



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 951 T2** 2006.07.27

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 000 163 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 951.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/14341**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 935 604.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/002713**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.07.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **21.01.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.07.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 39/21** (2006.01)

**C07K 16/10** (2006.01)

**A61K 39/104** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**52375 P**

**11.07.1997**

**US**

(74) Vertreter:

**Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München**

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America  
as represented by the Secretary of the Department  
of Health and Human Services, Bethesda, Md., US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**FITZGERALD, J., David, Rockville, US**

(54) Bezeichnung: **PSEUDOMONAS EXOTOXIN A-ÄHNLICHE CHIMÄRE IMMUNOGENE**

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

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

**Beschreibung****Hintergrund der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf die Bereiche chimärer Proteine und der Immunologie.

**[0002]** Eine Immunisierung gegen infektiöse Krankheiten war eine der großen Errungenschaften der modernen Medizin. Impfstoffe können nur dann nützlich sein, wenn der Impfstoff selbst nicht signifikant pathogen ist. Viele Impfstoffe werden hergestellt durch Inaktivieren des Pathogens. Beispielsweise können Hepatitis-Impfstoffe hergestellt werden durch Erhitzen des Virus und Behandeln des Virus mit Formaldehyd. Andere Impfstoffe, beispielsweise bestimmte Polio-Impfstoffe, werden hergestellt durch Attenuieren eines lebenden Pathogens. Jedoch besteht ein Problem bei einer Herstellung attenuierter Impfstoffe für bestimmte infektiöse Mittel, deren Pathologie nicht vollständig verstanden wird, wie beispielsweise HIV.

**[0003]** Die Molekular-Biologie hat die Herstellung von Subunit-Impfstoffen (Untereinheit-Impfstoffen) ermöglicht, also Impfstoffen, in denen das Immunogen ein Fragment oder eine Untereinheit (Subunit) eines Eltern-Proteins oder Komplexes ist. Hüll-Proteine von HIV-1, wie beispielsweise gp120, werden derzeit als Untereinheit-Impfstoffe bewertet. Einige Untersuchungen haben vorgeschlagen, dass Antikörper für den V3-Loop-Bereich von gp120 Schutz über eine Virus-Neutralisation liefern (Emini, E. A., et al., 1992, Nature 355, 728–730; Javaherian, K., et al., 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86, 6768–6772; Steimer, K. S., et al., 1991, Science 254, 105–108; Wang, C. Y., et al., 1991, Science 254, 285–288).

**[0004]** Jedoch können Subunit-Impfstoffe (Untereinheit-Impfstoffe) nicht komplex genug sein, um eine passende Immunantwort zu erzeugen. Auch können dann, wenn das Pathogen hochgradig mutierbar ist, wie beispielsweise HIV, Subunit-Impfstoffe, die eine Stammspezifische Immunität hervorrufen, nicht wirksam dahingehend sein, dass sie für einen globalen Schutz sorgen. Weiter hat die Injektion von inaktivem Virus oder selbst von Hüll-Protein selbst das Potential, eine Mischung von neutralisierenden und sogenannten „verstärkenden“ Antikörpern zu erzeugen. (Toth, F. D., et al., 1994, Clin Exp Immunol 96, 389–394; Eaton, A. M., et al., 1994, Aids Res Hum Retroviruses 10, 13–18; Mitchell, W. M., et al., 1995, Aids 9, 27–34; Montefiori, D. C., et al., 1996, J Infect Dis 173, 60–67).

**[0005]** Die Immunogenizität von Subunit-Impfstoffen wird manchmal erhöht durch Koppeln der Untereinheit an einen Träger-Protein zur Schaffung eines Konjugat-Impfstoffs. Ein derartiges Trägerprotein ist Pseudomonas-Exotoxin A („PE“). Forscher haben ein nicht-immunogenes O-Polysaccharid, das von Lipopolysaccharid („LPS“) abgeleitet war, kovalent an PE gebunden. Der resultierende Konjugat-Impfstoff ergab eine Immunantwort sowohl gegen LPS als auch PE (S. J. Cryz, Jr. et al. (1987) J. Clin. Invest., 80:51–56 und S. J. Cryz, Jr. et al. (1990) J. Infectious Diseases, 163:1040–1045). In einer anderen Studie waren Forscher in der Lage, eine Immun-Antwort gegen Plasmodium falciparum-Antigen hervorzurufen, indem sie es über einen Spacer an PE koppelten (J. U. Que et al. (1988) Infection and Immunity, 56:2645–2649). In einer dritten Studie haben Forscher PE detoxifiziert und haben es chemisch vernetzt mit principle neutralizing domain- (Prinzip-neutralisierende Domäne-; „PND-“) Peptiden von HIV-1. Der Konjugat-Impfstoff rief die Produktion von Antikörpern hervor, die das PND-Peptid erkannten und den homologen Stamm, H-1<sub>MN</sub>, neutralisierten (S. J. Cryz, Jr. et al. (1995) Vaccine, 13:66–71).

**[0006]** Chimäre Proteine, die Komponenten von HIV-1 enthalten, wurden konstruiert, und ihre immunogenen Eigenschaften wurden bewertet. Diese schließen ein: ein Poliovirus-Antigen, das ein Epitop von gp41-Transmembran-Glycoprotein von HIV-1 enthält (Evans, D. J., et al., 1989, Nature 339,385–388), ein Mucin-Protein, das multiple Kopien des V3-Loops enthält (Fontenot, J. D., et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 315–319), eine genetisch modifizierte Cholera-B-Kette mit V3-Loop-Sequenzen (Backstrom, M., et al., 1994, Gene 149, 211–217), und ein chemisch detoxifiziertes PE-V3-Loop-Peptid-Konjugat (Cryz, S., Jr., et al., 1995, Vaccine 13, 67–71).

**[0007]** Der dritte variable (V3)-Loop des Hüll-Proteins, gp120, enthält die Prinzipneutralisierende Domäne von HIV-1 (Emini, E. A., et al., 1992, Nature 355, 728–730; Javaherian, K., et al., 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86, 6788–6772; Rusche, J. R., et al., [published errata appear in Proc Natl Acad Sci USA 22, 8697 1988 und Proc Natl Acad Sci USA 5, 1667 1989] Proc Natl Acad Sci USA 85, 3198–3202 1988). Obwohl V3-Loops bei den verschiedenen HIV-1-Stämmen erheblich variieren (Berman, P. W., et al., 1990, Nature 345, 622–625), wurde gezeigt, dass spezielle Antikörper für diese Region die Infektivität des Virus neutralisieren und eine virale Zellfusion in vitro verhindern (Kovacs, J. A., et al., 1993, J. Clin Invest 92, 919–928). Weiter scheint eine systemische Immunisierung mit einer rekombinanten Form von gp120 ausreichend zu sein, um Schimpansen

vor einer Infektion durch eine systemische HIV-1-Bedrohung zu schützen (White-Scharf, M. E., et al., 1993, Virology 192, 197–206).

**[0008]** HIV erlangt Einlass in den Körper an Schleimhaut-Oberflächen. Jedoch ist nicht bekannt, dass häufig derzeit erhältliche HIV-Immunogene eine sekretorische Immun-Antwort hervorrufen, die einen viralen Zugang durch die Schleimhaut inhibieren.

**[0009]** Die Entwicklung eines stabilen Impfstoffs, der sowohl humorale als auch zelluläre Antworten hervorrufen könnte, einschließlich einer Schleimhaut-Immunität, und der flexibel genug ist, um Sequenzen von vielen Stämmen eines infektiösen Mittels zu inkorporieren, wie beispielsweise HIV-1, wäre wünschenswert.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliche („PE-ähnliche“) chimäre Immunogene, in denen ein nicht-natives Epitop in die Ib-Domäne eingesetzt ist, sind nützlich dafür, humorale, Zell-vermittelte und sekretorische Immun-Antworten gegen das nicht-native Epitop hervorzurufen. Insbesondere kann das nicht-native Epitop der V3-Loop des gp120-Proteins von HIV sein. Solche Chimären sind nützlich in Impfstoffen gegen eine HIV-Infektion.

**[0011]** PE-chimäre Immunogene bieten einige Vorteile. Zum einen können sie durch vollständig rekombinante Mittel hergestellt werden. Dies eliminiert die Notwendigkeit, das Epitop an PE über chemische Vernetzung zu binden und das Exotoxin chemisch zu inaktivieren. Rekombinante Verfahrensweisen erlauben es auch, eine chimäre „Kassette“ herzustellen, die eine Insertionsstelle für das nicht-native Epitop der Wahl an dem Ort der Ib-Domäne aufweist. Dies ermöglicht es, bestehende Varianten eines Epitops oder neue Varianten schnell entstehender Epitope schnell einzusetzen. Dies ermöglicht die Produktion von Impfstoffen, die einen Cocktail verschiedener Immunogene einschließen.

**[0012]** Zum zweiten kann Pseudomonas-Exotoxin durch Engineering so bearbeitet werden, dass die Funktion seiner Domäne geändert wird, wodurch eine Vielzahl von Aktivitäten bereitgestellt wird. Beispielsweise kann man durch Ersetzen der nativen Zellbindungs-Domäne von Pseudomonas-Exotoxin A (Domäne Ia) durch einen Liganden für einen speziellen Zell-Rezeptor die Chimäre so auszurichten, dass sich an den speziellen Zell-Typ bindet.

**[0013]** Zum dritten können deswegen, weil die Ib-Domäne einen Cystein-Cystein-Loop einschließt, Epitope, die hinsichtlich ihrer Natur so eingeschränkt sind, in einer Konformation nahe der nativen Konformation präsentiert werden. Dies unterstützt das Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen das native Antigen. Beispielsweise ist ein Turn-Turn-Helix-Motiv offensichtlich mit (durch eine Disulfid-Bindung eingeschränkten) kreisförmigen Peptiden, jedoch nicht mit linearen Peptiden (Ogata, M., et al., 1990, Biol Chem 265, 20678–20685). Auch werden kreisförmige Peptide bereitwilliger durch monoklonale Anti-V3-Loop-Antikörper erkannt als lineare Peptide (Catasti, P., et al., 1995, J Biol Chem 270, 2224–2232).

**[0014]** Zum vierten können die Chimären gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um eine humorale, eine Zell-vermittelte oder eine sekretorische Immun-Antwort hervorzurufen. Pseudomonas-Exotoxin dient – wie berichtet wurde – als „Super-Antigen“, das sich direkt an MHC-Klasse-II-Moleküle ohne vorherige Verarbeitung in einer das Antigen präsentierenden Zelle bindet (P. K. Lagaard et al., (1991) Cellular Immunology 135:372–382). Dies fördert eine durch MHC-Klasse II-vermittelte Immun-Antwort gegen Zellen, die Proteine tragen, die das nicht-native Epitop enthalten. Auch gehen bei Bindung an einen Zell-Oberflächen-Rezeptor chimäre Pseudomonas-Exotoxine in das Cytosol über. Dies macht eine MHC-Klasse I-abhängige Immun-Antwort gegen Zellen möglich, die das nicht-native Epitop auf ihrer Oberfläche tragen. Dieser Aspekt ist besonders vorteilhaft, da normalerweise das Immunsystem eine MHC-Klasse I-abhängige Immun-Antwort nur gegen Proteine aufbaut, die durch die Zelle gebildet werden. Auch kann man durch Richten der Chimäre gegen eine Schleimhaut-Oberfläche eine sekretorische Immun-Antwort hervorrufen, die IgA einschließt.

**[0015]** In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung bereit, ein nicht-toxisches Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches („PE-ähnliches“) chimäres Immunogen, umfassend: (1) eine Zellerkennungs-Domäne von zwischen 10 und 1500 Aminosäuren, die sich an einen Zelloberflächen-Rezeptor bindet; (2) eine Translokations-Domäne, umfassend eine Aminosäure-Sequenz, die im wesentlichen identisch ist mit einer Sequenz der PE-Domäne II, und ausreichend ist, eine Translokation zu einem Zell-Cytosol zu bewirken; (3) eine nicht-native Epitop-Domäne, umfassend eine Aminosäure-Sequenz von zwischen 5 und 1500 Aminosäuren, die für ein nicht-natives Epitop kodiert; und (4) eine Aminosäure-Sequenz, die für eine Retentions-Domäne des Endo-

plasmatischen Reticulums („ER“) kodiert, die eine ER-Retentions-Sequenz umfasst. In einer Ausführungsform umfasst das chimäre Immunogen die Amino-Säure-Sequenz eines nicht-toxischen PE, in der die Domäne Ib weiter das nicht-native Epitop zwischen den beiden Cystein-Resten der Domäne Ib umfasst.

**[0016]** In bestimmten Ausführungsformen lässt sich die Zell-Erkennungs-Domäne binden an einen  $\alpha 2$ -Macroglobulin-Rezeptor („ $\alpha 2$ -MR“), einen Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, „EGF“), den IL-2-Rezeptor, den IL-6-Rezeptor, den Rezeptor für Human-Transferrin oder an gp120. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Zell-Erkennungs-Domäne Aminosäure-Sequenzen eines Wachstums-Faktors. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Translokations-Domäne die Aminosäuren 280 bis 364 der Domäne II von PE. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Domäne des nicht-nativen Epitops einen Cystein-Cystein-Loop, der das nicht-native Epitop umfasst. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Domäne des nicht-nativen Epitops eine Aminosäure-Sequenz, die gewählt ist aus dem V3-Loop aus HIV-1. In einer weiteren Ausführungsform ist die ER-Retentions-Domäne die Domäne III von PE, die eine Mutation umfasst, die die ADP-Ribosylierungs-Aktivität eliminiert, wie beispielsweise  $\Delta E553$ . Die ER-Retentions-Domäne kann die ER-Retentions-Sequenz REDLK (SEQ ID Nr. 11), REDL (SEQ ID Nr. 12) oder KDEL (SEQ ID Nr. 13) umfassen. In einer weiteren Ausführungsform ist das nicht-native Epitop ein Epitop von einem Pathogen (z. B. ein Epitop von einem Virus, Bakterium oder an parasitischen Protozoa) oder von einem Krebs-Antigen.

**[0017]** In einer weiteren Ausführungsform ist die Zell-Erkennungs-Domäne die Domäne Ia von PE, ist die Translokations-Domäne die Domäne II von PE, umfasst die Domäne des nicht-nativen Epitops eine Aminosäure-Sequenz, die für ein nicht-natives Epitop kodiert, das zwischen zwei Cystein-Resten der Domäne Ib von PE eingeschoben ist, und ist die ER-Retentions-Domäne die Domäne III von PE und umfasst eine Mutation, die die ADP-Ribosylierungs-Aktivität eliminiert.

**[0018]** In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein rekombinantes Polynucleotid bereit, das eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die für das nicht-toxische Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert. In einer Ausführungsform ist das rekombinante Polynucleotid ein Expressions-Vektor, der weiter eine Expressions-Kontroll-Sequenz umfasst, die operativ an die Nucleotid-Sequenz gebunden ist.

**[0019]** Gemäß einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung bereit eine rekombinante Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogen-Klonierungs-Plattform, die eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die kodiert für: (1) eine Zell-Erkennungs-Domäne von zwischen 10 und 1500 Aminosäuren, die sich an einen Zell-Oberflächen-Rezeptor bindet; (2) eine Translokations-Domäne, die eine Aminosäure-Sequenz umfasst, die im wesentlichen identisch einer Sequenz der PE-Domäne II ist und ausreichend ist, um eine Translokation zum Zell-Cytosol zu bewirken; (3) eine Aminosäure-Sequenz, die für eine Retentions-Domäne eines endoplasmatischen Reticulums („ER“) kodiert, die eine ER-Retentions-Sequenz umfasst; und gegebenenfalls (4) eine Splicing-Stelle zwischen der Sequenz, die für die Translokations-Domäne kodiert, und der Sequenz, die für die ER-Retentions-Domäne kodiert. In einer Ausführungsform ist das rekombinante Nucleotid ein Expressions-Vektor, der weiter eine Expressions-Kontroll-Sequenz umfasst, die operativ an die Nucleotid-Sequenz gebunden ist.

**[0020]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen ein nicht-natives Epitop bereit, das natürlich innerhalb eines Cystein-Cystein-Loops zugegen ist. Das Verfahren umfasst den Schritt des Inokulierens eines Tiers mit einem nicht-toxischen Pseudomonas-Exotoxin A-ähnlichen chimären Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung, in dem die nicht-native Epitop-Domäne einen Cystein-Cystein-Loop umfasst, der das nicht-native Epitop umfasst.

**[0021]** In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung bereit einen Impfstoff, der wenigstens ein Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches chimäres Immunogen umfasst, das umfasst: eine Zellerkennungs-Domäne, eine Translokations-Domäne, eine nicht-native Epitop-Domäne, die ein nicht-natives Epitop umfasst, und eine Retentions-Domäne des Endoplasmatischen Reticulums („ER“), die eine ER-Retentions-Sequenz umfasst. In einer Ausführungsform umfasst der Impfstoff eine Vielzahl von PE-ähnlichen chimären Immunogenen, wobei jedes Immunogen ein unterschiedliches nicht-natives Epitop aufweist. In einer weiteren Ausführungsform sind die verschiedenen nicht-nativen Epitope Epitope von verschiedenen Stämmen desselben Pathogens.

**[0022]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung bereit ein Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen ein nicht-natives Epitop in einem Subjekt bzw. in einer Person. Das Verfahren umfasst

den Schritt des Verabreichens eines Impfstoffs an die Person, der wenigstens ein Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches chimäres Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst. In einer Ausführungsform umfasst das nicht-native Epitop ein Bindungsmotiv für ein Molekül der MHC-Klasse II der Person, und die hervorgerufene Immun-Antwort ist eine MHC-Klasse II-abhängige, Zell-vermittelte Immun-Antwort. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das nicht-native Epitop ein Bindungsmotiv für ein MHC-Klasse I-Molekül der Person, und die hervorgerufene Immun-Antwort ist eine MHC-Klasse I-abhängige, Zell-vermittelte Immun-Antwort.

**[0023]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen Polynucleotid-Impfstoff bereit, der wenigstens ein rekombinantes Polynucleotid umfasst, das eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die für ein nicht-toxisches Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches chimäres Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert.

**[0024]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen ein nicht-natives Epitop in einem Subjekt bzw. in einer Person bereit. Das Verfahren umfasst den Schritt des Verabreichens eines Polynucleotid-Impfstoffs an die Person, der wenigstens ein rekombinantes Polynucleotid umfasst, das eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die für ein nicht-toxisches Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches chimäres Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert. In einer Ausführungsform ist das rekombinante Nucleotid ein Expressions-Vektor, der eine Expressions-Steuerungs-Sequenz umfasst, die operativ mit der Nucleotid-Sequenz verknüpft ist.

**[0025]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen ein nicht-natives Epitop in einem Subjekt bzw. in einer Person bereit, wobei das Verfahren die Schritte des Transfektierens von Zellen mit einem rekombinanten Nucleotid umfasst, das eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die für ein nicht-toxisches Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches chimäres Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, und Verabreichen der Zellen an die Person umfasst.

**[0026]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Hervorrufen einer IgA-vermittelten sekretorischen Immun-Antwort bereit. Die Verfahren schließen das Verabreichen eines nicht-toxischen Pseudomonas chimären Immunogens gemäß der vorliegenden Erfindung an eine Schleimhaut-Membran ein, worin sich die Zell-Erkennungs-Domäne an einem Rezeptor auf einer Schleimhaut-Membran bindet. Die Zell-Erkennungs-Domäne kann sich an  $\alpha 2$ -MR (z. B. die native Zell-Erkennungs-Domäne von PE) oder an den EGF-Rezeptor binden. Die Schleimhaut-Oberfläche kann der Mund, die Nase, die Lunge, der Darm, die Vagina, der Dickdarm oder das Rectum sein.

**[0027]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung bereit, die sekretorische IgA-Antikörper umfasst, die spezifisch ein Epitop eines Pathogens erkennen, das in den Körper durch eine Schleimhaut-Oberfläche eintritt, z. B. ein Epitop von HIV-1.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0028]** [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1C](#): (A und B) eine schematische Abbildung von PE- und eines PE-V3-Loop-Chimären, die die relative Anordnung der Ib- und V3-Loops zwischen den Domänen II und III zeigt. Die ungefähre Anordnung der Einzel-Aminosäure-Streichung ( $\Delta 553$ ) zur Beseitigung der PE-Toxizität ist ebenfalls gezeigt. (C) Aminosäure-Sequenzen, wiedergegeben mit dem Ein-Buchstaben-Code, bei denen der Ib-Loop von PE des Wildtyps ersetzt wurde durch eine V3-Loop-Sequenz von gp120 (fett gedruckt) entweder von dem MN-Stamm oder von dem Thai-E- (TE)-Stamm von HIV-1, die zwei Cystein-Reste enthielt, die dafür vorgesehen waren, zu einer Loop-Konformation im Anschluss an die Bildung einer Disulfid-Bindung zu führen. Das Einsetzen einer einzelnen PstI-Restriktionsstelle, die zum Einführen der V3-Loop-Sequenzen verwendet wurde, führte zu verschiedenen Modifikationen der Aminosäure-Sequenz des PE-Wildtyps in Nachbarschaft zu dem Ib-Loop (kursiv gedruckt). Ein irrelevanter Kontroll-Peptid-Einschub wurde als Kontrolle hergestellt und ist mit „ntPE-fp16“ bezeichnet. Die berechneten Molekularmassen sind für exprimierte Proteine in voller Länge gezeigt. Wildtyp PE: SEQ ID Nr. 6; ntPE-V3MN14: SEQ ID Nr. 7; ntPE-V3MN26: SEQ ID Nr. 8; ntPE-V3Th-E26: SEQ ID Nr. 9; ntPE-fp16: SEQ ID Nr. 10.

**[0029]** [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2C](#): Charakterisierung von ntPE-V3-Loop-Chimären nach Trennung durch SDS-PAGE. (A) Coomassie-Blau-Färbung von gereinigten PE-V3-Loop-Chimären im Anschluss an eine Trennung durch SDS-PAGE. Etwa 1  $\mu$ g Protein wurde auf jede Spur aufgegeben. (B) Western-Blot-Analyse von ntPE-V3-Loop-Chimären. Nach Übertragung auf Immobilon P-Membranen wurden die Proteine mit monoclonalen Antikörpern getestet, die gegen intaktes gp120/MN (1F12) oder gp120/Thai-E (1B2) aufgezogen worden waren. Eine irrelevante Sequenz von 16 Aminosäuren wurde in den Ib-Loop-Bereich von ntPE (ntPE-fp16) eingesetzt und wurde hier als negative Kontrolle verwendet. (C) Immunocapture-Untersuchungen, bei denen

1F12 oder 1B2 immobilisiert auf Protein G-Sepharose verwendet wurde, wurden zum Charakterisieren der Präsentation von V3-Loop-Sequenzen auf der Oberfläche der verschiedenen chimären Proteine verwendet. Die Proteine wurden durch färbende Gele mit Coomassie-Blau visualisiert. gp120 und ntPE-fp16 wurden als positive bzw. negative Kontroll-Proben verwendet. Das Festhalten der PE-V3-Loop-Proteine ist mit einem einzelnen Pfeil-Kopf angezeigt, und dasjenige von gp120 ist durch einen doppelköpfigen Pfeil angezeigt. Die linke Platte zeigt das Vorhandensein der schweren Kette (hc) des Antikörpers nur, weil die leichte (lc) aus dem Gel herausgelaufen war. Die rechte Platte zeigt beide Ketten.

**[0030]** [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3C](#): Einschübe in die V3-Loop-Aminosäure-Sequenz verändern die Sekundärstruktur der PE des Wildtyps nicht signifikant. CD-Spektren des nahen UV (A) und des fernen UV (B) (Mittelwert von drei Scans im Anschluss an eine Hintergrund-Spektrum-Subtraktion) wurden digital geglättet, hinsichtlich der Konzentration korrigiert und auf Einheiten einer mittleren Rest-Gewicht-Elliptizität normalisiert. (C) es wurden Sekundär-Struktur-Berechnungen unter Verwendung des SELCON-Fitting-Programms durchgeführt. \*: Berechneter  $\alpha$ -Helix-Gehalt steht in Übereinstimmung mit Werten, die von Änderungen der beobachteten Elliptizität bei 220 nm bestimmt wurden.

**[0031]** [Fig. 4](#): Toxische PE-V3-Loop-Chimäre beeinflussen das Überleben der Zelle. Das Ausmaß der Protein-Synthese, das geschätzt über die  $^3\text{H}$ -Leucin-Einarbeitung, wurde in humanen A431-Zellen im Anschluss an eine 18stündige Konzentrierung mit verschiedenen Konzentrationen entweder von PE des Wildtyps oder einer toxischen Form (meist einem Glutamin-Säure-Rest in der Position 553 und fähig für eine ADP-Ribosylierung mit dem Engungs-Faktor 2) von PE-V3MN26.

**[0032]** [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5B](#): Charakterisierung von Kaninchen-Seren im Anschluss an eine Immunisierung entweder mit ntPE-V3MN26 oder ntPet-V3TH-E26. (A) Die Western-Blot-Reaktivität von Kaninchen-Antiseren, die für rekombinantes gp120/MN und gp120/Th-E um 1:1000 verdünnt worden waren, wurde im Anschluss an SDS-PAGE und den Transfer von Proteinen auf Immobilon-P-Membranen abgeschätzt. Reaktiver Primär-Antikörper wurde nachgewiesen mittels eines an Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörpers. (B) Kaninchen-Seren, die von Tieren erhalten worden waren, denen ntPE-V3MN26 injiziert worden war, wurden mit konkurrierendem löslichem gp120/MN bei Konzentrationen bis zu 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vor-inkubiert. Rest-Reaktivität wurde mittels Western-Blot-Analyse von immobilisiertem gp120/MN nachgewiesen, wie dies für (A) beschrieben wurde.

**[0033]** [Fig. 6](#): Eine ntPE-V3-Loop-Chimäre, die Kaninchen verabreicht wurde, produziert eine Antikörper-Antwort, die in der Lage ist, HIV-1-Infektivität in vitro zu neutralisieren. Die Kaninchen wurden subkutan mit 200  $\mu\text{g}$  ntPE-V3MN26 immunisiert und in ähnlicher Weise nach 2,4 und 12 Wochen geboostet. Seren, die bis zu 27 Wochen nach der anfänglichen Verabreichung gewonnen worden waren, wurden bewertet hinsichtlich des Vermögens, eine Human-T-Zell-Linie, MT4, davon zu schützen, durch HIV-1 MN getötet zu werden, wie mittels eines MTT-Farbstoff-Umwandlungs-Assays getestet wurde. Die Werte stehen für Dreifach-Ablesungen, die gegen eine zur Kontrolle durchgeführte MT4-Inkubation normalisiert wurden, die nicht durch Virus befallen war.

**[0034]** [Fig. 7](#) ist ein Diagramm der Pseudomonas-Exotoxin A-Struktur. Die Aminosäure-Position, die auf SEQ ID Nr. 2 basiert, ist angegeben. Die Domäne Ia erstreckt sich von den Aminosäuren 1 bis 252. Die Domäne II erstreckt sich von den Aminosäuren 253 bis 364. Sie schließt einen Cystein-Cystein-Loop ein, der von den Cysteinen bei den Aminosäure-Positionen 265 bis 287 gebildet wird. Furin spaltet innerhalb des Cystein-Cystein-Loops zwischen den Aminosäuren 279 und 280. Ein Fragment von PE, das mit der Aminosäure 280 beginnt, geht in das Cytosol über. Konstrukte, in denen die Aminosäuren 245 bis 364 eliminiert sind, translozieren ebenfalls. Die Domäne Ib überspannt die Aminosäuren 365 bis 399. Sie enthält einen Cystein-Cystein-Loop, der durch die Cystein-Reste der Aminosäuren 372 bis 379 gebildet wird. Die Domäne kann völlig eliminiert werden. Domäne III überspannt die Aminosäuren 400 bis 613. Die Streichung der Aminosäure 553 eliminiert die ADP-Ribosylierungs-Aktivität. Die Sequenz des Endoplasmatischen Reticulums (REDLK; SEQ ID Nr. 11) ist an dem Carboxy-Ende des Moleküls angeordnet, und zwar von Aminosäure 609 bis 613.

**[0035]** [Fig. 8](#) zeigt, dass PE-V3-Loop-Chimären in ähnlicher Weise an natives PE überführt werden. Konfluente Monoschichten von Caco-2-Zellen wurden apikal an rekombinantem, enzymatisch aktivem Pseudomonas-Exotoxin (rEA-PE) ausgesetzt. Zell-Abtötungen, die in 24 h des Kontakts bei verschiedenen Konzentrationen an nativem PE (rEA-PE) produziert wurden, wurden mit denjenigen verglichen, die durch eine ähnliche Behandlung mit enzymatisch aktiven Versionen von PE-Chimären produziert wurden, die entweder 14 oder 26 Aminosäuren des V3-Loops von HIV-1 MNgp120 enthielten.

**[0036]** [Fig. 9](#) zeigt, dass PE-V3-Loop-Chimären eine Serum-IgG-Antwort induzieren. Eine nicht-toxische (en-



zymatisch inaktive) V3-Loop-Chimäre, die 26 Aminosäuren des V3-Loops von HIV-1 MNgp120 (PEMN26) enthielt, wurde Kaninchen über sechs verschiedene Inokulierungs-Protokolle verabreicht. Serum-Proben, die zu den beschriebenen Zeiten abgezogen wurden, wurden ELISA auf MNgp120-spezifisches IgG unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (1F12) getestet, der den V3-Loop dieses Proteins für eine Assay-Kalibrierung erkennt.

**[0037]** [Fig. 10](#) zeigt, dass PE-V3-Loop-Chimäre eine Speichel-IgA-Antwort induzieren. Eine nicht-toxische (enzymatisch inaktive) V3-Loop-Chimäre, die 26 Aminosäuren des V3-Loops von HIV-1 MNgp120 (PEMN26) enthielt, wurde an Kaninchen über sechs unterschiedliche Inokulierungs-Protokolle verabreicht. Speichel-Proben, die im Anschluss an eine Pilokarpin-Verabreichung zu den beschriebenen Zeiten erhalten wurden, wurde mittels ELISA auf MNgp120-spezifisches IgA getestet. Kein gp120-spezifischer IgA-Antikörper war für eine Assay-Kalibrierung erhältlich. Werte sind angegeben als Werte, die auf eine standardisierte positive Probe normalisiert sind.

**[0038]** [Fig. 11](#) zeigt relative Werte des IgA im Speichel im Anschluss an eine Mucosa-Inokulierung oder systemische Inokulierung mit ntPE-V3MN26. MN-gp120-spezifische IgA-Antikörper wurden durch ELISA in Speichelproben gemessen, gegen eine stark positive Probe normalisiert, und wurden auf einer willkürlichen Skala einer Antigenspezifischen IgA-Einheit angegeben.

**[0039]** [Fig. 12](#) zeigt die IgG-Serum-Werte im Anschluss an eine Mucos-Inokulierung oder systemische Inokulierung mit ntPE-V3MN26. MN-gp120-spezifische IgG-Antikörper wurden in Serum-Proben mit ELISA gemessen und gegen einen monoklonalen Maus-Antikörper standardisiert, der spezifisch dem V3-Loop von MNgp120 erkennt.

**[0040]** [Fig. 13](#) zeigt IgG-Serum-Werte im Anschluss an eine subkutane Injektion von ntPE-V3MN26. Die Immun-Antwort, die durch eine Injektion von ntPE-V3MN26 produziert wurde (schraffierte Balken) wurde mit derjenigen verglichen, die induziert wurde, wenn eine Koinjektion mit einer bestimmten Menge von Freud'schem vollständigem und unvollständigem Adjuvans stattfand (durchgehend gefärbte Balken). Nicht-toxisches PE, das die 26 Aminosäuren des V3-Loops von MNgp120 nicht enthielt, wurde mit derselben Adjuvans-Menge als Kontrolle injiziert. MN-gp120-spezifische IgG-Antikörper wurden in Serum-Proben durch ELISA gemessen und gegen einen monoklonalen Maus-Antikörper standardisiert, der spezifisch den V3-Loop von MNgp120 erkennt.

**[0041]** [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) zeigen eine Neutralisation von klinischen HIV-Isolaten mit Antikörpern, die mit den chimären Immunogenen gemäß der vorliegenden Erfindung hervorgerufen worden waren. Nach einer Impfung abgenommene Seren von Kaninchen, denen ntPE-V3MN26 injiziert worden war, wurden gemischt entweder mit einem Virus des B-Subtyps ([Fig. 14A](#)) oder einem Virus des E-Subtyps ([Fig. 14B](#)). Nach einer einstündigen Inkubation bei 37° C wurde die virale Infektivität durch Zugabe von behandeltem Virus zu PBMCs weitere 3 Tage bestimmt. Eine Inhibierung des Virus-Wachstums wurde durch Messen der p24-Werte bewertet. Offene Quadrate: p24-Antigen (uninfiziert); geschlossener Kreis: p24-Antigen 1-Vorblut-Seren; offener Kreis: p24-Antigen 1-Immun-Seren (24 Wochen).

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

### I. Definitionen

**[0042]** Solange nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die in der vorliegenden Erfindung und in den Patentansprüchen verwendet werden, die Bedeutung, wie sie allgemein von einem in diesem technischen Bereich erfahrenen Fachmann verstanden wird, zu dem die vorliegende Erfindung gehört. Die folgenden Druckschriften versorgen einen Fachmann in diesem technischen Gebiet mit einer allgemeinen Definition vieler der im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe: „Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS; 5. Ausgabe, R. Rieger et al. (Hrsg.), Springer Verlag (1991); und Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991). Wenn in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen vorkommend, haben die Begriffe die Bedeutungen, die ihnen gegeben werden, solange nichts anderes angegeben ist.

