycobacterium africanum*.

**[0024]** In dem vorliegenden Kontext steht der Begriff „verstoffwechselnde Mycobakterien“ für lebende Mycobakterien, die sich logarithmisch vermehren und Polypeptide in das Kulturmedium freigeben, in dem sie kultiviert werden.

**[0025]** Der Begriff „Sequenzidentität“ zeigt eine quantitative Messung des Grads der Homologie zwischen zwei Aminosäuresequenzen oder zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen gleicher Länge an: Die Sequenzidentität kann folgendermaßen berechnet werden

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})}{N_{ref}} \cdot 100$$

, in der

**[0026]**  $N_{dif}$  die gesamte Anzahl von nicht identischen Resten in zwei Sequenzen ist, wenn sie aufgereiht werden, und in der  $N_{ref}$  die Anzahl der Reste in einer der Sequenzen ist. Daher wird die Sequenz AGTCAGTC eine Sequenzidentität von 75% mit der Sequenz AATCAATC ( $N_{dif} = 2$  und  $N_{ref} = 8$ ) haben.

**[0027]** Die Sequenzidentität wird hier verwendet, um den Grad der Identität zwischen der Aminosäuresequenz eines bestimmten Polypeptids und der Aminosäuresequenz darzustellen, die in SEQ ID NR. 2 gezeigt wird. Die Aminosäuresequenz, die mit der Aminosäuresequenz zu vergleichen ist, die in SEQ ID NR. 2 gezeigt wird, kann von einer DNA-Sequenz abgeleitet werden, die z. B. durch Hybridisieren gemäß nachstehender

Definition erhalten wird, oder durch konventionelle Verfahren zur Aminosäuresequenzierung erhalten werden kann. Die Sequenzidentität wird bevorzugt auf der Aminosäuresequenz eines reifen Polypeptids bestimmt, d. h. ohne Berücksichtigung irgendeiner Führungssequenz.

**[0028]** Wie aus der obigen Offenlegung hervorgeht, sind Polypeptide, die nicht mit dem Polypeptid identisch sind, das sie SEQ ID NR. 2 aufweist, in der vorliegenden Erfindung inbegriffen. Die Erfindung lässt geringfügige Variationen zu, die keine negativen Auswirkungen auf die Immunogenität der Eltern-Sequenzen haben und die interessante und nützliche neue bindende Eigenschaften oder biologische Funktionen und Immunogenitäten, usw. ergeben können.

**[0029]** Jedes Polypeptidfragment kann damit durch spezifische Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen gekennzeichnet sein. Es versteht sich von selbst, dass solche Sequenzen analoge und Varianten beinhalten, die durch rekombinante Verfahren produziert werden, in denen solche Nukleinsäure- und Polypeptidsequenzen durch Substitution, Einfügen, Hinzufügen und/oder Entfernen einer oder mehrerer Nukleotide in den genannten Nukleinsäuresequenzen modifiziert worden sind, um die Substitution, das Einfügen, das Hinzufügen oder das Entfernen eines oder mehrerer Aminosäurereste(s) in dem rekombinanten Polypeptid zu veranlassen. Wenn im Folgenden der Begriff DNA verwendet wird, versteht es sich von selbst, dass bei der Anzahl von Zwecken, bei denen die DNA durch die RNA substituiert werden kann, der Begriff DNA als RNA-Ausführungsformen einschließlich verstanden werden soll, die für den Fachmann offensichtlich sind. Für den Zweck der Hybridisierung kann die PNA anstelle der DNA verwendet werden, da sich herausgestellt hat, dass die PNA ein sehr dynamisches Hybridisierungsprofil aufweist (Die PNA wird in Nielsen PE et al., 1991, Science 254: 1497–1500 beschrieben).

**[0030]** Sowohl bei immunodiagnostischen als auch bei Vaccinezubereitungen ist es häufig möglich und praktisch, Antigene von Segmenten eines bekannten immunogenen Proteins oder Polypeptids herzustellen. Bestimmte epitopische Regionen können zur Herstellung von Reaktionen verwendet werden, die ähnlich wie die sind, die vom gesamten antigenen Polypeptid produziert werden. Potenzielle Antigene oder immunogene Regionen können durch irgendeine aus einer Reihe von Ansätzen festgestellt werden, wie z. B. Jameson-Wolf oder die Antigenanalyse Kyte-Doolittle oder die Hydrophobizitätsanalyse Hopp and Woods (1981) (siehe z. B. Jameson and Wolf, 1988; Kyte and Doolittle, 1982; oder das US-Patent Nr. 4,554,101). Die Hydrophobizitätsanalyse ordnet jedem Aminosäurerest durchschnittliche Hydrophilicitätswerte zu, von diesen Werten aus können durchschnittliche Hydrophilicitätswerte berechnet werden und die Regionen der größten Hydrophilicität können bestimmt werden. Unter Verwendung einer oder mehrerer dieser Verfahren können Regionen der vorbestimmten Antigenität von den Aminosäuresequenzen abgeleitet werden, die den Polypeptiden der Erfindung zugeordnet werden.

**[0031]** Um relevante T-Zellen-Epitope zu identifizieren, die während einer Abwehrreaktion erkannt werden, ist es alternativ ebenfalls möglich, ein Verfahren der „rohen Gewalt“ anzuwenden: da die T-Zellen-Epitope linear sind, wird die Entfernung von Mutanten der Polypeptide mit der SEQ ID NR. 2, wenn sie systematisch konstruiert ist, aufdecken, welche Regionen der Polypeptide bei einer immunologischen Erkennung wesentlich sind, z. B. durch Unterziehung dieser Entfernung-Mutanten der hierin beschriebenen IFN- $\gamma$ -Versuchsreihe. Ein weiteres Verfahren verwendet überlappende Oligomere (bevorzugterweise synthetische mit einer Länge von z. B. 20 Aminosäureresten), die von dem Polypeptid abgeleitet sind, das die SEQ ID NR. 2 aufweist. Einige davon werden in der IFN- $\gamma$ -Versuchsreihe eine positive Reaktion zeigen, während andere dies nicht tun werden.

**[0032]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Polypeptidfragment der Erfindung ein Epitop für eine T-Hilfszelle.

**[0033]** Obwohl sich herausgestellt hat, dass die Mindestlänge eines T-Zellenepitops mindestens 6 Aminosäuren beträgt, ist es normal, dass solche Epitope aus längeren Aminosäurenstrecken gebildet werden. Daher wird es bevorzugt, dass das Polypeptidfragment der Erfindung eine Länge von mindestens 12 Aminosäureresten aufweist.

**[0034]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Polypeptidfragment der Erfindung frei von Signalsequenzen; dies ist besonders interessant, wenn das Polypeptidfragment synthetisch produziert wird, doch selbst wenn die Polypeptidfragmente rekombinant produziert werden, ist es normalerweise akzeptabel, dass sie nicht durch die Wirtszelle zu dem Periplasma oder dem extrazellulären Raum exportiert werden; die Polypeptidfragmente können durch herkömmliche Verfahren (siehe nachstehende Diskussion) nach dem Aufschluß der Wirtszellen vom Zytosoma gewonnen werden, und wenn es notwendig ist, die Polypeptidfragmente umzufalten, können allgemeine Umfaltverfahren eingesetzt werden, siehe z. B. die Offenlegung in WO

94/18227, in dem ein derartiges allgemeines anwendbares Umverfahren beschrieben wird.

**[0035]** Ein geeignetes Assay für die potentielle Nützlichkeit eines bestimmten, von der SEQ ID NR. 2 abgeleiteten Polypeptidfragments ist die Bewertung der Fähigkeit des Polypeptidfragments zur Durchführung einer IFN- $\gamma$ -Freisetzung von geprägten Memory-T-Lymphozyten. Polypeptidfragmente, die diese Fähigkeit haben, sind erfindungsgemäß besonders interessante Ausführungsformen der Erfindung: Es wird in Erwägung gezogen, dass Polypeptidfragmente, die die Abwehrreaktion der T-Lymphozyten kurz nach dem Eintreten der Infektion stimulieren, bei der Kontrolle der Mycobakterien, die die Infektion verursachen, bevor es den Mycobakterien gelungen ist, sich bis zu einer Anzahl an Bakterien zu vermehren, die zu einer fulminanten Infektion führen, wichtig sind.

**[0036]** Damit ist eine wichtige Ausführungsform der Erfindung ein oben definiertes Polypeptidfragment, das

- 1) eine Freisetzung von IFN- $\gamma$  aus geprägten Memory-T-Lymphozyten induziert, die aus einer Maus, innerhalb von 2 Wochen einer ersten Infektion oder innerhalb von 4 Tagen, nachdem die Maus mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, Re-challenge-infiziert worden war, entnommen worden sind, wobei die Induktion durch den Zusatz des Polypeptids zu einer Suspension, die etwa 200.000 Milzzellen pro ml umfasst, durchgeführt wird, der Zusatz des Polypeptids zu einer Konzentration von 1–4  $\mu$ g Polypeptid pro ml Suspension führt, die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch Bestimmung von IFN- $\gamma$  im Überstand, der 2 Tage nach Zusatz des Polypeptids zur Suspension geerntet wird, bewertbar ist, und/oder
- 2) eine Freisetzung von IFN- $\gamma$  von mindestens 300 pg/ml über dem Hintergrundwert von ungefähr 1.000.000 menschlichen PBMC (peripheren Blut-Mononuklearzellen) pro ml induziert, die aus TB-Patienten in der ersten Infektionsphase oder aus gesunden, mit BCG geimpften Spendern oder aus gesunden Kontakten mit TB-Patienten isoliert worden sind, wobei die Induktion durch den Zusatz des Polypeptids zu einer Suspension, die etwa 1.000.000 PBMC pro ml umfasst, wobei der Zusatz des Polypeptids zu einer Konzentration von 1–4  $\mu$ g Polypeptid pro ml Suspension führt, die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch Bestimmung von IFN- $\gamma$  im Überstand, der 2 Tage nach dem Zusatz des Polypeptids zur Suspension geerntet wird, bewertbar ist, und/oder
- 3) eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung von Rinder-PBMC induziert, das aus Tieren, die vorher mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, sensibilisiert worden sind, wobei die Freisetzung mindestens zweimal die Freisetzung, die bei Rinder-PBMC beobachtet wird, das aus Tieren, die nicht vorher mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, sensibilisiert worden sind, abgeleitet sind.

**[0037]** Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung vom Rinder-PBMC kann z. B. als der optische Dichte(OD)-Index über dem Hintergrund in einem Standard-Zytokin ELISA gemessen werden und sollte daher mindestens zwei sein, höhere Anzahlen, wie z. B. mindestens 3, 5, 8 und 10 werden jedoch bevorzugt.

**[0038]** Die Polypeptidfragmente der Erfindung umfassen bevorzugterweise eine Aminosäuresequenz von mindestens 12 Aminosäureresten in einer Länge, die eine höhere Sequenzidentität von mindestens 80 Prozent mit der SEQ ID NR. 2 hat. Ein bevorzugter Mindestprozentsatz der Sequenzidentität beträgt mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98%, mindestens 99% und mindestens 99,5%.

**[0039]** Wie oben erwähnt, wird es normalerweise interessant sein, die Führungssequenzen von den Polypeptidfragmenten der Erfindung wegzulassen. Durch die Produktion von Fusionspolypeptiden können jedoch höhere Merkmale der Polypeptidfragmente der Erfindung erreicht werden. z. B. sind Fusionspartner, die den Export des Polypeptids erleichtern, wenn sie rekombinant produziert werden, Fusionspartner, die die Reinigung des Polypeptids erleichtern, und Fusionspartner, die die Immunogenität des Polypeptidfragments der Erfindung verbessern, alles interessante Möglichkeiten. Daher bezieht sich die Erfindung ebenfalls auf ein Fusionspeptid, das wenigstens ein Polypeptidfragment umfasst, das oben definiert ist und wenigstens einen Fusionspartner. Der Fusionspartner kann, um die Immunogenität zu verbessern, z. B. aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus einem anderen Polypeptidfragment gemäß obiger Definition besteht (um damit die multiple Expression relevanter Epitope zu erlauben) und ein anderes Polypeptid, das aus einer Bakterie abgeleitet wurde, die zum Tuberkulosekomplex gehört, wie z. B. ESAT-6, MPB64, MPT64 und MPB59 oder mindestens ein T-Zellenepitop irgendeines dieser Antigene. Weitere, die Immunogenität verbessernde Polypeptide, die als Fusionspartner dienen können, sind T-Zellenepitopde (die z. B. von den Polypeptiden ESAT-6, MPB64, MPT64 oder MPB59 abgeleitet wurden) oder andere immunogene Epitope, die die Immunogenität des Zielgenprodukts verbessern, z. B. Lymphokine, wie z. B. INF- $\gamma$ , IL-2 und IL-12. Um die Expression und/oder die Reinigung zu erleichtern, kann der Reinigungspartner z. B. ein bakterielles Fimbrinenprotein sein, z. B. die Pilus-Komponenten Pilin und papA; Protein A; das ZZ-Peptid (ZZ-Fusionen werden von Pharmacia in Schweden vermarktet); das Maltose bindende Protein; Gluthation S-Transferase;  $\beta$ -Galactosidase; oder Poly-Histidin.

**[0040]** Weitere interessante Fusionspartner sind Polypeptide, die lipidisiert sind und dadurch bewirken, dass das immunogene Polypeptid dem Immunsystem auf eine geeignete Weise präsentiert wird. Diese Wirkung ist z. B. von Impfstoffen bekannt, die auf dem Polypeptid Borrelia burgdorferi OspA basieren, bei dem der lipidisierte Membrananker im Polypeptid dem Polypeptid eine selbst-zuführende Wirkung verleiht (das ursprünglich lipidisiert ist), wenn es von Zellen isoliert wird, die dies produzieren. Im Gegensatz dazu ist das Polypeptid OspA immunologisch relativ ruhig, wenn es ohne den Lipidationsanker produziert wird.

**[0041]** Ein weiterer Teil der Erfindung bezieht sich auf ein Nukleinsäurefragment in isolierter Form, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein Polypeptid oder ein Fusions-Polypeptid gemäß obiger Definition kodiert oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz umfasst.

**[0042]** Es wird bevorzugt, dass das Nukleinsäurefragment ein DNA-Fragment ist.

**[0043]** Solch ein Fragment kann problemlos zubereitet werden, z. B. durch direktes Synthetisieren des Fragments durch chemische Mittel, durch Anwendung einer Nukleinsäurerereproduktionstechnologie, wie z. B. der PCR-Technologie des US Patents 4,603,102, oder durch Einführen ausgewählter Sequenzen in rekombinante Vektoren für die rekombinante Produktion.

