



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 20 136 T2** 2006.02.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 214 416 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 20 136.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/03601**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 960 857.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/021201**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.09.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.06.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/30** (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9922361 21.09.1999 GB

(73) Patentinhaber:

Isis Innovation Ltd., Oxford, GB

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SCHNEIDER, Joerg, Barton, Oxford OX3 8BT, GB;
GILBERT, Catherine, Sarah, Headington, Oxford
OX3 7EQ, GB; HANNAN, Mary, Carolyn, Oxford
OX4 3AA, GB; HILL, Vivian, Adrian, Oxford OX3
9DL, GB**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG EINES REPLIKATIONDEFIZIENTEN ADENOVIRALENVEKTORS ZUR HERSTELLUNG EINES MEDIKAMENTS ZUR ERHÖHUNG DER CD8+ T-ZELL-IMMUNANTWORT GEGEN ANTIGEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Medikamente zur Verwendung bei der Erzeugung einer CD8+-T-Zellen-Immunantwort auf ein Antigen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung "Prime-and-Boost"-Immunisierungspläne, in denen die durch Verabreichung einer Priming-Zusammensetzung induzierte Immunantwort durch Verabreichung einer Booster-Zusammensetzung geboostet wird. Die vorliegende Erfindung basiert auf der experimentellen Darstellung der Erfinder, dass wirksames Boosten unter Verwendung von replikationsdefekten Adenovirusvektoren, gefolgt von Priming mit einer nicht-adenoviralen Priming-Zusammensetzung erzielt werden kann.

[0002] Eine Hauptschutzkomponente der Immunantwort auf zahlreiche Pathogene wird durch T-Lymphozyten vom CD8+-Typ, auch bekannt als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), vermittelt. Eine wichtige Funktion von CD8+-Zellen ist die Sekretion von Gamma-Interferon (IFN γ), und dies liefert ein Maß für die CD8+-T-Zellen-Immunantwort.

[0003] CD8+-T-Zellen-Immunantwort ist für den Schutz gegen zahlreiche Parasiten, einschließlich Protozoen-Parasiten wie beispielsweise Toxoplasma und Trypanosoma, Plasmodium falciparum (und bei Mäusen P. berghei), Viren wie beispielsweise HIV, Herpes simplex, Herpes zoster, HBV, HCV-Influenza, EBV, Masern, Dengue-Fieber und HTLV-1, Bakterien wie beispielsweise Mycobacterium tuberculosis und Listeria sp und verschiedene Krebsarten wie beispielsweise Melanom und Nierenkarzinom von großer Bedeutung.

[0004] Infektion von Mäusen mit P. berghei liefert ein gutes Modell für P.-falciparum-Malaria bei Menschen und wurde von den Erfindern zur beispielhaften Darstellung der Fähigkeit der vorliegenden Erfindung ausgewählt, für starke CD8+-T-Zellen-Immunantworten auf Antigene zu sorgen. Malaria stellt ein zentrales Weltgesundheitsproblem dar, und bedeutende Anstrengungen zielten bereits darauf ab, wirksame Immunzusammensetzungen für Impfungen zu finden.

[0005] Um gegen das Prä-Erythrozytenstadium von Plasmodium-falciparum-Malaria zu schützen, muss eine immunogene Zusammensetzung eine starke CD8+-T-Zellen-Immunantwort hervorrufen. Im Allgemeinen sind Lebendimpfstoffe, die in der Lage sind, eine kurzfristige Infektion hervorzurufen, die für eine gesunde Person harmlos ist, zur Induktion von T-Zell-Antworten wirksam. Für bestrahlte Plasmodium-Sporozoiten, die Hepatozyten infizieren können, sich jedoch nicht zu einer Infektion auf Niveau des Blutkreislaufs weiterentwickeln, wurde gezeigt, dass sie durch Induktion von T-Zellen-Reaktionen gegen Prä-Erythrozyten-Antigene sowohl Mäuse als auch Menschen gegen Malaria schützen [Nardin & Nussenzweig, Annu. Rev. Immunol. 11, 687-727 (1993)]. Bei Menschen erfordert dies jedoch zahlreiche Immunisierungen über eine längere Zeitspanne hinweg, und wenn sich diese experimentellen Immunisierungen auch als wertvolle Informationen herausstellten, ist dieser Ansatz für die Entwicklung eines Impfstoffs nicht von Nutzen.

[0006] Rekombinante Proteinuntereinheitsvakzinen rufen humorale Antworten, jedoch nur schwache CD8+-T-Zellen-Immunantworten hervor [Schirmbeck et al., Vaccine 13(9), 857-865 (1995)]. Für DNA-Vakzinen wurde gezeigt, dass sie sowohl humorale als auch zelluläre Antworten auf das P.-yoelii-CS-Protein hervorrufen [Sedegah et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(21), 9866-9870 (1994)]. Dennoch zeigten Mäuse, die mit einer DNA-Vakzine immunisiert worden waren, die das P.-berghei-CS-Gen exprimierten, nur eine schwache CD8+-T-Zell-Immunantwort auf das schützende CD8+-T-Zell-Epitop pb9 [Romero et al., Nature 341(6240), 323-326 (1989)] und waren sogar nach wiederholten Immunisierungen gegen einen Angriff mit infektiösen Sporozoiten nicht geschützt [Schneider et al., Nat. Med. 4(4), 397-402 (1998)]. Ty-Virus-ähnliche Partikel (Ty-VLP), bestehend aus einem rekombinanten Protein, angeordnet zu einem 30-nm-Partikel, induzierten stärkere CD8+-T-Zell-Immunantworten, schützten jedoch nicht gegen Infektion [Gilbert et al., Nat. Biotechnol. 15(12), 1280-1284 (1997)].

[0007] Rekombinante Viren können auch als Vakzinen verwendet werden. Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (MVA) repliziert sich in menschlichen Zellen nicht und ist ein sehr sicheres Virus zur Verwendung als Vakzine [Mayr et al., Zentralbl. Bakteriol. 167(5-6), 375-390 (1978); Sutter & Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. 89(22), 10847-10851 (1992); Sutter et al., Vaccine 12(11), 1032-1040 (1994)]. Rekombinantes MVA, das P.-berghei-CS exprimiert, wurde auch an Mäusen getestet, was zu ähnlichem Ausmaß an peptidspezifischer Lyse in einem Zytotoxizitätstest führte wie bei der Immunisierung von Mäusen mit Ty-VLPs [Gilbert et al., Biol. Chem. 380(3), 299-303 (1999)]. Diese Mäuse waren jedoch wiederum nicht gegen Infektionsgefahren geschützt. Trotz der Tatsache jedoch, dass weder DNA-Vakzinen, Ty-VLPs noch MVA alleine verwendet gegen Malaria-Infektion schützen können, resultiert die Verwendung von DNA oder Ty-VLPs zum Primen einer T-Zellantwort und von MVA zum Boosten dieser Antwort zu stark ansteigenden Zahlen an IFN- γ -sekretierenden CD8+-T-Zel-

len und zu vollständigem Schutz gegen Infektion, wenn das MVA intravenös verabreicht wird [Schneider et al., Nat. Med. 4(4), 397-402, (1998), WO 98/56919].