**[0043]** Der Begriff „Polynucleotid“ bezieht sich auf ein Polymer, das aus Nucleotid-Einheiten aufgebaut ist. Polynucleotide schließen natürlich vorkommende Nucleinsäuren wie beispielsweise Desoxyribonucleinsäuren („DNS“) und Ribonucleinsäuren („RNS“) sowie Nucleinsäure-Analoga ein. Nucleinsäure-Analoga schließen

diejenigen mit ein, die nicht natürlich vorkommende Basen einschließen, Nucleotide, die Bindungen mit anderen Nucleotiden eingehen, die von der natürlich vorkommenden Phosphodiester-Bindung verschieden ist, oder die Basen einschließen, die über Bindungen gebunden sind, die von Phosphodiester-Bindungen verschieden sind. Damit schließen Nucleotid-Analoga beispielsweise und ohne Beschränkung Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Phosphorotriester, Phosphoramidate, Boranophosphate, Methylphosphonate, Chiral-Methyl-Phosphonate, 2-O-Methyl-Ribonucleotide, Peptid-Nucleinsäuren (PNAs) und dergleichen ein. Solche Polynucleotide können beispielsweise synthetisiert werden und unter Verwendung einer automatischen DNS-Synthese-Vorrichtung. Der Begriff „Nucleinsäure“ bezieht sich üblicherweise auf große Nucleotide. Der Begriff „Oligonucleotid“ bezieht sich typischerweise auf kurze Polynucleotide, allgemein mit nicht mehr als etwa 50 Nucleotiden. Es versteht sich, dass dann, wenn eine Nucleotid-Sequenz durch eine DNS-Sequenz wiedergegeben wird (d. h. A, T, G, C), dies auch eine RNS-Sequenz einschließt (d. h. A, U, G, C), worin „U“ das „T“ ersetzt.

**[0044]** Der Begriff „cDNS“ bezieht sich auf eine DNS, die komplementär oder identisch zu einer mRNA ist, und zwar entweder in einsträngiger oder doppelsträngiger Form.

**[0045]** Eine herkömmliche Notation wird in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen verwendet, um Polynucleotid-Sequenzen zu beschreiben: Das auf der linken Seite liegende Ende einer einsträngigen Polynucleotid-Sequenz ist das 5'-Ende; die nach links laufende Richtung einer doppelsträngigen Nucleotid-Sequenz wird als die 5'-Richtung bezeichnet. Die Richtung der Zufügung von Nucleotiden zu entstehenden RNS-Transkripten von 5' nach 3' wird als Transkriptionsrichtung bezeichnet. Der DNS-Strang, der dieselbe Sequenz wie eine mRNA aufweist, wird als der „kodierende Strang“ bezeichnet; Sequenzen auf dem DNS-Strang, die dieselbe Sequenz wie eine mRNA aufweisen, die von der RNS transkribiert wurde und die auf der 5'-Seite, bezogen auf das 5'-Ende des RNS-Transkripts, angeordnet sind, werden als „stromaufwärts liegende Sequenzen“ bezeichnet; Sequenzen auf dem DNS-Strang, die dieselbe Sequenz wie die RNS aufweisen und in die 3'-Richtung, bezogen auf das 3'-Ende der kodierenden RNS angeordnet sind, werden als „stromabwärts liegende Sequenzen“ bezeichnet.

**[0046]** Der Begriff „komplementär“ bezieht sich auf topologische Kompatibilität oder das Zusammenpassen von miteinander in Wechselwirkungen tretenden Oberflächen zweier Polynucleotide. So können die beiden Moleküle als komplementär beschrieben werden, und weiter sind die charakteristischen Eigenschaften der Kontakt-Oberfläche komplementär zueinander. Ein erstes Polynucleotid ist komplementär zu einem zweiten Polynucleotid, wenn die Nucleotid-Sequenz des ersten Polynucleotid identisch der Nucleotid-Sequenz des Polynucleotid-Bindungs-Partners des zweiten Polynucleotids ist. So ist ein Polynucleotid, dessen Sequenz 5'-TA-TAC-3' ist, komplementär zu einem Polynucleotid, dessen Sequenz 5'-GTATA-3' ist.

**[0047]** Eine Nucleotid-Sequenz ist „im wesentlichen komplementär“ zu einer Referenz- Nucleotid-Sequenz, wenn die Sequenz, die komplementär zu der jeweiligen Nucleotid-Sequenz ist, im wesentlichen identisch mit der Referenz- Nucleotid-Sequenz ist.

**[0048]** Der Begriff „kodierend für“ bezieht sich auf die inhärente Eigenschaft spezifischer Sequenzen von Nucleotiden in einem Polynucleotid, wie beispielsweise einem Gen, einer cDNS oder einer mRNA, als Schablone für eine Synthese von anderen Polymeren und Makromolekülen in biologischen Prozessen zu dienen, die entweder eine definierte Sequenz von Nucleotiden aufweisen (d. h. rRNS, tRNS und mRNA) oder eine definierte Sequenz von Aminosäuren aufweisen, und die biologischen Eigenschaften, die daraus resultieren. So kodiert ein Gen für ein Protein, wenn eine Transkription und Translation von mRNA, die von dem Gen produziert wird, das Protein in einer Zelle oder in einem anderen biologischen System produziert. Sowohl der kodierende Strang, dessen Nucleotid-Sequenz identisch mit der mRNA-Sequenz ist und üblicherweise in Sequenzlisten angegeben wird, als auch der nicht-kodierende Strang, der als Matrize für eine Transkription verwendet wird, eines Gens oder einer cDNS können als „für das Protein oder ein anderes Produkts des Gens oder der cDNS kodierend“ bezeichnet werden. Solange nichts anderes angegeben wird, schließt der Begriff „Nucleotid-Sequenz, die für eine Aminosäure-Sequenz kodiert“ alle Nucleotid-Sequenzen ein, die degenerierte Versionen voneinander sind und die für dieselbe Aminosäure-Sequenz kodieren. Nucleotid-Sequenzen, die für Proteine und RNS kodieren, können Introns einschließen.

**[0049]** Der Begriff „rekombinantes Polynucleotid“ bezieht sich auf ein Polynucleotid, das Sequenzen aufweist, die nicht natürlich vereinigt wurden. Ein amplifiziertes oder zusammengebautes rekombinantes Polynucleotid kann in einem geeigneten Vektor eingeschlossen sein, und der Vektor kann zum Transformieren einer geeigneten Wirts-Zelle verwendet werden. Eine Wirts-Zelle, die das rekombinante Nucleotid umfasst, wird als „rekombinante Wirts-Zelle“ bezeichnet. Das Gen wird dann in der rekombinanten Wirts-Zelle expremiert und pro-



duziert so beispielsweise ein „rekombinantes Polypeptid“. Ein rekombinantes Polynucleotid kann auch einer nicht-kodierenden Funktion dienen (und beispielsweise ein Promoter, Replikationsursprung (origin of replication), Ribosomen-Bindungs-Stelle usw. sein).

**[0050]** Der Begriff „Expressions-Kontroll-Sequenz“ bezieht sich auf eine Nucleotid-Sequenz in einem Polynucleotid, die die Expression (Transkription und/oder Translation) einer operativ daran gebundenen Nucleotid-Sequenz reguliert. „Operativ gebunden“ bezieht sich auf eine funktionelle Beziehung zwischen zwei Zeilen, in denen die Aktivität eines Teils (z. B. das Vermögen, die Transkription zu regulieren) zu einer Wirkung des anderen Teils (z. B. Transkription der Sequenz) führt. Expressions-Kontroll-Sequenzen können beispielsweise und ohne Beschränkung einschließen: Sequenzen von Promotern (z. B. indizierbaren oder konstitutiven), Verstärkern, Transkriptions-Terminatoren, ein Start-Codon (d. h. ATG), Splice-Signale für Introns und Stop-Codons.

**[0051]** Der Begriff „Expressions-Vektor“ bezieht sich auf einen Vektor, der ein rekombinantes Nucleotid umfasst, das Expressions-Kontroll-Sequenzen operativ an eine zu exprimierende Nucleotid-Sequenz gebunden umfasst. Ein Expressions-Vektor umfasst ausreichende cis-Wirkungs-Elemente zur Expression, andere Elemente zur Expression können durch die Wirts-Zelle oder ein in vitro-Expressions-System geliefert werden. Expressions-Vektoren schließen alle diejenigen ein, die im Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Cosmide, Plasmide (z. B. nackt oder in Liposomen enthalten) und Viren, die das rekombinante Nucleotid einschließen.

**[0052]** Der Begriff „Amplifikation“ (Vervielfältigung) bezieht sich auf irgendeine Einrichtung, durch die eine Polynucleotid-Sequenz kopiert und so in eine größere Zahl von Polynucleotid-Molekülen erstreckt wird, z. B. durch Reverse Transkription, Polymerase-Kettenreaktion und Ligase-Kettenreaktion.

**[0053]** Der Begriff „Primer“ bezieht sich auf ein Polynucleotid, das in der Lage ist, spezifisch zu einer bestimmten Polynucleotid-Matrize zu hybridisieren und einen Initiationspunkt für eine Synthese eines komplementären Polynucleotids zu liefern. Eine derartige Synthese findet statt, wenn der Polynucleotid-Primer Bedingungen unterworfen wird, bei denen eine Synthese induziert wird, d. h. in Gegenwart von Nucleotiden, einer komplementären Polynucleotid-Matrize und einem Mittel zur Polymerisation wie beispielsweise DNS-Polymerase. Ein Primer ist typischerweise einsträngig, kann jedoch auch doppelsträngig sein. Primer sind typischerweise Desoxyribonucleinsäuren, jedoch ist eine große Vielzahl synthetisch und natürlich vorkommender Primer für viele Anwendungen nützlich. Ein Primer ist komplementär zur Matrize, an die zu hybridisieren er bestimmt ist, und dient so als Stelle für die Initiierung einer Synthese, muss jedoch nicht die exakte Sequenz der Matrize wiedergeben. In einem derartigen Fall hängt die spezifische Hybridisierung des Primers mit der Matrize von der Stringenz der Hybridisierungs-Bedingungen ab. Primer können beispielsweise mit chromogenen, radioaktiven oder fluoreszierenden Resten markiert und als nachweisbare Einheiten verwendet werden.

**[0054]** Der Begriff „Sonde“, wenn er in Bezugnahme auf ein Polynucleotid verwendet wird, bezieht sich auf ein Polynucleotid, das in der Lage ist, sich an eine bestimmte Sequenz eines anderen Polynucleotids spezifisch zu hybridisieren. Eine Sonde hybridisiert spezifisch an einem komplementären Ziel-Polynucleotid, muss jedoch nicht die exakte komplementäre Sequenz der Matrize wiedergeben. In einem solchen Fall hängt die spezifische Hybridisierung der Sonde an dem Ziel-Molekül von der Stringenz der Hybridisierungs-Bedingungen ab. Sonden können z. B. mit chromogenen, radioaktiven oder fluoreszierenden Einheiten markiert werden und als nachweisbare Einheiten verwendet werden.

**[0055]** Eine erste Sequenz ist eine „Antisense-Sequenz“ in Bezug auf eine zweite Sequenz, wenn ein Polynucleotid, dessen Sequenz die erste Sequenz ist, speziell mit einem Polynucleotid hybridisiert, dessen Sequenz die zweite Sequenz ist.

**[0056]** Die Begriffe „spezifisch hybridisieren an“ oder „spezifische Hybridisierung“ oder „selektiv hybridisieren an“ beziehen sich auf das Binden, Verdoppeln oder Hybridisieren eines Nucleinsäure-Moleküls, vorzugsweise an eine spezielle Nucleotid-Sequenz, unter stringenten Bedingungen, wenn die Sequenz in einer komplexen Mischung (z. B. Gesamt-Zell-Mischung), DNS oder RNS zugegen ist.

**[0057]** Der Begriff „stringente Bedingungen“ bezieht sich auf Bedingungen, unter denen eine Sonde vorzugsweise mit ihrer Target-Subsequenz hybridisiert und in einem geringeren Ausmaß oder überhaupt gar nicht mit anderen Sequenzen. „Stringente Hybridisierung“ und „stringente Hybridisierungs-Wasch-Bedingungen“ im Kontext von Nucleinsäure-Hybridisierungs-Experimenten, wie beispielsweise Southern-Hybridisierung und Northern-Hybridisierung sind Sequenz-abhängig und sind unterschiedlich unter verschiedenen Umwelt-Para-

metern. Ein extensiver Führer für die Hybridisierung von Nucleinsäuren findet sich in der Druckschrift „Tijssen (1993); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Teil I, Kapitel 2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, New York". Allgemein werden hochgradig stringente Hybridisierungs- und Wasch-Bedingungen so gewählt, dass sie etwa 5° C niedriger liegen als der thermische Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH-Wert. Der T<sub>m</sub>-Wert ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke und bei definiertem pH-Wert), bei der 50 % der Target-Sequenz mit einer perfekt passenden Sonde hybridisieren. Sehr stringente Bedingungen werden so gewählt, dass sie gleich dem T<sub>m</sub>-Wert für eine bestimmte Sonde sind.

**[0058]** Ein Beispiel stringenter Hybridisierungs-Bedingungen für eine Hybridisierung von komplementären Nucleinsäuren, die mehr als 100 komplementäre Reste haben, auf einem Filter in einem Southern Blot oder Northern Blot ist: 50 % Formalin mit 1 mg Heparin bei 42° C, wobei die Hybridisierung über Nacht durchgeführt wird. Ein Beispiel hochgradig stringenter Wasch-Bedingungen ist das Waschen mit 0,15 M NaCl bei 72° C für etwa 15 Minuten. Ein Beispiel stringenter Wasch-Bedingungen ist das Waschen mit 0,2 x SSC bei 65° C für 15 Minuten (siehe die Druckschrift „Sambrook et al." hinsichtlich einer Beschreibung des SSC-Puffers). Oft geht einem hochgradig stringenten Waschen ein niedriggradig stringentes Waschen zum Entfernen des Hintergrund-Sonden-Signals voraus. Ein Beispiel für ein Waschen mittlerer Stringenz für ein Doppel von z. B. mehr als 100 Nucleotiden ist ein Waschen von 1x SSC bei 45° C für 15 Minuten. Ein Beispiel für ein Waschen mit niedriger Stringenz für ein Doppel von z. B. mehr als 100 Nucleotiden ist 4–6x SSC bei 40° C für 15 Minuten. Allgemein zeigt ein Signal-zu-Geräusch-Verhältnis von 2x (oder höher) als dasjenige, das für eine unverwandte Sonde in dem speziellen Hybridisierungs-Assay beobachtet wird, den Nachweis einer spezifischen Hybridisierung an.

**[0059]** Der Begriff „Polypeptid" bezieht sich auf ein Polymer, das aus Aminosäure-Resten, verwandten, natürlich auftretenden Struktur-Varianten davon und synthetischen, nicht natürlich auftretenden Analogen davon aufgebaut ist, die über Peptid-Bindungen verbunden sind, auf verwandte, natürlich auftretende Struktur-Varianten davon und auf synthetische, nicht natürlich auftretende Analoge davon. Synthetische Polypeptide können beispielsweise unter Verwendung eines automatisierten Polypeptid-Synthese-Apparates synthetisiert werden. Der Begriff „Protein" bezieht sich typischerweise auf große Polypeptide. Der Begriff „Peptid" bezieht sich typischerweise auf kurze Polypeptide.

**[0060]** In der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen wird eine konventionelle Notation verwendet, um Polypeptid-Sequenzen zu porträtieren: Das auf der linken Seite stehende Ende einer Polypeptid-Sequenz ist der Amino-Terminus; das auf der rechten Seite stehende Ende einer Polypeptid-Sequenz ist der Carboxyl-Terminus.

**[0061]** Der Begriff „konservative Substitution" bezieht sich auf die Substitution einer Aminosäure durch eine funktionell ähnliche Aminosäure in einem Polypeptid. Die folgenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die konservative Substitutionen füreinander sind:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T);
- 2) Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).

**[0062]** Der Begriff "Allele Variante" bezieht sich auf irgendeine von zwei oder mehreren polymorphen Formen eines Gens, die denselben genetischen Ort einnehmen. Allele Variationen entstehen natürlich durch Mutation und können zu Phänotypen-Polymorphismus innerhalb von Populationen führen. Gen-Mutationen können stumm sein (keine Änderung in dem kodierten Polypeptid) oder können für Polypeptide kodieren, die veränderte Aminosäure-Sequenzen aufweisen. „Allele Varianten" bedeuten auch cDNSS, die von mRNS-Transkripten genetisch alleler Varianten abgeleitet sind, sowie die durch diese kodierten Proteine.

**[0063]** Die Begriffe „identisch" oder „Prozent-Identität" im Kontext von zwei oder mehreren Polynucleotid- oder Polypeptid-Sequenzen beziehen sich auf zwei oder mehrere Sequenzen oder Subsequenzen, die gleich sind oder einen spezifizierten Prozentsatz von Nucleotiden oder Aminosäure-Resten aufweisen, die gleich sind, wenn sie hinsichtlich maximaler Korrespondenz verglichen und aufgereiht werden, gemessen unter Verwendung eines der folgenden Sequenz-Vergleichs-Algorithmen oder durch visuelles Anschauen.

**[0064]** Der Ausdruck „im wesentlichen identisch“ bezieht sich im Kontext von zwei Nucleinsäuren oder Polypeptiden auf zwei oder mehrere Sequenzen oder Subsequenzen, die wenigstens 60 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 98 % Nucleotid-Rest-Identität oder Aminosäure-Rest-Identität aufweisen, wenn sie hinsichtlich maximaler Korrespondenz verglichen und aufgereiht werden, gemessen unter Verwendung eines der folgenden Sequenz-Vergleichs-Algorithmen oder durch visuelles Anschauen. Vorzugsweise existiert die wesentliche Identität über einen Bereich der Sequenzen, der wenigstens etwa 50 Reste lang ist, mehr bevorzugt über einen Bereich von wenigstens etwa 100 Resten, und am meisten bevorzugt sind die Sequenzen im wesentlichen identisch über wenigstens etwa 150 Reste. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform sind die Sequenzen im wesentlichen identisch über die gesamte Länge der kodierenden Bereiche.

**[0065]** Für einen Sequenz-Vergleich dient typischerweise eine Sequenz als Referenz-Sequenz, mit der Test-Sequenzen verglichen werden. Wenn man einen Sequenz-Vergleichs-Algorithmus verwendet, werden Test-Sequenzen und Referenz-Sequenzen in einen Computer eingegeben, es werden Sub-Sequenz-Koordinaten angegeben, sofern dies erforderlich ist, und es werden Sequenz-Algorithmus-Programm-Parameter bestimmt. Der Sequenz-Vergleichs-Algorithmus berechnet dann den Sequenz-Identitäts-Prozentwert für die Test-Sequenz(en), bezogen auf die Referenz-Sequenz, basierend auf den angegebenen Programm-Parametern.

**[0066]** Eine optimale Aufreihung von Sequenzen zum Vergleich kann beispielsweise durchgeführt werden durch den Algorithmus der lokalen Homologie von Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); durch den Algorithmus der Homologie-Aufreihung von Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970); durch das Verfahren der Suche nach Ähnlichkeit von Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); durch computerisierte Implementierungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA in dem Wisconsin Genetics Software Package der Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch visuelles Anschauen (siehe allgemein Ausubel et al., a.a.O.).

**[0067]** Ein Beispiel eines nützlichen Algorithmus ist PILEUP. PILEUP schafft eine Mehrfach-Sequenz-Aufreihung aus einer Gruppe von verwandten Sequenzen unter Anwendung von progressiven, paarweisen Aufreihungen und zeigt so die Beziehung und einen Prozentwert der Sequenz-Identität. Das Programm zeichnet auch einen Baum oder ein Dendrogramm, das die clusternden Beziehungen zeigt, die zur Schaffung der Aufreihung verwendet wurden. PILEUP macht Gebrauch von einer Vereinfachung des fortschreitenden Ordnungsverfahrens von Feng & Doolittle, 7. Mol. Evol. 35:351–360 (1987). Das verwendete Verfahren ist ähnlich dem Verfahren, das beschrieben wurde von Higgins & Sharp, CABIOS 5:151–153 (1989). Das Programm kann bis zu 300 Sequenzen ausrichten, jede mit einer maximalen Länge von 5000 Nucleotiden oder Aminosäuren. Die Verfahrensweise der mehrfachen Ausrichtung beginnt mit einer paarweisen Ausrichtung der beiden am meisten ähnlichen Sequenzen, was ein Cluster von zwei ausgerichteten Sequenzen produziert. Dieser Cluster wird dann zu der am nächstbesten verwandten Sequenz oder einem Cluster von ausgerichteten Sequenzen ausgerichtet. Zwei Cluster von Sequenzen werden ausgerichtet durch eine einfache Ausdehnung der paarweisen Ausrichtung auf zwei einzelne Sequenzen. Die endgültige Ausrichtung wird erreicht durch eine Serie von fortschreitenden, paarweisen Ausrichtungen. Das Programm lässt man in der Weise laufen, dass man spezielle Sequenzen und ihre Aminosäure- oder Nucleotid-Koordinaten für Bereiche eines Sequenz-Vergleichs bestimmt und die Programm-Parameter bestimmt. Beispielsweise kann eine Referenz-Sequenz mit anderen Test-Sequenzen verglichen werden, um die prozentuale Sequenz-Identitäts-Beziehung unter Verwendung der folgenden Parameter zu bestimmen: Fehler-Lücken-Gewicht (3,00), Fehler-Lücken-Längen-Gewicht (0,10) und gewichtete End-Lücken.

**[0068]** Ein weiteres Beispiel eines Algorithmus, der zum Bestimmen des Prozentwerts der Sequenz-Identität und Sequenz-Ähnlichkeit geeignet ist, ist der BLAST-Algorithmus, der beschrieben ist in der Druckschrift „Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403–410 (1990)“. Software zur Durchführung von BLAST-Analysen ist öffentlich erhältlich durch das National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dieser Algorithmus schließt ein zum ersten das Identifizieren von hochwertenden Sequenz-Paaren (high scoring sequence pairs; HSPs) durch Identifizieren kurzer Worte der Länge W in der in Frage stehenden Sequenz, die entweder passen oder einem gewissen positiv bewerteten Schwellenwert T genügen, wenn sie mit einem Wort derselben Länge in einer in der Datenbasis befindlichen Sequenz ausgerichtet werden. T wird bezeichnet als Nachbarschafts-Wort-Bewertungsgrenze (Altschul et al., a.a.O.). Diese anfänglichen Nachbarschafts-Wort-Treffer dienen als Keime zum Initiieren von Suchen zum Auffinden längerer HSPs, die diese enthalten. Die Wort-Treffer werden dann in beide Richtungen entlang jeder Sequenz so weit ausgedehnt, wie der kumulative Ausrichtungs-Wert erhöht werden kann. Kumulative Werte werden berechnet, indem man – für Nucleotid-Sequenzen – die Parameter M (Verdienen von Punkten für ein Paar passender Reste; immer > 0) und N (Verlust-Punkt für nicht passende Reste; immer < 0) verwendet. Bei Aminosäure-Sequenzen wird eine Be-

wertungs-Matrix zum Berechnen des Kumulativ-Werts verwendet. Eine Ausdehnung der Wort-Treffer in jede Richtung wird angehalten, wenn der kumulative Ausrichtungs-Wert um die Menge X von dem maximal erreichten Wert abfällt; wenn der Kumulativ-Wert auf 0 oder darunter geht, und zwar aufgrund der Akkumulierung einer oder mehrerer Rest-Ausrichtung mit negativem Wert; oder wenn das Ende einer der Sequenzen erreicht ist. Die BLAST-Algorithmus-Parameter W, T und X bestimmen die Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Ausrichtung. Das BLASTN-Programm (für Nucleotid-Sequenzen) macht Gebrauch von Fehlern einer Wortlänge (W) von 11, einer Erwartung (E) von 0, M = 5, N = -4 und einen Vergleich beider Stränge. Für Aminosäure-Sequenzen macht das BLASTP-Programm Gebrauch von Fehlern einer Wortlänge (W) von 3, einer Erwartung (E) von 10 und von der BLOSUM62-Bewertungs-Matrix (siehe „Henikoff & Henikoff“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

**[0069]** Über die Berechnung des Prozentwertes der Sequenz-Identität hinaus führt der BLAST-Algorithmus auch eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen durch (siehe z. B. Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873–5787 (1993)). Ein Maß der Ähnlichkeit, wie es von dem BLAST-Algorithmus bereitgestellt wird, ist die Wahrscheinlichkeit der kleinsten Summe (P(N)), welche einen Indikator der Wahrscheinlichkeit liefert, mit der ein Passen zwischen zwei Nucleotid- oder Aminosäuren-Sequenzen zufällig auftritt. Beispielsweise wird eine Nucleinsäure als ähnlich mit einer Referenz-Sequenz angesehen, wenn die Kleinigkeit der kleinsten Summe in einem Vergleich der Test-Nucleinsäure mit der Referenz-Nucleinsäure geringer ist als 0,1, noch mehr bevorzugt weniger als etwa 0,01 und am meisten bevorzugt weniger als 0,001.

**[0070]** Als weiterer Hinweis darauf, dass zwei Nucleinsäure-Sequenzen oder Polypeptide im wesentlichen identisch sind, ist die Tatsache, dass das von der ersten Nucleinsäure kodierte Polypeptid immunologisch kreuzreaktiv mit dem Polypeptid ist, das von der zweiten Nucleinsäure kodiert wird, wie dies nachfolgend beschrieben ist. Damit ist ein Polypeptid typischerweise im wesentlichen identisch mit einem zweiten Polypeptid, wenn beispielsweise die beiden Peptide nur durch konservative Substitutionen unterschiedlich sind. Ein anderer Hinweis, dass zwei Nucleinsäure-Sequenzen im wesentlichen identisch sind, ist, dass zwei Moleküle miteinander unter stringenten Bedingungen hybridisieren, wie dies in der vorliegenden Beschreibung beschrieben wurde.

**[0071]** Ein „Ligand“ ist eine Verbindung, die sich spezifisch an ein Ziel-Molekül (Target-Molekül) bindet.

**[0072]** Ein „Rezeptor“ ist eine Verbindung, die sich spezifisch an einen Liganden bindet.

**[0073]** Der Begriff „Antikörper“ bezieht sich auf einen Polypeptid-Liganden, der im wesentlichen von einem Immunoglobulin-Gen oder von Immunoglobulin-Genen oder Fragmenten davon kodiert wird, der/die sich spezifisch an ein Epitop bindet/binden und dieses erkennt/erkennen (z. B. ein Antigen). Die anerkannten Immunoglobulin-Gene schließen ein: Die Gene des konstanten Bereichs der leichten Kappa- und Lambda-Kette; die Gene des konstanten Bereichs der schweren Alpha-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und Mu-Kette; und die Myriaden von Immunoglobulin-Genen des variablen Bereichs. Antikörper existieren z. B. als intakte Immunoglobuline oder als Zahl gut charakterisierter Fragmente, die durch Verdauung mit verschiedenen Peptidasen erzeugt werden. Dies schließt z. B. Fab'- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente ein. Der Begriff „Antikörper“, wie er in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen verwendet wird, schließt auch Antikörper-Fragmente ein, die entweder durch die Modifikation von ganzen Antikörpern produziert werden, oder diejenigen, die de novo unter Verwendung rekombinanter DNS-Verfahrensweisen synthetisiert werden. Er schließt auch polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, chimäre Antikörper und humanisierte Antikörper ein. Der Begriff „Fc“-Abschnitt eines Antikörpers bezieht sich auf den Abschnitt der schweren Kette eines Immunoglobulins, die eine oder mehrere Domänen des konstanten Bereichs mit schwerer Kette umfasst, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub>, schließt jedoch nicht den variablen Bereich der schweren Kette ein.

**[0074]** Ein Ligand oder ein Rezeptor (z. B. ein Antikörper) „bindet sich spezifisch an“ eine Verbindung in Form einer zu analysierenden Substanz oder „ist spezifisch immunoreaktiv mit“ einer Verbindung in Form einer zu analysierenden Substanz, wenn der Ligand oder Rezeptor in einer bindenden Reaktion funktioniert, die bestimmend für die Präsenz der zu analysierenden Substanz in einer Probe von heterogenen Verbindungen ist. So bindet sich unter Bedingungen eines designierten Tests (z. B. unter Bedingungen eines Immuno-Assays) der Ligand oder Rezeptor vorzugsweise an eine speziell zu analysierende Substanz und bindet sich nicht in signifikanter Menge an andere Verbindungen, die in der Probe zugegen sind. Beispielsweise bindet sich ein Polynucleotid spezifisch unter Hybridisierungs-Bedingungen an ein zu analysierendes Polynucleotid, das eine komplementäre Sequenz umfasst; es bindet sich ein Antikörper spezifisch unter Immuno-Assay-Bedingungen an ein Antigen als zu analysierende Substanz, das ein Epitop trägt, gegen den der Antikörper gerichtet war; und ein Adsorbens bindet sich spezifisch an eine zu analysierende Substanz unter geeigneten Elutions-Bedin-

gungen.

**[0075]** Der Begriff „Immuno-Assay“ bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis einer zu analysierenden Substanz in einer Probe, das das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Antikörper, der sich spezifisch an die zu analysierende Substanz bindet, und das Nachweisen des Bindens zwischen dem Antikörper und der zu analysierenden Substanz einschließt. Eine Vielzahl von Immuno-Assays-Formaten kann verwendet werden, um Antikörper auszuwählen, die spezifisch immunoreaktiv mit einem bestimmten Protein sind. Beispielsweise werden routinemäßig Festphasen-ELISA-Immuno-Assays verwendet, um monoklonale Antikörper auszuwählen, die spezifisch immunoreaktiv mit einem Protein sind. Verwiesen wird hierzu auf „Harlow und Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York“, hinsichtlich einer Beschreibung von Immuno-Assay-Formaten und -Bedingungen, die zur Bestimmung einer spezifischen Immunoreaktivität verwendet werden können.

**[0076]** Der Begriff „Impfstoff“ bezieht sich auf ein Mittel oder eine Zusammensetzung, die ein Mittel enthält, das wirksam dahingehend ist, einem Organismus einen therapeutischen Grad von Immunität zu verleihen, während es nur sehr niedrige Werte der Morbidität und Mortalität hervorruft. Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen sind natürlich nützlich bei der Untersuchung des Immunsystems und bei der Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten in Tieren oder Menschen.

**[0077]** Eine „immunogene Menge“ ist eine Menge, die wirksam ist, eine Immunantwort (Immun-Response) in einem Subjekt bzw. in einer Person hervorzurufen.

**[0078]** Der Begriff „im wesentlichen rein“ oder „isoliert“ bedeutet, dass eine Objekt-Spezies die vornehmlich vorhandene bzw. gegenwärtige Spezies ist (d. h. auf molarer Basis sehr viel häufiger zugegen ist als irgendeine andere individuelle makromolekulare Spezies in der Zusammensetzung), und eine im wesentlichen gereinigte Fraktion ist eine Zusammensetzung, in der die Objekt-Spezies wenigstens etwa 50 % (auf molarer Basis) aller vorhandenen makromolekularen Spezies ausmacht. Allgemein bedeutet eine im wesentlichen reine Zusammensetzung, dass etwa 80 % bis 90 % oder mehr der makromolekularen Spezies, die in der Zusammensetzung zugegen sind, die gereinigte Spezies von Interesse ist. Die Objekt-Spezies wird bis zu essentieller Homogenität gereinigt (kontaminierende Spezies können nicht in der Zusammensetzung mittels herkömmlicher Nachweisverfahren nachgewiesen werden), wenn die Zusammensetzung im wesentlichen aus einer einzigen makromolekularen Spezies besteht. Solvenz-Spezies, kleine Moleküle (< 500 Dalton), Stabilisatoren (z. B. BSA) und Elementar-Ionen-Spezies werden nicht als makromolekulare Spezies für die Zwecke der vorliegenden Definition angesehen.

**[0079]** Der Begriff „natürlich vorkommend“, wie er auf einen Gegenstand angewendet wird, bezieht sich auf die Tatsache, dass der Gegenstand in der Natur gefunden werden kann. Beispielsweise ist eine Polypeptid- oder Polynucleotid-Sequenz, die in einem Organismus (einschließlich Viren) zugegen ist, die von einer Quelle in der Natur isoliert werden kann und die nicht absichtlich durch den Menschen im Labor modifiziert wurde, natürlich vorkommend.

**[0080]** Der Begriff „nachweisen“ bezieht sich auf das Bestimmen der Gegenwart, Abwesenheit oder Menge einer zu analysierenden Substanz in einer Probe und kann das quantitative Bestimmen der Menge der zu analysierenden Substanz in einer Probe oder pro Zelle in einer Probe einschließen.

