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

(10) **DE 695 33 920 T2** 2005.12.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 750 513 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 920.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/03311**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 913 733.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024923**
(86) PCT-Anmeldetag: **16.03.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **21.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 39/002**
A61K 39/02, A61K 39/118, A61K 39/12, A61K 39/295, C07K 17/00

(30) Unionspriorität:
210421 **16.03.1994** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Mount Sinai School of Medicine of the City University of New York, New York, N.Y., US

(72) Erfinder:
SRIVASTAVA, Pramod K., New York, US

(74) Vertreter:
Andrae Flach Haug, 81541 München

(54) Bezeichnung: **Stressproteinpeptidkomplexe als prophylaktische und therapeutische Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene**

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 Erfindung betrifft generell das Gebiet der Impfstoffentwicklung. Genauer gesagt betrifft die Erfindung die Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Impfstoffe, die gegen intrazelluläre Pathogene wirksam sind.

[0002] Die Entwicklung von Impfstoffen, die gegen intrazelluläre Pathogene gerichtet sind, zum Beispiel Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze und intrazelluläre Parasiten, ist im Gange. Die Entwicklung und der Einsatz von Impfstoffen haben sich für die Verhinderung einer Ausbreitung von Erkrankungen des Menschen als von unschätzbarem Wert erwiesen. Zum Beispiel waren die Pocken 1967 in 33 Ländern endemisch, wobei jährlich 10 bis 15 Millionen Fälle berichtet wurden. Zu dieser Zeit startete die Weltgesundheitsorganisation ein Programm zur Ausrottung der Pocken. Ungefähr ein Jahrzehnt später waren die Pocken erfolgreich aus der menschlichen Population ausgerottet worden.

[0003] Theoretisch hat ein idealer Impfstoff eine lange Lagerfähigkeit, ist imstande, mit einer einzigen Dosis eine lang anhaltende Immunität gegen ein ausgewähltes Pathogen und alle seine phänotypischen Varianten hervorzurufen, ist nicht imstande, die Krankheit zu verursachen, gegen die der Impfstoff gerichtet ist, ist therapeutisch und prophylaktisch wirksam, wird auf einfache Weise und ökonomisch mittels Standardverfahren hergestellt und kann auf einfache Weise im Feld verabreicht werden.

[0004] Bis heute sind vier Hauptklassen von Impfstoffen gegen Erkrankungen von Säugetieren entwickelt worden. Zu diesen gehören Lebendimpfstoffe, Tot-Impfstoffe aus ganzen Keimen, Vektor-Impfstoffe und Untereinheiten-Impfstoffe. Mehrere Übersichtsarbeiten diskutieren die Herstellung und die Einsetzbarkeit dieser Impfstoffklassen; siehe zum Beispiel Subbarao et al. (1992) in Genetically Engineered Vaccines, herausgegeben von Ciardi et al., Plenum Press, New York, und Melnick (1985) in High Technology Route to Virus Vaccines, herausgegeben von Dreesman et al., veröffentlicht durch die American Society for Microbiology, wobei diese Offenlegungen hier mit den entsprechenden Quellenangaben aufgenommen werden. Im Folgenden werden die Vorteile und die Nachteile einer jeden der vier Impfstoffklassen zusammengefasst.

[0005] Lebendimpfstoffe umfassen lebende, aber abgeschwächte Pathogene, das heißt nicht-virulente Pathogene, die mit Hilfe genetischer Mutationen „verkrüppelt" wurden. Die Mutationen hindern die Pathogene daran, die Krankheit beim Empfänger oder Geimpften auszulösen. Der primäre Vorteil dieses Impfstofftyps besteht darin, dass der abgeschwächte Organismus das Immunsystem des Empfängers auf die gleiche Weise wie das Wildtyp-Pathogen stimuliert, indem er die natürliche Infektion nachahmt. Außerdem vermehren sich die abgeschwächten Pathogene im Geimpften, wodurch für eine kontinuierliche Zufuhr der antigenen Determinanten zum Immunsystem des Empfängers gesorgt wird. Als Ergebnis davon können Lebendimpfstoffe eine starke, lang anhaltende Immunantwort gegen das Wildtyp-Pathogen hervorrufen. Außerdem können Lebendimpfstoffe die Erzeugung von Antikörpern stimulieren, die das Pathogen neutralisieren. Sie können auch eine Resistenz gegen das Pathogen an dessen natürlicher Eintrittspforte in den Wirt hervorrufen. Bis heute wurden Lebendimpfstoffe gegen Pocken, Gelbfieber, Masern, Mumps, Röteln, Poliomyelitis, das Adenovirus und Tuberkulose entwickelt.