**[0044]** Es ist bekannt, dass dieselbe Aminosäure durch verschiedene Kodons kodiert werden kann, wobei der Kodoneinsatz u. a. mit der Präferenz der fraglichen Organismen verbunden ist, die die Nukleinsequenz exprimieren. Somit kann mindestens ein Nukleotid oder Kodon eines Nukleinsäurefragments der Erfindung durch andere ausgetauscht werden, was, wenn sie exprimiert werden, zu einem Polypeptid führt, das mit dem Polypeptid identisch oder im Wesentlichen identisch ist, das durch das fragliche Nukleinsäurefragment kodiert wird. Damit erlaubt die Erfindung Variationen in der Sequenz, wie z. B. die Substitution, das Einfügen (unter Einschluss von Introns), das Hinzufügen, das Entfernen und Umlagerung eines oder mehrerer Nukleotide, wobei diese Variationen keinerlei wesentliche Auswirkung auf das Polypeptid haben, das durch das Nukleinsäurefragment oder eine Teilsequenz davon kodiert wird. Der Begriff „Substitution“ soll das Ersetzen eines oder mehrerer Nukleotid(e) in der vollständigen Nukleotidsequenz mit einem oder mehreren unterschiedlichen Nukleotiden bedeuten, „Hinzufügen“ wird als das Hinzufügen von einem oder mehreren Nukleotid(en) an einem Ende der vollständigen Nukleotidsequenz verstanden, „Einfügen“ soll das Einführen eines oder mehrerer Nukleotid(e) innerhalb der vollständigen Nukleotidsequenz bedeuten, „Entfernen“ soll angeben, dass ein oder mehrere Nukleotid(e) aus der vollständigen Nukleotidsequenz entweder an einem Ende der Sequenz oder an jedem geeigneten Punkt darin entfernt worden ist/sind und „Umlagerung“ soll bedeuten, dass zwei oder mehrere Nukleotidreste gegeneinander ausgetauscht worden sind.

**[0045]** Die zu modifizierende Nukleotidsequenz kann cDNA- oder genomischen Ursprungs sein, wie oben besprochen, kann jedoch auch synthetischen Ursprungs sein. Darüber hinaus kann die Sequenz ausgemischten cDNA- und genomischen, ausgemischten cDNA- und synthetischen oder genomischen und synthetischen Ursprungs bestehen, wie oben besprochen. Die Sequenz kann modifiziert worden sein, z. B. ortsspezifische (site-directed) Mutagenese, um zu dem gewünschten Nukleinsäurefragment zu gelangen, das das gewünschte Polypeptid kodiert. Die folgende Diskussion, die sich auf Modifikationen von Nukleinsäuren konzentriert, die das Polypeptid kodieren, müssen so verstanden werden, dass sie ebenfalls solche Möglichkeiten umfassen, sowie die Möglichkeit, die Nukleinsäure durch Ligation von zwei oder mehr DNA-Fragmenten aufzubauen, um das gewünschte Nukleinsäurefragment zu erhalten, sowie Kombinationen der oben erwähnten Prinzipien.

**[0046]** Die Nukleidsequenz kann unter Verwendung einer geeigneten Technik modifiziert werden, die zu der Produktion eines Nukleinsäurefragments führt, das ein Polypeptid der Erfindung kodiert.

**[0047]** Die Modifizierung der Nukleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz des Polypeptids der Erfindung kodiert, sollte eine Sequenz sein, die die immunologische Funktion des resultierenden Polypeptids nicht beeinträchtigt.

**[0048]** Ein bevorzugtes Verfahren zur Zubereitung von Varianten des hierin offen gelegten Antigens ist die ortsspezifische Mutagenese. Diese Technik ist bei der Zubereitung von individuellen Peptiden oder biologisch funktionalen äquivalenten Proteinen oder Peptiden nützlich, die durch spezifische Mutagenese der zugrunde liegenden Nukleinsäure von Antigensequenzen abgeleitet wurden. Die Technik sieht weiterhin eine problemlose Fähigkeit zur Zubereitung und zum Testen von Sequenzvarianten vor, z. B. durch Integrieren von einer oder mehrerer der obigen Überlegungen, durch Einführen einer oder mehrerer Nukleidsequenz(en) in die Nukleinsäure. Die ortsspezifische Mutagenese erlaubt die Produktion von Mutanten durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen, die die Nukleotidsequenz der gewünschten Mutation kodieren, sowie

eine ausreichende Anzahl von benachbarten Nukleotiden, um eine Primer-Sequenz ausreichender Größe und eine Sequenzkomplexität zu bieten, um einen stabilen Duplex auf beiden Seiten der Entfernungsverbindung zu bilden, die durchquert wird. Im typischen Fall wird ein Primer von ungefähr 17 bis 25 Nukleotiden in der Länge bevorzugt, mit ungefähr 5 bis 10 Resten auf beiden Seiten der Verbindung der veränderten Sequenz.

**[0049]** Im Allgemeinen ist die Technik der ortsspezifischen Mutagenese nach dem Stand der Technik bekannt, wie durch Veröffentlichungen (Adelman et al., 1983) beispielhaft belegt ist. Es versteht sich von selbst, dass die Technik im typischen Fall einen Phagen-Vektor verwendet, der sowohl in einzelsträngiger Form als auch in doppelsträngiger Form existiert. Zu den typischen Vektoren, die in der ortsspezifischen Mutagenese nützlich sind, gehören Vektoren, wie z. B. der Phage M12 (Messing et al., 1981). Diese Phagen sind problemlos im Handel erhältlich, und ihre Verwendung ist dem Fachmann allgemein bekannt.

**[0050]** Im Allgemeinen wird die ortsspezifische Mutagenese gemäß dieser Erfindung durchgeführt, indem erst ein einzelsträngiger Vektor erhalten wird, der innerhalb seiner Sequenz eine Nukleinsäuresequenz beinhaltet, die die Polypeptide der Erfindung kodiert. Es wird ein Oligonukleotidprimer zubereitet, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt, und zwar im Allgemeinen synthetisch, z. B. durch das Verfahren von Crea et al. (1978). Dieser Primer wird dann mit dem einzelsträngigen Vektor vergütet und DNA-polymerisierenden Enzymen unterzogen, wie z. B. einem E. coli Polymerase I Klenow-Fragment, um die Synthese des die Mutation tragenden Strangs zu vervollständigen. Damit wird ein Heteroduplex gebildet, in dem ein Strang die nicht-mutierte Originalsequenz kodiert; und der zweite Strang trägt die gewünschte Mutation. Dieser Heteroduplexvektor wird dann zur Transformation der entsprechenden Zellen verwendet, wie z. B. E. coli-Zellen, und es werden Klone ausgewählt, die rekombinante Vektoren beinhalten, die die mutierte Sequenzanordnung beinhalten.

**[0051]** Die Zubereitung der Sequenzvarianten der ausgewählten Nukleinsäurefragmente der Erfindung, die die ortsspezifische Mutagenese verwenden, wir als ein Mittel zur Produktion von potenziell nützlichen Spezies der Gene vorgesehen und ist nicht dazu bestimmt, einschränkend zu sein, da es weitere Wege gibt, auf die Sequenzvarianten der Nukleinsäurefragmente der Erfindung erhalten werden können. z. B. können rekombinante Vektoren, die die gewünschten Gene kodieren, mit mutagenen Mitteln behandelt werden, um Sequenzvarianten (siehe z. B. ein von Eichenlaub, 1979, beschriebenes Verfahren) für die Mutagenese von Plasmid-DNA verwendendes Hydroxylamin zu erhalten.

**[0052]** Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf eine replizierbaren Expressionsvektor, der ein oben definierter Nukleinsäurefragment umfasst, insbesondere einen Vektor, der ein Nukleinsäurefragment umfasst, das ein Polypeptidfragment der Erfindung kodiert.

**[0053]** Der Vektor kann ein Vektor sein, der praktischerweise rekombinanten DNA-Verfahren unterzogen werden kann, und die Wahl des Vektors wird häufig von der Wirtszelle abhängen, in die er eingeführt werden soll. Somit kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d. h. ein Vektor, der als eine extrachromosomal Einheit existiert, deren Replizierung von der chromosomal Replizierung unabhängig ist; Beispiele für einen solchen Vektor sind ein Plasmid, ein Phage, ein Kosmid, ein Mini-Chromosom oder ein Virus. Alternativ kann der Vektor auch ein Vektor sein, der, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt wird, in das Wirtszellengenom integriert wird und zusammen mit dem/den Chromosomen) repliziert wird, in das/die er integriert worden ist.

**[0054]** Expressionsvektoren können konstruiert sein, um irgendeines der hierin offen gelegten DNA-Segmente zu beinhalten. Eine derartige DNA könnte ein Antigenprotein kodieren, das spezifisch für virulente Stämme von Mycobakterien oder sogar Hybridisierungssonden für die Erfassung von Mycobakterien-Nukleinsäuren in Proben kodieren. Längere oder kürzere DNA-Segmente könnten je nach dem gewünschten Antigenprotein verwendet werden. Epitopische Regionen der von der offen gelegten DNA exprimierten oder kodierten Proteine könnten als relativ kurze Segmente der DNA inbegriffen sein. Es ist eine weite Reihe von Expressionsvektoren möglich, unter Einschluss z. B. von DNA-Segmenten, die Reporter-Genprodukte kodieren, die für die Feststellung von heterologen Genprodukten und/oder Resistenzgenen nützlich sind, wie z. B. Antibiotika-Resistenzgene, die bei der Feststellung von transformierten Zellen nützlich sein können.

**[0055]** Der Vektor der Erfindung kann zur Transformation von Zellen verwendet werden, um die Verbreitung der Nukleinsäurefragmente der Erfindung zu erlauben oder um die Expression der Polypeptidfragmente der Erfindung zu ermöglichen. Daher bezieht sich die Erfindung ebenfalls auf eine transformierte Zelle, die mindestens einen solchen Vektor gemäß der Erfindung beherbergt, wobei die genannte Zelle eine Zelle ist, die nicht ursprünglich den Vektor und/oder das Nukleinsäurefragment der Erfindung beherbergt, das hierin enthalten ist. Eine derartige transformierte Zelle (die ebenfalls Bestandteil der Erfindung ist), kann jede geeignete Wirtszelle oder jeder andere Zelltyp sein, wie z. B. ein einzelliger eukaryotischer Organismus, ein Pilz oder eine

Hefe oder eine Zelle, die von multizellulären Organismen abgeleitet worden ist, z. B. einem Tier oder einer Pflanze. Dies gilt insbesondere in Fällen, in denen eine Glykosylation gewünscht wird, dass eine Säugetierzelle verwendet wird, obwohl die Glykosylation von Proteinen in Prokaryoten ein seltenes Ereignis ist. Normalerweise jedoch wird eine prokaryotische Zelle bevorzugt, wie z. B. eine Bakterie, die zu den Gattungen Mycobacterium, Salmonella, Pseudomonas, Bacillus und Escherichia gehört. Es wird bevorzugt, dass die transformierte Zelle eine E. coli, B. subtilis oder M. bovis BCG-Zelle ist, und es wird ganz besonders bevorzugt, dass die transformierte Zelle ein erfindungsgemäßes Polypeptid exprimiert. Letztere eröffnet die Möglichkeit, das Polypeptid der Erfindung durch einfaches Gewinnen von der Kultur zu produzieren, die die transformierte Zelle enthält. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform dieses Teils der Erfindung ist die transformierte Zelle ein Mycobacterium bovis BCG-Stamm: Danish 1331, welches der Mycobacterium bovis Stamm Kopenhagen aus dem Labor Copenhagen BCG Laboratory, Statens Serum Institut, Dänemark ist.

**[0056]** Die Nukleinsäurefragmente der Erfindung erlauben die rekombinante Produktion der Polypeptidfragmente der Erfindung. Allerdings ist die Isolation von der natürlichen Quelle ebenfalls ein Weg, die Polypeptidfragment als Peptidsynthese vorzusehen.

**[0057]** Daher bezieht sich die Erfindung ebenfalls auf ein Verfahren zur Zubereitung eines Polypeptidfragments der Erfindung, wobei das genannte Verfahren ein Einfügen eines Nukleinsäurefragments gemäß obiger Definition in den Vektor umfasst, der in der Lage ist, sich in einer Wirtszelle zu replizieren, dem Einführen des resultierenden rekombinanten Vektors in die Wirtszelle (Es können transformierte Zellen unter Hinzuziehung verschiedener Techniken ausgewählt werden, unter Einschluss des Screening durch Differenzial-Hybridisierung, der Identifizierung von fusionierten Reporter-Genprodukten, Resistenzmarkern, Anti-Antigen-Antikörpern, und dergleichen), dem Kultivieren der Wirtszelle in einem Kulturmedium unter ausreichenden Bedingungen, um die Expression des Polypeptids zu bewirken (selbstverständlich kann die Zelle unter für die Umstände geeigneten Bedingungen kultiviert werden, und wenn DNA gewünscht wird, werden Replizierungsbedingungen verwendet) und dem Gewinnen des Polypeptids von der Wirtszelle oder dem Kulturmedium; oder dem Isolieren des Polypeptids von einem Kurzzeitfiltrat gemäß Definition in Anspruch 1; oder dem Isolieren des Polypeptids von einer ganzen Mycobakterie des Tuberkulosekomplexes oder von Lysaten oder Fraktionen davon, z. B. Fraktionen enthaltende Zellwände oder dem Synthetisieren des Polypeptids durch Festphase-Peptidsynthese oder Flüssigphase-Peptidsynthese.

**[0058]** Das zum Wachsen der transformierten Zellen verwendete Medium kann jedes für den Zweck geeignete konventionelle Medium sein. Ein geeigneter Vektor kann jeder oben beschriebene Vektor sein, und eine geeignete Wirtszelle kann von jedem der oben aufgeführten Zelltypen sein. Das Verfahren, das zur Konstruktion des Vektors und zum Bewirken der Einführung desselben in die Wirtszelle verwendet wird, kann jedes für derartige Zwecke bekannte Verfahren innerhalb des Bereichs rekombinanter DNA sein. In der Folge wird eine detailliertere Beschreibung der Möglichkeiten gegeben:

Im Allgemeinen werden selbstverständlich Prokaryoten für das anfängliche Klonen von Nukleinsequenzen der Erfindung und das Konstruieren der in der Erfindung sinnvollen Vektoren bevorzugt. Zusätzlich zu den bestimmten, in der nachstehenden spezifischeren Offenlegung erwähnten besonderen Stämmen können z. B. beispielhaft Stämme erwähnt werden wie E. coli K12 Stamm 294 (ATCC Nr. 31446), E. coli B, und E. coli X 1776 (ATCC Nr. 31537). Diese Beispiele sollen selbstverständlich veranschaulichend sein anstatt einschränkend.