**[0081]** Der Begriff „nachweisbare Einheit“ oder „Markierung“ bezieht sich auf eine Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel nachweisbar ist. Beispielsweise schließen nützliche Markierungen ein: <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, Fluoreszenz-Farbstoffe, Elektronendichte-Reagenzien, Enzyme (z. B. wie sie üblicherweise in einem ELISA-Test verwendet werden), Biotinstreptavidin, Dioxigenin, Haptene und Proteine, für die Antiseren oder monoklonale Antikörper erhältlich sind, oder Nucleinsäure-Moleküle mit einer Sequenz, die zu einem Ziel-Molekül komplementär ist. Die nachweisbare Einheit erzeugt häufig ein messbares Signal, wie beispielsweise ein radioaktives, chromogenes oder Fluoreszenz-Signal, das dazu verwendet werden kann, die Menge an gebundener nachweisbarer Einheit in einer Probe quantitativ zu bestimmen. Die nachweisbare Einheit kann in einen Primer oder eine Sonde inkorporiert oder an dieser bindungsmäßig befestigt sein, und zwar entweder kovalent oder über ionische, van-der-Waals- oder Wasserstoff-Bindungen, d. h. die Einarbeitung radioaktiver Nucleotide oder biotinylierter Nucleotide, die durch Streptavidin erkannt werden. Die nachweisbare Einheit kann direkt oder indirekt nachweisbar sein. Ein indirektes Nachweisen kann das Binden einer zweiten, direkt oder indirekt nachweisbaren Einheit an eine nachweisbare Einheit involvieren. Beispielsweise kann die nachweisbare Einheit der Ligand eines Bindungspartners wie beispielsweise Biotin sein, das ein Bindungspartner für Streptavidin ist, oder kann eine Nucleotid-Se-

quenz sein, die der Bindungspartner für eine komplementäre Sequenz ist, mit der sie spezifisch hybridisieren kann. Der Bindungspartner kann selbst direkt nachweisbar sein; beispielsweise kann ein Antikörper selbst mit einem Fluoreszenz-Molekül markiert sein. Der Bindungspartner kann auch indirekt nachweisbar sein; beispielsweise kann eine Nucleinsäure, die eine komplementäre Nucleotid-Sequenz aufweist, ein Teil eines verzweigten DNA-Moleküls sein, das seinerseits durch Hybridisierung mit anderen markierten Nucleinsäure-Molekülen nachweisbar ist (siehe z. B. PD. Fahrlander und A. Klausner, *Bio/Technology* (1988) 6:1165). Eine quantitative Bestimmung des Signals wird erreicht durch z. B. Scintillations-Count, Densitometrie oder Fließcytometrie.

**[0082]** Der Begriff „Linker“ bezieht sich auf ein Molekül, das zwei andere Moleküle miteinander verbindet, und zwar entweder kovalent oder durch ionische, van-der-Waals- oder Wasserstoff-Bindungen, z. B. ein Nucleinsäure-Molekül, das mit einer komplementären Sequenz am 5'-Ende hybridisiert und mit einer anderen komplementären Sequenz 3'-Ende hybridisiert und so zwei nicht-komplementäre Sequenzen verbindet.

**[0083]** Der Begriff „pharmazeutische Zusammensetzung“ bezieht sich auf eine Zusammensetzung, die für pharmazeutische Verwendung in einem Säuger geeignet ist. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfasst eine pharmakologisch wirksame Menge eines aktiven Mittels und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. Der Begriff „pharmakologisch wirksame Menge“ bezieht sich auf die Menge eines Mittels, die wirksam ist zum Produzieren des beabsichtigten pharmakologischen Ergebnisses. Der Begriff „pharmazeutisch annehmbarer Träger“ bezieht sich auf irgendeinen der standardmäßig verwendeten pharmazeutisch verwendeten Träger, Puffer und Arzneimittel-Träger wie beispielsweise eine Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung, eine 5%ige wässrige Lösung von Dextrose und Emulsionen wie beispielsweise eine Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsion und verschiedene Typen von Befeuchtungsmitteln und/oder Hilfsstoffen. Geeignete pharmazeutische Träger und Formulierungen sind beschrieben in dem Werk „Remington's Pharmaceutical Sciences, 19. Auflage (Mack Publishing Co., Easton, 1995)“. Bevorzugte pharmazeutische Träger hängen von der beabsichtigten Art der Verabreichung des aktiven Mittels ab. Typische Arten der Verabreichung schließen die enterale (z. B. orale) oder parenterale (z. B. subkutane, intramuskuläre, intravenöse oder intraperitoneale Injektion oder topische, transdermale oder transmukosale) Verabreichung ein. Der Begriff „pharmazeutisch annehmbares Salz“ bezieht sich auf ein Salz, das zu einer Verbindung für pharmazeutische Verwendungen formuliert werden kann, und schließt beispielsweise Metall-Salze (Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium-Salze usw.) und Salze von Ammoniak oder organischen Aminen ein.

**[0084]** Der Begriff „kleines organisches Molekül“ bezieht sich auf organische Moleküle einer Größe, die vergleichbar denjenigen organischen Molekülen ist, die allgemein in pharmazeutischen Produkten verwendet werden. Der Begriff schließt organische Biopolymere (z. B. Proteine, Nucleinsäuren usw.) aus. Bevorzugte kleine organische Moleküle haben eine Größe im Bereich bis zu 5.000 Da, bis zu etwa 2.000 Da oder bis zu etwa 1.000 Da.

**[0085]** Der Begriff „Gegenstand“ der Diagnose oder Behandlung ist ein Mensch oder vom Menschen verschiedenes Tier, einschließlich Säugern, oder ein Primat.

**[0086]** Der Begriff „Behandlung“ bezieht sich auf eine prophylaktische Behandlung oder therapeutische Behandlung.

**[0087]** Eine „prophylaktische“ Behandlung ist eine Behandlung, die einem Subjekt verabreicht wird, der keine Zeichen einer Krankheit zeigt oder nur frühe Zeichen zeigt, und zwar zum Zweck einer Senkung des Risikos des Entwickelns pathologischer Symptome.

**[0088]** Eine „therapeutische“ Behandlung ist eine Behandlung, die einem Subjekt verabreicht wird, der Zeichen pathologischer Erscheinungen zeigt, und zwar zum Zweck der Verringerung oder Eliminierung dieser Zeichen.

**[0089]** Der Begriff „diagnostisch“ bedeutet das Identifizieren der Gegenwart oder Natur eines pathologischen Zustands. Diagnostische Verfahren unterscheiden sich in ihrer Spezifität und Selektivität. Zwar kann ein spezielles diagnostisches Verfahren nicht eine definitive Diagnose eines Zustands liefern; es reicht jedoch aus, wenn das Verfahren ein positives Anzeichen liefert, das bei der Diagnose hilfreich ist.

**[0090]** Der Begriff „prognostisch“ bedeutet das Voraussagen der wahrscheinlichen Entwicklung (z. B. der Schwere) eines pathologischen Zustands.

**[0091]** Der Begriff „Mehrzahl“ bedeutet wenigstens zwei.

**[0092]** Das „Pseudomonas-Exotoxin A“ oder „PE“ wird von *Pseudomonas aeruginosa* als ein 67 kD umfassendes Protein abgeschieden, das aus drei vornehmlichen globulären Domänen (Ia, II und III) und einer kleinen Subdomäne (Ib) aufgebaut ist, die die Domänen II und III verbindet (A. S. Allured et al. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. 83:1320–1324). Die Domäne Ia von PE vermittelt die Zell-Bindung. In der Natur bindet sich die Domäne Ia an das mit dem low-density-lipoprotein-Rezeptor-verwandte Protein (lipoprotein receptor-related protein; LRP), auch bekannt als  $\alpha 2$ -Macroglobulin-Rezeptor („ $\alpha 2$ -MR“) (M. Z. Kounnas et al. (1992), J. Biol. Chem. 267:12420-23). Es überspannt die Aminosäuren 1–252. Die Domäne II vermittelt die Translokation zum Cytosol. Sie überspannt die Aminosäuren 253–364. Die Domäne Ib hat keine bekannte Funktion. Sie überspannt die Aminosäuren 365–399. Die Domäne III ist verantwortlich für Cytotoxizität und schließt eine Sequenz für die Retention des endoplasmatischen Reticulums ein. Sie vermittelt die ADP-Ribosylierung des Verlängerungsfaktors (elongation factor) 2, der die Protein-Synthese inaktiviert. Sie überspannt die Aminosäuren 400–613. PE ist „nicht toxisch“, wenn ihm die EF2-ADP-Ribosylierungs-Aktivität fehlt. Ein Streichen der Aminosäuren E553 („ $\Delta E553$ “) von der Domäne III detoxifiziert das Molekül. PE, das die Mutation  $\Delta E553$  aufweist, wird nachfolgend bezeichnet als „PE $\Delta E553$ “. Allgemein werden modifizierte Formen von PE beschrieben beispielsweise in dem US-Patent Nr. 5,602,095 (Pastan et al.); in dem US-Patent Nr. 5,512,658 (Pastan et al.) und in dem US-Patent Nr. 5,458,878 (Pastan et al.). Allele Formen von PE sind in diese Definition eingeschlossen (siehe z. B. „M. L. Vasil et al. (1986), Infect. Immunol. 52:538–548“).

**[0093]** Der Begriff „Cystein-Cystein-Loop“ bezieht sich auf eine Peptid-Einheit in einem Polypeptid, die durch eine Aminosäure-Sequenz definiert ist, die durch zwei Disulfid-gebundene Cystein-Reste eingefasst ist.

**[0094]** Der Begriff „nicht-natives Epitop“ bezieht sich auf ein Epitop, für das eine Aminosäure-Sequenz kodiert, die nicht natürlicherweise in der Ib-Domäne des Pseudomonas-Exotoxins A vorkommt.

## II. Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogene

### A. Grundlegende Struktur

**[0095]** Die Pseudomonas-Exotoxin-A-ähnlichen („PE-ähnlichen“) chimären Immunogene gemäß der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide, die strukturelle Domänen aufweisen, die – mit Ausnahme der Fälle, die speziell in der vorliegenden Beschreibung angegeben sind – in derselben Sequenz organisiert sind wie die vier strukturellen Domänen von PE (d. h. Ia, II, Ib und III), und die bestimmte Funktionen aufweisen (z. B. Zell-Erkennung, cytosolische Translokation und Retention des endoplasmatischen Reticulums), die auch die funktionellen Domänen von PE besitzen. Darüber hinaus besitzen die PE-ähnlichen chimären Immunogene gemäß der vorliegenden Erfindung eine Domäne, die eine Domäne von PE funktionalisiert, für die bisher noch keine Funktion identifiziert wurde. PE-ähnliche chimäre Immunogene ersetzen nämlich Ib-Domäne von PE durch eine funktionelle nicht-native Epitop-Domäne, die als Immunogen dient und so eine Immunantwort gegen das nicht-native Epitop hervorruft.

**[0096]** Dementsprechend schließen PE-ähnliche chimäre Immunogene die folgenden strukturellen Domänen ein, die aus Aminosäuresequenzen bestehen, wobei die Domänen dem chimären Protein besondere Funktionen verleihen: (1) eine „Zell-Erkennungs-Domäne“ die als Ligand für einen Zell-Oberflächen-Rezeptor dient und das Binden des Proteins einer Zelle vermittelt; (2) eine „Translokations-Domäne“, die eine Translokation von den Endosomen in das Cytosol vermittelt; (3) eine „nicht-native Epitop-Domäne“, die das immunogen nicht-native Epitop enthält; und gegebenenfalls (4) eine „Domäne die Retention bzw. den Erhalt des endoplasmatischen Reticulums („ER“)“, die in der Weise funktioniert, dass sie das Molekül von dem Endosom in das endoplasmatische Reticulum transloziert, von wo es in das Cytosol eintritt. Wenn die ER-Retentions-Domäne eliminiert wird, kann das chimäre Immunogen nach wie vor immunogene Funktionen beibehalten.

**[0097]** In einer Ausführungsform umfasst das PE-ähnliche chimäre Immunogen die native Sequenz von PE, mit Ausnahme der Ib-Domäne, die in der Weise durch genetic engineering verändert wurde, dass sie die Aminosäure-Sequenz eines nicht-nativen Epitops einschließt. Beispielsweise kann man eine Aminosäure-Sequenz in den Cystein-Cystein-Loop der Ib-Domäne einbauen, die für das nicht-native Epitop kodiert.

**[0098]** Jedoch wird die Beziehung der PE-Struktur zu ihrer Funktion extensiv untersucht. Die Aminosäure-Sequenz von PE wurde durch genetic engineering nachgebaut und liefert so neue Funktionen, und es wurden viele Aminosäuren oder Peptid-Segmente identifiziert, die für die PE-Funktion kritisch und nicht kritisch sind. Die PE-ähnlichen chimären Immunogene gemäß der vorliegenden Erfindung können diese strukturellen Mo-



difikationen in PE einbauen.

## B. Zell-Erkennungs-Domäne

**[0099]** Die Pseudomonas-Exotoxin-Chimären gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen eine Aminosäure-Sequenz, die für eine „Zell-Erkennungs-Domäne“ kodiert. Die Zell-Erkennungs-Domäne fungiert als Ligand für einen Zell-Oberflächen-Rezeptor. Sie vermittelt ein Binden des Proteins an einer Zelle. Ihr Zweck ist, das chimäre Molekül zielmäßig einer Zelle zuzuleiten, die dieses in das Cytosol für eine Verarbeitung transportiert. Die Zell-Erkennungs-Domäne kann in der Position von Domäne Ia des PE lokalisiert sein. Jedoch kann diese Domäne aus der normalen Organisations-Sequenz heraus bewegt werden. Noch spezieller kann die Zell-Erkennungs-Domäne stromaufwärts der ER-Retentions-Domäne eingesetzt werden. Alternativ kann die Zell-Erkennungs-Domäne chemisch an das Toxin gebunden werden. Auch kann das chimäre Molekül eine erste Zell-Erkennungs-Domäne am Ort der Ia-Domäne und eine zweite Zell-Erkennungs-Domäne stromaufwärts der ER-Retentions-Domäne einschließen. Solche Konstrukte können sich an mehr als einen Zelltyp binden; siehe beispielsweise „R. J. Kreitman et al. (1992), Bioconjugate Chem. 3:63–68.

**[0100]** Da die Zell-Erkennungs-Domäne als „Griff“ zum Binden der Chimäre an eine Zelle funktioniert, kann sie die Struktur irgendeines Polypeptids aufweisen, von dem bekannt ist, dass es sich an einen speziellen Rezeptor bindet. Dementsprechend hat die Domäne allgemein die Größe bekannter Polypeptid-Liganden, z. B. zwischen etwa 10 Aminosäuren und etwa 1.500 Aminosäuren oder zwischen etwa 100 Aminosäuren und etwa 300 Aminosäuren.

**[0101]** Einige Verfahren sind nützlich zum Identifizieren funktioneller Zell-Erkennungs-Domänen zur Verwendung in chimären Immunogenen. Ein Verfahren schließt das Nachweisen eines Bindens zwischen einem chimären Molekül, das die Zell-Erkennungs-Domäne umfasst, mit dem Rezeptor oder mit einer Zelle ein, die den Rezeptor trägt. Andere Verfahren schließen das Nachweisen des Eintretens des chimären Moleküls in das Cytosol ein, was anzeigt, dass der erste Schritt, also das Binden an die Zelle, erfolgreich war. Diese Verfahren sind im einzelnen unten in dem Abschnitt bezüglich der Tests beschrieben.

**[0102]** Die Zell-Erkennungs-Domäne kann die Struktur irgendeines beliebigen Polypeptids aufweisen, das sich an einen Zell-Oberflächen-Rezeptor bindet. In einer Ausführungsform ist die Aminosäure-Sequenz diejenige der Domäne Ia von PE, wodurch das chimäre Protein zielmäßig auf die  $\alpha 2$ -MR-Domäne ausgerichtet wird. In anderen Ausführungsformen kann die Domäne Ia ersetzt werden durch: Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise TGF $\alpha$ , der sich an den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor; EGF) bindet; IL-2, das sich an den IL-2-Rezeptor bindet; IL-6, das sich an den IL-6-Rezeptor bindet (z. B. aktivierte B-Zellen und Leberzellen); CD4, das sich an HIV-infizierte Zelle bindet; ein Chemokin (z. B. Rantes, MIP-1 $\alpha$  oder MIP-1 $\beta$ ), das sich an einen Chemokin-Rezeptor bindet (z. B. CCR5 oder Fusin (CXCR4)); Liganden für Leukocyten-Zellen-Oberflächen-Rezeptoren, wie beispielsweise GM-CSF, G-CSF; Liganden für den IgA-Rezeptor; oder Antikörper oder Antikörperfragmente, die auf irgendeinen Rezeptor gerichtet sind (z. B. Einzelketten-Antikörper gegen den Human-Transferin-Rezeptor); siehe: „I. Pastan et al. (1992), Annu. Rev. Biochem. 61:331–354“.

**[0103]** In einer Ausführungsform ist die Zell-Erkennungs-Domäne an der Stelle der Domäne Ia von PE lokalisiert. Sie kann an die andere Einheit des Moleküls über einen Linker gebunden werden. Jedoch zeigen Engineering-Untersuchungen, dass Pseudomonas-Exotoxin zielmäßig auf bestimmte Zelltypen ausgerichtet werden kann durch Einführen einer Zell-Erkennungs-Domäne stromaufwärts der ER-Retentions-Sequenz, die am Carboxy-Terminus des Polypeptids angeordnet ist. Beispielsweise wurde TGF $\alpha$  in die Domäne III unmittelbar vor Aminosäure 604 eingesetzt, d. h. etwa 10 Aminosäuren entfernt vom Carboxy-Terminus. Dieses chimäre Protein bindet sich an Zellen, die den EGF-Rezeptor tragen; siehe Pastan et al., US-Patent Nr. 5,602,095.

**[0104]** Zellspezifische Liganden, die Proteine sind, können oft teilweise oder als Ganzes als ein Fusionsprotein mit den Pseudomonas-Exotoxin-Chimären der vorliegenden Erfindung ausgebildet werden. Der Begriff „Fusionsprotein“ bezieht sich auf ein Polypeptid, das gebildet wurde durch das Vereinigen von zwei oder mehr Polypeptiden über eine Peptid-Bindung, die durch den Amino-Terminus eines Polypeptids und den Carboxyl-Terminus des anderen Polypeptids gebildet wird. Das Fusionsprotein kann gebildet werden durch chemische Kopplung der Konstituenten-Polypeptide, wird jedoch typischerweise als einzelnes Polypeptid von einer Nucleinsäure-Sequenz exprimiert, die für das einzelne benachbarte Fusionsprotein kodiert. Eingeschlossen in solche Fusionsproteine sind Einzelketten-Fv-Fragmente (single chain Fv fragments; scFv). Besonders bevorzugte zielgerichtete Pseudomonas-Exotoxin-Chimäre sind Disulfid-stabilisierte Proteine, die zum Teil als Fusionsprotein gebildet werden können, wie dies in der vorliegenden Beschreibung beispielhaft angegeben wurde. Andere Protein-Zell-spezifische Liganden können als Fusionsproteine gebildet werden unter Verwendung von

Cloning-Verfahrensweisen, wie sie einem mit diesem technischen Gebiet vertrautem Fachmann wohlbekannt sind.

**[0105]** Das Binden zellspezifischer Liganden kann auch bewirkt werden durch Verwendung von Linkern. Der Linker ist in der Lage, kovalente Bindungen oder nicht-kovalente Bindungen hoher Affinität zu beiden Molekülen auszubilden. Geeignete Linker sind Fachleuten mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich wohlbekannt und schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf geradkettige oder verzweigt-kettige Kohlenstoff-Linker, heterozyklische Kohlenstoff-Linker oder Peptid-Linker. Die Linker können mit den Bestandteil-Aminosäuren über ihre Seitengruppen vereinigt werden (z. B. über eine Disulfid-Bindung an Cystein).

**[0106]** In einer Ausführungsform wird die Domäne Ia ersetzt durch ein Polypeptid-Sequenz für eine schwere Kette eines Immunoglobulins von einem Immunoglobulin, das spezifisch für die Ziel-Zelle ist. Die leichte Kette des Immunoglobulins kann mit dem PE-ähnlichen chimären Immunogen gemeinsam exprimiert werden und bildet so ein Chimär mit einer leichten Kette und einer schweren Kette. In dem Konjugat-Protein ist der Antikörper chemisch an ein Polypeptid gebunden, das die anderen Domänen des chimären Immunogens umfasst.

**[0107]** Das Verfahren zum Binden einer Pseudomonas-Exotoxin-Chimäre an einen Antikörper oder an einen anderen zellspezifischen Liganden variiert entsprechend der chemischen Struktur des Toxins. Antikörper enthalten eine Vielzahl funktioneller Gruppen, z. B. Sulfhydryl-Gruppen (-S), Carbonsäure-Gruppen (COOH) oder freien Amino-Gruppen (-NH<sub>2</sub>), die für eine Reaktion mit einer geeigneten funktionellen Gruppe an einem Toxin verfügbar sind. Zusätzlich oder alternativ kann der Antikörper oder das chimäre Pseudomonas-Exotoxin-Molekül derivatisiert werden und zeigt dann – oder ist gebunden an – weitere reaktive funktionelle Gruppen. Die Derivatisierung kann das Binden irgendeines aus einer Zahl von Linker-Molekülen involvieren, wie beispielsweise diejenigen, die erhältlich sind von der Firma Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

**[0108]** Ein bifunktionaler Linker, der eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit einer Gruppe an dem chimären Pseudomonas-Exotoxin-Molekül reagieren kann, und eine andere Gruppe aufweist, die mit einem zellspezifischen Liganden reagieren kann, kann zur Bildung eines gewünschten Konjugats verwendet werden. Alternativ kann eine Derivatisierung eine chemische Behandlung des chimären Pseudomonas-Exotoxin-Moleküls oder des zellspezifischen Liganden einschließen, z. B. eine Glycol-Spaltung der Zucker-Einheit eines Glycoprotein-Antikörpers mit Periodat unter Bildung freier Aldehyd-Gruppen. Die freien Aldehyd-Gruppen an dem Antikörper können mit freiem Amin oder Hydrazin-Gruppen an dem Antikörper unter Binden des chimären Pseudomonas-Exotoxin-Moleküls an diesen zur Umsetzung gebracht werden (siehe J. D. Rodwell et al., US-Patent Nr. 4,671,958). Verfahren zur Bildung freier Sulfhydryl-Gruppen an Antikörpern oder anderen Proteinen sind ebenfalls bekannt; siehe R. A. Nicoletti et al., US-Patent Nr. 4,659,839).

#### C. Translokations-Domäne

**[0109]** PE-ähnliche chimäre Immunogene umfassen auch eine Aminosäure-Sequenz, die für eine „PE-Translokations-Domäne“ kodiert. Die PE-Translokations-Domäne umfasst eine Aminosäure-Sequenz, die ausreichend ist, um eine Translokation von chimären Proteinen zu bewirken, die von der Zelle in das Cytosol durch Endocytose inkorporiert wurden. Die Aminosäure-Sequenz ist identisch zu einer Sequenz oder ist im wesentlichen identisch zu einer Sequenz, die gewählt ist aus der Domäne II von PE.

**[0110]** Die Aminosäure-Sequenz, die ausreichend ist um eine Translokation zu bewirken, kann abstammen von der Translokations-Domäne von nativem PE. Diese Domäne umspannt die Aminosäuren 253–364. Die Translokations-Domäne kann die gesamte Sequenz der Domäne II einschließen. Jedoch ist die gesamte Sequenz für eine Translokation nicht erforderlich. Beispielsweise kann die Aminosäure-Sequenz mindestens enthalten z. B. Aminosäuren 280–344 der Domäne II von PE. Sequenzen außerhalb dieses Bereichs, d. h. die Aminosäuren 253–279 und/oder die Aminosäuren 345–364, können von der Domäne eliminiert werden. Diese Domäne kann auch durch molecular engineering mit Ersatz-Sequenzen versehen werden, solange eine Translokations-Aktivität erhalten bleibt.

**[0111]** Die Translokations-Domäne funktioniert wie folgt: Nach Binden an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche treten die chimären Proteine in die Zelle durch Endocytose über mit Clathrin ausgekleidete Vertiefungen ein. Die Reste 265 und 287 sind Cystein-Reste, die einen Disulfid-Loop bilden. Sobald es einmal in Endosome mit einer sauren Umgebung eingeschlossen wurde, wird das Peptid durch die Protease Furin zwischen den Resten Arg279 und Gly280 gespalten. Danach wird die Disulfid-Bindung reduziert. Eine Mutation am Arginin-Rest 279 inhibiert eine proteolytische Spaltung und die anschließende Translokation in das Cytosol (siehe M. Ogata et al., (1990), J. Biol. Chem. 265:20678–20685). Jedoch ein Fragment von PE, das die Sequenz

stromabwärts des Restes Arg279 enthält (genannt „PE37“) behält ein wesentliches Vermögen zum Translozieren in das Cytosol; siehe C. B. Siegall et al., (1989), J. Biol. Chem. 264:14256–14261. Die Sequenzen in der Domäne II jenseits der Aminosäure 345 können ebenfalls gestrichen werden, ohne dass dies eine Translokation inhibiert. Weiter scheinen die Aminosäuren an den Positionen 339 und 343 für eine Translokation nötig zu sein; siehe C. B. Siegall et al., (1991), Biochemistry 30:7154–7159.

**[0112]** Verfahren zum Bestimmen der Funktionalität einer Translokations-Domäne sind weiter unten im Abschnitt bezüglich der Tests beschrieben.

#### D. Nicht-native Epitop-Domäne

**[0113]** PE-ähnliche chimäre Immunogene umfassen auch eine Aminosäure-Sequenz, die für eine „nicht-native Epitop-Domäne“ kodiert. Die nicht-native Epitop-Domäne umfasst die Aminosäure-Sequenz eines nicht-nativen Epitops. Die Domäne funktioniert in der Weise, dass sie das immunogene nicht-native Epitop zum Präsentieren gegenüber dem Immunsystem enthält. Die nicht-native Epitop-Domäne wird in den Ib-Domäne-Ort von PE zwischen der Translokations-Domäne (z. B. der Domäne II) und der ER-Retentions-Domäne (z. B. der Domäne III) durch Engineering eingebaut. Verfahren zum Bestimmen der Immunogenizität einer Translokations-Domäne sind weiter unten im Abschnitt bezüglich der Tests beschrieben.

**[0114]** Das nicht-native Epitop kann irgendeine Aminosäure-Sequenz sein, die immunogen ist. Die nicht-native Epitop-Domäne kann zwischen etwa 5 Aminosäuren und etwa 1.500 Aminosäuren aufweisen. Dies schließt Domänen zwischen etwa 15 Aminosäuren und etwa 350 Aminosäuren oder etwa 15 Aminosäuren und etwa 50 Aminosäuren ein.

**[0115]** In nativem Pseudomonas-Exotoxin-A umspannt die Domäne Ib die Aminosäuren 365–399. Die native Ib-Domäne ist strukturell gekennzeichnet durch eine Disulfid-Bindung zwischen zwei Cystein-Resten an den Positionen 372 und 379. Die Domäne Ib ist für ein Binden an der Zelle, eine Translokation, eine ER-Retention oder die ADP-Ribosylierungs-Aktivität nicht essentiell. Daher kann sie vollständig durch Engineering überarbeitet werden.

**[0116]** Die nicht-native Epitop-Domäne kann linear sein, oder sie kann einen Cystein-Cystein-Loop einschließen, der das nicht-native Epitop umfasst. In einer Ausführungsform schließt die nicht-native Epitop-Domäne einen Cystein-Cystein-Loop ein, der das nicht-native Epitop umfasst. Diese Anordnung bietet einige Vorteile. Zum einen repräsentiert dann, wenn das nicht-native Epitop natürlich im Inneren eines Cystein-Cystein-Disulfid-Bindungs-Loop existiert oder diesen umfasst, die nicht-native Epitop-Domäne das Epitop in einer nahe der nativen Konformation vorliegenden Konformation. Zum zweiten wird angenommen, dass geladene Aminosäure-Reste in der nativen Ib-Domäne zu einer hydrophilen Struktur führen, die von dem Molekül weg nach außen und in das Lösungsmittel hinein zeigt, wo sie für eine Wechselwirkung mit Komponenten des Immunsystems verfügbar ist. Daher führt das Anordnen des nicht-native Epitops innerhalb des Cystein-Cystein-Loops zu einer wirksameren Präsentation, wenn das nicht-native Epitop auch hydrophil ist. Zum dritten ist die Ib-Domäne in hohem Maße unempfindlich gegenüber einer Mutation. Daher kann man trotz der Tatsache, dass der Cystein-Cystein-Loop der nativen Ib-Domäne nur sechs Aminosäure-Reste zwischen den Cystein-Resten aufweist, viel längere Sequenzen in den Loop einsetzen, ohne eine Zell-Bindung, eine Translokation, eine ER-Retention oder die ADP-Ribosylierungs-Aktivität zu stören.

**[0117]** Die vorliegende Erfindung zieht einige Wege in Betracht, auf denen die nicht-native Epitop-Domäne in den Ib-Domäne-Ort durch Engineering eingebaut werden kann. Ein Verfahren schließt das Einsetzen der Aminosäure-Sequenz des nicht-native Epitops direkt in die Aminosäure-Sequenz der Ib-Domäne ein, mit oder ohne Streichen von nativen Aminosäuren-Sequenzen. Ein anderes Verfahren schließt das Entfernen der gesamten Ib-Domäne oder eines Teils davon und das Ersetzen davon durch eine Aminosäure-Sequenz ein, die das nicht-native Epitop zwischen zwei Cystein-Resten einschließt, so dass die Cystein-Reste eine Disulfid-Bindung eingehen, wenn das Protein exprimiert wird. Wenn beispielsweise das nicht-native Epitop normalerweise innerhalb der Cystein-Cystein-Loop-Struktur eines Polypeptids existiert, kann ein Abschnitt des Polypeptids, der den Loop und das nicht-native Epitop einschließt, anstelle der Cystein-Cystein-Loop-Domäne eingesetzt werden.

**[0118]** Die Wahl des nicht-nativen Epitops liegt im Belieben des Praktikers. Bei der Auswahl kann der Praktiker die folgenden Punkte beachten: Zwar kann die nicht-native Epitop-Domäne linear sein, jedoch ziehen nicht-native Epitope, die natürlich innerhalb eines Cystein-Cystein-Loops existieren, Vorteil von der natürlichen Struktur des Ib-Loops von Pseudomonas-Exotoxin A. Epitope von Mitteln, die verantwortlich für schmerzlose

Infektionen sind, oder Krebs-spezifische Antigene sind attraktiv, da diese Antigene dazu neigen, einem Angriff von dem Immunsystem zu widerstehen. Auch ermöglicht es die Rekombinant-Technologie, schnell ein Polynucleotid, das für ein Epitop kodiert, in einen Vektor einzubauen, der für das chimäre Protein kodiert. Daher kann man schnell Sequenzen ändern, wenn sich ein nicht-natives Epitop ändert. Dementsprechend stellen Epitope von schnell auftretenden infektiösen Mitteln attraktive Inserts dar.

**[0119]** So können beispielsweise Epitope gewählt sein von jedem beliebigen Pathogen, zum Beispiel von Viren, Bakterien und Protozoen-Parasiten. Virale Quellen von Epitopen schließen beispielsweise das HIV, Herpes Zoster-Viren, Influenza-Viren, Polio-Viren und Hepatitis-Viren ein. Bakterielle Quellen schließen beispielsweise Tuberkulose-Bakterien, Chlamydien oder Salmonellen ein. Parasiten-Protozoen-Quellen schließen beispielsweise Trypanosoma oder Plasmodium ein. Insbesondere kann das Mittel ein solches sein, das Eintritt in den Körper über epitheliale Schleimhaut-Membranen erlangt. Nützliche Krebs-spezifische Mittel schließen diejenigen ein, die auf der Zell-Oberfläche exprimiert werden und daher Ziel einer cytotoxischen T-Lymphocyten-Response sein können, wie beispielsweise ein Prostatakrebs-spezifischer Marker (z. B. PSA), ein Brustkrebs-spezifischer Marker (z. B. BRCA-1 oder HER2), ein Pankreaskrebs-spezifischer Marker (z. B. CA9-19), ein Melanom-Marker (z. B. Tyrosinase) oder eine Krebs-spezifische Mutantenform von EGF.

**[0120]** In einer Ausführungsform leitet sich das nicht-native Epitop ab von dem neutralisierenden Haupt-Loop eines Retrovirus wie beispielsweise HIV-1 oder HIV-2. Insbesondere kann sich das Epitop ableiten von dem V3-Loop des gp120-Proteins von HIV-1. Ein neutralisierender Loop kann identifiziert werden durch neutralisierende Antikörper, d. h. Antikörper, die eine Infektivität des Virus neutralisieren. Die Sequenzen können von jedem beliebigen Stamm stammen, insbesondere von zirkulierenden Stämmen. Solche Stämme schließen beispielsweise ein MN (z. B. den Sub-Typ B) oder Thai-E (z. B. den Sub-Typ E). V3-Loops von verschiedenen Stämmen von HIV-1 haben etwa 35 Aminosäuren. Die Stämme von HIV können T-Zell-tropisch oder Makrophagen-tropisch sein. In einer Ausführungsform schließen die Sequenzen von dem V3-Loop wenigstens 8 Aminosäuren ein (z. B. ein Peptid, das ausreichend lang ist, um in eine MHC-Klasse II-Bindungstasche zu passen), das eine V3-Loop-Spitze einschließt. Der V3-Loop des MN-Stamms von HIV hat die folgende Sequenz: CTRPNYNKRK RIHIGPGRAF YTTKNIIGTI RQAHC (Seq.-ID Nr. 3). Der V3-Loop des Thai-E-Strangs von HIV hat die folgende Sequenz: CTRPSNNTRT SITIGPGQVF YRTGDIIGDI RKAYC (Seq.-ID Nr. 4). Die V3-Loop-Spitze ist unterstrichen. Die Sequenz kann etwa 14 bis etwa 26 Aminosäuren lang sein. Ein Impfstoff kann eine Mehrzahl von Immunogenen umfassen, die verschiedene virale Epitope aufweisen.