[0008] In Int. J. Cancer, Bd. 7, 300-307 (1997) wird eine Immunisierung vom Priming-Boost-Typ unter Verwendung von Adenovirusvektor beschrieben.

[0009] Die vorliegende Erfindung verwendet replikationsdefektes Adenovirus, das, wie die nachstehend beschriebenen Versuche zeigen, als wirksames Mittel zur Bereitstellung eines Boosts einer CD8+-T-Zellen-Immunantwort erkannt wurde, die mit einer nicht-adenoviralen Priming-Zusammensetzung geprimed wurde.

[0010] Replikationsdefektes Adenovirus, abgeleitet vom menschlichen Serotyp 5, wurde als Lebendvirusvektor von Graham und Kollegen verwendet [Graham & Prevec, Mol. Biotechnol. 3(3), 207-220 (1995); Bett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(19), 8802-8806 (1994)]. Adenoviren sind hüllenlose Viren, die ein unverzweigtes doppelsträngiges DNA-Genom von etwa 3.600 bp enthalten. Rekombinante Viren können durch In-vitro-Rekombination zwischen einem Adenovirusgenomplasmid und einem Shuttle-Vektor, der das Gen von Interesse zusammen mit einem starken eukaryotischen Promotor enthält, in einer permissiven Zelllinie, die virale Replikation erlaubt, konstruiert werden. Hohe Virentiter können aus der permissiven Zelllinie gewonnen werden, doch die resultierenden Viren – obwohl sie in der Lage sind, zahlreiche verschiedene Zelltypen zu infizieren – replizieren in keiner anderen Zelllinie als der permissiven Linie und sind daher ein sicheres Antigen-Zufuhrsystem. Es wurde gezeigt, dass rekombinante Adenoviren schützende Immunantworten auf zahlreiche Antigene, einschließlich Zecken-Enzephalitisvirus-NS1-Protein [Jacobs et al., J. Virol. 66(4), 2086-2095 (1995)] und Marnervirus-Nucleoprotein [Fooks et al., Virology 210(2), 456-465 (1995)], hervorrufen. Weiters resultierte eine einzelne Dosis von rekombinantem Adenovirus in einem 93%igen Rückgang der Konzentration von Leberparasiten-rRNA aus *P. yoelii* bei Mäusen und zu 40 % Schutz, der sich als CD8+-T-Zellen-vermittelter Schutz erwies [Rodrigues et al., J. Immunol. 158(3), 1268-1274 (1997)].

[0011] Bemerkenswerterweise zeigten die nachstehend beschriebenen Versuche, dass die Verwendung von Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ermöglicht, dass rekombinantes replikationsdefektes Adenovirus, das ein Antigen exprimiert (wofür ein spezifisches Beispiel das CS-Gen aus *Plasmodium berghei* ist), eine CD8+-T-Zellen-Immunantwort boostet, die durch eine DNA-Vakzine, Ty-VLPs oder rekombinantes Modifiziertes Vakziniavirus Ankara (MVA) geprimed ist. Es wurde erkannt, dass das replikationsdefekte Adenovirus eine CD8+-T-Zellen-Immunantwort nach intradermaler oder intramuskulärer Immunisierung induziert.

[0012] Sowohl rekombinantes replikationsdefektes Adenovirus als auch rekombinantes MVA sind Vakzinen, die für die Verwendung bei Menschen sicher sind. Vorteilhafterweise erkannten die Erfinder, dass ein Impfschema unter Einsatz von intradermaler Immunisierung sowohl zum Primen als auch Boosten verwendet werden kann und ein allgemeines Immunisierungsschema darstellt, das zur Einführung von CD8+-T-Zellen, z.B. in Menschen, geeignet ist.

[0013] Die vorliegende Erfindung verwendet in mehreren Aspekten und Ausführungsformen einen für ein Antigen kodierenden replikationsdefekten Adenovirusvektor zur Herstellung eines Medikamentes zum Boosten einer CD8+-T-Zellen-Immunantwort auf das Antigen, das durch vorangehende Verabreichung des Antigens oder von für das Antigen kodierender Nucleinsäure geprimed wurde.

[0014] Ein allgemeiner Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines replikationsdefekten Adenovirusvektor bei der Herstellung eines Medikamentes zum Boosten einer CD8+-T-Zellen-Immunantwort auf ein Antigen.

[0015] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines replikationsdefekten Adenovirusvektors bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zum Boosten einer CD8+-T-Zellen-Immunantwort auf ein Antigen bei einem Individuum, wobei der replikationsdefekte Adenovirusvektor für das Antigen kodierende Nucleinsäure umfasst, die operabel an Regulationssequenzen zur Antigenproduktion im Individuum durch Expression aus der Nucleinsäure gebunden ist, wodurch eine CD8+-T-Zellen-Immunantwort auf das Antigen, das davor im Individuum geprimed wurde, geboostet wird.

[0016] Eine Immunantwort auf ein Antigen wird in der vorliegenden Erfindung durch Immunisierung mit einer nicht-adenoviralen Priming-Zusammensetzung geprimed.

[0017] Ein weiterer Aspekt betrifft die Verwendung eines replikationsdefekten Adenovirusvektors, wie offenbart, zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an ein Säugetier, um eine CD8+-T-Zellen-Immu-

antwort auf ein Antigen zu boosten. Solch ein Medikament dient für eine Verabreichung, die auf vorangehende Verabreichung einer ein Antigen umfassenden Priming-Zusammensetzung folgt.