**[0059]** Prokaryoten werden ebenfalls für die Expression bevorzugt. Die vorgenannten Stämme, sowie E. coli W3110 (F-, lambda-, prototrophisch, ATCC Nr. 273325), bacilli wie z. B. Bacillus subtilis oder andere Enterobakterien, wie z. B. Salmonella typhimurium oder Serratia marcescens, und verschiedene Pseudomonas-Spezies, können verwendet werden. Besonders interessant sind schnell wachsende Mycobakterien, z. B. M. smegmatis, da diese Bakterien eine große Ähnlichkeit mit Mycobakterien des Tuberkulosekomplexes haben und daher gute Chancen aufweisen, die Notwendigkeit der Durchführung von posttranslationalen Modifikationen des Expressionsprodukts zu reduzieren.

**[0060]** Im Allgemeinen werden Plasmidvektoren, die ein Replikon enthalten, und Kontrollsequenzen, die von Spezies abgeleitet wurden, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, im Zusammenhang mit diesen Wirten verwendet. Der Vektor trägt üblicherweise eine Replikationsstelle sowie Markierungssequenzen, die in der Lage sind, eine phänotypische Selektion in transformierten Zellen zu liefern. z. B. wird E. coli im typischen Fall unter Verwendung von pBR322 transformiert, einem Plasmid, das von E. coli-Spezies abgeleitet wurde (siehe z. B., Bolivar et al., 1977, Gen 2: 95). Das pBR322-Plasmid enthält Gene für die Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz und bietet somit problemlose Mittel zur Feststellung von transformierten Zellen. Das pBR-Plasmid oder ein anderes mikrobielles Plasmid oder ein Phage muss ebenfalls Promotoren enthalten oder modifiziert werden, um

diese zu enthalten, die vom Mikroorganismus zur Expression verwendet werden können.

**[0061]** Solche Promotoren, die in den meisten Fällen üblich in rekombinanten DNA-Konstruktionen verwendet werden, beinhalten die B-Laktamase-(Penicillinase-) und Laktose-Promotor-Systeme (Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979) und ein Tryptophan(*trp*)-Promotor-System (Goeddel et al., 1979; EPO Appl. Veröffentl. Nr. 0036776). Während dies die am meisten verwendeten Systeme sind, wurden weitere mikrobielle Promotor entdeckt und verwendet, und Einzelheiten bezüglich ihrer Nukleotidsequenzen wurden veröffentlicht, wodurch Facharbeiter in die Lage versetzt wurden, sie funktional mit Plasmidvektoren zu ligieren (Siebenlist et al., 1980). Bestimmte Gene von Prokaryoten können effizient in *E. coli* von ihren eigenen Promotorsequenzen exprimiert werden und damit die Notwendigkeit eines Hinzufügens von einem weiteren Promotor durch künstliche Mittel von vornherein ausschließen.

**[0062]** Nach der rekombinanten Zubereitung des erfindungsgemäßen Polypeptids kann die Isolierung des Polypeptids z. B. durch Affinitätschromatographie (oder andere konventionelle biochemische, auf Chromatographie basierende Verfahren) unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, der im Wesentlichen spezifisch das erfindungsgemäße Polypeptid bindet, durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung der von Andersen et al. in J. Immunol. Methods 161: 29–39 beschriebenen simultanen Elektro-Elutionstechnik.

**[0063]** Erfindungsgemäß implizieren posttranskriptionale Modifikationen eine Lipidation, Glykosylation, eine Zellteilung oder Dehnung des Polypeptids.

**[0064]** In bestimmten Aspekten erlauben die DNA-Sequenz-Informationen, die durch diese Erfindung vorgesehen werden, die Zubereitung von relativ kurzen DNA-(oder RNA- oder PNA-)Sequenzen mit der Fähigkeit, sich spezifisch mit mycobakteriellen Gensequenzen zu hybridisieren. In diesen Aspekten werden Nukleinsäuresonden einer entsprechenden Länge basierend auf der Berücksichtigung der relevanten Sequenz zubereitet. Die Fähigkeit solcher Nukleinsäuresonden zum spezifischen Hybridisieren mit den mycobakteriellen Gensequenzen verleiht ihnen in einer Reihe von Ausführungsformen eine besondere Nützlichkeit. Am wichtigsten ist es, dass die Sonden in einer Reihe von diagnostischen Assays für die Feststellung des Vorhandenseins von pathogenen Organismen in einer bestimmten Probe verwendet werden können. Allerdings werden weitere Verwendungen in Betracht gezogen, unter Einschluss der Verwendung von Sequenzinformationen für die Zubereitung von mutierten Speziesprimern oder Primern für die Verwendung bei der Zubereitung von anderen genetischen Konstruktionen.

**[0065]** Abgesehen von ihrem Einsatz als Ausgangspunkte für die Synthese von Polypeptiden der Erfindung und für Hybridisierungssonden (nützlich für direkte Hybridisierungs-Versuchsreihen oder als Primer z. B. in anderen PCR oder anderen molekularen Amplifikationsverfahren), können die Nukleinsäurefragmente der Erfindung zur Durchführung der *in vivo*-Expression von Antigenen verwendet werden, d. h. die Nukleinsäurefragmente können in so genannten DNA-Vaccinen verwendet werden. Jüngste Forschungen haben ergeben, dass ein in einem Vektor geklontes DNA-Fragment, das in eukaryotischen Zellen nicht-replikativ ist, in ein Tier (unter Einschluss eines Menschen) z. B. durch intramuskuläre Injektion oder durch perkutane Verabreichung (der so genannte „Gen-Waffen“-Ansatz) eingeführt werden kann. Die DNA wird z. B. durch Muskelzellen aufgenommen, und das entsprechende Gen wird durch einen Promotor exprimiert, der in Eukaryoten funktioniert, z. B. ein viraler Promotor, und das Genprodukt stimuliert anschließend das Immunsystem. Diese neu entdeckten Verfahren sind in Ulmer et al., 1993 offen gelegt, die hiermit durch Bezugnahme mit aufgenommen werden.

**[0066]** Daher bezieht sich die Erfindung ebenfalls auf eine Vaccine, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurenfragment umfasst, wobei die Vaccine die *in vivo*-Expression des Antigens durch ein Tier, unter Einschluss eines Menschen, durchführt, dem die Vaccine verabreicht wurde, wobei die Menge des exprimierten Antigens wirksam ist, um im Wesentlichen eine erhöhte Resistenz gegen Infektionen mit Mycobakterien des Tuberkulosekomplexes in einem Tier, unter Einschluss eines Menschen, zu verleihen.

**[0067]** Die Effizienz einer derartigen „DNA Vaccine“ kann möglicherweise verbessert werden durch die Verabreichung eines Gens, das das Expressionsprodukt kodiert zusammen mit einem DNA-Fragment, das ein Polypeptid kodiert, das die Fähigkeit zur Modulation einer Immunreaktion hat. z. B. könnte ein Gen, das Lymphokin-Vorläufer oder Lymphokine (z. B. IFN- $\gamma$ , IL-2, oder IL-12) kodiert, zusammen mit dem Gen verabreicht werden, das das immunogene Protein kodiert, und zwar entweder durch Verabreichung von zwei separaten DNA-Fragmenten oder durch Verabreichung von beiden DNA-Fragmenten, die in demselben Vektor enthalten sind. Es gibt ebenfalls eine Möglichkeit, DNA-Fragmente zu verabreichen, die eine Vielzahl von Nukleotidsequenzen umfassen, die jeweils die relevanten Epitope der hierin offen gelegten Polypeptide kodieren, so dass

eine kontinuierliche Sensibilisierung des Immunsystems mit einem breiten Spektrum dieser Epitope bewirkt wird.

**[0068]** Wie oben erläutert, sind die Polypeptidfragmente der Erfindung aufgrund ihrer extrazellulären Präsenz in Kulturmedien, die verstoffwechselnde, zum Tuberkulosekomplex gehörende virulente Mycobakterien enthalten, oder aufgrund ihrer hohen Homologien mit solchen extrazellulären Antigenen oder aufgrund ihres Fehlens in M. bovis BCG ausgezeichnete Kandidaten für Vaccinebestandteile oder für Bestandteile in einem Immun-Diagnosemittel.

**[0069]** Somit bezieht sich ein weiterer Teil der Erfindung auf eine immunologische Zusammensetzung, die ein Polypeptid der ein Fusions-Polypeptid gemäß der Erfindung aufweist, umfasst. Um eine optimale Leistung einer solchen immunologischen Zusammensetzung zu gewährleisten, wird bevorzugt, dass sie einen immunologisch und pharmazeutisch verträglichen Träger, ein immunologisch und pharmazeutisch verträgliches Vehikel oder Adjuvans umfasst.

**[0070]** Geeignete Träger werden aus der Gruppe ausgewählt, die aus einem Polymer bestehen, an das/die Polypeptid(e) durch eine hydrophobe, nicht kovalente Interaktion gebunden ist/sind, wie z. B. ein Plastik, z. B. Polystyrol, oder ein Polymer, an das/die Polypeptid(e) kovalent gebunden ist/sind, wie z. B. ein Polysaccharid, oder ein Polypeptid, z. B. Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Keyhole Limpet Hämocyanin. Geeignete Vehikel werden aus der Gruppe ausgewählt, die aus einem Verdünnungsmittel und einem Stellmittel bestehen. Das Adjuvans wird bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDA), Quil A, poly I:C, Freunds unvollständigem Adjuvans, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und Muramyl-Dipeptid (MDP) besteht.

**[0071]** Eine bevorzugte immunologische Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst mindestens zwei unterschiedliche Polypeptidfragmente, von denen jedes unterschiedliche Polypeptidfragment ein Polypeptid oder Fusions-Polypeptid ist, das oben definiert wird. Es wird bevorzugt, dass die immunologische Zusammensetzung zwischen 3 und 20 unterschiedliche Polypeptidfragmente oder Fusions-Polypeptide umfasst.

**[0072]** Eine derartige immunologische Zusammensetzung kann bevorzugt die Form einer Vaccine oder die Form eines Hauttestreagens aufweisen.

**[0073]** Entsprechend den obigen Ausführungen bezieht sich die Erfindung daher auf ein Verfahren zur Produktion einer immunologischen Zusammensetzung gemäß der Erfindung, wobei das Verfahren die Zubereitung, die Synthesierung oder die Isolation eines erfindungsgemäßen Polypeptids und das Löslichmachen gemäß der Erfindung oder das Dispergieren des Polypeptids in einem Medium für eine Vaccine und wahlweise das Hinzufügen von anderen M. tuberculosis-Antigenen und/oder eines Trägers, Vehikels und/oder einer Adjuvans-Substanz umfasst.

**[0074]** Die Zubereitung von Vaccinen, die Peptidsequenzen als aktive Zutaten enthalten, wird im Allgemeinen nach dem Stand der Technik verstanden, wie durch die US-Patente 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; und 4,578,770 beispielhaft belegt wird, die hierin alle durch Bezugnahme mit aufgenommen werden. Im typischen Fall werden solche Vaccinen als injizierbare Vaccinen entweder als flüssige Lösungen oder Suspension zubereitet; feste Formen, die zur Auflösung oder Suspension in Flüssigkeiten vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls zubereitet werden. Die Zubereitung kann ebenfalls emulgiert werden. Die aktive immunogene Zutat wird häufig mit Hilfsstoffen vermischt, die pharmazeutisch verträglich und mit dem Wirkstoff kompatibel sind. Geeignete Hilfsstoffe sind z. B. Wasser, Salzlösung, Dextrose, Glycerol, Ethanol oder dergleichen sowie Kombinationen davon. Wenn gewünscht kann zusätzlich dazu die Vaccine geringfügige Mengen an Hilfssubstanzen enthalten, wie z. B. Benetzungsmittel oder Emulgatoren, pH-Puffer oder Adjuvans, die die Effizienz der Vaccinen verbessern.

**[0075]** Die Vaccinen werden konventionellerweise parenteral, durch Injektion, z. B. entweder subkutan oder intramuskulär verabreicht. Zusätzliche Formulierungen, die für andere Verabreichungsmodi geeignet sind, umfassen Zäpfchen und in einigen Fällen orale Formulierungen. Bei Zäpfchen können die herkömmlichen Bindemittel und Träger z. B. Polyalkylenglycole oder Triglyceride umfassen; derartige Zäpfchen können aus Mischungen gebildet werden, die den Wirkstoff in der Größenordnung von 0,5% bis 10%, bevorzugt 1–2% enthalten. Zu den oralen Formulierungen gehören solche normalerweise verwendeten Hilfsstoffe, wie z. B. pharmazeutische Güteklassen von Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natrium-Saccharin, Zellulose, Magnesium-Karbonat und dergleichen. Diese Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Sus-

pensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Retard-Freisetzungs-Formulierungen oder Pulvern an und enthalten 10–95% Wirkstoff, bevorzugt 25–70%.

**[0076]** Die Proteine können in der Vaccine als neutrale Proteine oder in Salzform formuliert sein. Zu den pharmazeutisch verträglichen Salzen gehören Säurezusatzsalze (die mit freien Aminogruppen des Peptids gebildet werden), und die mit anorganischen Säuren, wie z. B. Salzsäure oder Phosphorsäure oder solchen organischen Säuren wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Mandelsäure und dergleichen gebildet werden. Salze, die mit den freien Carboxylgruppen gebildet werden, können ebenfalls aus anorganischen Basen abgeleitet werden, wie z. B. Natrium, Kalium, Ammonium, Kalzium oder Eisen-Hydroxide, sowie solchen organischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ehtylamino-Ethanol, Histidin, Prokain und dergleichen.