**[0121]** In einer anderen Ausführungsform kann das nicht-native Epitop ein Epitop sein, das durch eine Zelle während einer Krankheit exprimiert wird. Beispielsweise kann das nicht-native Epitop ein Krebszellen-Marker sein. Beispielsweise exprimieren bestimmte Brust-Krebse einen Mutanten EGF-Rezeptor („epidermal growth factor“), der von einer Splice-Variante resultiert. Diese Mutanten-Form zeigt ein einzigartiges Epitop.

#### E. ER-Retentions-Domäne

**[0122]** PE-artige chimäre Immunogene können auch eine Aminosäure-Sequenz umfassen, die für eine „Retentions-Domäne des endoplasmatischen Reticulums“ kodiert. Die Retentions-Domäne für das endoplasmatische Reticulum („ER“) fungiert in der Weise, dass sie das chimäre Protein vom Endosom in das endoplasmatische Reticulum überträgt, von wo es in das Cytosol transportiert wird. Die ER-Retentions-Domäne ist an der Position der Domäne III in PE angeordnet. Die ER-Retentions-Domäne umfasst eine Aminosäure-Sequenz, die an ihrem Carboxy-Terminus eine ER-Retention-Sequenz aufweist. Die ER-Retentions-Sequenz in nativem PE ist REDLK (Seq. ID Nr. 11). Lysin kann eliminiert werden (d. h. REDL (Seq. ID Nr. 12)), und zwar ohne eine Senkung der Aktivität. REDLK (von Seq ID Nr. 11) kann durch andere ER-Retentions-Sequenzen ersetzt werden, wie beispielsweise durch KDEL (Seq. ID Nr. 12) oder Polymere aus diesen Sequenzen. Verwiesen wird auf folgende Druckschriften: M. Ogata et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20678-85. Pastan et al., U.S. Patent 5,458,878. I. Pastan et al. (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:331-54.

**[0123]** Sequenzen stromaufwärts der ER-Retentions-Sequenz können die native PE-Domäne III sein (vorzugsweise detoxifiziert), können vollständig eliminiert sein oder können ersetzt sein durch eine andere Aminosäure-Sequenz. Wenn die Sequenz durch eine andere Aminosäure-Sequenz ersetzt ist, kann sie selbst hochgradig immunogen sein oder kann schwach immunogen sein. Eine hochgradig immunogene ER-Retentions-Domäne ist bevorzugt zur Verwendung beim Hervorrufen einer humoralen Immun-Antwort. Chimären, in denen die ER-Retentions-Domäne nur schwach immunogen ist, sind nützlicher, wenn eine MHC-Klasse I-abhängige, Zell-vermittelte Immun-Antwort erwünscht ist.

**[0124]** Die Aktivität dieser Domäne kann abgeschätzt werden durch Testen auf eine Translokation des Prote-

ins in das Ziel-Zell-Cytosol unter Verwendung der unten beschriebenen Assays.

**[0125]** In nativem PE ist die ER-Retentions-Sequenz am Carboxy-Terminus der Domäne III angeordnet. Die Domäne III hat in PE zwei Funktionen: Sie zeigt ADP ribosylierende Aktivität und richtet endocytosiertes Toxin in das endoplasmatische Reticulum. Ein Eliminieren der ER-Retentions-Sequenz von dem chimären Protein verändert nicht die Aktivität von Pseudomonas-Exotoxin als Super-Antigen, inhibiert jedoch seine Nützlichkeit zum Hervorrufen einer MHC-Klasse I-abhängigen, Zell-vermittelten Immun-Antwort.

**[0126]** Die ribosylierende Aktivität von PE ist angeordnet etwa zwischen den Aminosäuren 400 und 600 von PE. In Verfahren zum Impfen einer Person unter Verwendung der chimären Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, dass das Protein nicht-toxisch ist. Eine Verfahrensweise, dies einzustellen, besteht darin, die ADP-Ribosylierungs-Aktivität zu eliminieren. Auf diese Weise kann das chimäre Protein als Vektor für nicht-native Epitop-Sequenzen fungieren, die durch die Zelle verarbeitet werden sollen und auf der Zell-Oberfläche mit MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, jedoch nicht als Toxin. Die ADP-Ribosylierungs-Aktivität kann beispielsweise eliminiert werden durch Entfernen von Aminosäure E553 („ΔE553“); verwiesen wird auf die Druckschrift M. Lukac et al. (1988) Infect. and Immun. 56:3095–3098. Alternativ dazu kann die Aminosäure-Sequenz der Domäne III oder Teile davon von dem Protein entfernt werden. Natürlich sollte eine ER-Retentions-Sequenz am Carboxy-Terminus eingeschlossen sein.

**[0127]** In einer Ausführungsform ist die Sequenz der ER-Retentions-Domäne im wesentlichen identisch mit den nativen Aminosäure-Sequenzen der Domäne III oder einem Fragment davon. In einer Ausführungsform ist die ER-Retentions-Domäne die Domäne III von PE.

**[0128]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Zell-Erkennungs-Domäne in die Aminosäure-Sequenz der ER-Retentions-Domäne eingebaut (z. B. in die Domäne III). Beispielsweise kann die Zell-Erkennungs-Domäne unmittelbar stromaufwärts der ER-Retentions-Sequenz eingebaut sein, so dass die ER-Retentions-Sequenz direkt gebunden ist an oder in 10 Aminosäuren des Carboxy-Terminus der Zell-Erkennungs-Domäne.

#### F. Verfahren zum Herstellen von PE-ähnlichen chimären Immunogenen

**[0129]** PE-ähnliche chimäre Immunogene werden vorzugsweise rekombinant produziert, wie dies unten beschrieben wird. Diese Erfindung zieht auch die Herstellung von PE-chimären Proteinen durch chemische Synthese in Betracht, die Gebrauch von Verfahrensweisen macht, die in diesem technischen Gebiet verfügbar sind.

#### G. Das Testen von PE-ähnlichen Immunogenen Chimären

**[0130]** Nach Auswählen verschiedener Strukturen als Domänen des chimären Immunogens kann die Funktion dieser Domänen und der Chimäre als ganzes getestet werden, um die Funktionalität zu bestimmen. PE-ähnliche Immunogene Chimären können getestet werden auf Zell-Erkennung, Translokation in das Cytosol und Immunogenität, und zwar unter Verwendung von Routine-Assays. Das gesamte chimäre Protein kann getestet werden, oder es kann die Funktion verschiedener Domänen getestet werden, indem man sie anstelle nativer Domänen des Toxin des Wild-Typs einsetzt.

##### 1. Rezeptor-Bindung/Zellerkennung

**[0131]** Die Funktion der Zell-Bindungs-Domäne kann getestet werden als Funktion der Chimären, der sich an dem Ziel-Rezeptor entweder isoliert oder an der Zell-Oberfläche bindet.

**[0132]** In einem Verfahren wird ein Binden der Chimären an ein Target durchgeführt durch Affinitätschromatographie. Beispielsweise kann die Chimäre an eine Matrix in einer Affinitäts-Säule gebunden werden, und ein Binden des Rezeptors an die Matrix kann nachgewiesen werden.

**[0133]** Ein Binden der Chimäre an Rezeptoren auf Zellen kann getestet werden beispielsweise durch Markieren der Chimäre und Nachweisen ihrer Bindung an Zellen beispielsweise durch Fluoreszenz-Zell-Sorting, Autoradiographie usw..

**[0134]** Wenn Antikörper identifiziert wurden, die sich an den Liganden bilden, von dem die Zell-Erkennungs-Domäne abgeleitet ist, sind sie auch nützlich zum Nachweis der Existenz der Zell-Erkennungs-Domäne in dem chimären Immunogen durch Immuno-Assay oder durch kompetitiven Assay für den Kognat-Rezeptor.

## 2. Translokation in das Cytosol

**[0135]** Die Funktion der Translokations-Domäne und der ER-Retentions-Domäne kann getestet werden als Funktion des Vermögens einer Chimäre, Zugang zum Cytosol zu erlangen. Da ein Zugang zuerst ein Binden an die Zelle erfordert, sind diese Assays auch nützlich dafür, zu bestimmen, ob die Zell-Erkennungs-Domäne funktioniert.

## a) Präsenz im Cytosol

**[0136]** In einem Verfahren wird ein Zugang zum Cytosol bestimmt durch Nachweisen der physikalischen Präsenz der Chimäre im Cytosol. Beispielsweise kann die Chimäre markiert werden, und die Chimäre kann mit der Zelle in Kontakt gebracht werden. Dann wird die Cytosol-Fraktion isoliert und die Menge an Markierung in der Fraktion wird bestimmt. Ein Nachweis der Markierung in der Fraktion zeigt an, dass die Chimäre Zugang zum Cytosol erlangt hat.

## b) ADP-Ribosylierungs-Aktivität

**[0137]** In einem weiteren Verfahren kann das Vermögen der Translokations-Domäne und der ER-Retentions-Domäne, eine Translokation in das Cytosol zu bewirken, getestet werden mit einem Konstrukt, das eine Domäne III enthält, die ADP-Ribosylierungs-Aktivität aufweist. Kurz beschrieben, werden Zellen in Gewebekultur-Platten ausgebracht und mit dem chimären Protein oder mit einem bearbeiteten PE-Exotoxin in Kontakt gebracht, das die modifizierte Translokations-Domäne-Sequenz oder ER-Retentions-Sequenz anstelle der nativen Domänen enthält. Die ADP-Ribosylierungs-Aktivität wird bestimmt als Funktion einer Inhibierung der Protein-Synthese beispielsweise durch Überwachen des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Leucin.

## 3. Immunogenizität

**[0138]** Die Funktion des nicht-nativen Epitops kann bestimmt werden durch Bestimmen der humoralen oder Zell-vermittelten Immunogenizität. Die Immunogenizität kann getestet werden mittels einiger Verfahren. Eine humorale Immun-Antwort kann getestet werden durch Inokulieren eines Tiers und Nachweis der Produktion von Antikörpern gegen das Fremd-Immunogen. Zell-vermittelte cytotoxische Immun-Antworten können getestet werden durch Immunisieren eines Tieres mit dem Immunogen, Isolieren cytotoxischer T-Zellen und Nachweis ihres Vermögens zum Töten von Zellen, deren MHC-Klasse I-Moleküle Aminosäure-Sequenzen von dem nicht-nativen Epitop tragen. Da das Erzeugen einer cytotoxischen T-Zell-Response sowohl das Binden der Chimäre an die Zelle als auch eine Translokation in das Cytosol erfordert, testet dieser Test auch die Aktivität der Zell-Erkennungs-Domäne, der Translokations-Domäne und der ER-Retentions-Domäne.

## III. Rekombinante Polynucleotide, die für PE-ähnliche chimäre Immunogene kodieren

## A. Rekombinante Polynucleotide

## 1. Quellen

**[0139]** Die vorliegende Erfindung liefert rekombinante Polynucleotide, die eine Nucleotid-Sequenz umfassen, die für die PE-ähnlichen chimären Immunogene der vorliegenden Erfindung kodiert. Diese Nucleotide sind nützlich zum Herstellen der PE-ähnlichen chimären Immunogene. In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung eine Klonierungsplattform für ein PE-ähnliches Protein, die eine rekombinante Polynucleotid-Sequenz umfasst, die für eine Zell-Erkennungs-Domäne, eine Translokations-Domäne, eine ER-Retentions-Domäne und – zwischen der Translokations-Domäne und der ER-Retentions-Domäne – eine Klonierungsstelle für eine Polynucleotid-Sequenz umfasst, die für eine nicht-native Epitop-Domäne kodiert.

**[0140]** Die rekombinanten Polynucleotide gemäß der vorliegenden Erfindung basieren auf Polynucleotiden, die für Pseudomonas-Exotoxin A kodieren, oder für Teile davon. Eine Nucleotid-Sequenz, die für PE kodiert, wird oben gezeigt. Der Praktiker kann diese Sequenz verwenden, um PCR-Primer zum Isolieren einer Sequenz voller Länge herzustellen. Die Sequenz von PE kann modifiziert sein, um ein Polynucleotid zu bearbeiten, das für das PE-ähnliche chimäre Immunogen oder die Plattform kodiert.

**[0141]** Ein Polynucleotid, das für PE oder irgendein anderes Polynucleotid kodiert, das in den chimären Proteinen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann durch in vitro-Verfahren kloniert oder amplifiziert werden, wie beispielsweise durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction; PCR), die Liga-

se-Ketten-Reaktion (ligase chain reaction; LCR), das Transkriptions-basierte Amplifikationssystem (transcription-based amplification; TAS), das selbst unterhaltene Sequenz-Replikations-System (self-sustained sequence replication system; 3SR) und das Q $\beta$ -Replikase-Amplifikationssystem (Q $\beta$ -replicase amplification system; QB). Beispielsweise kann ein Polynucleotid, das für das Protein kodiert, isoliert werden durch Polymerase-Ketten-Reaktion von cDNS unter Verwendung von Primern auf der Basis der DNS-Sequenz von PE oder eines Zell-Erkennungs-Moleküls.

**[0142]** Eine große Vielzahl von Klonierungs- und in vitro-Amplifikationsverfahren sind Fachleuten in diesem technischen Bereich wohlbekannt. PCR-Verfahren sind beispielsweise beschrieben in den Druckschriften US Patent Nr. 4,683,195; Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; und Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Polynucleotide können auch isoliert werden durch ein Screening von Genom- oder cDNS-Bibliotheken mit Sonden, die gewählt sind aus den Sequenzen des gewünschten Polynucleotids unter stringenten Hybridisierungsbedingungen.

## 2. Mutagenisierte Versionen

**[0143]** Mutanten-Versionen der Proteine können hergestellt werden durch site-spezifische Mutagenese anderer Nucleotide, die für die Proteine kodieren, oder durch statistische Mutagenese, die verursacht wird durch Erhöhen der Irrtums-Rate der PCR in dem ursprünglichen Polynucleotid mit 0,1 mM MnCl<sub>2</sub> und unausgewogenen Nucleotid-Konzentrationen.

**[0144]** Ein Eliminieren von Nucleotiden, die für die Aminosäuren 1–252 kodieren, führt zu einem Konstrukt, das als „PE40“ bezeichnet wird. Ein Eliminieren von Nucleotiden, die für die Aminosäuren 1–279 kodieren, führt zu einem Konstrukt, das als „PE37“ bezeichnet wird (siehe Pastan et al., U. S. Patent Nr. 5,602,095). Der Praktiker kann Sequenzen, die für Zell-Erkennungs-Domänen kodieren, mit dem 5'-Ende dieser Plattformen verbinden und so PE-ähnliche chimäre Proteine im Engineering herstellen, die auf bestimmte Zell-Oberflächen-Rezeptoren gerichtet sind. Diese Konstrukte können gegebenenfalls für einen Amino-terminalen Methionin-Rest kodieren. Eine Zell-Erkennungs-Domäne kann in solche Konstrukte in die Nucleotid-Sequenz eingebaut werden, die für die ER-Retentions-Domäne kodiert.

## 3. Chimäre Protein-Klonierungs-Plattformen

**[0145]** Eine Klonierungsstelle für die nicht-native Epitop-Domäne kann eingeführt werden zwischen den Nucleotiden, die für die Cystein-Reste der Domäne Ib kodieren. Beispielsweise kann – wie in den Beispielen geschrieben ist – eine Nucleotid-Sequenz, die für einen Abschnitt der Ib-Domäne zwischen den für Cystein kodierenden Resten kodiert, entfernt werden und ersetzt werden durch eine Nucleotid-Sequenz, die für eine Aminosäure-Sequenz kodiert und die eine PstI-Klonierungsstelle einschließt. Ein Polynucleotid, das für das nicht-native Epitop kodiert und von PstI-Sequenzen flankiert ist, kann in den Vektor eingebaut werden.

**[0146]** Das Konstrukt kann auch in der Weise bearbeitet werden, dass es für eine sekretorische Sequenz am Amino-Terminus des Proteins kodiert. Solche Konstrukte sind nützlich zur Herstellung der Immunogene in Säuger-Zellen. In vitro vereinfachen solche Konstrukte ein isolierendes Immunogen. In vivo sind die Konstrukte nützlich als Nucleotid-Impfstoff; Zellen, die das Konstrukt einbauen, exprimieren das Protein und scheiden es ab, so dass es mit dem Immunsystem in Wechselwirkung treten kann.

## B. Expressions-Vektoren

**[0147]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Expressions-Vektoren zum Exprimieren PE-ähnlicher chimärer Immunogene bereit. Expressions-Vektoren sind rekombinante Polynucleotid-Moleküle, die Expressions-Kontroll-Sequenzen umfassen, die operativ an eine Nucleotid-Sequenz gebunden sind, die für ein Polypeptid kodiert. Expressions-Vektoren können für ein Funktionieren in Prokaryanten oder Eukaryanten adaptiert werden durch Einschluss passender Promoter, Replikations-Sequenzen, Marker usw. für eine Transkription und Translation von mRNS. Die Konstruktion von Expressions-Vektoren und die Expression von Genen in transfektierten Zellen schließt die Verwendung molekularer Klonierungs-Verfahren ein, wie sie ebenfalls in diesem technischen Bereich wohlbekannt sind; verwiesen wird auf die Druckschriften Sambrook et al., Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989) und Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. und John Wiley & Sons, Inc.). Nützliche Promotoren für solche Zwecke schließen einen Metallothionein-Promoter, einen konstitutiven Adenovirus-Major-Late-Promoter, einen Dexamethason-induzierbaren MMTV-Promoter, einen SV40-Promoter, einen MRP polIII-Promoter, einen konstitutiven MPSV-Promo-



ter, einen Tetracyclin-induzierbaren CMV-Promoter (wie beispielsweise den human immediate-early CMV-Promoter), und einen konstitutiven CMV-Promoter ein. Ein Plasmid, wie es für eine Gen-Therapie nützlich ist, kann andere funktionelle Elemente umfassen, wie beispielsweise selektierbare Marker, Identifizierungs-Regionen und andere Gene.

**[0148]** Expressions-Vektoren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlich sind, hängen ab von ihrer beabsichtigten Verwendung. Solche Expressions-Vektoren müssen natürlich Expressions- und Replikations-Signale enthalten, die mit der Wirts-Zelle kompatibel sind. Expressions-Vektoren, die zum Exprimieren PE-ähnlicher chimärer Immunogene nützlich sind, schließen virale Vektoren wie beispielsweise Retro-Viren, Adeno-Viren und Adeno-assoziierte Viren, Plasmid-Vektoren, Cosmide und dergleichen ein. Virale und Plasmid-Vektoren sind bevorzugt zum Transfektieren von Säuger-Zellen. Der Expressions-Vektor pcDNA1 (Firma Invitrogen, San Diego, CA), in dem die Expressions-Kontroll-Sequenz den CMV-Promoter umfasst, liefert gute Transfektions- und Expressions-Raten. Adeno-assoziierte virale Vektoren sind nützlich in den Gen-Therapie-Verfahren der vorliegenden Erfindung.

**[0149]** Eine Vielzahl von Mitteln ist erhältlich zum Liefern von Polynucleotiden an Zellen. Diese schließen beispielsweise die direkte Aufnahme des Moleküls durch eine Zelle aus einer Lösung, eine erleichterte Aufnahme durch Lipofektion (z. B. Liposome oder Immuno-Liposome), eine Teilchen-vermittelte Transfektion und eine intrazelluläre Expression von einer Expressions-Kassette ein, die eine Expressions-Kontroll-Sequenz aufweist, die operativ an eine Nucleotid-Sequenz gebunden ist, die für das inhibitorische Polynucleotid kodiert. Hierzu wird auch auf die folgenden Druckschriften verwiesen: Inouye et al., US Patent Nr. 5,272,065; *Methods in Enzymology*. Vol. 185, Academic Press Inc., San Diego, CA (D. V. Goeddel, ed.) (1990) oder M. Krieger, *Gene Transfer and Expression – A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, NY, (1990). Rekombinante DNS-Expressions-Plasmide können auch verwendet werden, um die Polynucleotide gemäß der Erfindung zur Bereitstellung durch von einer Gen-Therapie verschiedene Mittel herzustellen, obwohl es wirtschaftlicher sein kann, kurze Oligonucleotide durch eine in vitro-Synthese auf chemischen Weg herzustellen.

**[0150]** Das Konstrukt kann auch ein Tag enthalten, um eine Isolation des Proteins zu vereinfachen. Beispielsweise kann ein Polyhistidin-Tag von beispielsweise sechs Histidin-Resten am Amino-terminalen Ende des Proteins eingebaut werden. Das Polyhistidin-Tag erlaubt ein bequemes Isolieren des Proteins in einem einzigen Schritt durch Nickel-Chelat-Chromatographie.

#### C. Rekombinante Zellen

**[0151]** Die Erfindung liefert auch rekombinante Zellen, die einen Expressions-Vektor für eine Expression der Nucleotid-Sequenzen umfassen, die für ein PE-chimäres Immunogen gemäß der vorliegenden Erfindung kodieren. Wirts-Zellen können für hohe Grade der Expression ausgewählt werden, um das Protein zu reinigen. Die Zellen können Prokaryonten-Zellen wie beispielsweise *E. coli* oder Eukaryonten-Zellen sein. Nützliche Eukaryonten-Zellen schließen Hefe und Säuger-Zellen ein. Die Zelle kann beispielsweise eine rekombinante Zelle in Kultur oder eine Zelle in vivo sein.

**[0152]** *E. coli* wurde erfolgreich zum Herstellen PE-ähnlicher chimärer Immunogene verwendet. Das Protein kann sich falten, und Disulfid-Bindungen können sich in dieser Zelle bilden.

#### IV. Pseudomonas Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogen-Impfstoffe

**[0153]** PE-ähnliche chimäre Immunogene sind nützlich in Impfstoffen zum Hervorrufen einer schützenden Immun-Antwort gegen Mittel, die das nicht-native Epitop tragen. Ein Impfstoff kann eines oder eine Mehrzahl (d. h. ein multivalenter Impfstoff) von verschiedenen PE-ähnlichen chimären Immunogenen einschließen. Beispielsweise kann ein Impfstoff PE-ähnliche chimäre Immunogene einschließen, deren nicht-native Epitope von mehreren zirkulierenden Stämmen eines Pathogens stammen. Sobald sich das Pathogen entwickelt, können neue, PE-ähnliche chimäre Immunogene konstruiert werden, die die veränderten Epitope einschließen, beispielsweise von Durchbruch-Viren. In einer Ausführungsform umfasst der Impfstoff Epitope von einem T-Zell-tropischen Virus und von einem Makrophagen-tropischen Virus. Beispielsweise kann ein Impfstoff gegen HIV-Infektion Immunogene einschließen, deren nicht-native Epitope von dem V3-Loop von MN und Thai-E-Stämmen von HIV abgeleitet sind. Auch können die Epitope abgeleitet sein von irgendeinem Peptid von HIV, das in einer Membran-Fusion eingeschlossen ist, z. B. gp120 oder gp41. Alternativ kann deswegen, weil sie Untereinheit-Impfstoffe sind, der Impfstoff PE-ähnliche chimäre Immunogene einschließen, deren nicht-native Epitope gewählt sind von verschiedenen Epitopen desselben Pathogens.

**[0154]** Der Impfstoff kann bereitgestellt werden in lyophilisierter Form oder kann bereits in steriler Lösung zur Verwendung rekonstituiert sein. Eine immunisierende Dosis liegt zwischen etwa 1 µg und etwa 1000 µg, noch mehr bevorzugt zwischen etwa 10 µg und etwa 50 µg des rekombinanten Proteins. Zur Bestimmung von immunisierenden Dosen wird beispielsweise verwiesen auf die Druckschrift „Manual of Clinical Immunology, H. R. Rose und H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1980)“. Eine Einheits-Dosis ist etwa 0,05 ml bis etwa 1 ml, noch mehr üblich etwa 0,5 ml. Eine Dosis wird vorzugsweise subkutan oder intramuskulär verabreicht. Einer Injektion können einige weitere Injektionen folgen, die im Abstand von etwa 4 bis etwa 8 Wochen getrennt von der ersten verabreicht werden. Booster-Dosen können in etwa 1 bis etwa 10 Jahren folgen. Der Impfstoff kann hergestellt werden in Dosis-Formen, die zwischen 1 und 50 Dosen enthalten (z. B. 0,5 ml bis 25 ml), noch mehr üblich zwischen 1 und 10 Dosen (z. B. 0,5 ml bis 5 ml). Der Impfstoff kann auch einschließen einen Hilfsstoff, der eine Immun-Antwort potenziert, wenn er zusammen mit einem Antigen verwendet wird. Nützliche Hilfsstoffe schließen Alaun, Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat ein.

#### V. Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort

**[0155]** PE-ähnliche chimäre Immunogene sind nützlich im Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen Antigene, die das nicht-native Epitop tragen. Das Hervorrufen einer humoralen Immun-Antwort ist nützlich bei der Herstellung von Antikörpern, die spezifisch das nicht-native Epitop erkennen, und bei einer Immunisierung gegen Zellen, Viren oder andere Mittel, die das nicht-native Epitop tragen. PE-ähnliche chimäre Immunogene sind auch nützlich beim Hervorrufen von MHC-Klasse I-abhängigen oder MHC-Klasse II-abhängigen, Zell-vermittelten Immun-Antworten. Sie sind auch nützlich beim Hervorrufen einer sekretorischen Immun-Antwort.

#### A. Prophylaktische und therapeutische Behandlungen

**[0156]** PE-ähnliche chimäre Immunogene können nicht-native Epitope von pathogenen Organismen oder von pathologischen Zellen von einer Person einschließen, wie beispielsweise Krebs-Zellen. Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung prophylaktische und therapeutische Behandlungen für Krankheiten bereit, die die pathologische Aktivität von Mitteln einschließen, entweder Pathogenen oder von der Norm abweichenden Zellen, die das nicht-native Epitop tragen. Die Verfahren schließen ein Immunisieren einer Person mit PE-ähnlichen chimären Immunogenen ein, die das nicht-native Epitop tragen. Die resultierenden Immun-Antworten bringen einen Angriff gegen die Pathogene selbst zustande oder gegen Zellen, die das nicht-native Epitop exprimieren. Wenn beispielsweise der pathologische Zustand von einer bakteriellen oder parasitischen Protozon-Infektion kommt, bringt das Immunsystem eine Response gegen die Pathogene selbst zustande. Wenn das Pathogen ein Virus ist, exprimieren infizierte Zellen das nicht-native Epitop auf ihrer Oberfläche und werden das Ziel einer cytotoxischen Response. Von der Norm abweichende Zellen wie beispielsweise Krebs-Zellen exprimieren häufig anormale Epitope und können auch Gegenstand einer cytotoxischen Immun-Antwort sein.

#### B. Humorale Immun-Antwort

**[0157]** PE-ähnliche chimäre Immunogene sind nützlich im Hervorrufen der Produktion von Antikörpern gegen das nicht-native Epitop durch eine Person. PE-ähnliche chimäre Immunogene sind attraktive Immunogene zur Herstellung von Antikörpern gegen nicht-native Epitope, die natürlicherweise innerhalb eines Cystein-Cystein-Loops auftreten. Da sie das nicht-native Epitop innerhalb eines Cystein-Cystein-Loops enthalten, präsentieren sie das Epitop dem Immunsystem in einer nahe der nativen Konformation vorliegenden Konformation. Die resultierenden Antikörper erkennen allgemein das native Antigen besser als diejenigen, die gegen linearisierte Versionen des nicht-nativen Epitops gezüchtet wurden.

**[0158]** Verfahren zum Produzieren polyklonaler Antikörper sind Fachleuten mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich wohl bekannt. Kurz gesagt, wird ein Immunogen, vorzugsweise ein gereinigtes Polypeptid, an einen passenden Träger (z. B. GST, keyhole-limpet-hemocyanin, usw.) gekoppeltes Polypeptid oder ein in einen Immunisierungs-Vektor eingebautes Polypeptid wie beispielsweise ein rekombinanter Vaccinia-Virus (siehe U. S. Patent Nr. 4,722,848) mit einem Hilfsstoff gemischt. Tiere werden mit der Mischung immunisiert. Die Immun-Antwort eines Tiers auf die immunogene Zubereitung wird überwacht durch Abnahme von Test-Blut-Proben und Bestimmen des Titers der Reaktivität gegenüber dem Polypeptid von Interesse. Wenn passend hohe Titer von Antikörper gegen das Immunogen erhalten werden, wird das Blut von dem Tier abgenommen, und Antiseren werden hergestellt. Ein weiteres Fraktionieren der Antiseren zum Anreichern von Antikörpern, die gegenüber dem Polypeptid reaktiv sind, wird durchgeführt, wo dies erwünscht ist. Verwiesen wird beispielsweise auf die Druckschriften Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; und Harlow und Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY.

**[0159]** In verschiedenen Ausführungsformen können die letztlich hergestellten Antikörper monoklonale Antikörper, humanisierte Antikörper, chimäre Antikörper oder Antikörper-Fragmente sein.

**[0160]** Monoklonale Antikörper werden hergestellt von Zellen, die den gewünschten Antikörper abscheiden. Diese Antikörper werden einem Screening auf Bindung an Polypeptide unterzogen, die das Epitop umfassen, oder einem Screening auf Agonisten- oder Antagonisten-Aktivität, z. B. eine Aktivität, die durch das Mittel vermittelt wird, das das nicht-native Epitop umfasst. In einigen Beispielen ist es wünschenswert, monoklonale Antikörper von verschiedenen Säuger-Wirten herzustellen, wie beispielsweise Mäusen, Nagern, Primaten, Menschen usw.. Eine Beschreibung von Verfahrensweisen zur Herstellung solcher monoklonaler Antikörper wird beispielsweise gefunden in den folgenden Druckschriften: Stites et al. (Hrsg.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications. Los Altos, CA, und darin zitierte Druckschriften; Harlow and Lane, a.a.O., Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.) Academic Press, New York, NY; und Kohler und Milstein (1975) Nature 256:495–497.

**[0161]** In anderen Ausführungsformen sind die Antikörper humanisierte Immunglobuline. Humanisierte Antikörper werden hergestellt durch Verknüpfen der CDR-Bereiche nicht-humaner Antikörper mit humanen konstanten Bereichen durch rekombinante DNS-Verfahrensweisen. Verwiesen wird auf Queen et al., US Patent Nr. 5,585,089.

**[0162]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden Fragmente von Antikörpern gegen das nicht-native Epitop bereitgestellt. Typischerweise zeigen diese Fragmente spezifische Bindung mit dem nicht-nativen Epitop in ähnlicher Weise zu derjenigen eines vollständigen Immunglobulins. Antikörper-Fragmente schließen getrennte schwere Ketten, leichte Ketten, Fab, Fab'F(ab')<sub>2</sub> und Fv ein. Fragmente werden hergestellt durch rekombinante DNS-Verfahrensweisen oder durch enzymatische oder chemische Trennung von intakten Immunglobulinen.

**[0163]** Andere geeignete Verfahrensweisen schließen eine Selektion von Bibliotheken rekombinanter Antikörper in Phagen- oder ähnlichen Vektoren ein. Verwiesen wird auf die Druckschriften Huse et al., (1989) Science 246: 1275–1281; und Ward et al. (1989) Nature 341: 544–546.

**[0164]** Ein Ansatz zum Isolieren von DNS-Sequenzen, die für einen humanen monoklonalen Antikörper oder ein Bindungsfragment davon kodieren, ist ein Screening einer DNS-Bibliothek von humanen B-Zellen entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise, die beschrieben wurde von Huse et al., Science 246:1275–1281 (1989) und anschließendes Klonieren und Amplifizieren der Sequenzen, die für den Antikörper (oder das Bindungsfragment) der gewünschten Spezifität kodieren. Das von Huse beschriebene Protokoll wird noch effizienter in Kombination mit der Phagen-Display-Technologie; siehe dazu beispielsweise Dower et al., WO 91/17271 und McCafferty et al., WO 92/01047. Die Phagen-Display-Technologie kann auch verwendet werden zum Mutagenisieren von CDR-Regionen von Antikörpern, von denen vorher gezeigt wurde, dass sie eine Affinität für die Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung oder ihre Liganden haben. Antikörper, die eine verbesserte Bindungsaffinität aufweisen, werden ausgewählt.

**[0165]** Die Antikörper der vorliegenden Erfindung sind nützlich für die Affinitäts-Chromatographie beim Isolieren von Mitteln, die das nicht-native Epitop tragen. Säulen werden beispielsweise hergestellt mit den an einem festen Träger wie beispielsweise Teilchen, z. B. Agarose, Sephadex oder dergleichen, gebundenen Antikörpern, wobei ein Zell-Lysat durch die Säule hindurch laufen gelassen wird, diese gewaschen und mit steigenden Konzentrationen eines milden denaturierenden Mittels behandelt wird, wodurch gereinigte Mittel freigesetzt werden.

**[0166]** Antikörper wurden hergestellt gegen gp120 unter Verwendung eines PE-ähnlichen chimären Immungens, das den gp120-V3-Loop als das nicht-native Epitop aufwies. Die monoklonalen Antikörper haben selektiv die löslichen chimären MN- und Th-E-Proteine eingefangen und bestätigten dadurch, dass die V3-Loops frei lagen und für Antikörper-Sonden zugänglich waren. Auch neutralisierten Seren von immunisierten Kaninchen HIV-1-Infektivität in einem in vitro-Assay.

#### C. MHC-Klasse II-abhängige, Zell vermittelte Immun-Antwort

**[0167]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahrensweisen zum Hervorrufen einer MHC-Klasse II-abhängigen Immun-Antwort gegen Zellen bereit, die das nicht-native Epitop exprimieren. MHC-Klasse II-Moleküle binden Peptide, die spezielle Aminosäure-Motive aufweisen, wie sie in diesem technischen Bereich bekannt sind. Die MHC-Klasse II-abhängige Immun-Antwort schließt die Aufnahme eines An-

tigens durch Antigen-präsentierende Zellen (APC's), seine Verarbeitung und Präsentation auf der Zell-Oberfläche als Teil eines MHC-Klasse II/Antigen-Peptid-Komplexes ein. Alternativ können MHC-Klasse II-Moleküle auf der Zell-Oberfläche Peptide mit dem passenden Motiv binden.