[0018] Die Priming-Zusammensetzung kann einen viralen Vektor umfassen, der kein Adenovirusvektor ist, beispielsweise einen Vakziniavirusvektor, wie z.B. einen replikationsdefekten Stamm wie Modifiziertes Virus Ankara (MVA) [Mayr et al., Zentralbl. Bakteriologie 167(5-6), 375-390 (1978); Sutter & Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. 89(22), 10847-10851 (1992); Sutter et al., Vaccine 12(11), 1032-1040 (1994)] oder NYVAC [Tartaglia et al., Virology 118(1), 217-232 (1992)], einen Avipoxvektor wie Geflügelpocken oder Kanarienvpocken, z.B. den Stamm, der als ALVAC bekannt ist [Knapox, Paoletti et al., Dev Biol Stand 82, 65-69 (1994)] oder ein Herpes-Virus-Vektor. Die Priming-Zusammensetzung kann einen rekombinanten Bakterienvektor umfassen, wie beispielsweise rekombinante BCG oder Salmonellen. Eine ein rekombinantes Geflügelpockenvirus umfassende Priming-Zusammensetzung zählt zu den bevorzugten Ausführungsformen der Anwendung der vorliegenden Erfindung.

[0019] Die Priming-Zusammensetzungen können DNA umfassen, die für das Antigen kodiert, wie z.B. DNA, die vorzugsweise in Form eines ringförmigen Plasmids vorliegt, das nicht in der Lage ist, in Säugetierzellen zu replizieren. Kein selektierbarer Marker sollte gegenüber einem im medizinischen Bereich verwendeten Antibiotikum resistent sein; somit wird beispielsweise Kanamycin-Resistenz gegenüber Ampicillin-Resistenz bevorzugt. Antigen-Expression sollte von einem Promotor vermittelt werden, der in Säugetierzellen aktiv ist, beispielsweise der unmittelbar frühe Zytomegalievirus-(CMV-IE-)Promotor.

[0020] Die Priming-Zusammensetzung kann ein rekombinantes Ty-VLP sein. Dies sind Proteinpartikel, die aus einer einzigen Proteinspezies aus dem Ty-Retrotransposon von *S. cerevisiae* bestehen, das sich spontan zu Partikeln anordnet. Rekombinante Ty-VLPs können durch Fusionieren der Codiersequenz des erforderlichen Epitops oder des Antigens an das 3'-Ende der Codiersequenz für das TyA-Protein und Transformieren von *S. cerevisiae* mit einem Vektor, der die Codiersequenz zur Expression des Fusionsproteins, das sich dann zu Partikel im Hefezytoplasma anordnet, von wo aus es dann gereinigt werden kann, einbindet, produziert werden. Die Partikelbeschaffenheit der Ty-VLPs ermöglicht dann, durch Antigene aufweisende Zellen aufgenommen zu werden und eine CD8+-T-Zell-Immunantwort auf Epitope, die darin enthalten sind, zu primen.

[0021] Andere geeignete Priming-Zusammensetzungen umfassen Peptide mit Lipid-Schwanz, Fusionsproteine, Adjuvans-Zusammensetzungen und dergleichen.

[0022] Auf die Verabreichung einer Priming-Zusammensetzung kann das Boosten mit einer ersten und einer zweiten Booster-Zusammensetzung folgen, wobei sich die erste und die zweite Booster-Zusammensetzung voneinander unterscheiden, wie dies anhand von Beispielen nachstehend beschrieben wird. Auch noch weitere Booster-Zusammensetzungen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. In einer Ausführungsform verwendet ein Dreifach-Immunisierungs-Schema DNA, dann Adenovirus als erste Booster-Zusammensetzung und dann MVA als zweite Booster-Zusammensetzung, gegebenenfalls gefolgt von einer weiteren (dritten) Booster-Zusammensetzung oder einer anschließenden Booster-Verabreichung von einem oder einem anderen oder von zwei gleichen oder unterschiedlichen Vektoren. Eine andere Möglichkeit ist DNA, dann MVA, dann Ad, gegebenenfalls gefolgt von anschließender Booster-Verabreichung des einem oder anderen oder von zwei gleichen oder unterschiedlichen Vektoren.

[0023] Die in die jeweiligen Priming- oder Booster-Zusammensetzungen einzubindenden Antigene (unabhängig von der Anzahl an eingesetzten Booster-Zusammensetzungen) brauchen nicht identisch zu sein, sollten jedoch zumindest ein CD8+-T-Zell-Epitop gemeinsam haben. Das Antigen kann einem vollständigen Antigen in einem Target-Pathogen oder einer Target-Zelle oder einem Fragment davon entsprechen. Peptid epitope oder künstliche Stränge von Epitopen können verwendet werden, wobei unnötige Proteinsequenzen im Antigen und Codiersequenzen im Vektor oder in den Vektoren effizienter herausgeschnitten werden. Ein oder mehrere zusätzliche Epitope können eingebunden werden, beispielsweise Epitope, die durch T-Helfer-Zellen erkannt werden, insbesondere Epitope, die von Individuen unterschiedlicher HLA-Typen erkannt werden (wie beispielsweise Tetanusepitope).

[0024] Innerhalb des replikationsdefekten Adenovirusvektors umfassen Regulationssequenzen zur Expression des kodierten Antigens einen Promotor. Unter "Promotor" wird eine Sequenz von Nucleotiden verstanden, von der aus Transkription von DNA, die stromab operabel gebunden ist, initiiert werden kann (d.h. in 3'-Richtung am codierenden Strang von doppelsträngiger DNA). "Operabel gebunden" bedeutet als Teil desselben Nucleinsäuremoleküls gebunden, zur Transkription, die durch den Promotor initiiert werden soll, geeignet positioniert und ausgerichtet. DNA, die operabel an einen Promotor gebunden ist, steht "unter Transkriptionsini-

tationsregulation" des Promotors. Andere Regulationssequenzen, einschließlich Terminatorfragmenten, Polyadenylierungssequenzen, Enhancersequenzen, Markergenen und anderen Sequenzen, können geeigneterweise, gemäß dem Wissen und der Praxis durchschnittlicher Fachleute, eingebunden werden: siehe beispielsweise Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Zahlreiche bekannte Verfahren und Arbeitsvorschriften zur Manipulation von Nucleinsäure, beispielsweise zur Herstellung von Nucleinsäurekonstrukten, zur Mutagenese, zum Sequenzieren, zum Einführen von DNA in Zellen und zur Genexpression sowie zur Analyse von Proteinen sind im Detail in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (Hrsg.), John Wiley & Sons (1994) beschrieben.

[0025] Geeignete Promotoren zur Verwendung in Aspekten und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen den unmittelbar frühen Zytomegalie-Virus (CMV IE-) Promotor, mit oder ohne Intron A, und jeden beliebigen anderen Promotor, der in Säugetierzellen aktiv ist, ein.

[0026] Entweder eine oder beide der Priming- und Booster-Zusammensetzungen kann/können ein Adjuvans wie beispielsweise Granulozytenmakrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) oder dafür kodierende Nucleinsäure einbinden.

[0027] Die Verabreichung der Booster-Zusammensetzung erfolgt im Allgemeinen 10 Tage bis 4 Wochen, vorzugsweise etwa 2 bis 3 Wochen, nach Verabreichung der Priming-Zusammensetzung.