**[0077]** Die Vaccinen werden auf eine mit der Dosierungsformulierung und in einer solchen Menge verabreicht, die therapeutisch wirksam und immunogen ist. Die zu verabreichende Menge hängt von dem zu behandelnden Patienten ab, wozu u. a. die Fähigkeit des Immunsystems des Individuums gehört, eine Immunabwehr aufzubauen, sowie von dem Grad des gewünschten Schutzes. Die geeigneten Dosierungsbandbreiten liegen in der Größenordnung von mehreren hundert Mikrogramm aktiver Zutat pro Impfung mit einer bevorzugten Bandbreite von ungefähr 0,1 µg bis 1000 µg, wie z. B. in der Bandbreite von 1 µg bis 300 µg, und besonders in der Bandbreite von ungefähr 10 µg bis 50 µg. Geeignete Kuren für die anfängliche Verabreichung und Auffrischungsimpfungen sind variabel, sind jedoch durch eine anfängliche Verabreichung, der nachfolgende Inokulationen oder andere Verabreichungen typisiert.

**[0078]** Die Art und Weise der Verabreichung kann stark variiert werden. Anwendbar ist jegliches konventionelle Verfahren zur Verabreichung einer Vaccine. Diese solle die orale Anwendung auf einer festen physiologisch verträglichen Basis oder in einer physiologisch verträglichen Dispersion, parenteral, durch Injektion oder dergleichen beinhalten. Die Dosierung der Vaccine hängt von dem Weg der Verabreichung ab und variiert entsprechend dem Alter der zu impfenden Person und, in geringerem Maße, der Größe der zu impfenden Person.

**[0079]** Einige der Polypeptide der Vaccine sind ausreichend immunogen in einer Vaccine, doch bei einigen anderen wird die Immunabwehr verstärkt, wenn die Vaccine darüber hinaus eine Adjuvans-Substanz umfasst.

**[0080]** Zu den verschiedenen Verfahren zum Erreichen einer Adjuvanswirkung für die Vaccine gehören die Verwendung von Mitteln wie z. B. Aluminiumhydroxid oder -Phosphat (Alum), das gemeinhin also, 0,05 bis 0,1 prozentige Lösung in Phosphatgepufferten Salzlösung verwendet wird, einer Mischung mit synthetischen Polymeren aus Zucker (Carbopol), das als 0,25 prozentige Lösung verwendet wird, einem Aggregat des Proteins in der Vaccine durch Hitzebehandlung bei Temperaturen in einer Bandbreite zwischen 70° bis 101°C, jeweils über Zeiträume von 30 Sek. bis 2 Minuten. Die Aggregatbildung durch Reaktivierung mit Pepsin behandelten (Fab) Antikörpern gegen Albumin, eine Mischung mit bakteriellen Zellen, wie z. B. C. parvum oder Endotoxinen oder Lipopolysacchariden aus gramnegativen Bakterien, eine Emulsion in physiologisch verträglichen Ölvehikeln, wie z. B. Mannid-Monooleat (Aracel A) oder eine Emulsion mit einer 20 prozentigen Lösung eines Perfluorokarbons (Fluosol-DA), das als ein Blocksubstitut verwendet wird, können ebenfalls verwendet werden. Erfindungsgemäß ist DDA (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) ein interessanter Kandidat für ein Adjuvans, doch Freunds vollständiges und unvollständiges Adjuvans sowie ein QuILA und RIBI sind ebenfalls interessante Möglichkeiten. Weitere Möglichkeiten sind Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und Muramyl-Dipeptid (MDP).

**[0081]** Eine weitere sehr interessante (und damit bevorzugte) Möglichkeit zum Erreichen einer Adjuvans-Wirkung besteht in der Verwendung der in Gosselin et al., 1992 beschriebenen Technik (die hiermit hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird). Kurz gesagt kann die Präsentation eines relevanten Antigens, wie z. B. ein Antigen der vorliegenden Erfindung, durch die Verpaarung des Antigens mit Antikörpern (oder Antigen-bindenden Antikörperfragmenten) gegen die FCy-Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen verstärkt werden. Insbesondere wurde nachgewiesen, dass Verpaarungen zwischen dem Antigen und dem Anti-FCyRI die Immungenität zum Zwecke der Impfung verstärken.

**[0082]** Weitere Möglichkeiten beinhalten die Verwendung von immunmodulierenden Substanzen, wie z. B. Lymphokinen (z. B IFN-γ, IL-2 und IL-12) oder synthetischen IFN-γ i-Induzieren, wie z. B. Poly I:C in Kombination mit den oben genannten Adjuvanzien. Wie in Beispiel 3 besprochen, wird in Betracht gezogen, dass solche Mischungen als Antigen und Adjuvans zu höherwertigeren Vaccineformulierungen führen.

**[0083]** In vielen Fällen wird es notwendig sein, multiple Verabreichungen der Vaccine durchzuführen, die üblicherweise sechs Impfungen nicht übersteigen, stärker üblicherweise vier Impfungen nicht übersteigen und bevorzugt eine oder mehr, üblicherweise mindestens rund drei Impfungen. Die Impfung wird normalerweise

zwischen zwei bis zwölf Wochen-Intervallen durchgeführt werden, stärker üblicherweise zwischen drei und fünf Wochen-Intervallen. Periodische Auffrischungsimpfungen in Intervallen von 1 bis 5 Jahren, üblicherweise drei Jahren, werden wünschenswert sein, um die gewünschten Niveaus der schützenden Immunität aufrechtzuerhalten. Auf den Ablauf der Immunisierung in vitro Proliferations-Assays mit PBL (peripherie Blutlymphozyten) folgen, die mit ESAT-6 oder ST-CF zusammen kultiviert werden, und insbesondere durch die Messung der Niveaus an IFN-γ, das von den präparierten Lymphozyten freigesetzt wurde. Die Assays können unter Verwendung konventioneller Etiketten durchgeführt werden, wie z. B. Radionukliden, Enzymen, Glimmer und dergleichen. Diese Techniken sind bekannt und können in einer ganzen Reihe von Patenten wieder gefunden werden, wie z. B. den US-Patenten Nr. 3,791,932; 4,174,384 und 3,949,064, die diese Typen von Versuchsreihen darstellen.

**[0084]** Aufgrund genetischer Variation können unterschiedliche Individuen mit Immunabwehr auf eine variierende Stärke desselben Peptids reagieren. Daher kann die erfindungsgemäße Vaccine mehrere unterschiedliche Polypeptide umfassen, um die Immunabwehr zu erhöhen. Die Vaccine kann zwei oder mehr Polypeptide umfassen, wobei alle Polypeptide obiger Beschreibung entsprechen, oder einige, jedoch nicht alle Peptide können von einer Bakterie abgeleitet sein, das zu dem M. tuberculosis-Komplex gehört. In letzterem Beispiel können die Polypeptide, die nicht notwendigerweise die oben für Polypeptide dargelegten Kriterien erfüllen, entweder aufgrund ihrer eigenen Immunogenität handeln oder als reine Adjuvanzien fungieren. Beispiele für solche interessanten Polypeptide sind MPB64, MPT64 und MPB59, jedoch sind auch jegliche anderen Substanzen, die von Mycobakterien isoliert werden können, ebenfalls mögliche Kandidaten.

**[0085]** Die Vaccine kann 3–20 unterschiedliche Polypeptide umfassen, wie z. B. 3–10 unterschiedliche Polypeptide.

**[0086]** Ein Grund für das Zumischen der Polypeptide der Erfindung mit einem Adjuvans ist die effiziente Aktivierung einer zellulären Immunabwehr. Diese Wirkung kann jedoch auch auf andere Weisen erreicht werden, z. B. durch Exprimieren des wirksamen Antigens in einer Vaccine in einem nicht pathogenen Mikroorganismus. Ein bekanntes Beispiel für einen derartigen Mikroorganismus ist Mycobacterium bovis BCG.

**[0087]** Daher besteht ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung in einer Verbesserung der derzeitig verfügbaren lebenden BCG-Vaccine, die eine Vaccine zur Immunisierung eines Tieres, unter Einschluss eines Menschen, gegen TB ist, die von Mycobakterien verursacht wird, die zum Tuberkulosekomplex gehören, die als wirksame Komponente einen Mikroorganismus umfassen, bei dem eine oder mehrere Kopien einer DNA-Sequenz, die ein Polypeptid gemäß obiger Definition kodiert, in das Genom des Mikroorganismus auf eine Weise aufgenommen wurde, die dem Mikroorganismus die Expression und die Sekretierung des Polypeptids erlaubt.

**[0088]** In dem vorliegenden Kontext bezieht sich der Begriff „Genom“ auf das Chromosom des Mikroorganismus sowie auf extrachromosomal DNA oder RNA, wie z. B. Plasmide. Es wird jedoch bevorzugt, dass die DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung in das Chromosom des nicht pathogenen Organismus eingeführt wird, da dies den Verlust des eingeführten genetischen Materials verhindern wird.

**[0089]** Es wird bevorzugt, dass der nicht pathogene Mikroorganismus ein Bakterium ist, das z. B. aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus den Gattungen Mycobacterium, Salmonella, Pseudomonas und Escherichia besteht. Es wird insbesondere bevorzugt, dass der nicht pathogene Mikroorganismus Mycobacterium bovis BCG ist, wie z. B. der Mycobacterium bovis BCG-Stamm: Danish 1331.

**[0090]** Die Aufnahme einer oder mehrerer Kopien einer Nukleotidsequenz, die das Polypeptid gemäß der Erfindung in einer Mycobakterie aus einem M. bovis BCG-Stamm kodiert, wird die immunogene Wirkung des BCG-Stammes verstärken. Die Aufnahme von mehr als einer Kopie einer Nukleotidsequenz der Erfindung wird in Betracht gezogen, um die Immunabwehr sogar noch mehr zu verstärken und infolgedessen ist ein Aspekt der Erfindung eine Vaccine, bei der mindestens 2 Kopien einer DNA-Sequenz ein Polypeptid kodieren, das in dem Genom des Mikroorganismus aufgenommen wird, wie z. B. mindestens 5 Kopien. Die Kopien der DNA-Sequenzen können entweder identisch sein und identische Polypeptide kodieren oder Varianten derselben DNA-Sequenz sein, die identische oder homologe Polypeptide eines Peptides kodieren oder in einer anderen Ausführungsform unterschiedliche DNA-Sequenzen sein, die unterschiedliche Peptide kodieren, bei denen wenigstens eines der Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung ausgebildet ist.

**[0091]** Die lebende Vaccine der Erfindung kann durch Kultivieren einer transformierten, nicht pathogenen Zelle gemäß der Erfindung zubereitet werden und diese Zelle zu einem Medium für eine Vaccine übertragen und

wahlweise einen Träger, ein Vehikel und/oder eine Adjuvanssubstanz hinzufügen.

**[0092]** Wenn die Diagnose einer vorherigen oder anhaltenden Infektion mit virulenten Mycobakterien das Ziel ist, könnte eine Blutprobe, die mononukleare Zellen (d. h. T-Lymphozyten) von einem Patienten mit einer Probe eines oder mehrerer Polypeptid(e) der Erfindung kontaktiert werden. Dieses Kontaktieren kann *in vitro* durchgeführt werden und eine positive Reaktion könnte z. B. die Proliferation von T-Zellen oder die Freisetzung von Zytokinen sein, wie z. B.  $\gamma$ -Interferon in der extrazellulären Phase (z. B. in einem Kulturüberstand); ein geeigneter *in vivo*-Test wäre ein Hauttest wie oben beschrieben. Es ist ebenfalls denkbar, eine Serumprobe von einem Patienten mit einem Polypeptid der Erfindung zu kontaktieren, wobei der Nachweis einer Bindung zwischen Antikörpern in der Serumprobe und dem Polypeptid eine vorherige oder anhaltende Infektion anzeigt.

**[0093]** Daher bezieht sich die Erfindung auf ein *in vitro*-Verfahren zur Diagnose einer anhaltenden oder vorherigen Sensibilisierung in einem Tier oder einem Menschen mit zum Tuberkulosekomplex gehörenden Bakterien, wobei das Verfahren die Bereitstellung einer Blutprobe von dem Tier oder Menschen und das Kontaktieren der Probe von dem Tier mit dem Polypeptid der Erfindung umfasst, wobei eine signifikante Freisetzung in der extrazellulären Phase mindestens eines Zytokins durch mononukleare Zellen in die Blutprobe anzeigt, dass das Tier sensibilisiert worden ist. Unter dem Begriff „signifikante Freisetzung“ wird hierin verstanden, dass die Freisetzung der Zytokine signifikant höher ist als die Zytokinfreisetzung von einer Blutprobe, die von einem tuberkulosefreien Patienten abgeleitet wird (z. B. einem Patienten, der nicht auf den herkömmlichen Hauttest für TB reagiert). Normalerweise beträgt eine signifikante Freisetzung mindestens die doppelte Freisetzung, die bei einer derartigen Probe beobachtet wird.

**[0094]** Schließlich ist auch ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der speziell mit einem Polypeptid der Erfindung in einer Immun-Versuchsreihe reagiert, oder ein spezifisch bindendes Fragment ebenfalls Teil der Erfindung. Die Produktion von solchen polyklonalen Antikörpern erfordert es, dass ein geeignetes Tier mit dem Polypeptid immunisiert wird und dass diese Antikörper nachfolgend isoliert werden, geeigneterweise per Immunaffinitätschromatographie. Die Produktion von Monoklonen kann durch nach dem Stand der Technik bekannte Verfahren durchgeführt werden, da die vorliegende Erfindung entsprechende Mengen von Antigenen sowohl für die Immunisierung als auch das Screening positiver Hybridome vorsieht.

#### LEGENDEN DER FIGUREN

**[0095]** [Fig. 1](#): Mäuse mit einem Langzeitimmungedächtnis werden sehr wirksam vor einer Infektion mit *M. tuberculosis* geschützt. Mäuse wurden einem Challenge mit *M. tuberculosis* ausgesetzt, und die Milzen wurden in unterschiedlichen Punkten isoliert. Die Milzlymphozyten wurden *in vitro* mit ST-CF stimuliert, und die Freisetzung von IFN- $\gamma$  geprüft (Panel A). Die Inhalte der CFU in den Milzen der beiden Mäusegruppen werden in einem Panel B angezeigt. Die Mäuse mit Immungedächtnis kontrollieren die Infektion innerhalb der ersten Woche und produzieren große Mengen an IFN- $\gamma$  als Reaktion auf das Antigen ST-CF.

**[0096]** [Fig. 2](#): Die in die schützende Immunität implizierten T-Zellen werden vornehmlich zu den Molekülen 6–12 und 17–38 kDa gerichtet. Milz-T-Zellen wurden vier Tage nach dem Challenge mit *M. tuberculosis* isoliert und *in vitro* mit engen Molekularmassenfraktionen von ST-CF stimuliert. Die Freisetzung von IFN- $\gamma$  wurde überprüft.