[0006] Mit Lebendimpfstoffen sind jedoch mehrere Probleme verbunden. Erstens besteht immer das Risiko, dass das abgeschwächte Pathogen zu einem virulenten Phänotyp revertieren könnte. Im Falle einer phänotypischen Reversion kann der Impfstoff tatsächlich die Krankheit auslösen, gegen die er konstruiert wurde, um eine Immunität bereit zu stellen. Zweitens ist es teuer und kann unpraktisch sein, Lebendimpfstoffe gegen Pathogene zu entwickeln, die kontinuierlich ihre antigenen Determinanten verändern. Zum Beispiel ist es Forschern nicht gelungen, einen einsetzbaren Lebendimpfstoff gegen das Influenzavirus zu entwickeln, da das Virus kontinuierlich die antigenen Determinanten seiner Hüllproteine verändert. Drittens können Lebendimpfstoffe nicht gegen Infektionen entwickelt werden, die durch Retroviren und transformierende Viren verursacht werden. Die Nucleinsäuren dieser Viren können sich in das Genom des Empfängers integrieren, was mit dem potentiellen Risiko verbunden ist, dass beim Empfänger Krebs hervorgerufen wird. Viertens kann es sein, dass bei der Herstellung von Lebendimpfstoffen zufällig vorhandene Agenzien, die in den Zellen vorhanden sind, in denen der Impfstoff hergestellt wird, zusammen mit dem abgeschwächten Pathogen gereinigt werden. Zu fremden Viren, die bis jetzt in Impfstoffpräparationen entdeckt wurden, gehören das Avian Leukosis Virus, das Simian-Papovavirus SV40 und das Simian-Cytomegalovirus. Fünftens können Lebendimpfstoffe instabil sein, wodurch ihre Lagerung und ihr Einsatz im Feld begrenzt sind. Derzeit werden Versuche unternommen, Stabilisierungsmittel zu entwickeln, die die Langlebigkeit der aktiven Impfstoffe verbessern.

[0007] Tot-Impfstoffe aus ganzen Keimen umfassen nicht-lebensfähige ganze Organismen. Die Pathogene

werden routinemäßig entweder über eine chemische Behandlung, z. B. eine Formalin-Inaktivierung, oder über eine Behandlung mit letalen Strahlungsdosen inaktiviert. Tot-Impfstoffe aus ganzen Keimen wurden gegen Keuchhusten, Fleckfieber, Typhus, Paratyphus und spezielle Influenzastämme entwickelt.

[0008] Im Prinzip sind Tot-Impfstoffe gewöhnlich sicher hinsichtlich ihrer Verabreichung, da es unwahrscheinlich ist, dass die Organismen die Krankheit im Wirt verursachen. Weiterhin tendieren die Impfstoffe, da der Organismus tot ist, dazu, stabil zu sein und lange Lagerfähigkeiten zu zeigen. Es sind jedoch mehrere Nachteile mit den Tot-Impfstoffen aus ganzen Keimen assoziiert. Erstens ist bei ihrer Herstellung beträchtliche Sorgfalt erforderlich, um sicher zu stellen, dass keine lebenden Pathogene im Impfstoff verbleiben. Zweitens sind Impfstoffe dieses Typs Im Allgemeinen bezüglich der Stimulierung zellulärer Reaktionen unwirksam, und sie neigen dazu, unwirksam gegen intrazelluläre Pathogene zu sein. Drittens ist die Immunität, die durch Tot-Impfstoffe hervorgerufen wird, üblicherweise von kurzer Dauer und muss später aufgefrischt werden. Dieser Prozess beinhaltet, dass die Personen, die eine Impfung benötigen, wiederholt erreicht werden müssen, und er ist auch mit der Sorge verbunden, dass der Geimpfte gegenüber dem Wildtyp-Pathogen hypersensibilisiert wird.