[0028] Vorzugsweise ist die Verabreichung von Priming-Zusammensetzung, Booster-Zusammensetzung oder sowohl von Priming- als auch Booster-Zusammensetzung intradermale oder intramuskuläre Immunisierung.

[0029] Intradermale Verabreichung von Adenovirus- und MVA-Vakzinen kann mittels einer Nadel erfolgen, um eine Suspension des Virus zu injizieren. Eine Alternative ist die Verwendung einer nadelfreien Injektionsvorrichtung zur Verabreichung einer Virussuspension (unter Verwendung von z.B. Biojector™) oder eines gefriergetrockneten Pulvers, das die Vakzine enthält (z.B. gemäß den Verfahren und Produkten von Powderject), was die Herstellung von einzeln vorbereiteten Dosen ermöglicht, die nicht kühl gelagert werden müssen. Dies würde für eine Vakzine, die in ländlichen Bereichen von Afrika benötigt wird, einen großen Vorteil darstellen.

[0030] Adenovirus und MVA sind beides Viren mit einem ausgezeichneten Sicherheitsniveau für die Immunisierung von Menschen. Die Bildung von rekombinanten Viren kann einfach erfolgen, und sie können in großen Mengen reproduzierbar hergestellt werden. Intradermale Verabreichung von rekombinantem replikationsdefektem Adenovirus, gefolgt von rekombinantem MVA, ist daher äußerst gut geeignet für prophylaktische oder therapeutische Impfung von Menschen gegen Erkrankungen, die durch eine CD8+-T-Zell-Immunantwort beeinflusst werden können.

[0031] Eine Person kann solch eine Erkrankung oder Störung aufweisen, dass die Zufuhr des Antigens und die Bildung einer CD8+-T-Zell-Immunantwort auf das Antigen von Vorteil ist oder eine therapeutisch positive Wirkung erzielt.

[0032] Sehr wahrscheinlich wird durch die Verabreichung ein prophylaktisches Ziel verfolgt, nämlich die Erzeugung einer Immunantwort gegen ein Pathogen oder eine Erkrankung noch vor Auftreten einer Infektion oder der Entwicklung von Symptomen.

[0033] Erkrankungen und Störungen, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt oder denen vorgebeugt werden kann, umfassen all jene, die bereits zuvor erwähnt wurden, und andere, bei denen eine CD8+-T-Zellen-Immunantwort eine schützende oder therapeutische Rolle spielen kann.

[0034] Gemäß der vorliegenden Erfindung zu verabreichende Komponenten können zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden. Diese Zusammensetzungen können einen pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelträger, Träger, Puffer, Stabilisatoren und andere Materialien umfassen, die Fachleuten bekannt sind. Solche Materialien sollten nicht toxisch sind und sollten die Effizienz des Wirkstoffs nicht beeinträchtigen. Die präzise Beschaffenheit des Trägers oder des anderen Materials kann von der Art der Verabreichung abhängen, die z.B. intravenös, kutan oder subkutan, nasal, intramuskulär oder intraperitoneal erfolgen kann.

[0035] Wie bereits erwähnt erfolgt die Verabreichung vorzugsweise intradermal, subkutan (s.c.) oder intramuskulär.

[0036] Flüssige pharmazeutische Verabreichungen umfassen im Allgemeinen einen flüssigen Träger wie beispielsweise Wasser, Petrol, Tier- oder Pflanzenöle, Mineralöl oder synthetisches Öl. Physiologische Salzlösung, Dextrose oder andere Saccharidlösungen oder Glykole wie beispielsweise Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol können enthalten sein.

[0037] Zur intravenösen (i.v.), kutanen oder subkutanen Injektion oder Injektion an der befallenen Stelle wird der Wirkstoff in Form einer parenteral annehmbaren wässrigen Lösung vorliegen, die pyrogenfrei ist und geeigneten pH, Isotonie und Stabilität aufweist. Fachleute auf diesem Gebiet werden selbstverständlich in der Lage sein, geeignete Lösungen unter Verwendung von beispielsweise isotonischen Vehikeln wie Kochsalzinjektion, Ringer-Injektion oder Ringer-Lactat herzustellen. Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Puffer, Antioxidanzien und/oder andere Additive können je nach Bedarf miteinbezogen werden.

[0038] Es kann auch eine Retard-Formulierung verwendet werden.

[0039] Nach der Herstellung von replikationsdefekten Adenoviruspartikeln und gegebenenfalls der Formulierung solcher Partikel zu Zusammensetzungen können die Partikel einem Individuum, insbesondere einem Menschen oder anderen Primaten, verabreicht werden. Die Verabreichung kann auch an ein anderes Säugetier erfolgen, z.B. an ein Nagetier wie beispielsweise eine Maus, eine Ratte oder einen Hamster, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, ein Schaf, eine Ziege, ein Schwein, ein Pferd, eine Kuh, einen Esel, einen Hund oder eine Katze.

[0040] Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in einer "prophylaktisch wirksamen Menge" oder einer "therapeutisch wirksamen Menge" (je nachdem, obwohl Prophylaxe auch als Therapie angesehen werden kann), was bedeutet, dass die Menge ausreichend sein muss, um eine positive Wirkung für die Person zu erzielen. Die tatsächliche zu verabreichende Menge und die Wiederholungen und Abstände der einzelnen Dosen hängen von der Beschaffenheit und dem Ausmaß des zu behandelnden Symptoms ab. Behandlungsvorschriften, z.B. Entscheidungen bezüglich der Dosierung usw., liegen innerhalb der Verantwortung der praktischen Ärzte oder anderer Fachärzte, oder in Zusammenhang mit Tierbehandlungen im Ermessen des Veterinärarztes, und richtet sich typischerweise nach der zu behandelnden Erkrankung, dem Leiden des einzelnen Patienten, der Verabreichungsstelle, der Art der Verabreichung und anderen Faktoren, die Ärzten bekannt sind. Beispiele für die zuvor erwähnten Verfahren und Arbeitsvorschriften können in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980) gefunden werden.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform wird DNA mit einer Dosierung von 0,5 mg/Injektion (vorzugsweise intramuskulär), gefolgt von Adenovirus (vorzugsweise intramuskulär oder intradermal) mit einer Dosierung von 5×10^7 bis 5×10^8 Viruspartikel/Injektion verabreicht.

[0042] Eine Zusammensetzung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen, entweder gleichzeitig oder nacheinander, je nach zu behandelndem Leiden, verabreicht werden.