**[0097]** [Fig. 3](#): Nukleotidsequenz (SEQ ID NR: 1) von cfp7. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NR: 2) von CFP7 wird in einen konventionellen Ein-Buchstabencode unter der Nukleotidsequenz gegeben. Die putative ribosombindende Stelle wird in unterstrichener Kursivschrift geschrieben, ebenso wie die putativen Regionen -10 und -35. Die in Fettschrift geschriebenen Nukleotide sind die, die CFP7 kodieren.

#### BEISPIEL 1

Feststellung eines einzigen Kulturfiltrat-Antigens, das in die schützende Immunität involviert ist

**[0098]** Es wurde eine Gruppe von effizient geschützten Mäusen durch Infizieren von 8–12 Wochen alten weiblichen C57BL/6j Mäusen mit  $5 \times 10^4$  *M. tuberculosis* i. v. erzeugt. 30 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse einer 60-tägigen Antibiotikabehandlung mit Isoniazid unterzogen und wurden dann 200 bis 240 Tage lang am Leben gelassen, um die Herstellung eines verbleibenden langfristigen Immunitätsgedächtnisses zu gewährleisten. Solche Mäuse mit Immungedächtnis waren sehr effizient gegen eine sekundäre Infektion geschützt ([Fig. 1](#)). Die lang anhaltende Immunität in diesem Modell wird durch eine Population von hochgradig reaktiven CD4-Zellen vermittelt, die der Infektionsstelle eingestellt und angeregt werden, große Mengen von IFN- $\gamma$  als

Reaktion auf das ST-CF ([Fig. 1](#)) zu produzieren (Andersen et al. 1995).

**[0099]** Wir haben dieses Modell verwendet, um einzelne Antigene festzustellen, die durch schützende T-Zellen erkannt werden. Mäuse mit Immungedächtnis wurden erneut mit  $1 \times 10^6$  M. tuberculosis i. v. infiziert und Milzlymphozyten wurden an Tag 4–6 zur Neuinfektion geerntet, ein Zeitpunkt, zu dem diese Population hochgradig reaktiv auf ST-CF ist. Die von diesen T-Zellen erkannten Antigene wurden durch die Multi-Elutionstechnik abgebildet (Andersen und Heron, 1993). Diese Technik teilt komplexe Proteinnischungen, die in SDS-PAGE getrennt sind, in enge Fraktionen in einem physiologischen Puffer ein. Diese Fraktionen wurden verwendet, um Milzlymphozyten in vitro zu stimulieren und die Freisetzung von IFN-γ wurde überwacht ([Fig. 2](#)). Das Langzeit-Immungedächtnis der Mäuse erkannte diese Fraktionen vor der TB-Infektion nicht an, doch die während der Erinnerung an die schützende Immunität erhaltenen Milzlymphozyten erkannten eine Reihe von Kulturfiltrat-Antigenen, und es wurde eine Spitzenproduktion von IFN-γ als Reaktion auf Proteine mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von 6–12 und 17–30 kDa ([Fig. 2](#)) festgestellt. Daher wird geschlussfolgert, dass Kulturfiltrat-Antigene innerhalb dieser Regionen die größten Ziele sind, die von Gedächtnis-Steuer-T-Zellen erkannt werden, die zur Freisetzung von IFN-γ während der ersten Phase einer schützenden Abwehrreaktion ausgelöst werden.

## BEISPIEL 2

### Klonen von Genen, die Kulturfiltrat-Antigene mit geringer Masse exprimieren

**[0100]** In Beispiel 1 wurde nachgewiesen, dass die Antigene in der Fraktion mit 1 geringer Molekularmasse in starkem Maße von Zellen erkannt werden, die von Immungedächtnis von Mäusen isoliert werden. Daher wurden mononukleale Antikörper (mAbs) dieser Antigene durch Immunisieren mit der Fraktion mit geringer Masse im RIBI-Adjuvans erzeugt (erste und zweite Immunisierung), gefolgt von zwei Injektionen mit den Fraktionen in Aluminiumhydroxid. Das Fusionieren und Klonen der reaktiven Zelllinien erfolgte gemäß den Standardverfahren (Kohler und Milstein 1975). Das Verfahren führte zu der Bereitstellung von zwei mAbs: ST-3, die zu einem 9 kDa Kulturfiltrat-Antigen (CFP9) und zu einem PV-2 führten, das zu einem 7 kDa Antigen (CFP7) gerichtet ist, wenn das Molekulargewicht von der Migration des Antigens in ein SDS-PAGE geschätzt wird.

**[0101]** Um die Antigene zu identifizieren, die sich an die MAbs binden, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

Die rekombinante λgt11 M. tuberculosis DNA-Bibliothek, die von R. Young (Young, R.A. et al. 1985) konstruiert und durch das Programm IMMTUB der Weltgesundheitsorganisation (WHO.0032.wibr) erhalten wurde, wurde auf Phagen durchsucht, die Genprodukte exprimieren, die die monoklonalen Antikörper ST-3 und PV-2 binden würden.

**[0102]** Rund  $1 \times 10^5$  pfu der Genbibliothek (die rund 25% rekombinante Phagen enthielten) wurden auf Escherichia coli Y1090 (DlacU169, proA<sup>+</sup>, Dlon, araD139, supF, trpC22::tn10[pMC9]ATCC#37197) in weichem Agar ausgestrichen und 2,5 Stunden lang bei 42°C inkubiert.

**[0103]** Auf die Plättchen wurden Blätter von Nitrozellulose gelegt, die mit Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid gesättigt waren, und die Inkubation wurde 2,5 Stunden bei 37°C fortgeführt. Die Nitrozellulose wurde entfernt und mit Proben der monoklonalen Antikörper in PBS mit Tween 20 inkubiert, wobei Tween 20 einer endgültigen Konzentration von 0,05% zugefügt wurde. Die gebundenen monoklonalen Antikörper wurden durch mit antimäuse-Immunoglobulinen aus Kaninchen, die mit Merreettich-Peroxidase konjugiert wurden (P260, Dako, Glostrup, DK), und einer Einfärbereaktion, die 5,5',3,3'-Tetramethylbenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implizierte, sichtbar gemacht.

**[0104]** Positive Plättchen wurden erneut geklont, und die aus einem einzigen Plättchen stammenden Phagen wurden zum Lysogenieren von E. coli Y1089 (DlacU169, proA<sup>+</sup>, Dlon, araD139, strA, hfl150[chr::tn10][pMC9]ATCC nr. 37196) verwendet. Die resultierenden lysogenen Stämme wurden zur Fortpflanzung von Phagenpartikeln für die DNA-Extraktion verwendet. Diese lysogenen E. coli-Stämme wurden folgendermaßen genannt:

AA226 (der das ST-3-reaktive Polypeptid CFP9 exprimiert), der am 28. Juni 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) unter der Zugangsnummer DSM 8377 und gemäß den Bestimmungen des Budapest Abkommens hinterlegt wurde, und

AA242 (der das PV-2-reaktive Polypeptid CFP7 exprimiert), der am 28. Juni 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) unter der Zugangsnummer DSM 8379 und gemäß den Bestimmungen des Budapest Abkommens hinterlegt wurde.

**[0105]** Diese beiden lysogenen E. coli-Stämme wurden in WO 95/01441 offen gelegt, da die mycobakteriellen Polypeptidprodukte dadurch direkt exprimiert wurden. Allerdings wird keinerlei Information bezüglich der Aminosäuresequenzen dieser Polypeptide oder ihres genetischen Ursprungs gegeben, und daher werden der Öffentlichkeit nur die direkten Expressionsprodukte von AA226 und AA242 zugänglich gemacht.

**[0106]** Das st-3 bindende Protein wird als eine mit  $\beta$ -Galactosidase fusioniertes Protein exprimiert, während das pv-2 bindende Protein in einer nicht fusionierten Version exprimiert zu sein scheint.

Sequenzierung der Nukleotidsequenz, die das PV-2 und ST-3 bindende Protein kodiert

**[0107]** Um die Nukleotidsequenz des Gens zu erhalten, das das pv-2 bindende Protein kodiert, wurde das von EcoRI-EcoRI (Strategene) abgeleitete, rund 3 kb M. tuberculosis Fragment von AA242 in der EcoRI-Stelle in dem pBluescriptSK + (Stratagene) teilgeklont und zur Transformation von E. coli XL-1Blue (Stratagene) verwendet.

**[0108]** Um die Nukleotidsequenz des Gens zu erhalten, das das st-3 bindende Protein kodiert, wurde das von EcoRI-EcoRI abgeleitete Fragment von ungefähr 5 kb M. tuberculosis abgeleitet EcoRI- in der EcoRI-Stelle in dem pBluescriptSK + (Stratagene) auf ähnliche Weise teilgeklont und zur Transformation von E. coli XL-1Blue (Stratagene) verwendet.

**[0109]** Die komplette DNA-Sequenz beider Gene wurde durch das Dideoxy-Ketten-Abbruch-Verfahren erhalten, das für die superaufgerollte DNA angepasst wurde, unter Verwendung der Sequenase-DNA Sequenzierungskit-Version 1.0 (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) und per Zyklussequenzierung unter Verwendung des Dye-Terminator-Systems in Kombination mit einer automatisierten Gel-Lesevorrichtung (Modell 373A; Applied Biosystems) gemäß den bereitgestellten Informationen bereitgestellt. Die DNA-Sequenzen werden in SEQ ID NR: 1 (CFP7) und in SEQ ID NR: 3 (CFP9) sowie jeweils in den [Fig. 3](#) und 4 gezeigt. Beide Strände der DNA wurden sequenziert.

#### CFP7

**[0110]** Es wurde ein offener Leserahmen (ORF), der eine Sequenz von 96 Aminosäureresten kodiert von einem ATG-Startkodon bei der Position 91–93, die sich zu einem TAG-Stopp-Kodon bei der Position 379–381 erstreckt, identifiziert. Die deduzierte Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NR: 2 gezeigt (und in [Fig. 3](#), wo konventionelle Ein-Buchstaben-Aminosäurecodes verwendet werden).

**[0111]** CFP7 wird in E. coli als eine nicht fusionierte Version exprimiert. Es wird davon ausgegangen, dass die Nukleotidsequenz bei Position 78–84 die Shine Delgarno-Sequenz ist und es wird davon ausgegangen, dass die Sequenzen von der Position 47–50 und 14–19 jeweils die Regionen -10 und -35 sind:

Teilklonen von CFP7 in Expressionsvektoren

**[0112]** Das ORF kodierende CFP7 war PCR, geklont in den pMST24 (Theisen et al., 1995) Expressionsvektor pRVN01.

**[0113]** Die PCR-Amplifikation wurde in einem thermalen Reaktor („Rapid cycler“, Idaho Technology, Idaho) durch Mischen von 10 ng Plasmid-DNA mit der Hauptmischung (0,5  $\mu$ M jedes Oligonukleotid-Primers, 0,25  $\mu$ M BSA (Stratagene), Puffer mit geringem Salzgehalt (20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1% Triton X-100) (Stratagene), 0,25 mM jedes Deoxynucleosid-Triphosphats und 0,5 U Taq Plus Long DNA-Polymerase (Stratagene)) durchgeführt. Das endgültige Volumen betrug 10  $\mu$ l (alle angegebenen Konzentrationen sind Konzentrationen im endgültigen Volumen). Die Prädenaturierung wurde bei 94°C 30 Sek. lang bei 30 Zyklen des Folgenden durchgeführt; Denaturierung bei 94°C 30 Sek. lang, Vergütung bei 55°C 30 Sek. lang und Dehnung bei 72°C 1 Min. lang.

**[0114]** Die Oligonukleotid-Primer wurden automatisch auf einem DNA-Synthetisierer synthetisiert (Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, PCR-Modus), entblockiert und per Ethanol-Fällung gereinigt.

**[0115]** Die cfp7 Oligonukleotide (TABELLE 1) wurden auf der Basis der Nukleotidsequenz von der CFP7-Sequenz synthetisiert ([Fig. 3](#)). Die Oligonukleotide wurden konstruiert, um eine Smal Restriktions-Enzymstelle am 5' Ende und eine BamHI Restriktions-Enzymstelle am 3' Ende zum gerichteten Klonen zu enthalten.

**[0116]** Durch die Verwendung des PCR wurde eine Smal Stelle unverzüglich 5' von dem ersten Kodon des ORF des 291 bp konstruiert, das das cfp7-Gen kodiert, so dass nur die kodierende Region exprimiert werden würde, und eine BamHi-Stelle wurde direkt nach dem Stop-Kodon am 3'-Ende eingefügt. Das 291 bp PCR-Fragment wurde durch Smal und BamHI gespalten, von einem Agarosegel gereinigt und in die Smal-BamHI-Stellen des mPST24-Expressionsvektors geklont. Die das Fusionsgen enthaltende Vektor-DNA wurde zur Transformation des E. coli XL1-Blue (pRVN01) verwendet.

#### Reinigung des rekombinanten CFP7

**[0117]** Das ORF wurde N-terminal mit dem (His)<sub>6</sub>-Tag (siehe EP-A-0 282 242) fusioniert. Das rekombinante Antigen wurde wie folgt zubereitet: Es wurde kurz eine einzige Kolonie E. coli, die entweder das pRVN01 oder das pRVN02-Plasmid beherbergt, in Luria-Bertani Brühe inkuliert, die 100 µg/ml Ampicillin und 12,5 µg/ml Tetracyclin enthielt, und bei 37°C auf OD<sub>600nm</sub> = 0,5 zum Wachsen gebracht. Dann wurde IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid) zu einer endgültigen Konzentration von 2 mM hinzugefügt (Die Expression wurde entweder durch das starke IPTG indizierbare P<sub>tac</sub> oder den T5-Promotor reguliert), und das Wachstum wurde weitere 2 Stunden fortgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 4.200 × g bei 4°C nach 8 Min. geerntet. Die Bakterien wurden über Nacht in Pelletform bei -20°C gelagert. Die Pellets wurden erneut in BC 40/100 Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 20% Glycerol, 100 mM KCl, 40 mM Imidazol) suspendiert, und die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (5 Mal 30 Sek. lang mit Intervallen von 30 Sek.) bei 4°C gebrochen, gefolgt von einem Zentrifugieren bei 12.000 × g 30 Min. lang bei 4°C, der Überstand (roher Extrakt) wurde zur Reinigung des rekombinanten Antigens verwendet.