[0009] Vektorimpfstoffe, die auch als rekombinante Lebendimpfstoffe bekannt sind, können hergestellt werden, indem ein Gen, das für eine spezifische interessierende antigene Determinante codiert, in ein lebendes, aber harmloses Virus oder Bakterium inkorporiert wird. Der harmlose Vektororganismus wiederum wird in den vorgesehen Empfänger injiziert. Theoretisch wird der rekombinante Vektororganismus im Wirt repliziert, wodurch die antigene Determinante produziert und dem Immunsystem des Wirts präsentiert wird. Man stellt sich vor, dass dieser Impfstofftyp wirksamer sein wird als der nicht-replizierende Impfstofftyp. Damit ein derartiger Impfstoff erfolgreich ist, muss der Vektor lebensfähig sein und entweder natürlicherweise nicht virulent sein oder einen abgeschwächten Phänotyp haben.

[0010] Zu derzeit bevorzugten Vektoren gehören spezielle Stämme des Vaccinia-Virus (Kuhpockenvirus), des Adenovirus, des Adeno-assoziierten Virus, von Salmonella und Mycobacteria. Lebende Stämme des Vaccinia-Virus und von Mycobacteria wurden Menschen auf sichere Weise in Form von Impfstoffen gegen Windpocken bzw. Tuberkulose (BCG-Impfstoffe) verabreicht. Für sie wurde gezeigt, dass sie fremde Proteine exprimieren und nur geringe oder keine Umwandlungen zu virulenten Phänotypen zeigen. Verschiedene Typen von Vektorimpfstoffen, die den BCG-Vektor einsetzen, werden derzeit gegen das humane Immunschwächevirus (HIV) entwickelt. Zum Beispiel wurden die antigenen HIV-Proteine gag, env, HIV-Protease, reverse Transkriptase, gp120 und gp41 einzeln in den BCG-Vektor eingeführt, und es wurde gezeigt, dass sie in Tiermodellen T-Zell-vermittelte Immunreaktionen gegen die HIV-Proteine hervorrufen (Aldovini et al. (1991), Nature 351: 479–482, Stover et al. (1991), Nature 351: 456–460, Colston (1991), Nature 351: 442–443).

[0011] Vektorimpfstoffe sind imstande, eine Vielzahl fremder Gene zu tragen, wodurch sie die gleichzeitige Impfung gegen verschiedene ausgewählte antigene Determinanten ermöglichen. Zum Beispiel haben Forscher gentechnologisch mehrere HIV-Gene in das Vaccinia-Virus-Genom eingeführt, wodurch multivalente Impfstoffe erzeugt wurden, die deshalb theoretisch imstande sind, eine gleichzeitige Reaktion gegen verschiede HIV-Proteine zu stimulieren.

[0012] Mit Vektorimpfstoffen sind verschiedene Nachteile verbunden. Erstens ist es notwendig, geeignete Stämme lebensfähiger, aber nicht-pathogener Organismen zu identifizieren, die als Träger für die interessierenden Gene fungieren könnten. Zweitens können Vektorimpfstoffe nur hergestellt werden, wenn potentiell protektive antigene Determinanten identifiziert und charakterisiert wurden. Dementsprechend können Vektorimpfstoffe nicht gegen Pathogene hergestellt werden, deren antigene Determinante nicht identifiziert wurde oder so variabel ist, dass eine Identifizierung der antigenen Determinante für alle Varianten nicht machbar ist. Drittens müssen die Gene, die für die ausgewählte antigene Determinante codieren, im bevorzugten Trägerorganismus stabil transfiziert und exprimiert werden. Demnach sind die Verfahren, die für die Entwicklung dieses Impfstofftyps erforderlich sind, sowohl arbeitsintensiv als auch zeitraubend. Viertens wurde noch nicht bestätigt, dass rekombinante Vektorimpfstoffe einen Empfänger wirksam gegen ein ausgewählte Pathogen immunisieren.