[0043] Die Verabreichung an ein Säugetier, das kein Mensch ist, muss nicht zu therapeutischen Zwecken erfolgen, sondern kann auch im Rahmen von Forschungstätigkeiten stattfinden, beispielsweise zur Untersuchung von Mechanismen von Immunantworten auf ein Antigen von Interesse, z.B. von Schutz gegen Krebsarten, Malaria oder andere Pathogene usw.

[0044] Weitere Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Fachleuten auf Grundlage der obigen Offenbarung und der folgenden Versuchsbeispiele, die als Veranschaulichung und nicht als Einschränkung in die Beschreibung aufgenommen wurden, und unter Hinweis auf die beiliegenden Figuren verständlich gemacht.

[0045] Die vorliegende Erfindung ist in ihrem Schutzzumfang auf den in Anspruch 1 beschriebenen Inhalt beschränkt. Inhalte, die den Schutzzumfang dieses Anspruches überschreiten, sind lediglich zu Vergleichszwecken aufgenommen.

[0046] [Fig. 1](#) zeigt Resultate von Versuchen, die peptidspezifische, IFN- γ sekretierende T-Zellen zeigen, geprimed durch eine einzelne Immunisierung von Ad-ObCS. Gruppen von drei Mäusen wurden über die dargestellten Wege unter Verwendung von 10^7 pfu immunisiert. Elispot-Tests zur Detektion von IFN- γ -sekretierenden, pb9-spezifischen T-Zellen wurden in doppelter Ausführung an Splenozyten zwei Wochen später durchgeführt. Das Diagramm zeigt Fleck-bildende Zellen (SFC) pro Million Splenozyten für jede der einzelnen Verabreichungsarten.

[0047] [Fig. 2](#) zeigt Resultate von Prime/Boost-Immunisierungen. Gruppen von drei Mäusen wurden an Tag 0 mit der ersten gezeigten Vakzine (D = pSG2.PbCS, A = Ad-PbCS, M = MVA-PbCS) und an Tag 14 mit der zweiten Vakzine immunisiert. DNA wurde intramuskulär (i.m.), Adenovirus und MVA intradermal (i.d.) verabreicht. Elisots wurden an Splenozyten, die an Tag 28 isoliert wurden, durchgeführt. Das Diagramm zeigt SFC pro Million Splenozyten für jedes Prime/Boost-Immunisierungsschema.

[0048] [Fig. 3](#) zeigt Resultate von Dreifach-Kombinationsimmunisierungen und einen Vergleich mit Zweifach-Kombinationsimmunisierungen. Gruppen von drei Mäusen wurden in 10-Tage-Intervallen mit den gezeigten Vakzinen (D = pSG2.PbCS, A = Ad-PbCS, M = MVA-PbCS) immunisiert, wobei die erste Vakzine der Zweifach-Kombinationen am selben Tag wie die zweite Vakzine der Dreifach-Kombinationen verabreicht wurde. Elisot-Tests wurden in doppelter Ausführung an Splenozyten 10 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt. Das Diagramm zeigt SFC pro Million Splenozyten für jedes Immunisierungsschema.

AUSFÜHRUNGSBEISPIELE

[0049] Die Erfinder konstruierten ein rekombinantes replikationsdefektes Adenovirus, das das CS-Gen von P. berghei exprimiert, (Ad-PBCS) und testeten die Fähigkeiten dieses Virus, CD8+-T-Zell-Immunantworten bei Mäusen, entweder allein oder in Kombination mit anderen Arten von Vakzinen, zu induzieren.

[0050] Wurde es in Form einer einzelnen Immunisierung eingesetzt, wurden hohe Konzentrationen an antigenspezifischen CD8+-T-Zellen gebildet. Adenovirus-Priming, gefolgt von MVA-Boosten, führte zu vollständigem Schutz. Beachtenswerterweise war das Adenovirus in der Lage, eine durch DNA, Ty-VLPs oder MVA geprimte Antwort wesentlich zu boosten.

MATERIALIEN UND VERFAHREN

DNA-Vakzine

[0051] Die DNA-Vakzine pSG2.PbCS besteht aus dem CMV-Promotor mit Intron-A, der Expression von P. berghei-CS-Protein vermittelt, mit der Poly-A-Sequenz des Rinderwachstumshormons. Das Plasmid ist Kanamycin-resistent und nicht in der Lage, in eukaryotischen Zellen zu replizieren. Plasmide wurden unter Verwendung von Qiagen-Säulen hergestellt und in endotoxinfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt.

Konstruktion von rekombinantem replikationsdefektem Adenovirus

[0052] Der CMV-Promotor mit Intron A, P.-berghei-CS-Proteingen und Rinderwachstumshormon-Poly-A-Sequenz aus pSG2.PbCSP wurde in die multiple Klonierungsstelle des Adenovirus-Shuttle-Vektors pΔE1sp1A ligiert [Bett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(19), 8802-8806 (1994)]. Dieser Vektor kann verwendet werden, um Adenovirus-5-Rekombinanten mit Deletionen in E1 zu konstruieren. Der rekombinante Shuttle-Vektor wurde verwendet, um die permissive Zelllinie 293 zusammen mit dem Adenovirus-Genomplasmid pJM17 zu transfizieren [Graham & Prevec, Mol. Biotechnol. 3(3), 207-220 (1995)]. Virus aus transfizierten Zellen wurde durch drei aufeinanderfolgende Grenzverdünnungen in 293-Zellen klonal gereinigt, und Expression von P.-berghei-CS in Zellen, die mit dem isolierten Virus infiziert waren, wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt. Große Mengen an Virus wurden aus infizierten 293-Zellen hergestellt und vor der Immunisierung durch Extraktion mit Arklon gereinigt [Graham & Prevec, Mol. Biotechnol. 3(3), 207-220 (1995)].

Ty-VLPs

[0053] Rekombinante Ty-VLPs, die das pb9-Epitop aus P.-berghei-CS, SYIPSAEKI, exprimieren, wurden wie in [Gilbert et al., Nat. Biotechnol. 15(12), 1280-1284 (1997)] beschrieben hergestellt und in PBS suspendiert.

Rekombinantes MVA

[0054] MVA, das P.-berghei-CS exprimiert, wurde durch In-vitro-Rekombination zwischen einem Shuttle-Vektor, der das CS-Gen enthält, gesteuert durch den Vakzinia-P7.5-Promotor, und dem MVA-Virus in primären Hühnerembryofibroblasten hergestellt [Sutter et al., Vaccine 12(11), 1032-1040 (1994)]. Die Rekombinante, die auch E.coli-β-Galactosidase exprimiert, wurde wiederholt Plaque-gereinigt, und Expression des rekombinanten Gens wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt. Virus zur Immunisierung wurde durch Ultrazentrifugation durch einen Saccharosekissen gereinigt und in endotoxinfreier PBS suspendiert.