**[0118]** Das Histidin-Fusionsprotein (His-rCFP7) wurde von dem rohen Extrakt per Affinitätschromatographie auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule von QIAGEN mit einem Volumen von 100 ml gereinigt. His-rCFP7 und His-rCFP9 binden sich an Ni<sup>2+</sup>. Nach intensiven Waschungen der Säule im BC 40/100 Puffer wurde das Verschmelzungsprotein mit einem BC 1000/100 Puffer eluiert, der 100 mM Imidazol, 20 mM Tris pH 7,9, 20% Glycerol und 1 M KCl enthält. Anschließend wurden die gereinigten Produkte extensiv gegen 10 mM Tris pH 8,0 dialysiert. His-rCFP7 und His-rCFP9 wurden dann von Verunreinigungen per schneller Protein-Flüssigchromatographie (FPLC) über eine Anionen-Austausch-Säule (Mono Q, Pharmacia, Schweden) in 10 mM Tris pH 8,0 mit einem linearen Gradienten NaCl von 0 bis 1 M separiert. Aliquots der Fraktionen wurden durch einen 10%-20% Gradienten Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) 5 analysiert. Gereinigtes His-rCFP7 enthaltende Fraktionen wurden gepoolt.

TABELLE 1. Sequenz der cfp7 Oligonukleotide<sup>a</sup>.

Ausrichtung und Oligonukleotid	Sequenzen (5' → 3')	Position <sup>b</sup> (Nukleotid)
<b>Sense</b>		
pvr3	<u>GCAACACCCGGGATGTCGCAAATCATG</u> (SEQ ID NO: 43)	91–105 (SEQ ID NO: 1)
<b>Antisense</b>		
pvf4	<u>CTACTAACG TTGGATCCCTAGCCGC-</u> CCCATTGGCGG (SEQ ID NO: 45)	381–362 (SEQ ID NO: 1)

<sup>a</sup> Die cfp7 Nukleotide basierten auf der in [Fig. 3](#) gezeigten Nukleotidsequenz (SEQ ID NR: 1).

Unterstrichene Nukleotide sind in der Nukleotidsequenz von cfp7<sup>b</sup> nicht enthalten. Die Positionen, auf die Bezug genommen wird, gehören zu dem nicht unterstrichenen Teil der Primer und entsprechen der in [Fig. 3](#) gezeigten Nukleotidsequenz

#### BEISPIEL 2

##### Abbildung des gereinigten Antigens in einem 2DE-System

**[0119]** Um das gereinigte Antigen zu kennzeichnen, wurde es in einem 2-dimensionalen Elektrophorese-(2DE)-Referenzsystem abgebildet. Dies besteht aus einem silbernen gefärbten Gel, das ST-CF Proteine

enthält, die durch isoelektrisches Fokussieren, gefolgt durch eine Trennung gemäß der Größe in einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese separiert wird. Die 2DE wurde gemäß Hochstrasser et al. (1988) ausgeführt. 85 µg ST-CF wurden auf die isoelektrischen Fokussierungsröhrchen angewendet, in denen BioRad Ampholyte BioLyt 4–6 (2 Teile) und BioLyt 5–7 (3 Teile) inbegriffen waren. Die erste Abmessung wurde in Acralamid-/Piperazin-Röhrchengels bei Vorhandensein von Harnstoff, dem Reinigungsmittel CHAPS und dem Reduktionsmittel DTT bei 400 V 18 Stunden lang und 800 V 2 Stunden lang durchgeführt. Die zweite Abmessung 10–20% SDS-PAGE wurde bei 100 V 18 Stunden lang durchgeführt und silbern eingefärbt. Die Identifikation des CFP7 im 2DE-Referenzgel erfolgte durch Vergleich der Fleckenmuster des gereinigten Antigens mit ST-CF mit und ohne dem gereinigte Antigen. Die Flecken wurden durch die Unterstützung des analytischen 2DE-Software-Systems (Phoretix International, GB) in **Fig. 6** identifiziert.

Biologische Aktivität des gereinigten rekombinannten Antigens.

Interferon-γ Induktion in dem Mausmodell der TB-Infektion.

**[0120]** Primäre Infektionen. 8 bis 12 Wochen alten weiblichen C57BL/6j(H-2<sup>b</sup>), CBA/J(H-2<sup>k</sup>), DBA.2(H-2<sup>d</sup>) und A.SW(H-2<sup>s</sup>) Mäusen (Bomholtegaard, Ry) wurden intravenöse Infektionen über die laterale Schwanzvene mit einem Inokulum von  $5 \times 10^4$  M. tuberculosis verabreicht, das in PBS in einem Vol. von 0,1 ml suspendiert wird. 14 Tage nach der Infektion wurden die Tiere geopfert, und die Milzzellen wurden isoliert und auf das Erkennen des rekombinannten Antigens getestet.

**[0121]** Gedächtnisreaktionen. 8–12 Wochen alten weiblichen Mäusen C57HL/6j(H-2<sup>b</sup>) (Bomholtegaard, Ry) wurden intravenöse Infektionen über die laterale Schwanzvene mit einem Inokulum von  $5 \times 10^4$  M. tuberculosis verabreicht, das in PBS in einem Vol. von 0,1 ml suspendiert war. 1 Monat nach der Infektion wurden die Mäuse zwei Monate lang mit Isoniazid (Merck and Co., Rahway, NJ) und Rifabutin (Farmatalia Carlo Erba, Mailand, Italien) im Trinkwasser behandelt. Die Mäuse wurden 4–6 Monate lang in Ruhe gelassen, bevor sie in Experimenten verwendet wurden. Für die Studie über den Abruf des Immungedächtnisses wurden die Tiere mit einem Inokulum von  $1 \times 10^6$  Bakterien i.v. infiziert und am Tag 4 nach der Infektion geopfert. Die Milzzellen wurden isoliert und auf das Erkennen des rekombinannten Antigens getestet. Die Stimulation mit rCFP7 rCFP7 führte zu einem IFN-γ, das nicht höher als 1/3 der Reaktion betrug, als mit ST-CF IFN-γ produzierenden Zellen festgestellt. Das Antigen hat keine IFN-γ Freisetzung in den naiven Mäusen stimuliert. Zusätzlich dazu war es für die Zellkulturen nicht toxisch.

TABELLE 7. T-Zellen-Reaktionen in primärer TB-Infektion.

Name	c57BL/6J (H2 <sup>b</sup> )	DBA.2(H2 <sup>d</sup> )	CBA/J(H2 <sup>k</sup> )	A.SW(H2 <sup>s</sup> )
rCFP7	+	+	-	-

Mäuse-IFN-γ-Freisetzung des Immungedächtnisses auf M. tuberculosis.

-: keine Reaktion; +: 1/3 ST-CF; ++: 2/3 ST-CF; +++: ST-CF-Niveau.

TABELLE 8. T-Zellen-Reaktionen in Gedächtnis-immunen Tieren.

Name	Gedächtnisreaktion
rCFP7	+

Mäuse-IFN-γ-Freisetzung 14 Tage nach der primären Infektion mit M. tuberculosis.

-: keine Reaktion; +: 1/3 ST-CF; ++: 2/3 ST-CF; +++: ST-CF-Niveau.

Interferon-γ-Induktion in menschlichen TB-Patienten und mit BCG geimpften Menschen.

**[0122]** Menschliche Spender: Es wurden PBMC aus gesunden, mit BCG geimpften Spendern ohne bekannte Exposition gegenüber Patienten mit TB und von Patienten mit Kultur- oder mikroskopisch nachgewiesener Infektion mit Mycobacterium tuberculosis gewonnen. Die Blutproben wurden 1–4 Monate nach der Diagnose von

den TB-Patienten entnommen.

**[0123]** Lymphozytenzubereitungen und Zellkultur: Die PBMC wurden frisch durch Gradientenzentrifugieren aus dem heparinisierten Blut auf Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norwegen) isoliert. Die Zellen wurden erneut in einem kompletten Medium suspendiert: RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N. Y.), ergänzt mit 40 µg/ml Streptomycin, 40 U/ml Penicillin und 0,04 mM/ml Glutamin, (alle von Gibco Laborstories, Paisley, Schottland) und 10% normalem menschlichem ABO-Serum (NHS) von der lokalen Blutbank. Die Anzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch blaue Trypan-Einfärbung bestimmt. Es wurden Kulturen mit 2,5 x 10<sup>5</sup> PBMC in 200 µl in Mikrotiterplättchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) aufgebaut und mit Nicht-Antigenen stimuliert, ST-CF, PPD (2,5 µg/ml); rCFP7, in einer endgültigen Konzentration von 5 µg/ml. Phytohaemagglutinin, 1 µg/ml (PHA, Difco Laborstories, Detroit, MI) wurde als positive Kontrolle verwendet. Die Überstände für die Detektion von Zytokinen wurden 5 Tage nach der Kultur geerntet, gepoolt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

**[0124]** Zytokinanalyse: Interferon-γ (IFN-γ) wurde mit einer standardmäßigen ELISA-Technik unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Paars mAb's von Endogen gemessen und gemäß den Anweisungen für den Gebrauch verwendet. Rekombinantes IFN-γ (Gibco Laborstories) wurde als Standard verwendet. Das Erfassungsniveau für die Versuchsreihe betrug 50 pg/ml. Die Abweichung zwischen den Dubletten-Näpfchen hat 10% des Durchschnitts nicht überschritten. Die Reaktionen von 9 einzelnen Spendern werden in TABELLE 9 dargestellt.

**[0125]** Wie in Tabelle 9 dargestellt, werden hohe Niveaus an IFN-γ Freisetzung nach der Stimulation mit mehreren rekombinanten Antigenen erreicht. rCFP7 scheint von mit BCG geimpften gesunden Spendern am stärksten erkannt zu werden.

TABELLE 9. Die durchschnittlichen Werte aus der Stimulation menschlicher Blutzellen mit 7 mit BCG geimpften und 7 TB-Patienten mit rekombinanten Antigenen. Die SE-Werte werden für jedes Antigen genannt. ST-CF und *M. avium* Kulturfiltrate werden zum Vergleich gezeigt.

Kontrollen, gesund, mit BCG geimpft, keine bekannte TB-Exposition

Spender:	no	ag	PHA	PPD	STCF	CFP7
1	6	9564	6774	3966	7034	
2	48	12486	6603	8067	3146	
3	190	11929	10000	8239	8015	
4	10	21029	4106	3537	1323	
5	1	18750	14209	13027	17725	

TB-Patienten, 1-4 Monate nach der Diagnose

no	ag	PHA	PPD	STCF	CFP7
6	9	8973	5096	6145	852
7	1	12413	6281	3393	168
8	4	11915	7671	7375	104
9	32	22130	16417	17213	8450

### BEISPIEL 3

[0126] Die rekombinanten Antigene wurden einzeln als Untereinheiten-Vaccinen in Mäusen getestet. Fünf Gruppen von 6–8 alten weiblichen C57B1/6j Mäusen (Bomholtegård, Dänemark) wurden subkutan an der Basis des Schwanzes mit Vaccinen der folgenden Zusammensetzungen immunisiert:

Gruppe 1: 10 µg CFP7

Gruppe 2: 50 µg ST-CF

Gruppe 3: Adjuvans-Kontrollgruppe

Gruppe 4: BCG  $2,5 \times 10^5$ /ml, 0,2 ml

Gruppe 5: Kontrollgruppe: unbehandelt

[0127] Die Untereinheits-Vaccine wurde mit DDA als Adjuvans verabreicht. Die Tiere wurden mit einem Volumen von 0,2 ml geimpft. Zwei Wochen nach der ersten Injektion und drei Wochen nach der zweiten Injektion

wurden die Gruppen 1–9 etwas höher im Rücken aufgefrischt. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden den Mäusen Blut abgenommen, und die Blutzellen wurden isoliert. Die induzierte Immunreaktion wurde durch Freisetzung von IFN- $\gamma$  in den Kulturüberstand bei der Stimulation in vitro mit homologen Proteinen überwacht.

**[0128]** 6 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit  $5 \times 10^6$  lebensfähigem Mycobacterium tuberculosis/ml per Aerol-Challenge ausgesetzt. 6 Wochen nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, und die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der Lunge und der Milz der infizierten Mäuse wurde durch Ausstreichen 3-maliger Verdünnungen der Organhomogenste auf 7H11-Plättchen bestimmt. Die Kolonien wurden 2–3 Wochen nach der Inkubation gezählt. Die schützende Wirkung wird als die Differenz zwischen den  $\log_{10}$ -Werten des geometrischen Mittels der Zählungen exprimiert, die von fünf Mäusen der relevanten Gruppe erhalten wurden und als das geometrische Mittel der Zählungen, die aus fünf Mäusen der relevanten Kontrollgruppe erhalten wurden.

**[0129]** Die Ergebnisse der Experimente sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Immunogenität und schützende Wirkung in Mäusen von ST-CF und der Untereinheit-Vaccine

Untereinheit-Vaccine	Immunogenität	Schützende Wirkung
ST-CF	+++	+++
CFP7	++	–

+++ Starker immunogener/hoher Schutz (Niveau des BCG)

++ Mittlerer immunogener/mittlerer Schutz

– Keine Erkennung/kein Schutz

**[0130]** Als Schlussfolgerung haben wir ein Protein identifiziert, das einen hohen Grad an Schutz induziert. FP7 hat in dem Mausmodell keinen Schutz induziert.

#### BEISPIEL 4

Verteilung der cfp7-spezies.

Präsenz von cfp7, in unterschiedlichen mycobakteriellen Spezies

**[0131]** Um die Verteilung des cfp7-Gens in Spezies, die zum M. tuberculosis-Komplex gehören, sowie in anderen Mycobakterien zu bestimmen, wurden PCR und/oder Southern Blotting verwendet. Die verwendeten Bakterienstämme sind in TABELLE 10 aufgelistet. Die genomische DNA wurde aus mycobakteriellen Zellen zubereitet, die zuvor beschrieben wurden (Andersen et al. 1992).

**[0132]** Zur Bestimmung der Verteilung des cfp7-Gens in Spezies, die zum Tuberkulosekomplex gehören, sowie in anderen Mycobakterien wurden PCR-Analysen verwendet. Die verwendeten Bakterienstämme sind in TABELLE 10 aufgelistet. Die genomische DNA wurde aus mycobakteriellen Zellen zubereitet, die zuvor beschrieben wurden (Andersen et al., 1992).

**[0133]** Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden automatisch auf einem DNA-Synthetisierer synthetisiert (Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, PCR-Modus), entblockiert und per Ethanol-Fällung gereinigt. Die für die Analysen verwendeten Primer sind in TABELLE 11 gezeigt.