**[0168]** Antigen-präsentierende Zellen treten mit CD4-positiven T-Helfer-Zellen in Wechselwirkung und aktivieren dadurch die T-Helfer-Zellen. Aktivierte T-Helfer-Zellen stimulieren B-Lymphocyten zur Produktion von Antikörpern gegen das Antigen. Antikörper markieren Zellen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Die markierten Zellen sind Gegenstand einer Antikörper-abhängigen, Zell-vermittelten Cytotoxizität, bei der NK-Zellen oder Makrophagen, die Fc-Rezeptoren tragen, die markierten Zellen attackieren.

**[0169]** Verfahrensweisen zum Hervorrufen einer MHC-Klasse II-abhängigen Immun-Antwort schließen das Verabreichen eines Impfstoffs, der eine immunogene Menge eines chimären Pseudomonas-Exotoxins einschließt, das ein Aminosäure-Motiv einschließt, das durch MHC-Klasse II-Moleküle der Person erkannt wird, an eine Person ein. Alternativ dazu können Antigen-präsentierende Zellen mit solchen Peptiden unter Zulassen einer Bindung kultiviert werden, und die Zellen können an die Person verabreicht werden. Vorzugsweise sind die Zellen syngen mit der Person.

#### D. MHC-Klasse I-abhängige, Zell-vermittelte Immun-Antwort

**[0170]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Hervorrufen einer MHC-Klasse I-abhängigen, Zell-vermittelten Immun-Antwort gegen Zellen bereit, die das nicht-native Epitop in einer Person exprimieren. MHC-Klasse I-Moleküle binden Peptide, die besondere Aminosäure-Motive aufweisen, wie sie in diesem technischen Bereich wohlbekannt sind. In einer Zelle exprimierte Proteine werden zu Peptiden verdaut und auf der Zell-Oberfläche in Assoziation mit MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert. Dort werden sie von CD8-positiven Lymphocyten erkannt, die eine cytotoxische T-lymphocyten-Response gegenüber Zellen erzeugen, die die Epitope in Assoziation mit MHC-Klasse I-Molekülen exprimieren. Da CD4-positive T-Lymphocyten, die mit HIV infiziert sind, gp120 und damit die V3-Domäne exprimieren, ist die Erzeugung von cytotoxischen T-Lymphocyten, die solche Zellen attackieren, nützlich in der prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen.

**[0171]** Ein HLA-A1-Bindungsmotiv schließt einen ersten konservierten Rest von T, S oder M, einen zweiten konservierten Rest von D oder E und einen dritten konservierten Rest von Y ein. Andere zweite konservierte Reste sind A, S oder T. Der erste und der zweite konservierte Rest sind benachbart und sind vorzugsweise von dem dritten konservierten Rest um 6 bis 7 Reste getrennt. Ein zweites Motiv besteht aus einem ersten konservierten Rest von E oder D und einem zweiten konservierten Rest von Y, wobei der erste und der zweite konservierte Rest um 5 bis 6 Reste voneinander getrennt sind. Das HLA-A3,2-Bindungsmotiv schließt einen ersten konservierten Rest von L, M, I, V, S, A, T und F an Position 2 und einen zweiten konservierten Rest von K, R oder Y am C-terminalen Ende ein. Andere erste konservierte Reste sind C, G oder D und alternativ E. Andere zweite konservierte Reste sind H oder F. Der erste und der zweite konservierte Rest sind vorzugsweise um 6 bis 7 Reste voneinander getrennt. Das HLA-A11-Bindungsmotiv schließt einen ersten konservierten Rest von T oder V an Position 2 und einen C-terminalen konservierten Rest von K ein. Der erste und der zweite konservierte Rest sind vorzugsweise um 6 oder 7 Reste voneinander getrennt. Das HLA-A24.1-Bindungsmotiv schließt einen ersten konservierten Rest von Y, F oder W an Position 2 und einen C-terminalen konservierten Rest von F, I, W, M oder L ein. Der erste und der zweite konservierte Rest sind vorzugsweise um 6 bis 7 Reste voneinander getrennt.

**[0172]** Ein weiteres Verfahren schließt das Transfektieren von Zellen ex vivo mit solchen Expressions-Vektoren und ein Verabreichen der Zellen an die Person ein. Die Zellen sind vorzugsweise syngen mit der Person.

**[0173]** Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort gegen einen Virus in einer Person sind nützlich in prophylaktischen Verfahren zum Verhindern einer Infektion mit dem Virus, wenn der Impfstoff an eine Person verabreicht wird, die nicht bereits infiziert ist.

#### D. IgA-vermittelte sekretorische Immun-Antwort

**[0174]** Mukosale Membranen sind hauptsächliche Einfallswegen für viele infektiöse Pathogene. Solche Pathogene schließen beispielsweise ein: HIV, Herpes, Vaccinia, Cytomegalovirus, Yersinia und Vibrio. Mukosale Membranen schließen die Membranen des Mundes, der Nase, der Kehle, der Lunge, der Vagina, des Rektums und des Darms ein. Als eine Verteidigung gegen ein Eindringen scheidet der Körper sekretorisches IgA auf den Oberflächen von mukosalen epithelialen Membranen gegen Pathogene ab. Weiter können Antigene, die

an einer Schleimhaut-Oberfläche präsentiert werden, Antworten an anderen Mukosa-Oberflächen-Triggern, und zwar aufgrund des gegenseitigen Austauschs von Antikörper abscheidenden Zellen zwischen diesen Schleimhäuten. Die Struktur von sekretorischen IgA ist – wie vorgeschlagen wurde – entscheidend für sein fortgesetztes Verbleiben und seine effektive Funktion an der luminalen Oberfläche einer Schleimhaut. Der Begriff „sekretorisches IgA“ oder „sIgA“, wie er in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen verwendet wird, bezieht sich auf ein polymeres Molekül, das zwei IgA-Immunglobuline umfasst, die durch eine J-Kette vereinigt sind und weiter an eine sekretorische Komponente gebunden sind. Zwar kann eine Verabreichung von Antigenen über die Schleimhaut eine IgG-Response erzeugen, jedoch produziert eine parenterale Verabreichung von Immunogenen nur selten starke sIgA-Antworten. Das Erzeugen einer sekretorischen Immun-Antwort zur Verteidigung gegen HIV ist eine anerkannte Notwendigkeit (Bukawa, H., et al. 1995, Nat Med 1, 681–685; Mestecky, J., et al., 1994, Aids Res Hum Retroviruses 10, S11–20).

**[0175]** Pseudomonas-Exotoxin bindet sich an Rezeptoren auf Mukosa- bzw. Schleimhaut-Membranen. Daher sind PE-ähnliche chimäre Immunogene ein attraktiver Vektor zum Verbringen nicht-nativer Epitope auf eine Schleimhaut-Oberfläche. Dort rufen die Immunogene eine IgA-vermittelte Immun-Antwort gegen das Immunogen hervor. Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung PE-ähnliche chimäre Immunogene bereit, die ein nicht-natives Epitop von einem Pathogen umfassen, das durch Schleimhaut-Membranen Eintritt erlangt. Die Zell-Erkennungs-Domäne kann auf irgendeinen Schleimhaut-Oberflächen-Rezeptor gerichtet werden. Diese PE-ähnlichen chimären Immunogene sind nützlich zum Hervorrufen einer IgA-vermittelten sekretorischen Immun-Antwort gegen Immunogene, die durch Schleimhaut-Oberflächen Zugang zum Körper erlangen. PE-ähnliche chimäre Immunogene, die für diesen Zweck verwendet werden, sollten Liganden aufweisen, die sich an Rezeptoren auf Schleimhaut-Membranen als ihre Zell-Erkennungs-Domänen binden. Beispielsweise bindet sich der epidermale Wachstumsfaktor an den Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor auf Schleimhaut-Oberflächen.

**[0176]** Die Immunogene können auf die Schleimhaut-Oberfläche mittels jedes beliebigen von typischen Mitteln aufgebracht werden, einschließlich pharmazeutischer Zubereitungen in Form von Flüssigkeiten oder Feststoffen, z. B. Sprays, Salben, Zäpfchen oder erodierbaren Polymeren, die mit dem Immunogen imprägniert sind. Eine Verabreichung kann einschließen das Aufbringen des Immunogens auf eine Vielzahl von verschiedenen Schleimhaut-Oberflächen in einer Reihe von Immunisierungs-Schritten, z. B. als Booster-Immunisierungs-Schritte. Eine Booster-Inokulierung kann auch parenteral verabreicht werden, z. B. subkutan. Das Immunogen kann verabreicht werden in Dosen von etwa 1 µg bis 1.000 µg, z. B. etwa 10 µg bis 100 µg.

**[0177]** Eine subkutane Inokulierung mit Impfstoffen, die ein Epitop von der hauptsächlichen neutralisierenden Domäne von gp120 von HIV umfassen, ist nicht dafür bekannt, sekretorisches IgA zu erzeugen. Dementsprechend ist die Schleimhaut-Präsentation der chimären Immunogene gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich zum Produzieren dieser bis dato unbekannten Antikörper. Die vorliegende Erfindung stellt auch sekretorisches IgA bereit, das spezifisch Epitope von anderen Pathogenen erkennt, die in den Körper durch eine Schleimhaut-Membran eintreten.

**[0178]** Die IgA-Response ist am stärksten auf Schleimhaut-Oberflächen, die mit dem Immunogen in Kontakt kommen. Daher wird in einer Ausführungsform das Immunogen auf eine Schleimhaut-Oberfläche aufgebracht, von der wahrscheinlich ist, dass sie eine Stelle des Kontakts mit einem speziellen Pathogen ist. Dementsprechend können chimäre Immunogene gegen sexuell übertragene Krankheiten auf vaginale, anale oder orale Schleimhaut-Oberflächen verabreicht werden.

**[0179]** Eine Schleimhaut-Verabreichung der chimären Immunogene der vorliegenden Erfindung führt zu stark mit einem Memory-Effekt verknüpften Antworten, und zwar sowohl für IgA als auch für IgG. Daher ist es beim Impfen mit diesen chimären Immunogenen nützlich, Booster-Dosen entweder über die Schleimhaut oder parenteral zur Verfügung zu stellen. Die mit einem Memory-Effekt verknüpfte Response kann hervorgerufen werden durch Verabreichen einer Booster-Dosis zu einem Zeitpunkt mehr als ein Jahr nach der Anfangsdosis. Beispielsweise kann eine Booster-Dosis verabreicht werden etwa 12, etwa 16, etwa 20 oder etwa 24 Monate nach der Anfangs-Dosis.

## VI. Polynucleotid-Impfstoffe und Verfahren der Gen-Therapie

**[0180]** Impfstoffe, die Polynucleotide umfassen, die für ein Protein-Immunogen kodieren, die häufig „DNS-Impfstoffe“ genannt werden, bieten bestimmte Vorteile gegenüber Polypeptid-Impfstoffen. DNS-Impfstoffe führen nicht zum Eingehen des Risikos einer Kontamination mit unerwünschten Protein-Immunogenen. Bei Verabreichung an eine Person wird das Polynucleotid durch eine Zelle aufgenommen. Die RNS wird revers

in eine DNS transkribiert. Die DNS wird in das Genom in einem gewissen Prozentsatz der transfektierten Zellen integriert. In den Fällen, in denen die DNS integriert wird, so dass sie operativ mit Expressions-Steuerungs-Sequenzen verknüpft wird, oder wenn solche Sequenzen mit dem rekombinanten Polynucleotid bereitgestellt werden, exprimiert die Zelle das kodierte Polypeptid. Bei Abscheiden durch die Zelle reagiert das Polypeptid als Immunogen. Die „nackte“ DNS wird vorzugsweise von der Leber und von Muskelzellen aufgenommen. Dementsprechend kann das Polypeptid in Muskelgewebe injiziert werden oder beispielsweise durch biolistische Injektion bereitgestellt werden. Allgemein liegen die Dosen von „nacktem“ Polynucleotid im Bereich von etwa 1 µg bis 100 µg für einen typischen, 70 kg schweren Patienten.

**[0181]** Die Polynucleotid-Impfstoffe gemäß der vorliegenden Erfindung können Polynucleotide einschließen, die für PE-ähnliche chimäre Immunogene kodieren, die in Polypeptid-Impfstoffen verwendet werden. Dies schließt Mehrfach-Immunogene ein, die einige Varianten eines Epitops einschließen.

**[0182]** Die folgenden Beispiele werden zu Zwecken der Veranschaulichung der Erfindung angegeben, nicht jedoch zu deren Beschränkung.

## Beispiele

### I. Konstruktion von PE-ähnlichen chimären Immunogenen

**[0183]** Um chimäre Proteine zu generieren, wurde die Sub-Domäne Ib von ntPE ersetzt durch V3-Loop-Sequenzen entweder von dem MN-Stamm (Subtyp B) oder von dem Thai-E-Subtyp-Stamm von HIV-1. Die MN-Sequenz stammt von einem T-Zell-tropischen Stamm, während die Thai-E-Sequenz von einem makrophagen-tropischen Stamm stammt.

**[0184]** PE des Wild-Typs (WT) besteht aus 613 Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 67.122 Da. Die Entfernung einer Glutaminsäure 553 ( $\Delta E553$ ) führt zu einer nicht-toxischen Version von PE (Lukac, M., et al., 1988, Infect and Immun 56:3095–3098), bezeichnet als ntPE.

**[0185]** Plasmide wurden konstruiert durch Einsetzen von Oligonucleotid-Doppeln, die für V3-Loop-Sequenzen kodieren, in einen neuen Vektor auf PE-Basis, der mit einer neuen PstI-Stelle versehen worden war. In einem Bemühen zur Herstellung eines V3-Loops mit einer Topologie, die ähnlich derjenigen ist, die in gp120 gefunden wird, wurden die 14 oder 26 Aminosäuren umfassenden Einschübe an der Seite mit Cystein-Resten versehen (flankiert) ([Fig. 1C](#) – Fettdruck). Die Konstruktion des neuen Vektors führte zu einigen Änderungen in der Aminosäure-Sequenz von ntPE nahe dem Insertionspunkt des V3-Loops ([Fig. 1C](#) – kursiv gedruckt). Die nicht-toxischen Chimären, ntPE-V3MN14, ntPE-V3MN26 und ntPE-V3Th-E26, enthielten V3-Loops mit 14 oder 26 Aminosäuren von dem MN-Stamm oder 26 Aminosäuren von dem Thai-E-Stamm (nt = „nicht-toxisch“). Das Einschleiben einer irrelevanten, 16 Aminosäuren umfassenden Sequenz führte zur Konstruktion einer Kontroll-Chimäre, die bezeichnet wird als „ntPE-Ep126“. Das Entfernen des Ib-Loops (6 Aminosäuren) und eine Modifikation von flankierenden Aminosäuren in Nachbarschaft zu dem V3-Loop-Einschub führte zu einer geringen Erhöhung der Molekularmasse, verglichen mit dem PE des Wild-Typs ([Fig. 1C](#)).

**[0186]** Noch spezieller gesagt, wurde das Plasmid pMOA1A2VK352 (Ogata, M., et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 25396–25401), das für PE kodiert, mit SfiI und Apal verdaut (Reste 1143 bzw. 1275) und danach wieder mit einem Doppel verbunden, das eine neue PstI-Stelle enthielt. Der kodierende Strang des Doppels hatte die folgende Sequenz: 5'-tggccctgac cctggccgcc gccgagagcg agcgcttcgt ccggcagggc accggcaacg acgaggccgg cg-cggcaaac ctgcagggcc-3' (Seq.-ID Nr. 5). Das resultierende Plasmid kodiert eine geringfügig kleinere Version von PE, und ihm fehlte viel der Domäne Ib. Die PstI-Stelle wurde dann zum Einführen von Doppeln verwendet, die für V3-Loop-Sequenzen kodierten und von Cystein-Resten flankiert waren. Um nicht-toxische Proteine herzustellen, wurden Vektoren modifiziert durch Subklonieren in einer enzymatisch inaktiven Domäne III von pVC45 $\Delta E553$ . Ein zusätzlicher Subklonierungs-Prozess von pJH4 (Hwang, J., et al., 1987, Cell, 48, 129–136) wurde benötigt, um einen Vektor zu produzieren, dem eine Signal-Sequenz fehlte. Insertion von Doppeln und Subklonierungs-Modifikationen wurden anfänglich verifiziert durch Restriktions-Analyse, während End-Konstrukte bestätigt wurden durch die Dideoxy-Doppelstrang-Sequenzierung.

### II. Charakterisierung von Chimären

#### A. Expression

**[0187]** Alle chimären ntPE-V3-Loop Proteine wurden exprimiert in E. coli SA2821/BL21 ( $\lambda$ DE3) unter Verwen-

derung eines T7-Promoter-/T7-Polymerase-Systems (Studier, F. W., et al., 1990, Methods Enzymol 185, 60–89). SA2821/BL21 ( $\lambda$ DE3)-Zellen wurden mit dem passenden Plasmid transformiert und bis zu einem Absorptionsvermögen von 1,0 (660 nm) in einem Ampicillin enthaltenden Medium gezüchtet. Um eine Protein-Expression auf hohem Niveau zu induzieren, wurde Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (1 mM) der Kultur zugesetzt und für zusätzliche 90 min inkubiert. E. coli-Zell-Pellets wurden in 50 mM Tris/20mM EDTA, pH 8,0 (TE-Puffer) resuspendiert und unter Verwendung eines Tissue-Misers dispergiert. Eine Zell-Lyse wurde bewirkt mit Lysozym (200  $\mu$ g/ml End-Konzentration; Sigma), und Membran-assoziierte Proteine wurden durch Zugabe von 2,5 % Triton X-100 und 0,5 M NaCl solubilisiert.

**[0188]** PE-V3-Loop-Chimären waren in den Einschlusskörpern zugegen, die durch Zentrifugation gewonnen wurden. Nach Waschen mit TE, das 0,5 % Triton X-100 enthielt, und danach allein mit TE wurden Einschlusskörper solubilisiert durch Zusatz von 6 M Guanidin und 65 mM Dithioerythritol. Man ließ einen Refolding-Prozess ablaufen bei einer End-Protein-Konzentration von 100  $\mu$ g/ml für ein Minimum von 24 h bei 8° C in 0,1 M Tris (pH 8,0), der 0,5 M L-Arginin (Firma Sigma), 2 mM EDTA und 0,9 mM Glutathion enthielt. Der Protease-Inhibitor AEBSF (Firma Boehringer Mannheim) wurde zu einer End-Konzentration von 0,5 mM zugesetzt. Proteine wurden gegen 20 mM Tris, 2 mM EDTA und 100 mM Harnstoff, pH 7,4, dialysiert. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteine auf eine Q-Sepharose-Säule (Firma Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) gegeben. Nach Waschen mit 20 mM Tris (pH 8,0), der 0,1 M NaCl enthielt, wurden chimäre Proteine mit 0,3 M NaCl in demselben Puffer eluiert und unter Verwendung von Centriprep-30-Ultrafiltrations-Vorrichtungen (Firma Amicon, Inc.; Beverly, MA) konzentriert. Eine HPLC-Gel-Filtrations-Säule (G3000SW von der Firma Toso Haas, Montgomeryville, PA) wurde zum Isolieren von End-Produkten verwendet. Eine typische Ausbeute von passend gefaltetem Protein pro 4 l Bakterienkultur betrug 50 bis 100 mg mit einer Reinheit größer als 95 %.

## B. Biochemische Charakterisierung

**[0189]** Chimäre Proteine wurden getrennt durch SDS-PAGE unter Verwendung von Polyacrylamid-Gelen mit einem 8 bis 16 % Gradienten (Firma Novex, San Diego, CA), und diese wurden visualisiert durch Anfärben mit Coomassie-Blau. Für eine Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Immobilon-P-Membranen (Firma Millipore Corp., Bedford, MA) übertragen und entweder mit einem monoklonalen Anti-PE-Maus-Antikörper (M40-1 (Ogata, M., et al., 1991, Infect and Immun 59, 407–414)) oder einem monoklonalen Anti-gp120-Maus-Antikörper in Kontakt gebracht, (1F12 für MN-Sequenzen oder 1B2 für Thai-E-Sequenzen; Firma Genentech, Inc.; South San Francisco, CA). Der primäre Antikörper wurde nachgewiesen durch einen sekundären Anti-Maus-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war. Reaktive Produkte wurden visualisiert durch Zusatz von Diaminobenzadin und Wasserstoffperoxid. Immun-Einfang-Experimente wurden durchgeführt für 30 min bei 23° C unter Verwendung des monoklonalen 1F12-Anti-gp120-Antikörpers. Komplexe aus Antikörper und chimärem Protein wurde gewonnen mit Protein G-Sepharose-Kugeln (Firma Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) und wurden unter Verwendung von SDS-PAGE (wie oben beschrieben) abgetrennt. Rekombinante Formen von gp120, die von HIV-1-MN (120/MN; Firma Genentech, Inc.) und von dem Thai-Subtyp E-Isolat (gp120/Th-E-Chiang Mai; Firma Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) abgeleitet waren, wurden als Standards verwendet.

**[0190]** Eine SDS-PAGE-Analyse von gereinigten ntPE-V3-Loop-Chimären ([Fig. 2A](#)) war übereinstimmend mit den berechneten Massen ([Fig. 1C](#)). Western-Blots unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die gegen gp120/MN (1F12) oder gp120/Th-E (1B2) gezüchtet worden waren, zeigten Stamm-spezifische Reaktivität mit den MN- und Thai-E-V3-Loop-Chimären ([Fig. 2B](#)).

**[0191]** Eine Analyse auf freie Sulfhydryl-Gruppen von gereinigten ntPE-V3-Loop-Chimären konnte keine ungepaarten Cysteine zeigen, was nahelegt, dass die gereinigten ntPE-V3-Loop-Chimären sich wieder gefaltet hatten und unter Bildung einer Disulfid-Bindung an der Basis des V3-Loops ([Fig. 1A](#)) oxidiert worden waren. Die Bildung dieser Disulfid-Bindung ergab sich – wie erwartet worden war – bei dem Kontakt des V3-Loops an der Oberfläche der Chimären.

**[0192]** Zur Bestimmung des Sulfhydryl-Gehalts wurden chimäre Proteine (15 nMol) in PBS (pH 7,4), die 1 mM EDTA enthielt, mit 1 mM Thionitrobenzoat (DTNB) (Firma Pierce Chem Co., Rockford, IL) für 15 min bei 23° C umgesetzt. Die Freisetzung von Thionitrobenzoat wurde bei 412 nm überwacht. Die Reaktivität von DTNB wurde durch die Verwendung von Cystein bestätigt.

**[0193]** Dies wurde direkt durch Immuno-Einfang-Untersuchungen getestet ([Fig. 2C](#)). Die monoklonalen 1F12- und 1B2-Antikörper fingen selektiv das lösliche MN-Chimären-Protein und das lösliche Th-E-Chimären-Protein ein, was bestätigte, dass die V3-Loops nach außen zeigten und für Antikörper-Sonden zugänglich



sind. Trotz der Tatsache, dass der 1F12-Antikörper stark mit ntPE-V3-MN14 in Western-Blot-Analysen ([Fig. 2B](#)) reagierte, fing er nur eine kleine Menge an löslichem Protein ein ([Fig. 2C](#), Spur 3), was nahelegt, dass das reaktive Epitop nicht vollständig freiliegend ist, wenn nur 14 Aminosäuren eingebaut wurden.

### C. Zirkular-Dichroismus

**[0194]** Zur Bewertung des Einflusses von Aminosäure-Einschüben auf die Sekundärstruktur der Chimären wurde eine CD-Spektral-Analyse im nahen und fernen UV-Bereich an gereinigten ntPE-V3-MN14- und ntPE-V3-MN26-Proteinen durchgeführt, und die Ergebnisse wurden mit Spektren von PE des Wild-Typs (wtPE) verglichen ([Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#)). Zirkular-Dichroismus-Spektren (CD-Spektren) wurden aufgenommen auf einem Spektropolarimeter mit der Bezeichnung Aviv 60DS. CD-Spektren im nahen UV-Bereich (400 nm bis 250 nm) wurden erhalten in 0,2 nm-Schritten mit einer Bandbreite von 0,5 nm und einer Zeitkonstante von 5 Sekunden (150 Ablesungen pro Sekunde im Mittel) für Proben in einer Zelle mit einer Weglänge von 1 cm. CD-Spektren im fernen UV-Bereich (250 nm bis 190 nm) wurden aufgenommen in 0,2 nm-Schritten bei einer Bandbreite von 0,5 nm und einer Zeitkonstante von 3 Sekunden in einer Zelle mit einer Weglänge von 0,05 cm. Jedes Spektrum wurde digital geglättet unter Verwendung des Savitsky-Golay-Algorithmus (Gorry, P. A., 1990, *Analytical Chem* 62, 570–573), hinsichtlich der Konzentration korrigiert und normalisiert auf Einheiten einer mittleren Restgewicht Elliptizität ( $\theta_{MRW}$ ) unter Verwendung der folgenden Beziehung:

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta_{obs}(MW_{monomer}/n_{monomer})}{10(d)(c)}$$

worin  $\theta_{obs}$  die beobachtete Elliptizität ist,  $MW_{monomer}$  das Molekulargewicht des Monomers ist,  $n_{monomer}$  die Zahl von Aminosäuren in dem Monomer ist,  $d$  die Weglänge der Zelle (in cm) ist, und  $c$  die Konzentration der Proben der Zelle (in mg/ml) ist.

**[0195]** Sekundärstruktur-Berechnungen ([Fig. 3C](#)) legten nahe, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Proteinen und wtPE gab. ntPE-V3MN14 zeigte eine stärkere negative Elliptizität als ntPE-V3MN26 und wtPE, was nahelegt, dass ein größerer Teil des Strangs an der Disulfid-Bindung an der Basis des Loop-Einschubs für diese Chimäre auftritt. Sowohl ntPE-V3MN14 als ntPE-V3MN26 zeigten eine apparente Rot-Verschiebung bei 290 nm, möglicherweise aufgrund der zusätzlichen Tyrosin-Reste in den Chimären. Alternativ dazu könnte diese Rot-Verschiebung resultieren aus einer geringfügigen Umgebungsstörung eines Tryptophan-Restes. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass die V3-Loop-Einschübe keine großen Veränderungen der Sekundärstruktur, relativ zu dem Toxin des Wild-Typs, produzierten und dass die Änderungen der Tertiärstruktur in Übereinstimmung mit der Präsenz der Einschübe aus 14 und 26 Aminosäuren waren.

### III. Translokation in das Cytosol

**[0196]** Nach Binden an den LRP-Rezeptor sollten ntPE-V3-Loop-Chimären einer Endocytose unterliegen, durch Furin gespalten werden und sollte der C-terminale Abschnitt, der die Domänen II, den V3-Loop und die Domäne III enthält, in das Cytosol in einer ähnlichen Weise wie wtPE transloziert werden (Ogata, M., et al.; 1990, *Biol. Chem.* 265, 20678 – ö 20685). Dies wurde direkt getestet durch Erzeugen enzymatischer aktiver Versionen von PE-V3-MN14 und 26 (die die Glutaminsäure 553 enthielten und das Vermögen hatten, den Verlängerungsfaktor 2 einer ADP-Ribosylierung zu unterziehen) und vergleichen ihre Aktivität mit wtPE in Cytotoxizitäts-Assays.

**[0197]** Human-A431-Zellen (epidermoide Carcinom-Zellen) wurden in 24 Vertiefungen enthaltenden Gewebekultur-Platten ausgebracht in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in RPMI-1640-Medium, das mit 5%igem fetalem Rinderserum supplementiert war. Nach 24 h wurden Zellen 18 h lang bei 37° C mit 4-fachen Verdünnungen von entweder wtPE oder toxischen Formen (mit einem Glutamin-Säure-Rest in Position 553 und in der Lage, den Verlängerungsfaktor 2 einer ADP-Ribosylierung zu unterziehen) der chimären Proteine behandelt. Eine Inhibierung der Protein-Synthese wurde abgeschätzt durch Überwachen des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Leucin.

**[0198]** Bei Tests seines Vermögens zur Inhibierung einer Protein-Synthese zeigte PE-V3MN26 eine ähnliche Toxizität wie wtPE in menschlichen A431-Zellen ([Fig. 4](#)). PE-V3MN14 war ebenfalls vollständig toxisch. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Größe und Anordnung der V3-Loop-Einschübe eine Toxin-Abgabe an das Cytosol nicht behindert. Weiter legen diese Daten nahe, dass die Isolierung, das erneute Falten und das Reinigungsprotokoll, das bei der Herstellung dieser Chimären angewendet worden war, zur Produktion eines korrekt gefalteten und funktionellen Proteins führten.

## IV. Immunogenizität

**[0199]** Zur Untersuchung der Nützlichkeit als Immunogene wurde Kaninchen subkutan 200 µg entweder das MN-Chimären-Molekül oder das Thai-E-Chimären-Molekül injiziert. Die Kaninchen wurden subkutan an vier Stellen mit 200 µg (insgesamt) ntPE-V3MN26 immunisiert. Die erste Injektion wurde verabreicht mit komplettem Freund's Adjuvant. Alle anschließenden Injektionen (in den Wochen 2, 4 und 12) wurden verabreicht mit unvollständigem Freund's Adjuvant. Venöse Blut-Abnahmen wurden wöchentlich nach der dritten Injektion erhalten und einem Screening durch Immuno-Blotting gegen gp120 unterworfen.

**[0200]** In Western-Blots zeigten Serum-Proben von Kaninchen, die mit den ntPE-V3MN-Proteinen immunisiert waren, eine starke Reaktivität gegenüber immobilisiertem rekombinanten gp120/MN ([Fig. 5A](#)). Reaktiv-Titer stiegen mit der Zeit an: Bei 6-wöchiger Reaktivität wurde eine 1:200-Verdünnung notiert, bei 12-wöchiger Reaktivität eine 1:5.000-Verdünnung, und eine Reaktivität bei späteren Zeitpunkten konnte nachgewiesen werden bei einer 1:25.000-Verdünnung. Diese Anti-V3-Loop/MN-Seren waren nicht reaktiv mit gp120/Thai-E ([Fig. 5A](#)). Seren von Kaninchen, denen nicht-toxisches PE injiziert worden war (d. h. ntPE ohne Einschub) zeigten keine Reaktivität gegenüber gp120. Kaninchen, denen das ntPE-V3Th-E injiziert worden war, produzierten reaktive Seren gegenüber gp120/Thai-E, nicht jedoch gegenüber gp120/MN ([Fig. 5A](#)).

**[0201]** Seren von Kaninchen, die mit ntPE-V3MN26 immunisiert worden waren, wurden weiter charakterisiert. Eine Reaktivität gegenüber immobilisierten gp120/MN wurde absorbiert, wenn diese Seren vorgemischt wurden mit löslichem rekombinanten gp120/MN ([Fig. 5B](#)). Diese blockierende Aktivität, die dosisabhängig war und bei 50 µg/ml maximal war, zeigte an, dass Kaninchen primär auf V3-Loop-Sequenzen antworteten, die auf der Oberfläche von gp120 exponiert waren.

**[0202]** Es wurde auch gefunden, dass Seren von immunisierten Kaninchen HIV-1-Infektivität in einem in vitro-Assay neutralisieren ([Fig. 6](#)). Dieser Assay machte Gebrauch von MT4-Zellen als Indikator des HIV-1-vermittelten Zell-Todes (Miyoshi, I. et al., 1981, Nature 294, 770–771). Doppelserien-Verdünnungen von Antiserum wurden inkubiert mit HIV-1/MN, gezüchtet in FDA/H9-Zellen (Popovic, M., et al., 1984 Science 224, 497–500), und die Mischung wurde zu Zellen für 7 Tage zugesetzt. Durch Virenvermittelter Zell-Tod wurde unter Verwendung eines MTT-Farbstoff-Assays abgeschätzt (Robertson, G. A., et al., 1988, J Virol Methods 20, 195–202), sowie durch spektrophotometrische Analyse bei 570 nm. Die 50%ige inhibitorische Konzentration wurde berechnet und als Neutralisations-Titer angegeben.

**[0203]** Vor-Immunisierungs-Seren zeigten keinen Schutz einer humanen T-Zell-Linie, nämlich MT4, gegenüber einem Killen durch HIV-1/MN. Obwohl Seren zu einem Zeitpunkt von 5 Wochen im Anschluss an die Immunisierung keinen Schutz zeigten, waren Seren zum Zeitpunkt der Woche 8 und zum Zeitpunkt der Woche 27 nach der Immunisierung schützend gegenüber einem viralen Angriff, wobei eine 50%ige Neutralisation bei einer ungefähren Verdünnung von 1:400 auftrat. Auf der Basis des angewendeten Immunisierungsplans gaben die Seren der Woche 5 die Response in Tieren wieder, die immunisiert und einmal auffrischend immunisiert worden waren, während Seren zum Zeitpunkt der Woche 8 von Tieren stammten, die zweimal mit einer Auffrischung versehen worden waren, und Seren zum Zeitpunkt der Woche 27 von Tieren kamen, die dreimal mit einer Auffrischung versehen worden waren. Werte des Überlebens von MT4-Zellen, die für Seren-Verdünnungen von weniger als 1:100 für Blut-Abnahmen in der Woche 8 und in der Woche 27 nach der Immunisierung erhalten worden waren, waren größer als die für eine Normalisierung verwendeten Kontrollwert nicht mit Viren in Kontakt gebrachter Zellen. Dies war wahrscheinlich zurückzuführen auf eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren, die in dem Kaninchen-Seren zugegen waren. Die Daten legen nahe, dass die Immun-Antwort im Anschluss an subkutane Injektionen von ntPE-V3-Loop-Chimären zur Produktion neutralisierender Antikörper führen können.