Immunisierungen

[0055] Weibliche BALB/c-Mäuse, 4-6 Wochen alt, wurden unter Betäubung wie für die einzelnen Versuche beschrieben immunisiert. Intramuskuläre DNA-Immunisierungen verwendeten 50 µg DNA, die in jeden Musculus tibialis injiziert wurden. MVA und Adenovirus (10^6 bzw. 10^7 pfu pro Dosis) wurden intradermal in die Ohrmuschel injiziert. Ty-VLPs (100 µg pro Dosis) wurden intradermal in den Fußballen oder intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert.

ELISPOT-Tests

[0056] Die Anzahl an IFN- γ -sekretierenden, pb9-spezifischen T-Zellen in frischen Splenozyten-Präparaten wurde wie bereits zuvor in [Schneider et al., Nat. Med. 4(4), 397-402 (1998)] beschrieben durch Beschichten von 96-Well-Nitrocellulose-Platten mit Anti-Maus-IFN- γ -Antikörper (Klon R4 aus ETCC), Waschen mit PBS und darauffolgendes Blockieren mit komplettem Medium, das 10 % FCS enthielt, bestimmt. Splenozyten von immunisierten Mäusen wurden bei $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert, in zweifacher Ausführung in die beschichteten Wells gefüllt und reihenverdünnt. Das H2-K^d-eingeschränkte Peptid pb9 (SYIPSAEKI) (Romero) wurde den Test-Wells und ein irrelevantes Peptid den Kontroll-Wells zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Wells gewaschen, und ein zweiter biotinylierter Anti-IFN- γ -Antikörper (Pharmingen-Klon) wurde den Wells zugesetzt. Die Wells wurden wiederum gewaschen, und Streptavidin-alkalische Phosphatase wurde zugesetzt. Nach weiterem Waschen wurden Spots durch Zusatz eines alkalischen Phosphatase-Substrats entwickelt. Die Reaktion wurde durch Waschen der Wells gestoppt, und die Spots wurden unter einem Stereomikroskop gezählt.

P.-berghei-Provokation

[0057] Sporozysten von *P. berghei* (ANKA-Stamm Klon 1) wurden von laborgezüchteten weiblichen Anopheles-stephensi-Moskitos erhalten, die bei 18 °C 20-25 Tage lang nach Füttern an infizierten Mäusen am Leben erhalten wurden. Speicheldrüsen der Moskitos wurden durch Ausschneiden gesammelt und in einen Gewebe-Homogenisator mit RPMI 1640 (Sigma) gegeben, um die Sporozysten freizusetzen, die dann unter Verwendung eines Hämozytometers gezählt wurden. Die Mäuse wurden durch Injektion von 2.000 Sporozysten in die Schwanzvene provoziert. Infektion wurde durch die Gegenwart von Ringformen in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen, die 7 und 9 Tage nach der Provokation abgenommen wurden, bestimmt. Wurde Parasitämie im Blut an zwei Zeitpunkten beobachtet, so wurden die Mäuse getötet. Überlebende Tiere wurden zumindest drei weitere Wochen auf die Entwicklung von Malaria-symptomen beobachtet.

ERGEBNISSE

Immunogenität einzelner Adenovirus-Immunisierungen unter Anwendung verschiedener Arten der Verabreichung

[0058] Anfänglich wurde die Auswirkung der Verabreichungsart auf die Fähigkeit von Ad-PbCS, pb9-spezifische, IFN- γ -sekretierende T-Zellen zu induzieren, getestet.

[0059] Rodrigues et al., J. Immunol. 158(3), 1268-1274 (1997), fanden heraus, dass hohe Konzentrationen an Malaria-spezifischen CD8⁺-T-Zellen nach intramuskulärer und subkutaner Immunisierung induziert wurden, jedoch nicht nach intravenöser, intraperitonealer (i.p.) oder intranasaler (i.n.) Immunisierung. Die Erfinder testeten weder intravenöse noch intraperitoneale Immunisierung, da diese keine geeigneten Wege für eine prophylaktische Vakzine sind, die an Menschen angewendet werden soll, aber sie arbeiteten mit intradermaler Immunisierung und "Genanstrich"-Gruppen-einfache Verabreichung von rekombinantem Virus auf die Haut (bekannt als "gene painting", gp), ein Verfahren, das bereits im Vorfeld dafür bekannt war, eine Immunantwort auf das durch das Virus exprimierte Antigen zu induzieren [Tang et al., Nature 388(6644), 729-730 (1997)].

[0060] Gruppen von Mäusen, die eine einzelne Immunisierung von 10^7 pfu Ad-PbCS erhalten hatten, sowie Splenozyten wurden auf peptidspezifische, IFN- γ -sekretierende T-Zellen nach 14 Tagen getestet.

[0061] Die Anzahl an peptidspezifischen, IFN- γ -sekretierenden T-Zellen ([Fig. 1](#)), die nach intramuskulärer oder intradermaler Immunisierung nachgewiesen wurde, lag etwas höher als die jener Zellen, die nach einer einzelnen Immunisierung mit intramuskulärer DNA nachgewiesen wurde, und geringfügig niedriger als die Anzahl jener Zellen, die nach intramuskulärer MVA nachgewiesen wurde [Gilbert et al., Biol. Chem. 380(3), 299-303 (1999)]. Intranasale oder subkutane Immunisierung führte zu einer sehr geringen Anzahl an pep-

tidspezifischen, IFN- γ -sekretierenden T-Zellen, und in der "Genanstrich"-Gruppe konnten keinerlei festgestellt werden. Für alle folgenden Versuche wurde intradermale Immunisierung angewandt.

Immunogenität von verschiedenen Prime/Boost-Immunisierungen

[0062] [Fig. 2](#) zeigt die Anzahl an peptidspezifischen, IFN- γ -sekretierenden T-Zellen, die in der Milz von immunisierten Mäusen nachgewiesen wurden, die eine Priming-Immunisierung an Tag 0 und eine Booster-Immunisierung an Tag 14 erhalten hatten.

[0063] Die Verwendung derselben Vakzine zum Primen und Boosten resultierte in einem Anstieg der spezifischen CD8⁺-T-Zellen, wobei jedoch ein sehr viel stärker ausgeprägter Anstieg nach heterologem Boosten beobachtet werden konnte. DNA boostet keine bereits bestehende Antwort. Die Kombination von Adenovirus-Priming und MVA-Boosten resultierte jedoch in extrem hohen Anzahlen an peptidspezifischen CD8⁺-T-Zellen. Zusätzlich zur Fähigkeit, eine Antwort zu primen, die zu solchen hohen Konzentrationen geboostet werden konnte, waren Ad-PbCS in der Lage, eine Antwort zu boosten, die durch DNA oder MVA geprimed worden war.