**[0134]** Die PCR-Amplifikation wurde in einem thermalen Reaktor (schneller Taktgeber, Idaho Technology, Idaho) durch Vermischen von 20 ng Chromosomal mit der Hauptmischung (die 0,5  $\mu$ M von jedem Oligonukleotid-Primer enthielt, 0,25  $\mu$ M BSA (Stratagene), geringem Salzpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1% Triton X-100) (Stratagene), 0,25 mM von jedem Deoxynukleosid-Triphosphat und 0,5 U Taq Plus Long DNA Polymerase (Stratagene)) durchgeführt. Das endgültige Volumen betrug 10  $\mu$ l (alle angegebenen Konzentrationen sind Konzentrationen im endgültigen Volumen). Die Prä-Denaturierung wurde 30 Sek. lang bei 94°C und 30 Zyklen wie folgt durchgeführt: Denaturierung 30 Sek. lang bei 94°C, Vergüten 30 Sek. lang bei 55°C und Dehnung 1 Min. lang bei 72°C.

**[0135]** Es wurden die folgenden Primer-Kombinationen verwendet (die Längen der amplifizierten Produkte

werden in Klammern aufgegeben):

cfp7: pVF1 und PVR1 (274 bp), pVF1 und PVR2 (197 bp), pVF3 und PVR1 (302 bp), pVF3 und PVR2 (125 bp).

TABELLE 10.

In diesem Beispiel verwendete mycobakterielle Stämme		
Spezies und Stamm/Stämme		Herkunft
1. M. tuberculosis	H37RVATCC <sup>a</sup> (ATCC 27294)	
2.	H37RaATCC (ATCC 25177)	
3.	Erdman	Bezogen von A. Lazlo, Ottawa, Kanada
4. M. bovis BCG Unterstamm: Danish 1331		SSI <sup>b</sup>
5.	chinesisch	SSI <sup>c</sup>
6.	kanadisch	SSI <sup>c</sup>
7.	Glaxo	SSI <sup>c</sup>
8.	Russland	SSI <sup>c</sup>
9.	Pasteur	SSI <sup>c</sup>
10.	Japan	WHO <sup>e</sup>
11. M. bovis MNC 27		SSI <sup>c</sup>
12. M. africanum		Isoliert von einem dänischen Patienten
13. M. leprae (armadillo-abgeleitet)		Bezogen von J. M. Colston, London, GB
14. M. avium (ATCC 15769)		ATCC
15. M. kansasii (ATCC 12478)		ATCC
16. M. marinum (ATCC 927)		ATCC

17. M. scrofulaceum (ATCC 19275)		ATCC
18. M. intercellulare (ATCC 15985)		ATCC
19. M. fortuitum (ATCC 6841)		ATCC
20. M. xenopi		Isoliert von einem dänischen Patienten
21. M. flavescens		Isoliert von einem dänischen Patienten
22. M. szulgai		Isoliert von einem dänischen Patienten
23. M. terrae		SSI <sup>c</sup>
24. E. coli		SSI <sup>d</sup>
25. S. aureus		SSI <sup>d</sup>

<sup>a</sup> American Type Culture Collection, USA.

<sup>b</sup> Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark.

<sup>c</sup> Unsere Sammelabteilung Department of Mycobacteriology, Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark.

<sup>d</sup> Department of Clinical Microbiology, Statens Serum Institut, Dänemark.

<sup>e</sup> WHO International Laboratory for Biological Standards, Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark

TABELLE 11.

Sequenz der cfp7-Oligonukleotide.

Ausrichtung und Oligonukleotid	Sequenzen (5' → 3') <sup>a</sup>	Position <sup>b</sup> (Nukleotide)
<b>Sense</b>		
pvR1	<u>GTACGAGAATT</u> CATGTTCG-CAAATCATG (SEQ ID NO: 35)	91–105 (SEQ ID NO: 1)
pvR2	<u>GTACGAGAATT</u> CGAG-CTTGGGGTGCCG (SEQ ID NO: 36)	168–181 (SEQ ID NO: 1)
<b>Gegenrichtung</b>		
pvF1	<u>CGTTAGGGATCCT</u> CATCGC-CATGGTGGTGG (SEQ ID NO: 38)	340–323 (SEQ ID NO: 1)
pvF3	<u>CGTTAGGGATCCGGT</u> TC-CACTGTGCC (SEQ ID NO: 39)	268–255 (SEQ ID NO: 1)

<sup>a</sup> Unterstrichene Nukleotide sind in der Nukleotidsequenz nicht enthalten cfp7.<sup>b</sup> Die angegebenen Positionen sind die nicht unterstrichenen Teile der Primer und entsprechen der Nukleotidsequenz, die in SEQ ID NR: 1 für cfp7 gezeigt werden.

**[0136]** Das Southern Blotting wurde wie zuvor beschrieben (Oettinger und Andersen, 1994) mit den folgenden Änderungen durchgeführt: 2 µg genommischer DNA wurden mit Pvull verdaut, in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoresiert und mit einer Vakuumtransfervorrichtung (Milliblot, TM-v; Millipore Corp., Redford, MA) auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond N-plus; Amersham International plc, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich). Die cfp7 Genfragmente wurden durch PCR von dem pRVN01 Plasmid unter Verwendung der in TABELLE 11 gezeigten Primer amplifiziert. Die Sonden wurden nicht radioaktiv mit einem verstärkten Chemilumineszenzkit (ECL; Amersham International plc, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) verstärkt. Die Hybridisierung und die Ermittlung wurden gemäß den vom Hersteller bereitgestellten Anweisungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in TABELLE 12 zusammengefasst.

TABELLE 12. Interspezies-Analyse der cfp7, cfp9 und mpt51 Gene durch PCR und/oder Southern Blotting und des MPT51-Proteins durch Western Blotting.

	PCR	Southern blot
Spezies und Stamm	cfp7	cfp7
1. M. tub. H37Rv	+	+
2. M. tub. H37Ra	+	N.D.
3. M. tub. Erdmann	+	+
4. M. bovis	+	+
5. M. bovis BCG Danish 1331	+	+
6. M. bovis BCG Japan	+	+
7. M. bovis BCG chinesisch	+	+
8. M. bovis BCG kanadisch	+	+
9. M. bovis BCG Glaxo	+	+
10 M. bovis BCG Russland	+	+
11. M. bovis BCG	+	+

12. M. africanum	+	+
13. M. leprae	-	-
14. M. avium	+	+
15. M. kansasii	+	+
16. M. marinum		+
17. M. scrofulaceum	-	-
18. M. intercellulare	+	+
19. M. fortuitum	-	-
20. M. flavescens	+	+
21. M. xenopi	-	N.D.
22. M. szulgai	(+)	-
23. M. terrae	-	N.D.

+, positive Reaktion; -, keine Reaktion, N.D. nicht bestimmt.

**[0137]** cfp7 wurde in dem M. tuberculosis Komplex festgestellt, der BCG und die umgebenden Mycobakterien; a; M. avium, M. kansasii, M. marinum, M. intracellular und M. flavescens beinhaltet.

#### LISTE DER REFERENZEN

- Andersen, P. and Heron, I., 1993, J. Immunol. Methods 161: 29–39.  
 Andersen, A. B. et al., 1992, Infect. Immun. 60: 2317–2323.  
 Andersen P., 1994, Infect. Immun. 62: 2536–44.  
 Andersen P. et al., 1995, J. Immunol. 154: 3359–72  
 Barkholt, V. and Jensen, A. L., 1989, Anal. Biochem. 177: 318–322.  
 Borodovsky, M., and J. McIninch. 1993, Computers Chem. 17: 123–133.  
 van Dyke M. W. et al., 1992. Gene pp. 99–104.  
 Gosselin et al., 1992, 3. Immunol. 149: 3477–3481.  
 Harboe, M. et al., 1996, Infect. Immun. 64: 16–22.  
 von Heijne, G., 1984, J. Mol. Biol. 173: 243–251.  
 Hochstrasser, D. F. et al., 1988, Anal. Biochem. 173: 424–435  
 Kohler, G. and Milstein, C., 1975, Nature 256: 495–497.  
 Li, H. et al., 1993, Infect. Immun. 61: 1730–1734.  
 Lindblad E. B. et al., 1997, Infect. Immun. 65: 623–629.  
 Mahairas, G. G. et al., 1996, J. Bacteriol. 178: 1274–1282.  
 Maniatis T. et al., 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.  
 Nagai, S. et al., 1991, Infect. Immun. 59: 372–382.  
 Oettinger, T. and Andersen, A. B., 1994, Infect. Immun. 62: 2058–2064.  
 Ohara, N. et al., 1995, Scand. J. immunol. 41: 233–442.  
 Pal P. G. and Horwitz M. A., 1992, Infect. Immun. 60: 4781–92.  
 Pearson, W. R. and Lipman D. J., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444–2448.  
 Ploug, M. et al., 1989, Anal. Biochem. 181: 33–39.  
 Porath, J. et al., 1985, FERS Lett. 185: 306–310.  
 Roberts, A. D. et al., 1995, Immunol. 85: 502–508.  
 Sorensen, A. L. et al., 1995, Infect. Immun. 63: 1710–1717.  
 Theisen, M. et al., 1995, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2: 30–34.  
 Valdes-Stauber, N. and Scherer, S., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 3809–3814.  
 Valdes-Stauber, N. and Scherer, S., 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62: 1283–1286.  
 Williams, N., 1996, Science 272: 27.  
 Young, R. A. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2583–2587.

## AUFLISTUNG DER SEQUENZEN

## (1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

## (i) ANTRAGSTELLER:

- (A) NAME: Statens Serum Institut
- (B) STRAßE: Artillerivej 5
- (C) STADT: Kopenhagen
- (E) LAND : Dänemark
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): 2300 S

## (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Von M. Tuberculoses abgeleitete

Nukleinsäurefragmente und Polypeptidfragmente

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 173

## (iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (EPO)

## (2) INFORMATION FÜR DIE SEQ ID NR: 1:

## (i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 381 Basispaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) VERDRILLUNG: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: kreisförmig

## (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

## (vi) ORIGINAL HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mycobacterium tuberculosis
- (B) STAMM: H37Rv

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: CDS
- (B) STANDORT: 91..381

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: -35\_signal
- (B) STANDORT: 14..19

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME / SCHLÜSSEL: -10\_signal

(B) STANDORT: 47..50

(ix) MERKMAL:

(A) NAME / SCHLÜSSEL: RBS

(B) STANDORT: 78..84

(ix) MERKMAL:

(A) NAME / SCHLÜSSEL: mat\_peptide

(B) STANDORT: 91..381

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGCCGCCGGT ACCTATGTGG CCGCCGATGC TGCGGACGCG TCGACCTATA CCGGGTTCTG	60
ATCGAACCT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr	114
1 5	
CCC GCG ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr	162
10 15 20	
CTG CAG AGC TTG GGT GCC GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln	210
25 30 35 40	
AGT GCG TGG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG TAT CAG GCG TGG CAG GCA Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala	258
45 50 55	
CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT GCG ATG Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met	306
60 65 70	
TCC AGC ACC CAT GAA AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr	354
75 80 85	
GCC GAA GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly	381
90 95	

(2) INFORMATION FÜR DIE SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 96 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

```

Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly
    1          5           10          15

Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile
    20         25           30

Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly
    35         40           45

Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp
    50         55           60

Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr
    65         70           75           80

```

```

Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
    85         90           95

```

### Patentansprüche

1. Präparat eines Polypeptidfragments, das

- a) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NR: 2 gezeigt, umfasst,
  - b) eine Teilsequenz des in a) definierten Polypeptidfragments umfasst, das eine Länge von mindestens 12 Aminosäureresten hat, wobei die Teilsequenz mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Fähigkeit, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostisch signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind, oder
  - c) eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine Sequenzidentität zu dem in a) definierten Polypeptid oder der in b) definierten Teilsequenz von mindestens 80% hat und gleichzeitig mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Fähigkeit, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostisch signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind,
- wobei das Präparat höchstens 5 Gewichtprozent eines anderen Polypeptidmaterials enthält, mit dem das Polypeptidfragment ursprünglich verknüpft ist, mit der Maßgabe, dass, wenn das Polypeptidfragment aus der Aminosäuresequenz 1–96 mit der SEQ ID Nr.: 2 besteht, das Polypeptidfragment frei von irgendeinem anderen Antigen aus Bakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, ist.

2. Präparat nach Anspruch 1, worin das Polypeptidfragment ein Epitop für eine T-Hilfszelle umfasst.

3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, das

- 1) eine Freisetzung von IFN-γ aus geprägten Memory-T-Lymphozyten induziert, die aus einer Maus, innerhalb von 2 Wochen einer ersten Infektion oder innerhalb von 4 Tagen, nachdem die Maus mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, Re-challengeinfiziert worden war, entnommen worden sind, wobei die Induktion durch den Zusatz des Polypeptids zu einer Suspension, die etwa 200.000 Milzzellen pro ml umfasst, durchgeführt wird, der Zusatz des Polypeptids zu einer Konzentration von 1–4 µg Polypeptid pro ml Suspension führt, die Freisetzung von IFN-γ durch Bestimmung von IFN-γ im Überstand, der 2 Tage nach Zusatz des Polypeptids zur Suspension geerntet wird, bewertbar ist, und/oder
- 2) eine Freisetzung von IFN-γ von mindestens 300 pg über dem Hintergrundwert von ungefähr 1.000.000 menschlichen PBMC (peripheren Blut-Mononuklearzellen) pro ml induziert, die aus TB-Patienten in der ersten Infektionsphase oder aus gesunden, mit BCG geimpften Spendern oder aus gesunden Kontakten mit TB-Patienten isoliert worden sind, wobei die Induktion durch den Zusatz des Polypeptids zu einer Suspension, die etwa 1.000.000 PBMC pro ml umfasst, wobei der Zusatz des Polypeptids zu einer Konzentration von 1–4 µg Polypeptid pro ml Suspension führt, die Freisetzung von IFN-γ durch Bestimmung von IFN-γ im Überstand, der 2 Tage nach dem Zusatz des Polypeptids zur Suspension geerntet wird, bewertbar ist, und/oder
- 3) eine IFN-γ-Freisetzung von Rinder-PBMC induziert, das aus Tieren, die vorher mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, sensibilisiert worden sind, wobei die Freisetzung mindestens zweimal die Freisetzung, die bei Rinder-PBMC beobachtet wird, das aus Tieren, die nicht vorher mit Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, sensibilisiert worden sind, abgeleitet sind.