## V. Neutralisieren einer Infektivität

**[0204]** Antikörper, die durch das chimäre Immunogen hervorgerufen waren, hatten – wie gezeigt wurde – das Vermögen, eine Infektivität von HIV-1 in Virus-Wachstums-Assays zu neutralisieren, wo eine Unterdrückung der p24-Produktion als Indikator einer HIV-Neutralisierung verwendet worden war. Klinische Isolate, die dem Subtyp B (RVL0S) und dem Subtyp E (Th92009) entsprachen, wurden mit Verdünnungen von Kaninchen-Seren inkubiert und in PBMCs für eine Gesamtzeit von 5 Tagen kultiviert.

**[0205]** Ein Assay machte Gebrauch von MT4-Zellen als Indikator des HIV-1-vermittelten Zell-Todes; siehe I. Miyoshi et al. (1981), Nature 294:770–771. Doppel-Serien-Verdünnungen von Antiserum wurden mit HIV-1/MN inkubiert und in FDA/H9-Zellen gezüchtet, und die Mischung wurde dem MT4-Zellen für 7 Tage zugesetzt; sie-

he M. Popovic et al. (1984), Science 224:497–500. Durch Viren-vermittelter Zell-Tod wurde abgeschätzt unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Farbstoff-Assays und spektrophotometrische Analyse bei 570 nm; siehe G. A. Robertson et al. (1988), J. Virol Methods 20:195–202. Die 50%ige Inhibitor-Serum-Konzentration wurde berechnet und als Neutralisations-Titer angegeben.

**[0206]** Ein zweiter Assay machte Gebrauch von der p24-Produktion als Indikator des Virus-Wachstums; siehe T. Wrin et al. (1995), J. Virol. 69:39–48. Ein Primär-Virus wurde erst titriert, um die Mengen zu bestimmen, bei der eine Reproduzierbarkeit signifikante, jedoch sub-maximale Menge von p24 ergab. Virus-Zubereitungen wurden für 1 h bei 37° C mit verschiedenen Verdünnungen von Kaninchen-Seren inkubiert, die entweder immunisiert oder vorher als Blut abgenommen worden waren, und diese Mischung wurde dann in vierfacher Ausführungsform in  $2,5 \times 10^5$  PBMCs gegeben. Das Kultivieren wurde für 3 Tage fortgesetzt, und zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen gewaschen, und V3-Loop-Toxin Chimären 9952 wurden in einem Interleukin 2 enthaltenden Medium resuspendiert. Eine Ansammlung von p24 wurde durch einen ELISA-Test nachgewiesen.

**[0207]** Da die von einem der Kaninchen, die mit ntPE-V3MN26 immunisiert worden waren, entnommenen Seren Virus in dem MT4-Assay bei einer Verdünnung von 1:400 neutralisierten, wurde dieses Serum verwendet, um eine Aktivität gegen klinische Isolate zu bewerten. Eine Serum-Probe, die zum Zeitpunkt von 24 Wochen nach der Immunisierung abgenommen worden war, zeigte eine neutralisierende Aktivität sowohl gegen ein B-Subtyp-Isolat als auch gegen ein E-Subtyp-Isolat (siehe [Fig. 14](#)). Keine Neutralisierungs-Aktivität wurde gefunden bei durch eine Vorab-Blut-Entnahme abgenommenen Seren von demselben Kaninchen.

## VI. Hervorrufen einer durch IgA-vermittelten Immun-Antwort

**[0208]** Eine Schleimhaut-Inokulierung durch ein PE-ähnliches chimäres Immunogen, das 26 Aminosäuren des V3-Loops von gp120 von HIV-1 enthielt, induzierte sowohl eine humorale als auch eine zell-vermittelte Immun-Antwort gegen HIV-1. Eine toxische Version dieses chimären Moleküls war in der Lage, eine humane Darm-Zell-Linie (Caco-2) zu killen, die als konfluente Monoschichten gezüchtet worden war. Eine nicht-lethale Form des chimären Moleküls wurde an Mäuse entweder subkutan oder an Vaginal-, Rektal-, Magen- oder Nasen-Schleimhaut-Oberflächen verabreicht. Anschließende Auffrischungen (boostings) wurden an diesen verschiedenen Schleimhaut-Oberflächen durch subkutane Verabreichung durchgeführt. Eine Messung von MNgp120-spezifischen Antikörpern in Serum- und Speichel-Proben demonstrierte sowohl IgA- als auch IgG-Antworten in jeder Gruppe der Schleimhaut- und Subkutan-Verabreichung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PE-ähnlichen chimären Immunogene gemäß der vorliegenden Erfindung in Epithelial-Zellen eintreten können, in ähnlicher Weise wie natives Toxin umlaufen können, über eine intakte epitheliale Barriere hinweg transportiert werden können und die Produktion sowohl von IgA- als auch von IgG-Antikörpern induzieren können.

### A. PE-ähnliche chimäre Immunogene

**[0209]** PE-ähnliche chimäre Immunogene, wie sie in diesen Experimenten verwendet werden, werden beschrieben in Beispiel I. Das für das Struktur-Gen kodierende native (toxische) PE wurde so modifiziert, dass der Ib-Bereich gestrichen wurde, um so eine einzigartige PstI-Stelle für das Einschieben von 26 Aminosäuren umfassenden V3-Loop-Sequenzen zu liefern. Nicht-toxische Versionen der PE-V3-Loop-Chimären wurden hergestellt, denen der Glutaminsäure-Rest in der Position 553 fehlte ( $\Delta E553$ ) und die deswegen keine ADP-Ribosylierungs-Aktivität aufwiesen. Alle Chimären PE-V3-Loop-Proteine wurden in E. coli BL21 ( $\Delta E3$ ) unter Verwendung des T7-Promoters/T7-Polymerase-Systems exprimiert, IPTG (1,0 mM für 90 min) wurde zugesetzt, um die Protein-Expression zu verstärken. PE-V3-Loop-Proteine wurden isoliert von Einschluss-Körpern, und sie wurden durch aufeinanderfolgende Runden einer Anionen-Austausch-Chromatographie und einer am Ende stattfindenden Gel-Filtration gereinigt.

### B. Zell-basierte Untersuchungen

**[0210]** Eine toxische Version des chimären Pseudomonas-Exotoxin (PE)-Moleküls, das 26 Aminosäuren des V3-Loops von MNgp120 enthielt (tPE-MN26), wurde auf die apikale Oberfläche von konfluenten Monoschichten von polarisierten Caco-2-Zellen aufgebracht. Die Caco-2-Zellen wurden kultiviert und so gehalten, wie dies vorher beschrieben worden war (W. Rubas et al. (1996), „Flux measurements across Caco-2-monolayers might predict transport in human large intestinal tissue“, J. Phar. Sci. 85:165–169), und zwar auf vorbefeuchteten (PBS, 15 min außen und danach innen), mit Collagen-beschichteten Polycarbonat-Filter-Trägern (Snapwells™). Das Kulturmedium wurde jeden Tag gewechselt, und konfluente Monoschichten wurden am Tag 25 nach dem Aufsetzen und beim Durchgang der Tage 30 – 35 verwendet. Toxische Versionen von PE- und PE-V3-Loop-Chimären wurden auf die apikale Oberfläche in den Kulturmedien gegeben. Nach 24 Stunden

fortgesetzten Inkubierens bei 37° C wurden Caco-2-Monoschichten dreimal mit PBS gewaschen, um Seru-  
mesterase-Aktivitäten zu entfernen, und wurden mit Calcein AM und einem Ethidium-Homodimer inkubiert, um  
das Verhältnis lebende/tote Zellen zu bestimmen (LIVE/DEAD® Eukolight kit; Firma Molecular Probes, Inc., Eu-  
gene, OR).

**[0211]** Die Chimären kllten diese intestinalen epithelialen Zellen mit einer Potenz ähnlich der von authentisch  
PE ([Fig. 8](#)). Die Zell-Überlebensfähigkeit wurde als Verhältnis lebender und toter Zellen gemessen.

**[0212]** Eine nicht-toxische ( $\Delta 553$ ) Chimäre (ntPE-V3MN26) wurde in allen nachfolgenden Immunisie-  
rungs-Untersuchungen zum Prüfen des Vermögens von ntPE-V3MN26 verwendet, die toxischen Aktionen von  
PE auf Caco-2-Monoschichten zu testen ([Fig. 8](#)). So zeigen die Ergebnisse von [Fig. 8](#), dass der Einbau von  
26 Aminosäuren des V3-Loops von MNgp120 (ntPE-V3MN26) anstelle des endogenen Ib-Loops von PE nicht  
das Vermögen der PE-Chimären-Moleküle verändert, aufgenommen und durch polarisierte konfluente epithe-  
liale Zellen verarbeitet zu werden. Dieses Vermögen der PE-V3-Loop-Chimären-Moleküle, von Epithelial-Zel-  
len aufgenommen und verarbeitet zu werden, ist wichtig gegen ein Pathogen wie beispielsweise HIV-1, das  
humane intestinale epitheliale Zellen infizieren und deren Funktion verändern kann; siehe D. M. Asmuth et al.  
(1994), „Physiological effects of HIV infection on human intestinal epithelial cells: an in vitro model for HIV en-  
teropathy“ AIDS 8:205–211.

### C. Immunisierungs-Protokolle

**[0213]** Weibliche Balb-c-Mäuse wurden erhalten von der Firma Simonsen im Alter von 6 bis 8 Wochen und  
wurden vor der Untersuchung für die Zeit von 2 Wochen unter Quarantäne gehalten. Die Tiere wurden in eine  
von 6 Gruppen gegeben, die dreimal in zweiwöchigen Intervallen inokuliert wurden. Die Tiere wurden so ge-  
halten, dass sie ad libitum Futter und Wasser aufnehmen konnten. Die Gruppen der Tiere wurden wie folgt im-  
munisiert: (1) oral, oral, oral; (2) vaginal, vaginal, vaginal; (3) rektal, rektal, rektal; (4) vaginal, oral, oral; (5) rek-  
tal, oral, oral und (6) subkutan, subkutan, subkutan. Jede orale Inokulierung verwendete 40 µg  
PE-V3-Loop-Chimäre in 200 µl PBS, die 0,05% Tween® 20, 1 mg/ml BSA und 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> enthielt (pH-Wert  
= 8,1). Alle vaginalen, rektalen und subkutanen Inokulierungen enthielten 20 µg PE-V3-Loop-Chimäre in 20 µl  
PBS, die 0,05% Tween® 20 enthielt.

### D. Antikörper-Titer

**[0214]** Im Anschluss an eine intraperitoneale Injektion von 0,1 mg Pilocarpin wurde Mause-Speichel (typi-  
scherweise 50 µl) unter Verwendung von Polypropylen-Pasteur-Pipetten abgenommen und in Polypropy-  
len-Röhrchen gegeben. Serum-Proben (100 µl) wurden von Periorbital-Blut-Abnahmen unter Verwendung von  
Serum-Separator-Röhrchen erhalten. Die abgenommenen Serum- und Speichel-Proben wurden bei -70° C bis  
zur Analyse gelagert. Ein für gp120 spezifischer ELISA-Test wurde durchgeführt unter Verwendung von Costar  
9018-E.I.A./R.I.A.-Platten, die mit gp120 überzogen waren. Im Anschluss an ein Waschen mit PBST (PBS, en-  
thaltend 0,05% Tween® 20 und 0,01% Thimerosol) wurden die Platten mit einem Test-Puffer (PBST, enthaltend  
0,5% BSA) geblockt. Ein anschließendes Waschen wurde vor der Aufgabe der Serum- oder Speichel-Probe  
durchgeführt (100 µl pro Vertiefung). Gebundene Immunoglobuline wurden getagged unter Verwendung bioti-  
nylierter Voll-Ziegen-Antikörper, die selektiv entweder Maus-IgA oder Maus-IgG erkannten (Firma Amersham).  
Ein monoklonaler Maus-Antikörper mit der Bezeichnung 1F12 (Firma Genentech, Inc.) wurde als positive Kon-  
trolle für IgG-Assays verwendet. Kein gp120-spezifischer Maus-IgA war als positiver Standard verfügbar. Ex-  
trAvidin®-Peroxidase-Konjugat (Firma Sigma), 2,2'-Azinobis(2-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (Firma Sig-  
ma) und ein Phosphat-Citrat-Puffer, der Harnstoff und Wasserstoffperoxid enthielt, wurden verwendet zur  
quantitativen Bestimmung von gebundenem Antikörper bei 405 nm.

**[0215]** Nicht-toxisches PE-V3MN26 wurde an Balb-c-Mäuse in Kombinationen von oraler künstlicher Ernäh-  
rung, Aufbringung auf die Vaginal-Schleimhaut, Aufbringung auf die Rektal-Schleimhaut oder durch subkutane  
Injektion verabreicht. Serum- und Speichel-Proben wurden ein, zwei und drei Monate nach der anfänglichen  
Inokulierung von jeder Dosierungs-Gruppe abgenommen und durch ELISA analysiert unter Bestimmung von  
IgG- und IgA-Antikörper-Titern, die spezifisch für MNgp120 waren. Vor der Immunisierung abgenommene  
Speichel- und Serum-Proben zeigten keine signifikante Hintergrund-Reaktion in diesen gp120-spezifischen  
ELISA-Tests. Messbare Mengen von gp120-spezifischen IgG wurden in den Seren aller Dosierungs-Gruppen  
beobachtet ([Fig. 9](#)). Obwohl die beobachtete IgG-Antwort anfänglich am größten in der Gruppe mit subkutaner  
Verabreichung war, zeigten alle Gruppen letztlich starke Serum-IgG-Antworten. Gruppen, denen das nt-  
PE-V3MN26 oral verabreicht worden war, schienen eine IgG-Antwort schneller zu erhalten als die Gruppen,  
bei denen eine Verabreichung nur an die Vaginal- oder Rektal-Schleimhaut erfolgt war. Verglichen mit einem



monoklonalen Maus-IgG, der selektiv den V3-Loop von MNgp120 erkennt, waren die höchsten gemessenen Werte in der Gruppen von gp120-spezifischen IgG zwischen 5 und 25 µg/ml Serum.

**[0216]** IgA-Antikörper scheinen zu einer Resistenz gegen beide strikten Schleimhaut-Pathogene und invasive Mittel beizutragen, welche sich anschicken, systemische Erkrankungen nach einer Kolonisierung der Schleimhaut hervorzurufen; siehe R. I. Walker et al. (1994); „New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization“; *Vaccine* 12:387–400. Ein ELISA-Test wurde zur Bestimmung von gp120-spezifischen IgA-Werten in gesammelten Speichel-Proben als Index einer mucosalen Antikörper-Response verwendet. Da kein MNgp120-spezifisches monoklonales IgA erhältlich ist, wurden die durch ELISA erhaltenen Werte nur zwischen den Gruppen verglichen und wurden nicht als absolute Werte charakterisiert. Speichel-Proben von allen 6 Dosierungs-Gruppen enthielten gp120-spezifisches IgA ([Fig. 10](#)). Die stärkste IgA-Antwort wurde beobachtet in Tieren, die eine anfängliche Vaginal-Dosis erhalten hatten und danach orale Dosen von PE-V3-Loop-Chimär-Molekülen erhalten hatten. Es war interessant, dass Tiere, die nur subkutane Injektionen erhalten hatten, IgA-Werte zeigten, die vergleichbar einigen von denen waren, die in Gruppen beobachtet wurden, die nur eine Mucosa-Verabreichung der Chimär-Moleküle erhalten hatten. Dies kann in Bezug stehen zu Fragen der Antikörper, die in dem IgA-ELISA verwendet wurden. Unabhängig davon zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl eine Schleimhaut-Immunität als auch eine systemische Immunität induziert werden kann durch mucosale Immunisierung, ähnlich zu derjenigen, die vorher bei oraler Immunisierung unter Verwendung von Pertussis-Toxin beobachtet wurde; siehe dazu auch M. J. Walker et al. (1992); „Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium* aro A. *Salmonella typhi* Ty21a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit“ *Infect. Immun.* 60:4260.

**[0217]** Es wurde berichtet, dass HIV-1-Untereinheit-Impfstoffe nur eine IgG-Antwort im Anschluss an eine subkutane Verabreichung produzieren (M. B. Vasudevachari et al. (1992); „Envelope-specific antibodies in the saliva of individuals vaccinated with recombinant HIV-1 gp160“; *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5:817–821) oder im Anschluss an eine intramuskuläre Injektion sowohl IgG als auch IgA produzieren (G. J. Gorse et al. (1996); „Salivary binding antibodies induced by human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp120 vaccine“ *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* 3:769–773). Obwohl diese Autoren vorschlugen, dass ein Maximieren der Produktion von mucosalen Antikörpern wichtig ist für einen HIV-1-Impfstoff, ist es jedoch unklar, ob die nachgewiesenen IgA-Antikörper sekretorischer Art waren. Es ist wahrscheinlich, dass sIgA die primäre Form von IgA in Speichel-Proben war und dass dimeres IgA die primäre Form in Serum-Proben in den dortigen wie auch in den vorliegenden Untersuchungen war. Das derzeit verwendete IgA-Bindungs-Reagenz wurde gegen Serum-IgA entwickelt und kann damit eine Vorspannung in IgA-Messungen hervorgerufen haben. So können die in Serum gemessenen IgA-Konzentrationen nur größer als die im Speichel gefundenen Werte erscheinen aufgrund einer geringeren Affinität gegenüber dem sIgA im Vergleich zu dem dimeren IgA. Die IgA-Werte, die in der vorliegenden Untersuchung angegeben sind, werden daher nur auf einer relativen Skala präsentiert.

**[0218]** Eine Anzahl von Faktoren, die von Th1- und Th2-Zellen freigesetzt wurden, regulieren – wie gezeigt wurde – IgA-Antworten (J. R. McGhee et al. (1993); „New perspectives in mucosal immunity with emphasis on vaccine development“ *Seminars in Hematology* 30:3–15). Beispielsweise zeigt in Gegenwart von IL-5 IL-2 einen Synergismus mit TGF-β unter Erhöhung der IgA-Synthese, was zu der Aussicht einer pharmakologischen Manipulation der Immun-Antwort führt. Die Form der Antigen-Präsentation wird jedoch signifikant diktiert durch das Schicksal des Immunogens. Epithelial-Zellen an Schleimhaut-Oberflächen, die den LRP-Rezeptor zu binden haben und ntPE-V3MN26 verinnerlichen, exprimieren – wie gezeigt wurde – MHC-Klasse II-Proteine, und Klasse II kann effizient die Oberfläche der Zellen für eine Antigen-Präsentation von einem lysosomalen Ursprung erreichen (V. G. Brachet et al. (1997); „li chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes“; *J. Cell Biol.* 137:51–65). So kann ntPE-V3MN26 von MHC-Klasse II-Strukturen auf die Zell-Oberfläche von Epithelial-Zellen geliefert werden. Alternativ dazu sollte dann, wenn das Immunogen die Schleimhaut-Barriere durchdringt und eine professionelle Antigen-Präsentations-Zelle in der darunter liegenden Lamina propria in einer intakten Form erreicht, dies eine Th2-Antwort induzieren und zu einer MHC-Klasse I-beschränkten Antigen-Präsentation führen.

## VII. Gedächtnis-beeinflusste Antwort, hervorgerufen durch mucosale Verabreichung von chimärem Immunogen

**[0219]** Eine Verabreichung von ntPE-V3MN26 über die Schleimhaut produzierte eine signifikante Memory-/Gedächtnis-Antwort, die charakterisiert war durch eine Kombination von Serum-IgG-Isotypen sowohl von Th1- als auch von Th2-Wegen. Da die Th2-Antwort – wie vorgeschlagen wurde – vorteilhaft zum Neutralisieren von Viren ist und die cytotoxischen Immun-Antworten, die mit Th1-Ereignissen verbunden sind, erforderlich

sein können für effektive Immun-Antworten gegen intrazelluläre Viren (J. R. Mc-Ghee et al. (1994); *Reprod. Fertil. Dev.* 6:369–379), legen diese Ergebnisse nahe, dass die Schleimhaut-Immunisierung mit ntPE-V3MN26 die Arten von Antworten lieferte, die für einen Schutz gegen HIV-1-Infektion erwünscht sind (G. L. Ada et al. (1997); *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13:205–210).

## A. Materialien und Methoden

### 1. Reagenzien

**[0220]** Die Struktur und Herstellung des ntPE-V3MN26, das in diesen Untersuchungen verwendet wurde, ist in der vorliegenden Beschreibung beschrieben. MNgp120 und der monoklonale 1F12-Antikörper, der den V3-Loop von MNgp120 erkennt, wurden hergestellt bei der Firma Genentech, Inc. (South San Francisco, CA). Biotin-markierte Ziegen-Antikörper, die entweder gegen Maus-IgG oder gegen Maus-IgA gezüchtet wurden, wurden erworben von der Firma Amersham Life Sciences (Arlington Heights, IL). Biotinylierte Ratten-Antikörper, die Maus-IgG<sub>1</sub>, -IgG<sub>2a</sub>, -IgG<sub>2b</sub>, -IgG<sub>3</sub> und -IgE erkannten, wurden erhalten von der Firma Pharmingen (San Diego, CA).

### 2. Immunisierungs-Protokolle und Proben-Abnahme

**[0221]** Weibliche BALB/c-Mäuse wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen erhalten und zwei Wochen vor der Untersuchung unter Quarantäne gestellt und während der Untersuchung so gehalten, dass sie ad libitum Futter und Wasser bekamen. Die Tiere wurden statistisch in Gruppen (n = 6) eingewiesen, die Kombinationen von oralen, vaginalen, rektalen oder subkutanen Dosierungen erhielten. Orale Inokulierungen wurden durchgeführt durch orale künstliche Futterverabreichung von 200 µl PBS, die 0,05% Tween® 20 enthielt, 1 mg/ml BSA, 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (End-pH-Wert = 8,1) und 40 µg ntPE-V3MN26. Die vaginalen, rektalen und subkutanen Inokulierungen enthielten 20 µg ntPE-V3MN26 in 20 µl PBS, die 0,05% Tween® 20 enthielt. Mause-Speichel (typischerweise 50 bis 100 µl) wurde über etwa 10 min unter Verwendung von Polypropylen-Pasteur-Pipetten im Anschluss an eine Hypersalivierung abgenommen, die durch intraperitoneale Injektion von 0,1 mg Pilocarpin pro Tier induziert worden war. Serum-Proben (100 µl) wurden von Periorbital-Blutabnahmen unter Verwendung von Serum-Separator-Röhrchen erhalten. Die abgenommenen Serum- und Speichel-Proben wurden bei -70° C bis zur Analyse gelagert.

**[0222]** In einer separaten Untersuchung wurde Mäusen subkutan 20 µg ntPE-V3MN26 oder 20 µg ntPE subkutan injiziert, und die Tieren erhielten Booster-Verabreichungen zum Zeitpunkt von 2 und 7 Wochen nach der ersten Injektion. Ein Satz von Tieren, die ntPE-V3MN26 erhielten (n = 3), und die Tiere, die ntPE erhielten (n = 2), erhielten gleichzeitig 40 µl Freund's vollständiges Adjuvant anfänglich dosiert und 40 µl Freund's unvollständiges Adjuvant zum Zeitpunkt 2 und 7 Wochen nach der ersten Injektion dosiert. Ein Satz von Tieren (n = 3), denen 20 µg ntPE-V3MN26 verabreicht worden war, formuliert in 40 µl normaler Kochsalzlösung, diente als Kontrolle. Serum-Proben (100 µl) wurden auf wöchentlicher Basis erhalten und wie oben beschrieben gelagert.

### 3. Messung der Antikörper-Antworten

**[0223]** Anti-gp120-spezifische Antikörper wurden gemessen durch Enzym-gebundenen Immuno-Sorbent-Assay (ELISA). Kurz gesagt, wurden Costar 9018-E.I.A./R.I.A.-Platten mit 96 Vertiefungen mit 1 µg/Vertiefung MNgp120 beschichtet, dreimal mit PBS gewaschen, die 0,05% Tween® 20 (v/v) enthielt, und wurden dann über Nacht bei 4° C mit PBS geblockt, die 1% BSA enthielt. Nach Waschen mit PBS/Tween® 20 wurden die Platten mit Verdünnungen von Serum- oder Speichel-Proben inkubiert (die verdünnt worden waren mit PBS/Tween® 20, die 0,1 % BSA enthielt). Die Platten wurden 2 h lang bei Raumtemperatur unter schwachem Bewegen inkubiert, danach dreimal mit PBS/Tween® 20 gewaschen und mit einem Biotin-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-IgA oder -IgG inkubiert oder zur Bestimmung von IgG-subclass- oder IgE-Antworten, mit Biotin-konjugiertem Ratten-Anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3 oder -IgGE für 1 h lang unter Anwendung derselben Inkubations-Bedingungen behandelt. Nach Waschen mit PBS/TweenV® 20 wurde Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin zugesetzt. Gebundene Antikörper wurden visualisiert durch ein ExtrAvidin®-Peroxidase-Konjugat (Firma Sigma), und 2,2'-Azinobis(2-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (Firma Sigma) und ein Phosphat-Citrat-Puffer, der Harnstoff und Wasserstoffperoxid enthielt, wurden zur quantitativen Bestimmung von gebundenem Antikörper bei 405 nm verwendet.

## B. Ergebnisse

## 1. IgA-Antikörper-Antworten auf ntPE-V3MN26

**[0224]** Tiere (n = 6/Gruppe) wurden auf einer Vielzahl von Wegen mit ntPE-V3MN26 inokuliert. Dem folgten 2 Auffrischungen (Boosts) an den Tagen 14 und 21 und danach im Monat 16 nach der anfänglichen Impfung. Tiere erhielten ntPE-V3MN26 entweder oral (PO), vaginal (V), rektal (R), vaginal und oral (V/PO), rektal und oral (R/PO) oder subkutan (SC). Speichel-Proben wurden abgenommen an den Tagen 30, 60 und 90 und danach erneut zum Zeitpunkt von 16,5 Monaten nach der ursprünglichen Impfung und wurden dann auf Antigen-spezifisches IgA analysiert ([Fig. 11](#)). Aufgrund des Fehlens eines Anti-V3-Loop-IgA-Antikörpers zum Standardisieren der Assays wurden die Antworten gegen eine stark positive Probe normalisiert. Die Werte wurden auf einer willkürlichen Skala von Antigen-spezifischen IgA-Einheiten angegeben. Alle Dosierungs-Gruppen zeigten vergleichbare IgA-Antworten im Speichel zum Zeitpunkt von 30 und 60 Tagen. Zum Zeitpunkt von 90 Tagen wurde die stärkste IgA-Antwort (Response) im Speichel beobachtet in der Gruppe, die eine anfängliche vaginale Dosis und danach orale Auffrischungen erhalten hatte. Zum Zeitpunkt von 16,5 Monaten nach der ursprünglichen Impfung, zeigten die Gruppen, denen alle Impfungen oral, alle Impfungen vaginal und alle Impfungen rektal verabreicht worden waren, die höchsten Werte von Antigen-spezifischen IgA im Speichel. Die Antworten der Gruppen, die bei der Inokulation Impfungen der Schleimhäute in Kombination erhalten hatten (vaginal/oral und rektal/oral), waren vergleichbar mit denen, die in der Gruppe beobachtet wurde, die die Impfung als Subkutan-Dosis erhalten hatte.

**[0225]** Um sicherzustellen, dass diese IgA-Antworten im Speichel Antigen-spezifische Bindung wiedergaben und nicht nicht-spezifische Bindung an Speichel-Komponenten, wurden vor der Immunisierung abgenommene Speichelproben bewertet, und es wurde eine Untersuchung durchgeführt, in der eine Mischung des V3-Loop-Peptids und ntPE an Mäuse verabreicht wurde. Die Untersuchungen zeigten, dass unverdünnte, vor der Immunisierung abgenommene Speichel-Proben im ELISA-Format keinen messbaren Hintergrund zeigten. Auch hatten Tiere, denen als Dosis gleichzeitig ntPE und ein unkonjugiertes V3-Loop-Peptid verabreicht worden war, das durch eine Disulfid-Bindung konstitutionsmäßig beschränkt worden war, keine messbaren MNgp120-spezifischen IgA-Werte. Diese Ergebnisse geben an, dass es wenig oder gar keine nicht-spezifische Kreuzreaktivität im ELISA-Test gab.

**[0226]** Keine nachweisbaren, Antigen-spezifischen IgA-Antworten im Serum wurden in irgendeiner der Dosierungs-Gruppen beobachtet, denen Proben zum Zeitpunkt von 1, 2 oder 3 Monaten nach der ursprünglichen Impfung abgenommen worden waren. Jedoch zum Zeitpunkt von 16,5 Monaten zeigten Seren, die von allen Gruppen abgenommen worden waren, Antigen-spezifisches IgA (Tabelle 1). Es ist möglich, dass die Möglichkeit, IgA zu diesem Zeitpunkt im Serum zu bestimmen, auf die Tatsache einer erhöhten Gesamt-Immun-Antwort zurückzuführen ist und weniger auf eine spezifische Stimulation. Interessanterweise korrelierten die relativen IgA-Werte im Serum nicht mit den IgA-Werten im Speichel. Beispielsweise ergab sich bei der Gruppe mit Inokulation in der Kombination rektal/oral eine der IgA-Antworten im Speichel mit schwächerem Gedächtnis-Effekt, jedoch ergab sich für diese Gruppe die stärkste IgA-Antwort mit Memory-Effekt im Serum (Tabelle 1, [Fig. 11](#)). Die Gruppen mit in allen Fällen oraler, in allen Fällen vaginaler oder in allen Fällen rektaler Verabreichung, die die stärksten IgA-Antworten im Speichel zum Zeitpunkt von 16,5 Monaten nach der ursprünglichen Verabreichung lieferten, hatten einige der schwächsten IgA-Antworten im Serum zu diesem Zeitpunkt. Anders als bei Verabreichung von ntPE-V3MN26 über die Schleimhaut, wo gegenläufige Werte im Speichel und im Serum die Norm waren, erzeugten subkutane Inokulationen mit ntPE-V3MN26 eine mäßige IgA-Antwort sowohl im Speichel als auch im Serum von Mäusen (Tabelle 1, [Fig. 11](#)). Was auch immer der Stimulus der IgA-Produktion ist, die Antigen-spezifischen IgA-Werte im Serum waren vorübergehend. Bei einer Probenabnahme zum Zeitpunkt von 22 Monaten nach der ursprünglichen Impfung, zeigten nur noch 2 Tiere der Gruppe mit rektaler/oraler Verabreichung positive Werte für messbare Serum-IgA-Werte, die MNgp120 erkannten. Keine andere Gruppe, selbst die Gruppe mit subkutaner Injektion, zeigte irgendwelche nachweisbaren Serum-IgA-Werte zu diesem Zeitpunkt.



Tabelle 1

Immunisierung mit ntPE-V3MN26 stimuliert die Produktion von Antigen-spezifischem IgA im Serum und IgG im Speichel von Mäusen

Immunisierungsweg <sup>a</sup>	IgA im Serum <sup>b</sup> (willkürliche Einheiten)	IgG im Speichel <sup>c</sup> (µg/ml)
PO/PO/PO/PO	0,233 ± 0,074	10,9 ± 2,2
V/V/V/V	0,172 ± 0,061	9,52 ± 1,6
R/R/R/R	0,178 ± 0,042	9,93 ± 1,7
V/PO/PO/PO	0,160 ± 0,021	9,90 ± 1,3
R/PO/PO/PO	0,450 ± 0,128	11,0 ± 0,49
SC/SC/SC/SC	0,273 ± 0,078	7,1 ± 0,63

<sup>a</sup> Die Immunisierungen wurden durchgeführt an den Tagen 0, 14, 21 und im Monat 16 an Tieren entweder oral (PO), vaginal (V), rektal (R) oder subkutan (SC).

<sup>b</sup> Die Werte für MNgp120-spezifisches IgA wurden gemessen durch ELISA in den Monaten 16,5 und wurden normalisiert gegen einen einzigen Proben-Standard und sind in willkürlichen Einheiten angegeben.

<sup>c</sup> Die Werte für MNgp120-spezifisches IgG wurden gemessen durch ELISA in den Monaten 16,5 und wurden kalibriert gegen einen monoklonalen Maus-Antikörper (1F12), der den V3-Loop des Proteins erkennt.

### 2. IgG-Antikörper-Antworten auf ntPE-V3MN26

**[0227]** Antigen-spezifische IgG-Antworten (Responses) im Serum und im Speichel, gemessen durch ELISA, wurden standardisiert unter Verwendung eines monoklonalen Maus-Antikörpers (1F12), der den V3-Loop von MNgp120 erkennt. Das Assay war linear über den Bereich von 0,05 bis 2,4 µg für 1F12, und vor der Immunisierung abgenommene Proben von Serum und Speichel waren in dem ELISA-Format negativ. Obwohl die IgG-Antwort, die durch eine anfängliche Inokulierung und zwei nachfolgende Auffrischungen (Boosts) erzeugt worden waren, letztendlich am größten in der Gruppe mit subkutaner Injektion war, zeigten alle über die Schleimhäute inokulierten Gruppen starke IgG-Antworten im Serum bei 30, 60 und 90 Tagen ([Fig. 12](#)). Zwei Wochen nach einer Auffrischung mit ntPE-V3MN26 im Monat 16 nach der anfänglichen Inokulierung hatte die Gruppe mit subkutaner Injektion die höchste IgG-Antwort mit Memory-Effekt im Serum. Alle über die Schleimhäute inokulierten Gruppen zeigten auch starke Antworten mit Memory-Effekt zu diesem Zeitpunkt ([Fig. 12](#)). Jedoch waren zum Zeitpunkt des Monats 22 die Titer für Antigen-spezifisches IgG im Serum in allen Gruppen zurückgegangen.