Immunogenität von Dreifach-Kombinations-Immunisierungen

[0064] Heterologes Primen und Boosten ist eindeutig viel effektiver als die wiederholte Verwendung derselben Vakzinen. DNA-Vakzinen boosten nicht, wodurch sich zwei mögliche Kombinationen ergaben und folglich verwendet wurden: DNA/Ad/MVA und DNA/MVA/Ad. Gruppen von Mäusen wurden in 10-Tage-Intervallen immunisiert, und Splenozyten wurden 10 Tage nach der letzten Immunisierung getestet.

[0065] Wie im vorhergehenden Versuch wurde eine hohe Anzahl an peptidspezifischen, IFN- γ -sekretierenden T-Zellen nach DNA/MVA-, Ad/MVA-, MVA/Ad- und DNA/Ad-Immunisierungen ([Fig. 3](#)) nachgewiesen. Diese Anzahl wurde jedoch nicht um dasselbe Ausmaß (drei- bis zehnfach) gesteigert, wenn eine dritte heterologe Booster-Immunisierung verabreicht wurde.

Schutz gegen Infektionsgefahr

[0066] Mehrere der Prime/Boost-Kombinationen, die Adenovirus entweder als Priming- oder als Booster-Mittel verwendeten, resultierten in einer hohen Anzahl an peptidspezifischen, IFN- γ -sekretierenden T-Zellen, von denen erwartet wurde, dass sie Mäuse gegen die Provokation durch P.-berghei-Sporoziten schützten. Daher wurden Gruppen von acht bis elf Mäusen mit einer Anzahl an verschiedenen heterologen Prime/Boost-Kombinationen immunisiert und 2.000 infektiösen P.-berghei-Sporoziten zwei Wochen nach der Boost-Immunisierung ausgesetzt. Die Resultate werden in Tabelle 1 gezeigt.

[0067] Intradermale Verabreichung von Adenovirus, gefolgt von intradermaler Verabreichung von MVA gewährte den immunisierten Mäusen vollständigen Schutz. In früheren P.-berghei-Provokationsversuchen wurde erkannt, dass intramuskuläre DNA-Verabreichung, gefolgt von intradermaler MVA-Verabreichung zu einem hohen Schutzniveau führte, dass jedoch vollständiger Schutz nur erzielt wurde, wenn das MVA intravenös verabreicht wurde [Schneider et al., Nat. Med. 4(4), 397-402 (1998)]. Durch die Verwendung von Adenovirus-Priming und MVA-Boosten jedoch konnten beide Vakzinen ohne Schutzverlust intradermal verabreicht werden. MVA-Priming und Adenovirus-Boosten resultierte ebenfalls in einem hohen Schutzniveau, während zwei aufeinanderfolgende Adenovirus-Immunisierungen dies nicht erreichten. Adenovirus boostete auch Antworten, die durch DNA oder Ty-VLPs geprimed waren, was zu Schutzniveaus führte, die mit jenen vergleichbar waren, die durch DNA-Priming und intradermales MVA-Boosten erreicht wurden.

TABELLE 1

[0068] Schutz von Mäusen, die mit verschiedenen Prime/Boost-Kombinationen immunisiert wurden. DNA wurde intramuskulär (50- μ g-Dosis) verabreicht. MVA (10^6 -pfu-Dosis), Adenovirus (10^7 -pfu-Dosis) und Ty-VLPs (100- μ g-Dosis) wurden, sofern nicht anders angegeben, intradermal verabreicht. Die Priming-Immunisierung wurde an Tag 0 verabreicht, die Booster-Immunisierung an Tag 14, und die Provokation erfolgte an Tag 28.

Prime	Boost	Anzahl infiziert	Anzahl provoziert	% Schutz
DNA	MVA	5	10	50
Ad	MVA	0	10	100
MVA	Ad	2	10	80
Ad	Ad	7	8	13
DNA	Ad	5	11	55
MVA	MVA	5	8	38
Ty (i.v.)	Ad	7	10	30
Ty (i.v.)	MVA (i.v.)	1	11	91
Ty	Ad	4	10	60
naiv		8	10	20

Patentansprüche

1. Verwendung eines Replikations-defizienten Adenovirusvektors, der für ein Antigen oder ein CD8+-T-Zellepitop dieses Antigens kodiert, zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines Individuums, in dem eine CD8+-T-Zell-Immunantwort auf das Antigen von therapeutischem oder prophylaktischem Nutzen ist, worin das Medikament für die Verabreichung an solch ein Individuum konzipiert ist, um in diesem Individuum eine CD8+-T-Zell-Immunantwort auf das Antigen zu fördern, und zwar nach einer vorherigen Verabreichung einer Nichtadenovirus-Priming-Zusammensetzung, die das Antigen oder Epitop oder die Nucleinsäure umfasst, die für das Antigen oder Epitop kodiert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Priming-Zusammensetzung DNA umfasst, die für das Antigen oder Epitop kodiert.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Priming-Zusammensetzung rekombinantes Ty-VLP umfasst.

4. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Priming-Zusammensetzung Modifiziertes Virus Ankara (MVA) umfasst.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Medikament eine Boost-Zusammensetzung zur Verabreichung vor der Verabreichung einer anderen, unterschiedlichen Boost-Zusammensetzung, die das Antigen oder Epitop umfasst, ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Medikament eine Boost-Zusammensetzung zur Verabreichung nach der Verabreichung einer anderen, unterschiedlichen Boost-Zusammensetzung, die das Antigen oder Epitop umfasst, ist.