4. Präparat nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Polypeptidfragment frei von irgendeinem anderen Antigen aus Bakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, ist.

5. Präparat nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Polypeptidfragment frei von irgendeiner Signalsequenz ist.

6. Präparat nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Sequenzidentität zu dem Polypeptid, gezeigt in SEQ ID NR: 2 oder zu Teilesequenzen des Polypeptids mit mindestens 12 Aminosäureresten, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98%, mindestens 99% oder mindestens 99,5% ist.

7. Präparat nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Polypeptidfragment lipidisiert ist, um somit einen selbst-adjuvenerenden Effekt auf das Polypeptid zu genehmigen.

8. Fusionspolypeptid, das mindestens ein Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche definiert, und mindestens einen Fusionspartner umfasst.

9. Fusionspolypeptid nach Anspruch 8, worin der Fusionspartner aus der Gruppe bestehend aus einem Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–7 definiert, und ein anderes Polypeptidfragment aus einem Bakterium, das zum Tuberkulosekomplex gehört, abgeleitet ist, gewählt ist.

10. Präparat eines Polypeptidfragments nach irgendeinem der Ansprüche 1–9 zur Verwendung als ein Arzneimittel, wobei das Präparat höchstens 5 Gewichtsprozent eines anderen Polypeptidmaterials enthält, mit dem das Polypeptidfragment ursprünglich verknüpft ist.

11. Verwendung eines Präparats eines Polypeptidfragments nach irgendeinem der Ansprüche 1–9 bei der Herstellung eines pharmazeutischen Zusammensetzung zur Diagnose von oder Impfung gegen Tuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* oder *Mycobacterium bovis*, wobei das Präparat höchstens 5 Gewichtsprozent eines anderem Polypeptidmaterial enthält, mit der das Polypeptidfragment ursprünglich verknüpft ist.

12. Nukleinsäurefragment in isolierter Form, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, das ein Polypeptid, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, kodiert oder eine dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz umfasst.

13. Nukleinsäurefragment nach Anspruch 12, das ein DNA-Fragment ist.

14. Vaccine, umfassend ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Vaccine eine in vivo-Expression von Antigenen durch ein Tier, einschliesslich eines Menschen, dem die Vaccine verabreicht worden ist, bewirkt, wobei die Menge an exprimierten Antigenen wirksam ist, um eine im Wesentlichen erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit Mycobakterien des Tuberkulosekomplexes in einem Tier, einschliesslich eines Menschen, zu verleihen.

15. Nukleinsäurefragment nach Anspruch 12 oder 13 zur Verwendung als ein Arzneimittel.

16. Verwendung eines Nukleinsäurefragments nach Anspruch 12 oder 13 in der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Diagnose von oder Impfung gegen Tuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* oder *Mycobacterium bovis*.

17. Immunologische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert.

18. Immunologische Zusammensetzung nach Anspruch 17, die weiterhin einen immunologisch oder pharmazeutisch verträglichen Träger, ein immunologisch oder pharmazeutisch verträgliches Vehikel oder Adjuvans umfasst.

19. Immunologische Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin der Träger aus der Gruppe bestehend aus einem Polymer, an das das/die Polypeptid/e durch eine hydrophobe nicht-kovalente Wechselwirkung, wie Plastik, z.B. Polystyrol, gebunden ist/sind, ein Polymer, an das das/die Polypeptid/e kovalent gebunden

ist/sind, z.B. Polysaccharide, und ein Polypeptid, z.B. Rinderserum-Albumin, Ovalbumin oder Keyhole Limpet Hemocyanin gewählt ist; das Vehikel aus der Gruppe bestehend aus einem Verdünnungsmittel und einem Stellmittel gewählt ist; und die Adjuvans aus der Gruppe bestehend aus Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDA), Quil A, Poly I:C, Freund's unvollständige Adjuvans, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und Muramyl-Dipeptid (MDP) gewählt ist.

20. Immunologische Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 17 bis 19, umfassend mindestens zwei verschiedene Polypeptidfragmente, wobei jedes verschiedene Polypeptidfragment ein Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, ist.

21. Immunologische Zusammensetzung nach Anspruch 20, umfassend 3–20 verschiedene Polypeptidfragmente, wobei jedes verschiedene Polypeptidfragment so ist, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert.

22. Immunologische Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 15–19, das in der Form einer Vaccine ist.

23. Immunologische Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 17–21, das in der Form einer Hauttestreagenz ist.

24. Vaccine zur Immunisierung eines Tiers, einschliesslich eines Menschen, gegen Tuberkulose, verursacht durch Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, das als wirksame Komponente einen nicht-pathogenen Mikroorganismus umfasst, worin mindestens eine Kopie eines DNA-Fragments, das eine DNA-Sequenz umfasst, die für ein Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, kodiert, in das Genom des Mikroorganismus derart inkorporiert ist, dass der Mikroorganismus das Polypeptid exprimieren und gegebenenfalls sezernieren kann.

25. Vaccine nach Anspruch 24, worin der Mikroorganismus ein Bakterium ist.

26. Vaccine nach Anspruch 25, worin das Bakterium aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen Mycobacterium, Salmonella, Pseudomonas und Escherichia gewählt ist.

27. Vaccine nach Anspruch 26, worin der Mikroorganismus ein Mycobacterium bovis BCG, wie Mycobacterium bovis BCG-Stamm: Danish 1331 ist.

28. Vaccine nach irgendeinem der Ansprüche 24–27, worin mindestens zwei Kopien eines DNA-Fragments, das für ein Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 1–9 kodiert, in das Genom des Mikroorganismus inkorporiert ist.

29. Vaccine nach Anspruch 28, worin die Kopienzahl mindestens 5 ist.

30. Replizierbarer Expressionsvektor, der ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 12 oder 13 umfasst.

31. Vektor nach Anspruch 30, der aus der Gruppe, bestehend aus einem Virus, einer Bakteriophage, einem Plasmid, einem Cosmid und einem Mikrochromosom, gewählt ist.

32. Transformierte Zelle, die mindestens einen Vektor nach Anspruch 30 oder 31 beherbergt.

33. Transformierte Zelle nach Anspruch 32, die ein Bakterium ist, das zum Tuberkulosekomplex gehört, wie eine M. Tuberkulose bovis BCG-Zelle.

34. Transformierte Zelle nach Anspruch 32 oder 33, die ein Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, ausdrückt.

35. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptidfragments, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, umfassend

Insertieren eines Nukleinsäurefragments nach Anspruch 12 oder 13 in einen Vektor, der fähig ist, in einer Wirtszelle zu replizieren, Einführen des resultierenden rekombinanten Vektors in die Wirtszelle, Kultivieren der Wirtszelle in einem Kulturmedium unter Bedingungen, die geeignet sind, Expression des Polypeptids zu bewirken, und Gewinnen des Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium; oder

Isolieren des Polypeptids aus einem Kurzzeitkulturfiltrat, wie es in Anspruch 1 definiert ist; oder  
Isolieren des Polypeptids aus ganzen Mycobacterien des Tuberkulosekomplexes oder aus Lysaten oder Fraktionen davon, z.B. Fraktionen, die Zellwand enthalten; oder  
Synthesieren des Polypeptids durch Fest- oder Flüssigphasepeptidsynthese.

36. Verfahren zur Herstellung eines immunologischen Präparats nach irgendeinem der Ansprüche 17–21, umfassend

Herstellen, Synthesieren oder Isolieren eines Polypeptidfragments, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, und

Solubisieren oder Dispergieren des Polypeptids in einem Medium für eine Vaccine, und gegebenenfalls Zusetzen eines anderen M. tuberculosis Antigens und/oder eines Trägers, Vehikels und/oder einer Adjuvanssubstanz,

oder

Kultivieren einer Zelle nach irgendeinem der Ansprüche 32–34, und

Transferieren der Zellen in ein Medium für eine Vaccine, und

gegebenenfalls Zusetzen eines Trägers, Vehikels und/oder einer Adjuvanssubstanz.

37. In vitro-Verfahren zur Diagnostizierung einer anhaltenden oder vorhergehenden Sensibilisierung in einem Tier oder einem Menschen mit Bakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, wobei das Verfahren umfasst, Kontraktieren einer Blutprobe aus dem Tier mit dem Polypeptidfragment, wie in irgendeinem der Ansprüche 1–9 definiert, eine signifikante Freisetzung von mindestens einem Zytokin in die extrazelluläre Phase durch mononukleare Zellen in der Blutprobe, als indikativ für das Tier sensibilisiert wird.

38. Zusammensetzung zur Diagnostizierung von Tuberkulose bei einem Tier, einschliesslich eines Menschen, umfassend ein Polypeptidfragment, wie in den Ansprüchen 1–9 definiert, oder ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 12 oder 13, gegebenenfalls in Kombination mit einem Mittel zur Detektion.

39. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der spezifisch mit einem Polypeptidfragment in einem Immunoassay reagiert, oder ein spezifisches Bindungsfragment des Antikörpers, worin das Polypeptidfragment ausgewählt ist aus:

a) einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NR: 2 gezeigt,

b) einer Teilsequenz des in a) definierten Polypeptidfragments, das eine Länge von mindestens 12 Aminosäureresten hat, wobei die Teilsequenz mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Fähigkeit, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobacterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostische signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind, oder

c) einer Aminosäuresequenz, die eine Sequenzidentität zu dem in a) definierten Polypeptid oder der in b) definierten Teilsequenz von mindestens 80% hat und gleichzeitig mit dem in a) definierten Polypeptid immunologisch äquivalent ist hinsichtlich der Fähigkeit, eine schützende immunologische Abwehrreaktion gegen Infektionen mit Mycobacterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, hervorzurufen, oder hinsichtlich der Fähigkeit, eine diagnostisch signifikante immunologische Abwehrreaktion auszulösen, die vorhergehende oder anhaltende Sensibilisierung mit Antigenen angibt, die aus Mycobakterien, die zum Tuberkulosekomplex gehören, abgeleitet sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

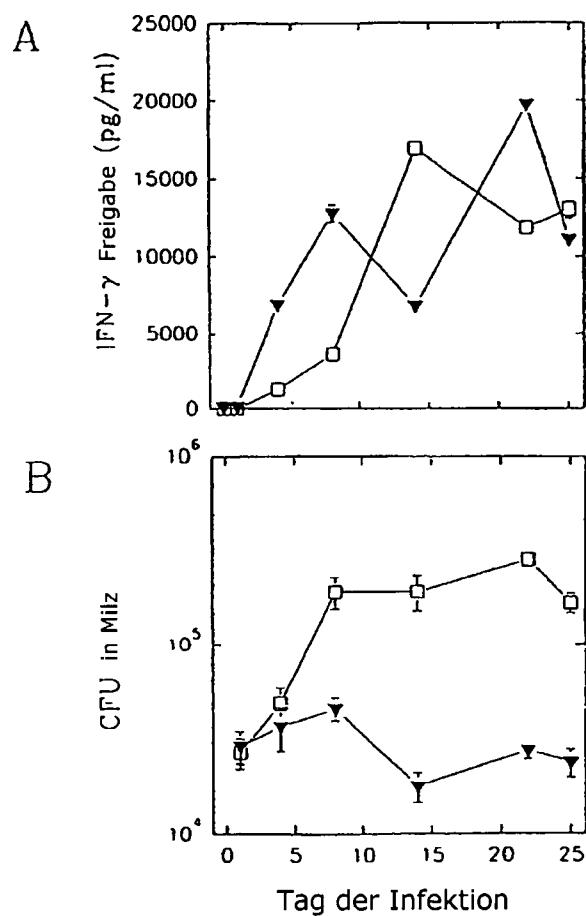


Fig. 1

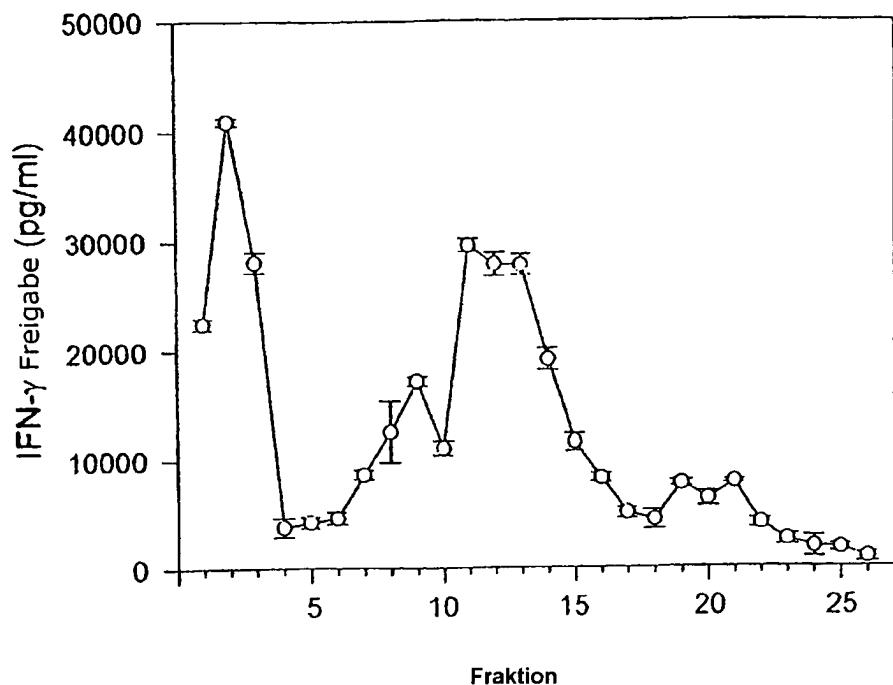


Fig. 2

1 GGCGCCGGT ACCTATGTT CGCCGATGC TGCGGNGCGC TCGACCTATA CCGGGTTCTG  
   -35 Region  
   -10 Region

61 ATCGAACCTT GCTGACCCGAG AGGACTTGTT ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC CCC GCG  
   Shine Delgarno M S Q I M Y N Y P A

121 ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG CTG CAG AGC TTG GGT GCC  
   M L G H A G D M A G Y A G T L Q S L G A

181 GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG ATG GCG TTG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG  
   E I A V E Q A A L Q S A W Q G D T G I T

241 TAT CAG GCG TTG CAG GCA CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG TTG CGG GCC TAT CAT  
   Y Q A W Q A Q W N Q A M E D L V R Y H A

301 GCG ATG TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC GCC GAA  
   Y M S S T H E A N T M A M M A R D T A E

361 GCC GCC AAA TTG GGC GGC TAG  
   A A K W G G \*

Fig. 3