### 3. Vergleich der Werte von IgG und IgA im Serum und Speichel

**[0228]** Frühere Untersuchungen haben nahe gelegt, dass IgG im Serum auf Mucosa- bzw. Schleimhaut-Oberflächen transudieren kann, was möglicherweise eine gewisse Form von Immun-Schutz liefert; siehe M. B. Vasudevachari et al. (1992) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 5:817–821. Andere waren nicht in der Lage, ein derartiges Transudat-Ereignis zu belegen; siehe E.-L. Johansson et al. (1998) Infect. Immun. 66:514–520. In diesen Untersuchungen wurde Antigen-spezifisches IgG nicht beobachtet in Speichel-Proben zum Zeitpunkt der Monate 1, 2 und 3, stieg jedoch auf nachweisbare Werte im Anschluss an eine Auffrischung (Boost) zum Zeitpunkt des Monats 16 an (Tabelle 1). Alle über die Schleimhäute Dosierung aufnehmenden Tier-Gruppen hatten vergleichbare IgG-Antworten im Speichel zu diesem Zeitpunkt, die größer waren als diejenigen, die für die Tiere beobachtet wurde, die subkutan ntPE-V3MN26 erhalten hatten (Tabelle 1). Dieser Mangel an Korrelation zwischen relativen Werte Antigen-spezifischen IgG im Serum und Speichel ([Fig. 12](#), Tabelle 1) legt eine Trennung der IgG-Pools im Serum und Speichel nahe, die von dieser Memory-Response resultiert. Es scheint also, dass das im Speichel vorhandene IgG in diesen Studien in einem signifikanten Umfang gekommen sein mag aus einer lokalen Antikörper-Produktion, nicht jedoch aus einem Überlauf „spill-over“ von zirkulierenden Antikörpern im Serum.

## 4. Serum-IgG-Isotyp-Antworten auf ntPE-V3MN26

**[0229]** In Mäusen führt eine Induktion einer Th1-Antwort typischerweise zu der Produktion von IgG2a und IgG3 durch B-Zellen, während eine Th2-Antwort zur Produktion von IgG1 und möglicherweise IgE führt; siehe A. K. Abbas et al. (1996) *Nature* 383:787–793. Die Entwicklung entweder einer Th1-Antwort oder einer Th2-Antwort wird angetrieben durch spezielle Cytokine wie beispielsweise Interferon- $\gamma$  und IL-4. Die Einführung von ntPE-V3MN26 entweder systemisch über eine subkutane Injektion oder über eine Aufbringung auf orale, vaginale oder rektale Gewebe führte zur Entwicklung einer Antigen-spezifischen IgG-Antwort im Serum. Die IgG-Isotyp-Population dieser Serum-Proben wurde untersucht, und es wurde gefunden, dass die MNgp120-spezifische Antwort dominiert war (ca. 55%) durch IgG1. Geringere und vergleichbare Mengen Antigen-spezifischen IgG2a (ca. 20%) und IgG2b (ca. 20%) wurden ebenfalls gefunden, zusammen mit geringen Mengen (ca. 5%) von IgG3. Es wurde kein Antigen-spezifisches IgE nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine subkutane Verabreichung von ntPE-V3MN26 sowohl Th1- als auch Th2-Antworten in BALB/c-Mäusen induziert, wobei der Th2-Phänotyp dominiert.

## VIII. Bewertung von ntPE-V3MN26 als Adjuvant

**[0230]** Adjuvants können dazu dienen, die Präsentation eines Antigens zu erleichtern und/oder die Immun-Antwort an der Stelle einer Inokulation zu aktivieren; siehe die Druckschrift F. R. Vogel et al. (1995) „A compendium of vaccine adjuvants and excipients“, p. 141–228; In: M. F. Powell und M. J. Newman (Hrsg.) *VACCINE DESIGN: THE SUBUNIT AND ADJUVANT APPROACH*, Bd. 6. Plenum Press, New York. Anerkannt als eines der potentesten erhältlichen Adjuvants, ist Freund's Adjuvant eine Mischung aus Mineralöl, Tensid und *Mycobacterium tuberculosis*. Eine Untersuchung zur Bewertung der Effizienz einer IgG-Induktion im Serum durch ntPE-V3MN26 wurde durchgeführt, indem man Mäusen subkutan ntPE-V3MN26 und Freund's vollständiges Adjuvant anfänglich subkutan injizierte, dies mit ntPE-V3MN26 und unvollständigem Adjuvant nach 14 und 49 Tagen auffrischte (Boost) und dann die IgG-Antworten im Serum mit denjenigen von Tieren verglich, die ntPE-V3MN26 ohne Freund's Adjuvant erhalten hatten ([Fig. 13](#)). Tiere, die dasselbe subkutane Dosierungs-Regime von ntPE-V3MN26 mit normaler Kochsalzlösung anstelle von Freund's Adjuvant erhalten hatten, zeigten etwa ein Drittel der Antigen-spezifischen Immun-Antwort, die in Tieren beobachtet worden war, die dieses chimäre Molekül zusammen mit Freund's Adjuvant erhalten hatten. Der Wert der Immun-Antwort auf ntPE-V3MN26 über diesen Zeitraum war ähnlich demjenigen, der in der subkutanen Injektions-Gruppe beobachtet worden war, die in der [Fig. 12](#) graphisch aufgezeichnet ist, und zwar in den Monaten 1, 2 und 3. Dies legt ein ziemlich konsistentes Ergebnis für diese Form der Verabreichung des chimären Moleküls nahe. Eine Kontrolle, in der Freund's Adjuvant im selben Verabreichungsplan zusammen mit einem nicht-toxischen PE injiziert worden war, dem der V3-Loop von MNgp120 fehlte, zeigte die Spezifität der gemessenen Immun-Antwort ([Fig. 13](#)).

**[0231]** Die vorliegende Erfindung stellt *Pseudomonas* Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogene und Verfahren zum Hervorrufen einer Immun-Antwort bereit. Zwar wurden spezielle Beispiele vorgestellt; die obige Beschreibung ist jedoch veranschaulichend und nicht beschränkend. Viele Variationen der Erfindung werden Fachleuten, die in diesem technischen Bereich versiert sind, bei Lesen dieser Beschreibung offensichtlich. Der Umfang der Erfindung sollte daher nicht unter Bezugnahme auf die obige Beschreibung bestimmt werden, sondern sollte statt dessen unter Bezugnahme auf die beigefügten Patentansprüche bestimmt werden, zusammen mit deren vollem Umfang an Äquivalenten.

## Sequenzliste

<110> FitzGerald, David J.

Die Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika

<120> Pseudomonas Exotoxin A-ähnliche chimäre Immunogene

<130> 015280-310100PC

<140> PCT/US98/14341

<141> 1998-07-10

<150> US 60/052,375

<151> 1997-07-11

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1839

<212> DNS

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1839)

<223> Exotoxin A

<400> 1

gcc gaa gaa gct ttc gac ctc tgg aac gaa tgc gcc aaa gcc tgc gtg 48

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val

1

5

10

15

ctc gac ctc aag gac ggc gtg cgt tcc agc cgc atg agc gtc gac ccg 96  
 Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro  
 20 25 30

gcc atc gcc gac acc aac ggc cag ggc gtg ctg cac tac tcc atg gtc 144  
 Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val  
 35 40 45

ctg gag ggc ggc aac gac gcg ctc aag ctg gcc atc gac aac gcc ctc 192  
 Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu  
 50 55 60

agc atc acc agc gac ggc ctg acc atc cgc ctc gaa ggc ggc gtc gag 240  
 Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu  
 65 70 75 80

ccg aac aag ccg gtg cgc tac agc tac acg cgc cag gcg cgc ggc agt 288  
 Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser  
 85 90 95

tgg tcg ctg aac tgg ctg gta ccg atc ggc cac gag aag ccc tcg aac 336  
 Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn  
 100 105 110

atc aag gtg ttc atc cac gaa ctg aac gcc ggc aac cag ctc agc cac 384  
 Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His  
 115 120 125

atg tcg ccg atc tac acc atc gag atg ggc gac gag ttg ctg gcg aag 432  
 Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys  
 130 135 140

ctg gcg cgc gat gcc acc ttc ttc gtc agg gcg cac gag agc aac gag 480  
 Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu  
 145 150 155 160

atg cag ccg acg ctc gcc atc agc cat gcc ggg gtc agc gtg gtc atg 528  
 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met  
 165 170 175

gcc cag acc cag ccg cgc cgg gaa aag cgc tgg agc gaa tgg gcc agc 576  
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser  
 180 185 190

ggc aag gtg ttg tgc ctg ctc gac ccg ctg gac ggg gtc tac aac tac 624  
 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr  
 195 200 205

ctc gcc cag caa cgc tgc aac ctc gac gat acc tgg gaa ggc aag atc 672  
 Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile  
 210 215 220

tac cgg gtg ctc gcc ggc aac ccg gcg aag cat gac ctg gac atc aaa 720  
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys  
 225 230 235 240

ccc acg gtc atc agt cat cgc ctg cac ttt ccc gag ggc ggc agc ctg 768  
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu  
 245 250 255

gcc gcg ctg acc gcg cac cag gct tgc cac ctg ccg ctg gag act ttc 816  
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe  
 260 265 270

## DE 698 31 951 T2 2006.07.27

acc cgt cat cgc cag ccg cgc ggc tgg gaa caa ctg gag cag tgc ggc	864
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly	
275 280 285	
tat ccg gtg cag cgg ctg gtc gcc ctc tac ctg gcg gcg cgg ctg tcg	912
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser	
290 295 300	
tgg aac cag gtc gac cag gtg atc cgc aac gcc ctg gcc agc ccc ggc	960
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly	
305 310 315 320	
agc ggc ggc gac ctg ggc gaa gcg atc cgc gag cag ccg gag cag gcc	1008
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala	
325 330 335	
cgt ctg gcc ctg acc ctg gcc gcc gcc gag agc gag cgc ttc gtc cgg	1056
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg	
340 345 350	
cag ggc acc ggc aac gac gag gcc ggc gcg gcc aac gcc gac gtg gtg	1104
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val	
355 360 365	
agc ctg acc tgc ccg gtc gcc gcc ggt gaa tgc gcg ggc ccg gcg gac	1152
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp	
370 375 380	
agc ggc gac gcc ctg ctg gag cgc aac tat ccc act ggc gcg gag ttc	1200
Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe	
385 390 395 400	

ctc ggc gac ggc ggc gac gtc agc ttc agc acc cgc ggc acg cag aac 1248  
 Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn  
 405 410 415

tgg acg gtg gag cgg ctg ctc cag gcg cac cgc caa ctg gag gag cgc 1296  
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg  
 420 425 430

ggc tat gtg ttc gtc ggc tac cac ggc acc ttc ctc gaa gcg gcg caa 1344  
 Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln  
 435 440 445

agc atc gtc ttc ggc ggc gtg cgc gcg cgc agc cag gac ctc gac gcg 1392  
 Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala  
 450 455 460

atc tgg cgc ggt ttc tat atc gcc ggc gat ccg gcg ctg gcc tac ggc 1440  
 Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly  
 465 470 475 480

tac gcc cag gac cag gaa ccc gac gca cgc ggc cgg atc cgc aac ggt 1488  
 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly  
 485 490 495

gcc ctg ctg cgg gtc tat gtg ccg cgc tcg agc ctg ccg ggc ttc tac 1536  
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr  
 500 505 510

cgc acc agc ctg acc ctg gcc gcg ccg gag gcg gcg ggc gag gtc gaa 1584  
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu  
 515 520 525

cgg ctg atc ggc cat ccg ctg ccg ctg cgc ctg gac gcc atc acc ggc 1632  
 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly  
 530 535 540

ccc gag gag gaa ggc ggg cgc ctg gag acc att ctc ggc tgg ccg ctg 1680  
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu  
 545 550 555 560

gcc gag cgc acc gtg gtg att ccc tcg gcg atc ccc acc gac ccg cgc 1728  
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg  
 565 570 575

aac gtc ggc ggc gac ctc gac ccg tcc agc atc ccc gac aag gaa cag 1776  
 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln  
 580 585 590

gcg atc agc gcc ctg ccg gac tac gcc agc cag ccc ggc aaa ccg ccg 1824  
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro  
 595 600 605

cgc gag gac ctg aag 1839  
 Arg Glu Asp Leu Lys  
 610

<210> 2

<211> 613

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val

1

5

10

15



Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro

20

25

30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val

35

40

45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu

50

55

60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu

65

70

75

80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser

85

90

95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn

100

105

110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His

115

120

125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys

130

135

140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu

145

150

155

160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met

165

170

175

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser

180

185

190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr

195

200

205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile

210

215

220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys

225

230

235

240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu

245

250

255

Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe

260

265

270

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly

275

280

285

Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser

290

295

300

Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly

305

310

315

320

Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala

325

330

335

Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg

340

345

350

Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val

355

360

365

Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp  
 370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe  
 385 390 395 400

Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn  
 405 410 415

Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg  
 420 425 430

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln  
 435 440 445

Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala  
 450 455 460

Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly  
 465 470 475 480

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly  
 485 490 495

Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr  
 500 505 510

Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu  
 515 520 525

Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly  
 530 535 540

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu  
 545 550 555 560

Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg  
 565 570 575

Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln  
 580 585 590

Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro  
 595 600 605

Arg Glu Asp Leu Lys  
 610

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Human-Immunmangel-Virus Typ 1

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (35)

<223> V3-Loop des MN-Stamms von HIV-1

<400> 3

Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro  
 1 5 10 15

Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly Thr Ile Arg Gln  
 20 25 30

Ala His Cys

35

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Human-Immunmangel-Virus Typ 1

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (35)

<223> V3-Loop des Thai-E-Stamms von HIV-1

<400> 4

Cys Thr Arg Pro Ser Asn Asn Thr Arg Thr Ser Ile Thr Ile Gly Pro

1 5 10 15

Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Lys

20 25 30

Ala Tyr Cys

35

<210> 5

<211> 90

<212> DNS

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Kodierender Strang  
eines Doppelstrangs, der die neue Pst I-Site enthält

<400> 5

tggccctgac cctggccgcc gccgagagcg agcgcttcgt ccggcagggc accggcaacg 60

acgaggccgg cgcggcaaac ctgcagggcc

90

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (24)

<223> Ib-Loop - Bereich des Wildtyp - Pseudomonas-exotoxins A

<400> 6

Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala

1

5

10

15

Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp

20

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Ib-Loop-Bereich  
des ntPE-V3MN14-Proteins.

&lt;400&gt; 7

Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala  
 1 5 10 15

Phe Tyr Thr Thr Lys Cys Met Gln Gly Pro Ala Asp  
 20 25

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Ib-Loop-Bereich des ntPE-V3MN26-Protein

&lt;400&gt; 8

Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His  
 1 5 10 15

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly Thr  
 20 25 30

Ile Cys Met Gln Gly Pro Ala Asp  
 35 40

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Ib-Loop-Bereich des ntPE-V3Th-E26-Protein

&lt;400&gt; 9

Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Ser Asn Asn Thr Arg Thr Ser Ile Thr

1 5 10 15

Ile Gly Pro Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp

20 25 30

Asp Ile Cys Met Gln Gly Pro Ala Asp

35 40

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Ib-Loop-Bereich des ntPE-fp16-Protein

&lt;400&gt; 10

Gly Ala Ala Asn Leu Gln Cys Arg Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr

1 5 10 15

Val Val Thr Asp His Arg Leu Cys Leu Gln Gly Pro Ala Asp

20 25 30



<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223>

Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Retentions-Sequenz des Endoplasmatischen Reticulums (ER)

<400> 11

Arg Glu Asp Leu Lys

1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223>

Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Retentions-Sequenz des Endoplasmatischen Reticulums (ER)

<400> 12

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Retentions-Sequenz des Endoplasmatischen Reticulums (ER)

&lt;400&gt; 13

Lys Asp Glu Leu

1

### Patentansprüche

1. Ein nicht-toxisches Pseudomonas-Exotoxin A-ähnliches („PE-ähnliches“) chimäres Immunogen, umfassend: (1) eine Zellerkennungs-Domäne von zwischen 10 und 1500 Aminosäuren, die sich an einen Zelloberflächen-Rezeptor bindet; (2) eine Translokations-Domäne, umfassend eine Aminosäure-Sequenz, die im wesentlichen identisch ist zu einer Sequenz der PE-Domäne II, und ausreichend ist, eine Translokation zu einem Zell-Cytosol zu bewirken; (3) eine nicht-native Epitop-Domäne, umfassend eine Aminosäure-Sequenz von zwischen 5 und 1500 Aminosäuren, die für ein nicht-natives Epitop kodiert; und (4) eine Aminosäure-Sequenz, die für eine Retentions-Domäne des Endoplasmatischen Reticulums („ER“) kodiert, die eine ER-Retentions-Sequenz umfasst.

2. Immunogen nach Anspruch 1, worin die Zellerkennungs-Domäne Aminosäure-Sequenzen eines Wachstumsfaktors oder eines Antikörpers umfasst.

3. Immunogen nach Anspruch 1, worin die Zellerkennungs-Domäne die Domäne Ia von PE ist.

4. Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Zellerkennungs-Domäne in der ER-Retentions-Domäne umfasst ist.

5. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin sich die Zellerkennungs-Domäne an einen  $\alpha$ 2-Macroglobulin-Rezeptor („ $\alpha$ 2-MR“), einen epidermalen Wachstumsfaktor („EGF“)-Rezeptor, den IL-2-Rezeptor, den IL-6-Rezeptor, an HIV-infizierte Zellen, einen Chemokin-Rezeptor, einen Leukozyten-Zelloberflächen-Rezeptor, einen Liganden für den IgA-Rezeptor, oder einen Antikörper oder ein Antikörper-Fragment, das auf einen Rezeptor gerichtet ist, bindet.

6. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die nicht-native Epitop-Domäne eine Cystein-Cystein-Schleife umfasst, die das nicht-native Epitop umfasst.

7. Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die nicht-native Epitop-Domäne eine Aminosäure-Sequenz umfasst, die für das nicht-native Epitop kodiert, das zwischen zwei Cystein-Resten der Domäne Ib von PE eingefügt ist.

8. Immunogen nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, worin das nicht-native Epitop natürlich innerhalb einer Cystein-Cystein-Schleife existiert.

9. Immunogen nach Anspruch 8, worin die Cystein-Cystein-Schleife nicht mehr als etwa 30 Aminosäuren umfasst.

10. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das nicht-native Epitop ein Epitop aus einem viralen, bakteriellen oder parasitären Protozoen-Pathogen ist.

11. Immunogen nach Anspruch 10, worin das nicht-native Epitop ein Epitop einer neutralisierenden Haupt-Schleife eines Retrovirus ist.

12. Immunogen nach Anspruch 10, worin das nicht-native Epitop ein Epitop einer neutralisierenden Haupt-Schleife von HIV-2 oder eine V3-Schleife von gp120 von HIV-1 ist.

13. Immunogen nach Anspruch 12, worin das nicht-native Epitop ein Epitop einer V3-Schleife von gp120 von HIV-1 von wenigstens 8 Aminosäuren ist, die eine V3-Schleife einschließen.

14. Immunogen nach Anspruch 10, worin das nicht-native Epitop ein Epitop der V3-Domäne von HIV-1 ist.
15. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das nicht-native Epitop ein Bindungsmotiv für ein MHC-Klasse II-Molekül umfasst, und die hervorgerufene Immunreaktion eine MHC-Klasse II-abhängige Zell-vermittelte Immunreaktion ist.
16. Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin das nicht-native Epitop ein Bindungsmotiv für ein MHC-Klasse I-Molekül der Testperson umfasst, und die hervorgerufene Immunreaktion eine MHC-Klasse I-abhängige Zell-vermittelte Immunreaktion ist.
17. Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin die nicht-native Epitop-Domäne eine Aminosäure-Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus CTRPNYNKRK RIHIGPGRAF YTTKNIIGTIRQAHC (SEQ ID Nr: 3) oder CTRPSNNTRT SITIGPGQVF YRTGDIIGDI RKAYC (SEQ ID Nr: 4).
18. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Translokations-Domäne eine Domäne II von PE oder die Aminosäuren 280 bis 364 der Domäne II von PE umfasst.
19. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin es der ER-Retentions-Domäne an ADP-Ribosylierungs-Aktivität mangelt.
20. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die ER-Retentions-Domäne die Domäne III von PE ist, mit der Ausnahme, dass die Aminosäure Glu in Position 553 der Sequenz mit der SEQ ID Nr: 2 entfernt ist.
21. Immunogen nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die ER-Retentions-Sequenz REDLK (SEQ ID Nr: 11), REDL (SEQ ID Nr: 12) oder KDEL (SEQ ID Nr: 13) umfasst.
22. Immunogen nach Anspruch 1, welches die Aminosäure-Sequenz von PE (SEQ ID Nr: 2) aufweist, mit der Ausnahme, dass die Sequenz der Domäne Ib das nicht-native Epitop umfasst, das zwischen zwei Cystein-Resten der Domäne Ib liegt, und die Aminosäure Glu in Position 553 entfernt ist.
23. Immunogen nach Anspruch 1, welches eine Aminosäure-Sequenz aufweist, die ausgewählt ist aus:
  - PE (SEQ ID Nr: 2) mit der Ausnahme, dass die Aminosäuren 361 bis 384 substituiert sind mit der Aminosäure-Sequenz: Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Cys Met Gln Gly Pro Ala Asp (SEQ ID Nr: 7) und die Aminosäure Glu in Position 553 entfernt ist (ntPE-V3MN14); und
  - PE (SEQ ID Nr: 2) mit der Ausnahme, dass die Aminosäuren 361 bis 384 substituiert sind mit der Aminosäure-Sequenz: Gly Ala Ala Asn Leu His Cys Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly Thr Ile Cys Met Gln Gly Pro Ala Asp (SEQ ID Nr: 8) und die Aminosäure Glu in Position 553 entfernt ist (ntPE-V3MN26).
24. Rekombinantes Polynucleotid, umfassend eine Nucleotid-Sequenz, die für das nicht-toxische Pseudomonas-Exonin A-ähnliche („PE-ähnliche“) chimäre Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 23 kodiert.
25. Polynucleotid nach Anspruch 24, das ein Expressions-Vektor ist, umfassend darüber hinaus eine Expressions-Kontroll-Sequenz, die operativ an die Nucleotid-Sequenz gebunden ist.
26. Rekombinante nicht-toxische Pseudomonas-Exonin A-ähnliche („PE-ähnliche“) chimäre Immunogen-Klonierungs-Plattform, welche eine Nucleotid-Sequenz umfasst, die für das chimäre Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 18 bis 23 kodiert, worin die nicht-native Epitop-Domäne nicht zugegen ist, und umfassend darüber hinaus eine Splice-Stelle zwischen der Sequenz, die für die Translokations-Domäne kodiert, und der Sequenz, die für die ER-Retentions-Domäne kodiert, worin die rekombinante Klonierungs-Plattform gegebenenfalls ein Expressions-Vektor ist, der darüber hinaus eine Expressions-Kontroll-Sequenz umfasst, die operativ an die Nucleotid-Sequenz gebunden ist.
27. Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 23 zur Verwendung als Arneimittel.
28. Impfstoff, umfassend wenigstens ein Immunogen nach einem der Ansprüche 1 bis 23 und gegebenenfalls eine Vielzahl von Immunogenen nach einem der Ansprüche 1 bis 23, worin jedes Immunogen ein unterschiedliches nicht-natives Epitop aufweist.

29. Impfstoff nach Anspruch 28, worin eine Vielzahl an Immunogenen zugegen sind, die verschiedene Epitope aufweisen, und die unterschiedlichen nicht-nativen Epitope von verschiedenen Stämmen desselben Pathogens sind, wobei die verschiedenen Stämme desselben Pathogens gegebenenfalls HIV-1 MN und HIV-1 Thai-E sind.

30. Impfstoff, umfassend wenigstens ein Polynucleotid nach Anspruch 24 oder Anspruch 25.

31. Impfstoff nach Anspruch 30, worin die Nucleotid-Sequenz für eine Säugetier-Sekretions-Sequenz kodiert, die an dem Amino-Ende des Immunogens angehängt ist.

32. Impfstoff nach einem der Ansprüche 28 bis 31, der darüber hinaus einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst, gegebenenfalls zur Verwendung in einer menschlichen Testperson.

33. Verwendung eines Immunogens nach einem der Ansprüche 1 bis 23 für die Herstellung eines Impfstoffs zum Hervorrufen einer Immunreaktion gegen ein nicht-natives Epitop in einem Test-Lebewesen.

34. Verwendung nach Anspruch 32 oder Anspruch 33, worin der Impfstoff für eine prophylaktische oder therapeutische Behandlung einer Krankheit dient, die durch ein Mittel vermittelt wird, welches das nicht-native Epitop trägt.

35. Verwendung eines rekombinanten Polynucleotids nach Anspruch 23 oder Anspruch 24 zur Herstellung von transfektierten Zellen zum Hervorrufen einer Immunreaktion gegen ein nicht-natives Epitop.

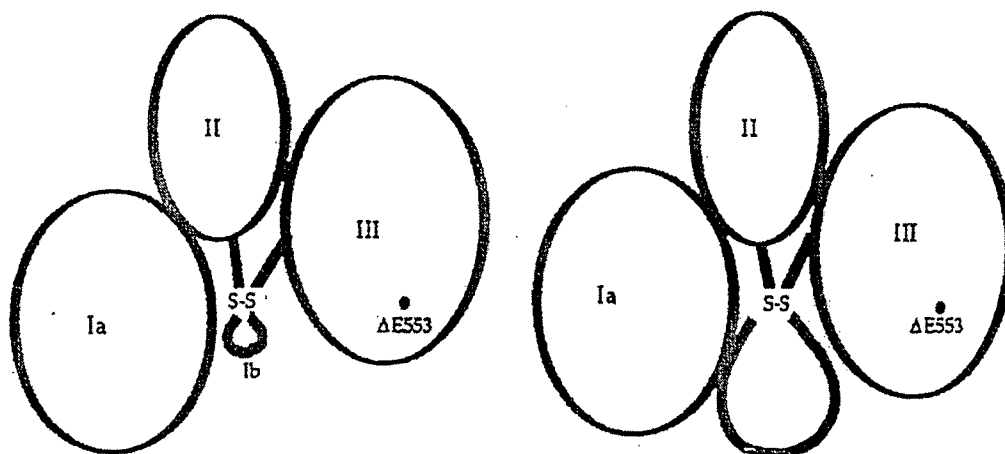
36. Verfahren zur Herstellung eines Medikaments, welches den Schritt umfasst, dass man das Produkt nach einem der Ansprüche 1 bis 25 in eine Formulierung zum Hervorrufen einer Immunreaktion gegen ein nicht-natives Epitop in einem Test-Lebewesen formuliert, worin die Formulierung für eine prophylaktische oder therapeutische Behandlung einer Krankheit dient, die durch ein Mittel vermittelt wird, welches das nicht-native Epitop trägt.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

1 A Pseudomonas exotoxin

1 B V3-Loop-Toxin-Chimäre

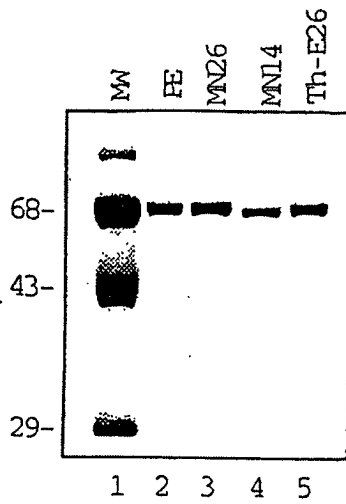


V3-Loop-Einschub

1 C

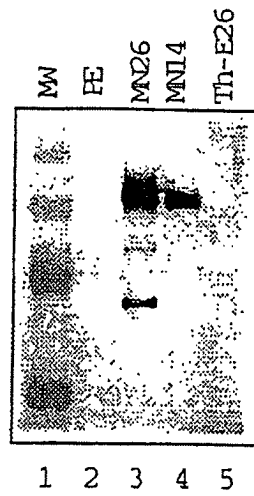
Protein	Ib-Loop-Bereich-Aminosäuresequenz	Molekularmasse
Wild-Typ-PE	-GAANADVSLTCPVAAGECAGPAD-	67,122 Da
ntPE-V3MN14	-GAANLHCGIHIGPGRAFYTTKCMQGPAD-	67,729 Da
ntPE-V3MN26	-GAANLHCNYNKRKRIHIGPGRAFYT TKNIIGTICMQGPAD-	68,937 Da
ntPE-V3ThE26	-GAANLHCSNNTRTSITIGPGQVFYRT GDIIGDDICMQGPAD-	68,700 Da
ntPE-FP16	-GAANLQCRLEEKKGNYVVTDHRLCLQGPAD-	67,862 Da

Figur 1



SDS-PAGE

FIG. 2A.



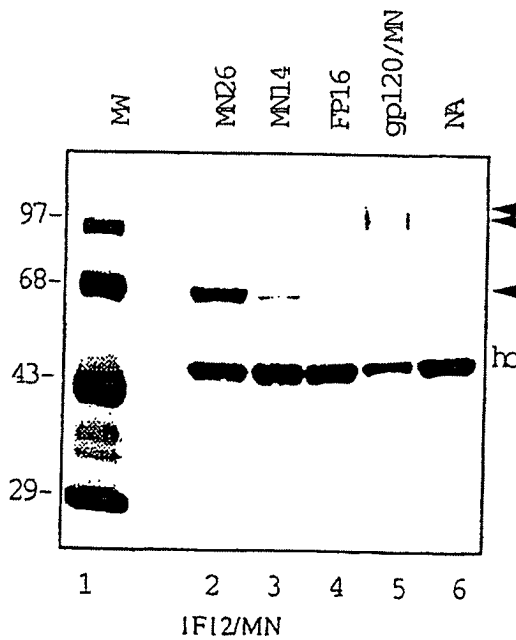
IB12/MN

Western-Blot-Analyse

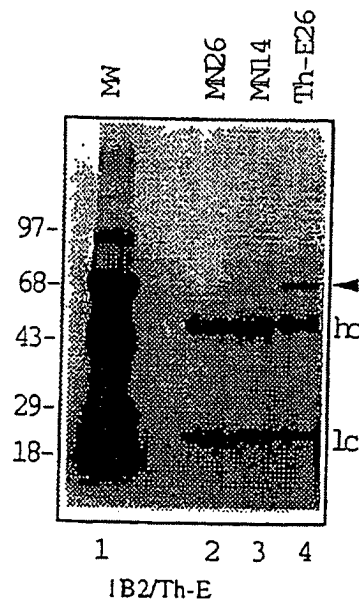
FIG. 2B.



IB2/Th-E



IB12/MN

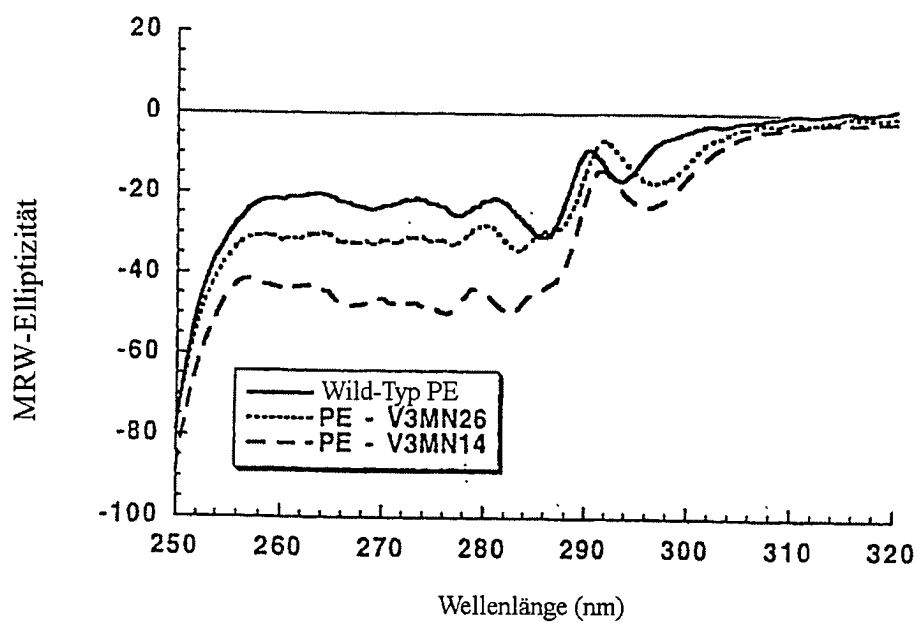


IB2/Th-E

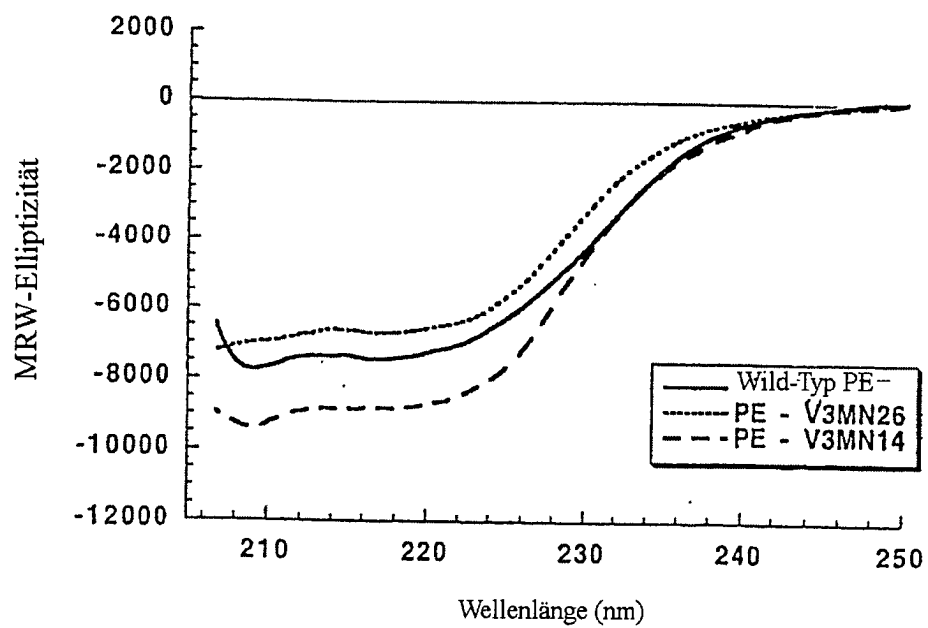
Antikörper-vermitteltes Einfangen von Proteinen

FIG. 2C.