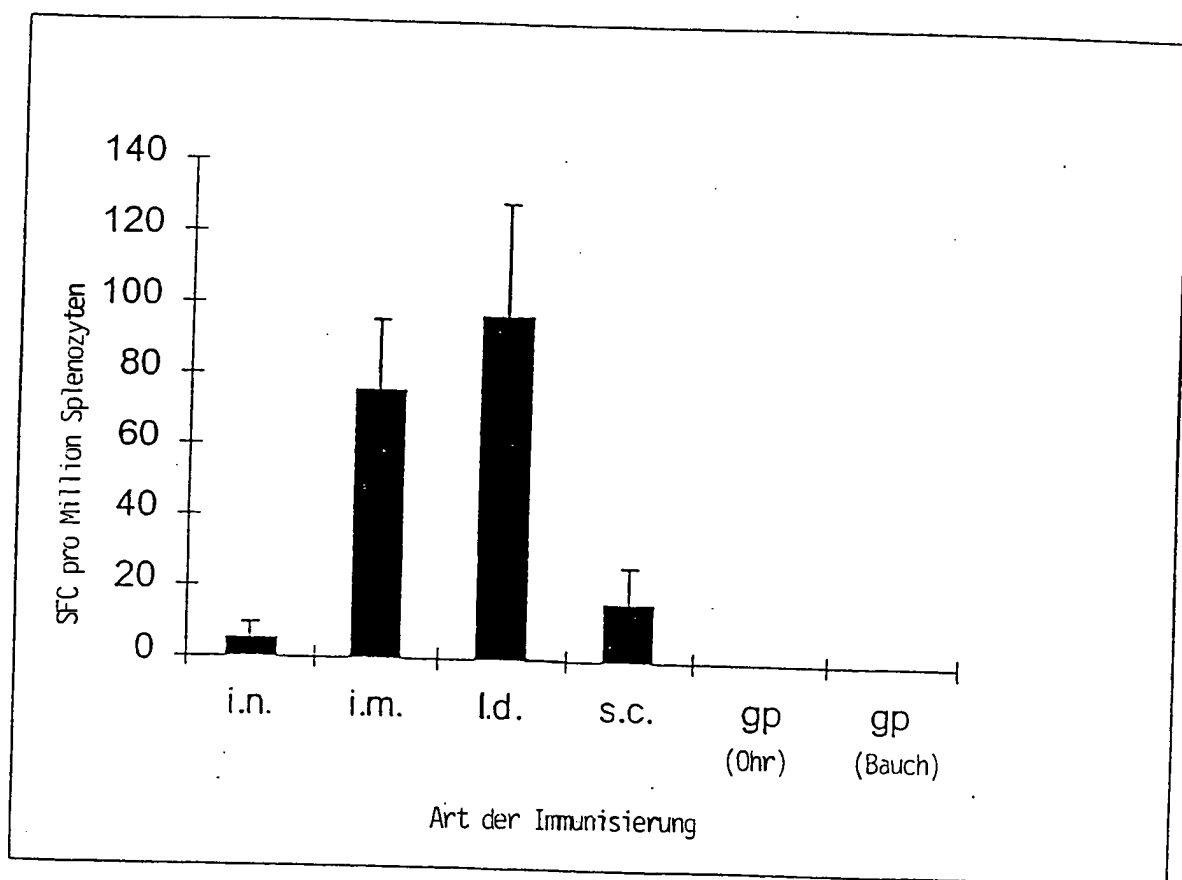
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Medikament zur intradermalen Verabreichung konzipiert ist.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Medikament zur intramuskulären Verabreichung konzipiert ist.

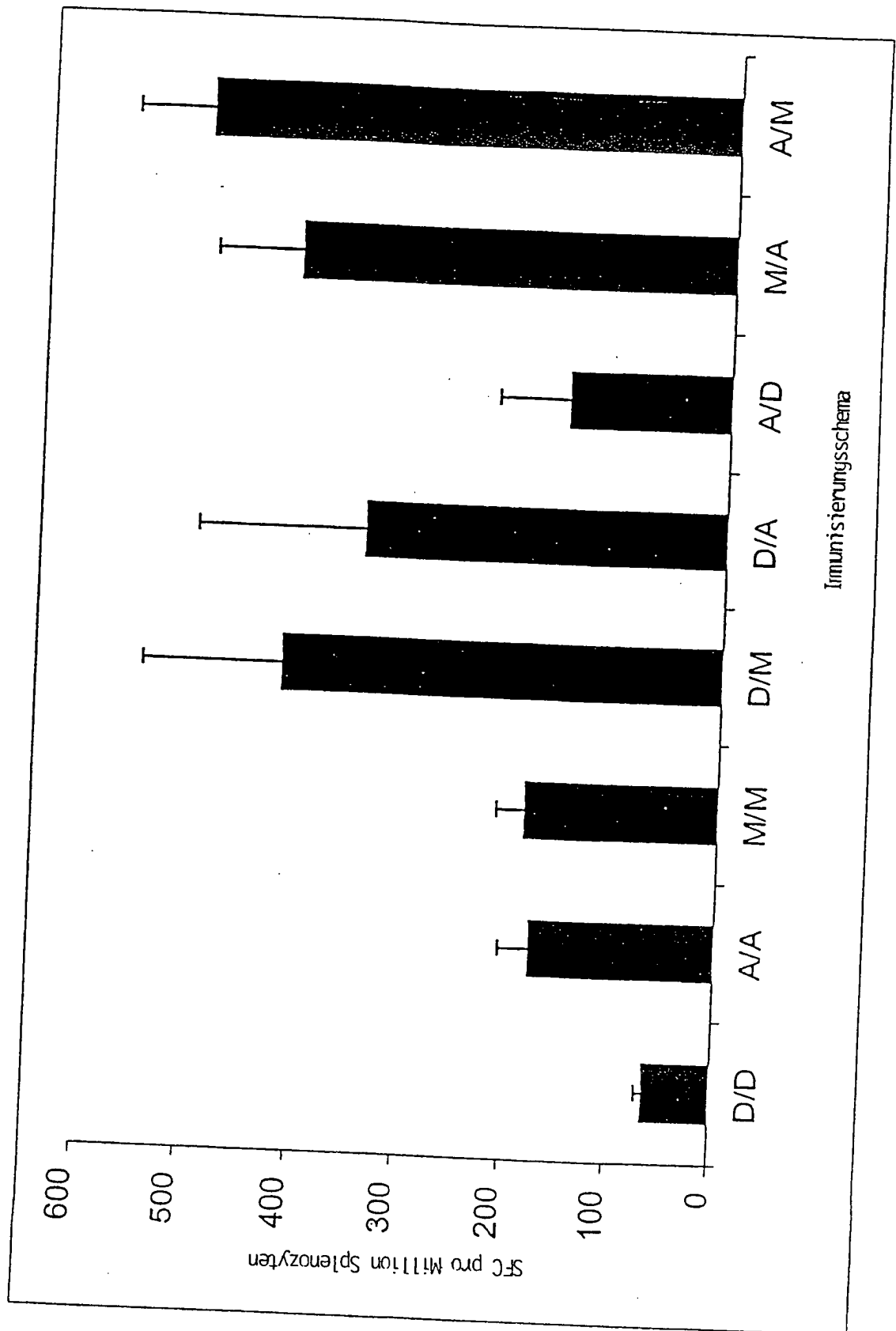
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2



Figur 3