3A



3B

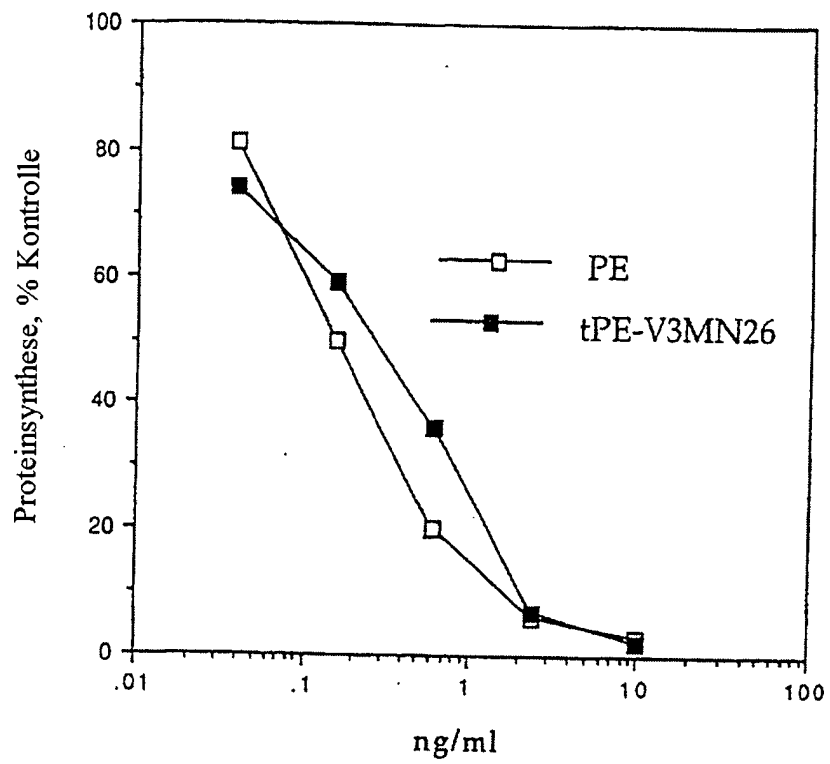


3C

Probe	% $\alpha$ -Helix*	% $\beta$ -Platten	% $\beta$ -Turns	% Andere
Wild-Typ PE	21	48	12	20
ntPE-V3MN14	26	46	10	19
ntPE-V3MN26	18	50	12	20

Figur 3

Cytotoxische Aktivität für A431-Zellen



Figur 4



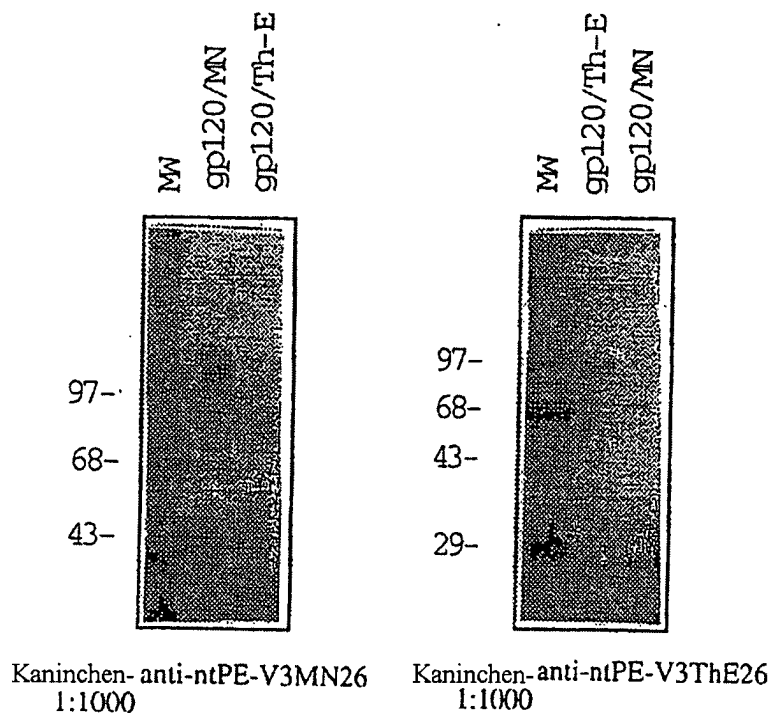


FIG. 5A.

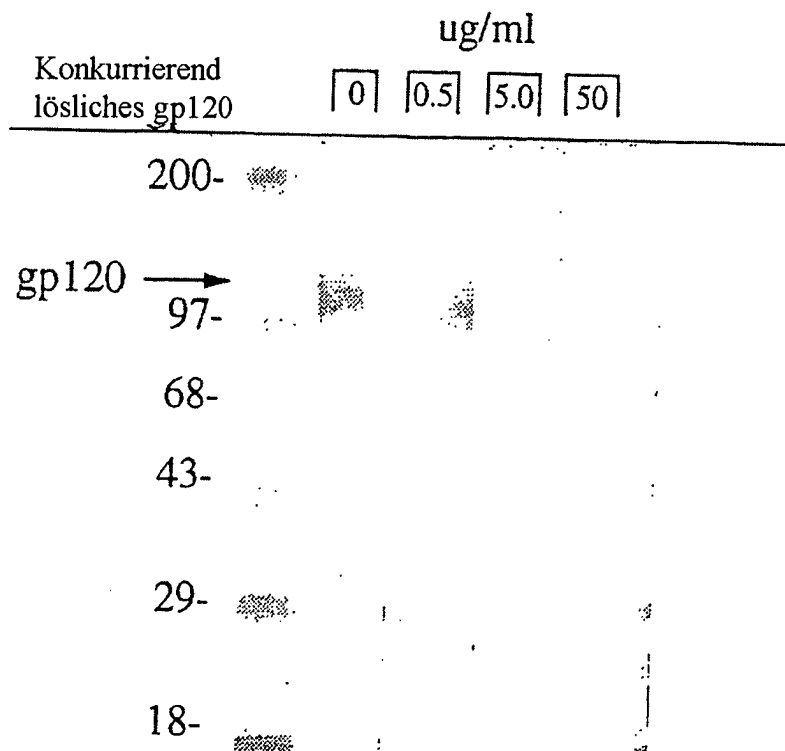
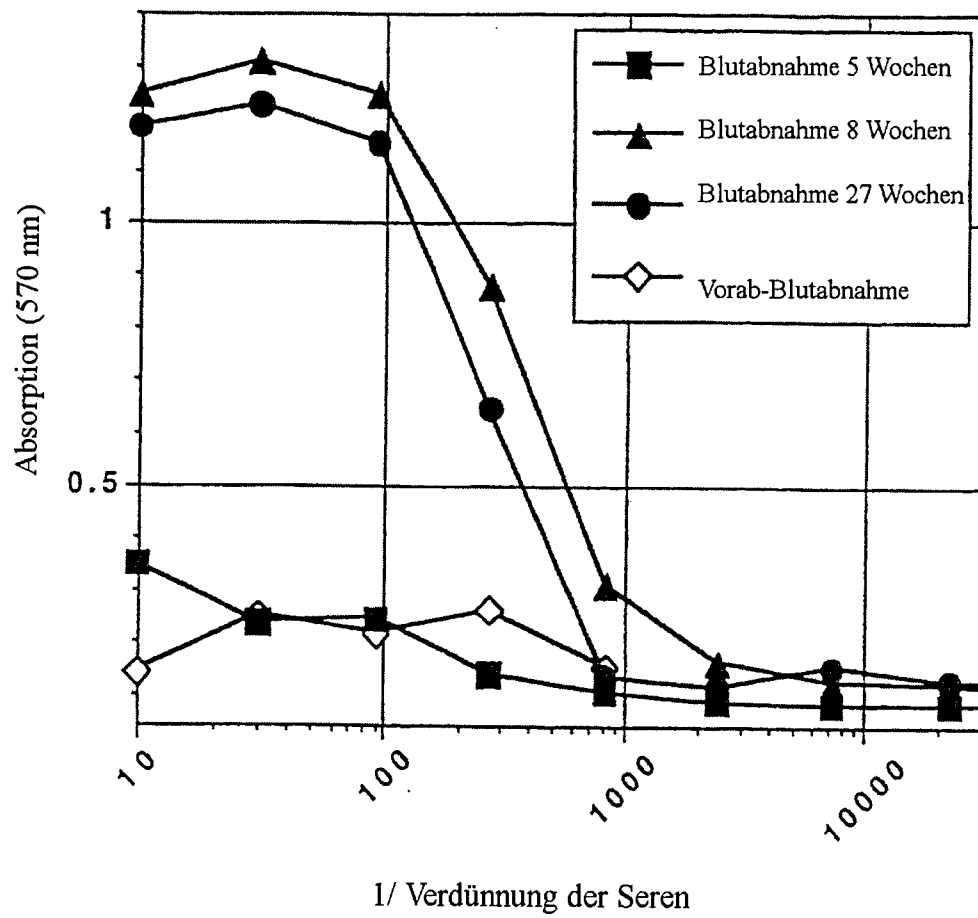
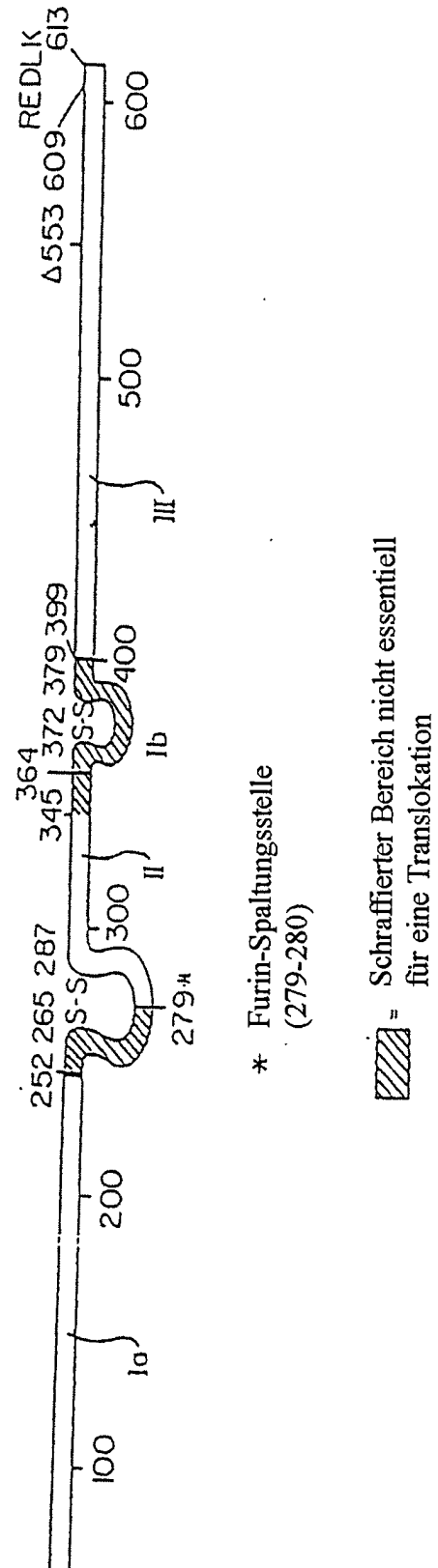


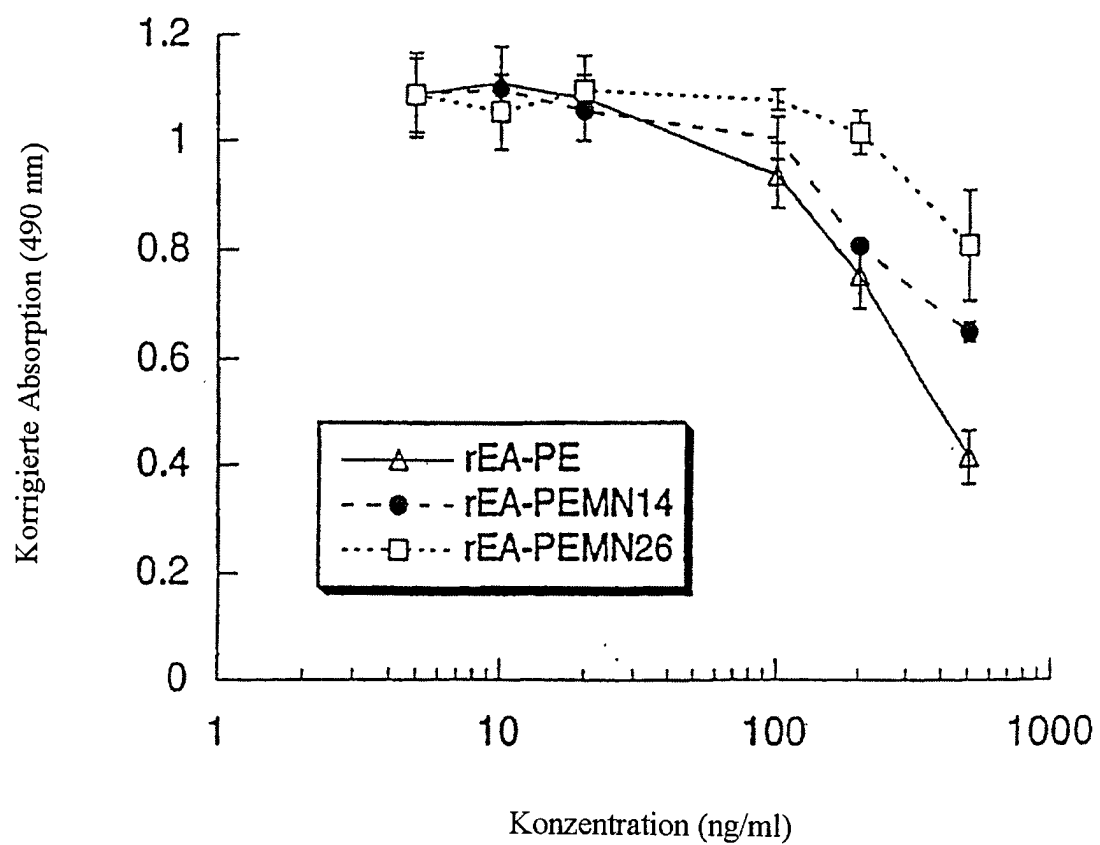
FIG. 5B.



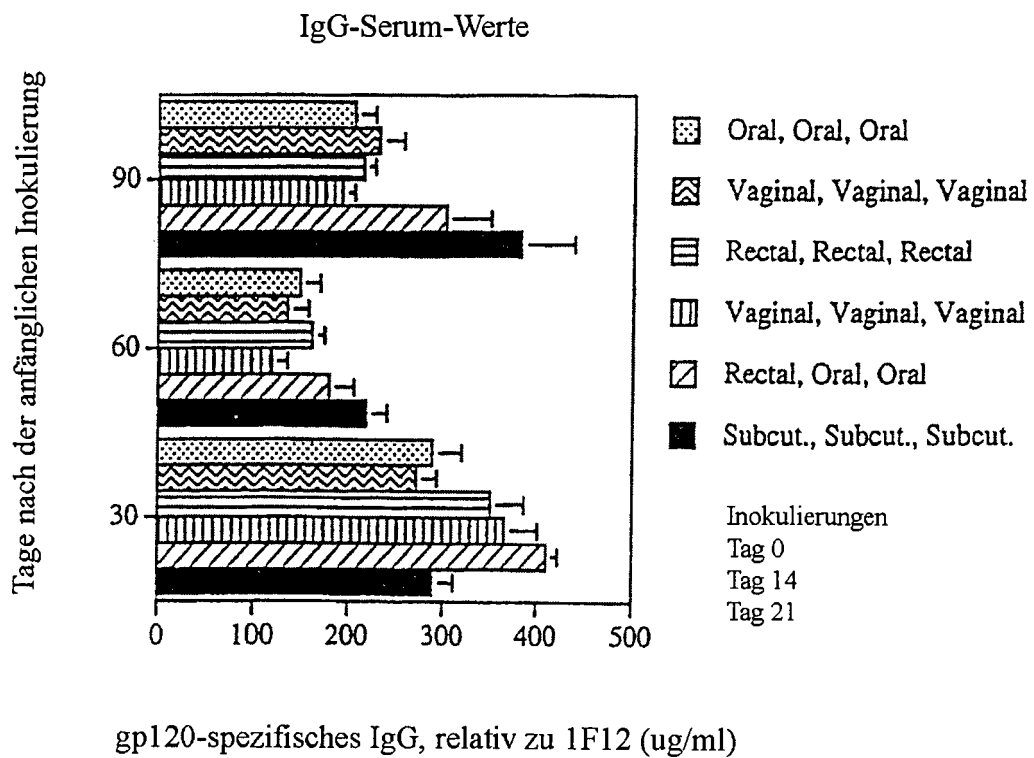
Figur 6



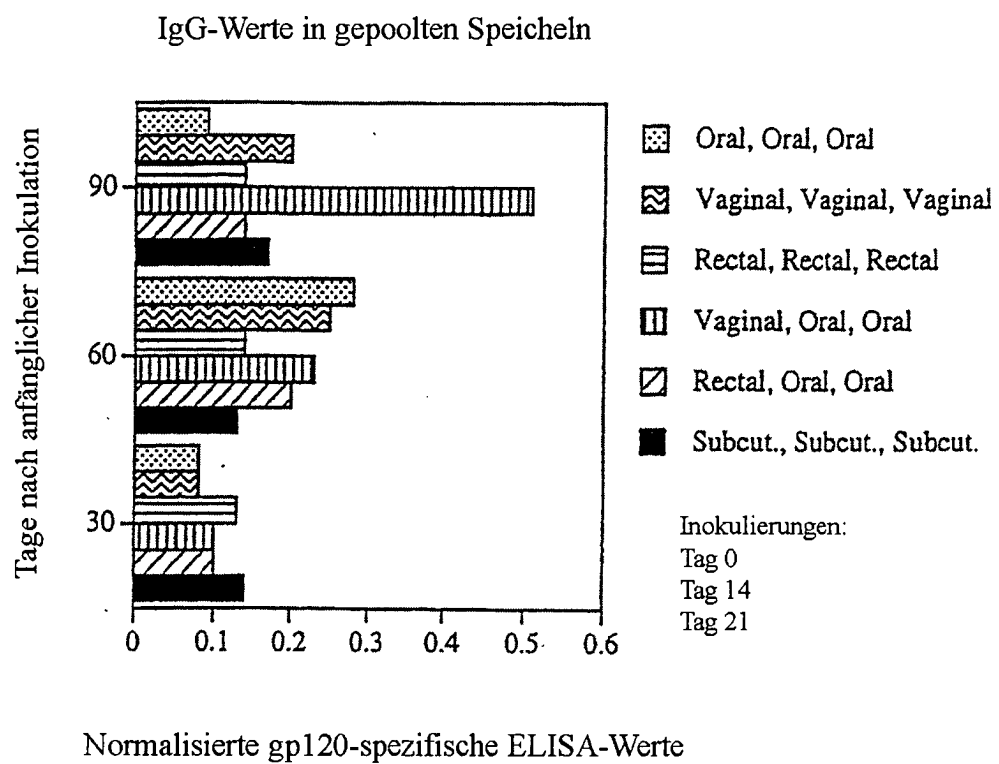
Figur 7



Figur 8

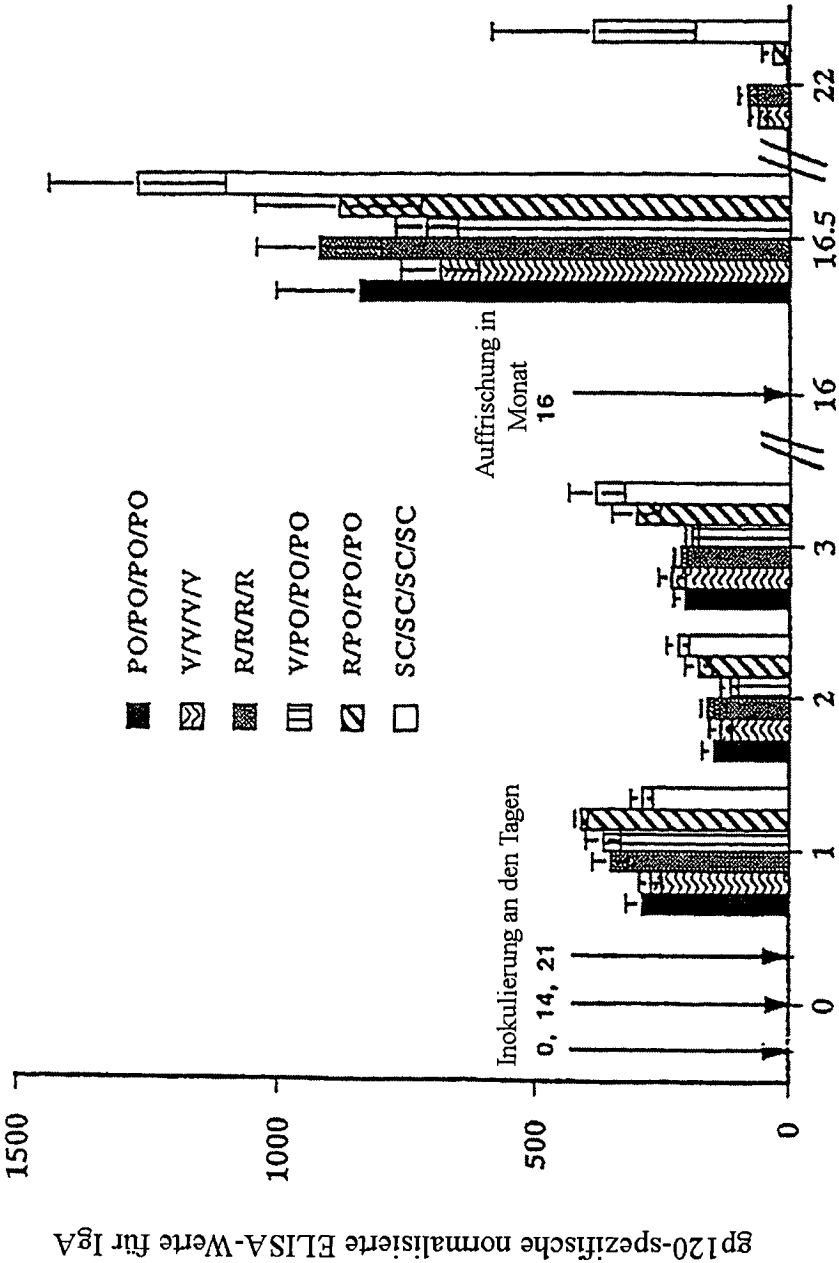


Figur 9



Figur 10

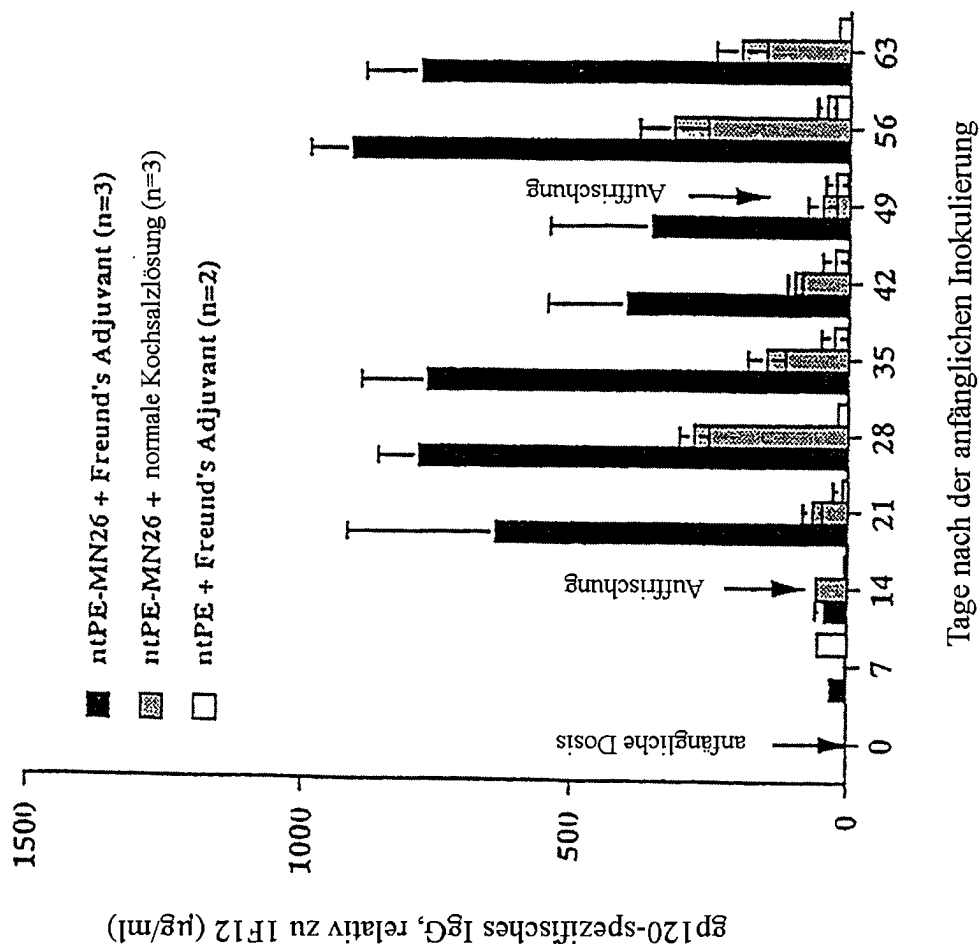
Durch ntPE-MN26 im Speichel induzierte IgA-Response



Monate nach anfänglicher Inokulierung

Figur 11

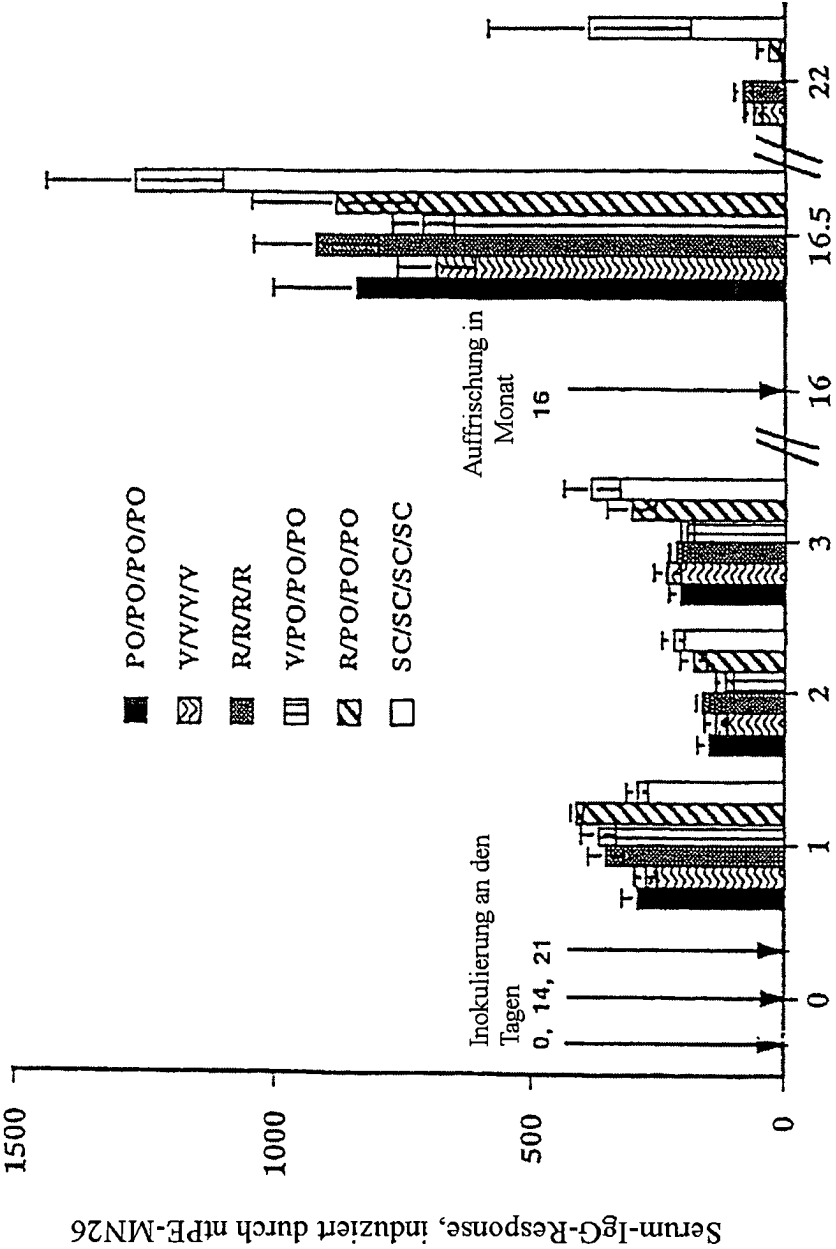
Serum-IgG-Response auf eine subkutane Injektion von ntPE-MN26



Figur 12

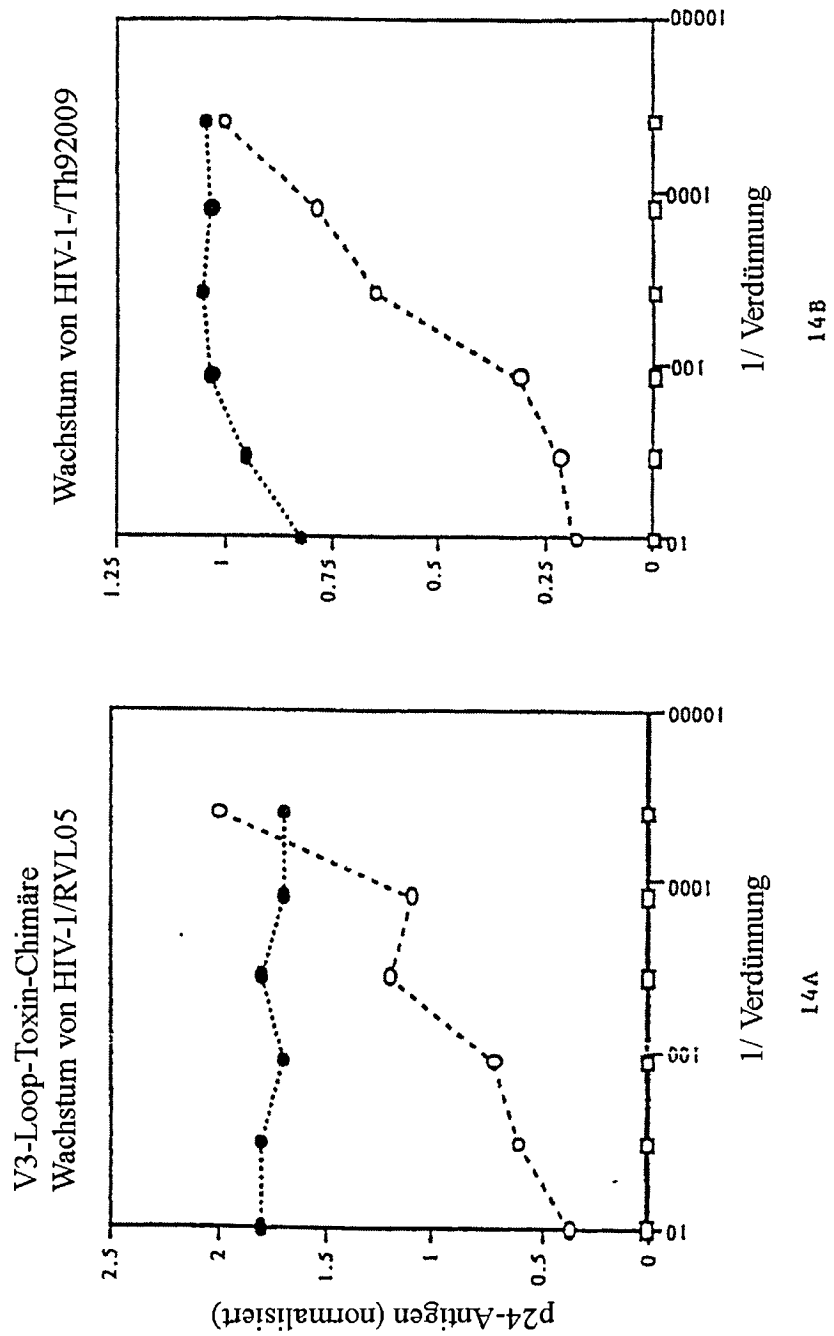


Serum-IgG-Response, induziert durch ntPE-MN26



Monate nach der anfänglichen Inokulierung

Figur 13



Figur 14