[0013] Untereinheiten-Impfstoffe umfassen üblicherweise ein subzelluläre Komponente, die aus dem interessierenden Pathogen gereinigt wurde. Untereinheiten-Impfstoffe sind Im Allgemeinen sicher bezüglich ihrer Anwendung, da es unwahrscheinlich ist, dass die subzellulären Komponenten im Empfänger eine Krankheit verursachen. Die gereinigte subzelluläre Komponente kann entweder eine definierte subzelluläre Fraktion, ein gereinigtes Protein, eine Nucleinsäure oder ein Polysaccharid sein, die bzw. das eine antigene Determinante besitzt, die imstande ist, eine Immunreaktion gegen das Pathogen zu stimulieren. Die antigenen Komponenten können aus einer Präparation des aufgebrochenen Pathogens gereinigt werden. Alternativ können die antige-

nen Proteine, Nucleinsäuren oder Polysaccharide mittels Verfahren, die auf diesem Gebiet gut bekannt sind, synthetisiert werden. Zu Krankheiten, die mit Impfstoffen vom Untereinheiten-Typ behandelt wurden, gehören Cholera, Diphtherie, Hepatitis B, Poliomyelitis, Tetanus und bestimmte Influenzastämme.

[0014] Es gibt jedoch verschiedene Nachteile, die mit Untereinheiten-Impfstoffen assoziiert sind. Erstens ist es wichtig, die protektive antigene Determinante zu identifizieren und zu charakterisieren. Das kann ein arbeitsintensiver und zeitraubender Prozess sein. Als Ergebnis davon kann es sein, dass es nicht machbar ist, Untereinheiten-Impfstoffe gegen Pathogene mit hochvariablen antigenen Determinanten zu entwickeln. Zweitens sind Untereinheiten-Impfstoffe Im Allgemeinen unwirksam bezüglich der Stimulierung von Reaktionen zytotoxischer T-Zellen, und so kann es sein, dass sie unwirksam bezüglich der Stimulierung einer Immunreaktion gegen intrazelluläre Pathogene sind. Drittens ist die Immunität, die durch Untereinheiten-Impfstoffe hervorgerufen wird, üblicherweise von kurzer Dauer, und wie bei den Tot-Impfstoffen aus ganzen Keimen muss sie zu einem späteren Zeitpunkt aufgefrischt werden, was mit Bedenken bezüglich einer Hypersensibilisierung des Geimpften gegen das Wildtyp-Pathogen verbunden ist.

[0015] Bis jetzt waren viele der Tot-Impfstoffe aus ganzen Keimen und der Untereinheiten-Impfstoffe als solche nicht immunogen genug, um eine starke schützende Reaktion hervorzurufen. Deshalb werden Immunstimulanzien, zu denen beispielsweise Aluminiumhydroxid, intakte Mycobakterien und/oder Bestandteile von Mycobakterien gehören, zusammen mit diesen Impfstoffen verabreicht, um die vom Impfstoff stimulierte Immunreaktion zu verstärken. Vor einiger Zeit haben Experimente gezeigt, dass Heat-Shock-Proteine von Mycobakterien als Träger für Peptid-Impfstoffe dienen können und dadurch die Immunogenität der Peptide in vivo verstärken (Lussow et al. (1991), Eur. J. Immunol. 21: 2297–2302). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Verabreichung einer Zusammensetzung, die ein antigenes Peptid umfasst, das chemisch mit einem gereinigten Stressprotein von Mycobakterien vernetzt ist, an Mäuse eine humorale (antikörpervermittelte) und nicht eine temporäre (zellvermittelte) Reaktion gegen das antigene Peptid stimuliert (Barrios et al. (1992), Eur. J. Immunol. 22: 1365–1372). WO-A-9403208 bezieht sich auf Impfstoffe, die Heat-Shock-Proteine enthalten. Blachere et al., März 1993, J. Cell. Biochem. Suppl. 17D: 124 (Abstract NZ 502) offenbaren, daas Influenza-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) aus den Milzen von Mäusen erhalten werden können, die mit gp96 immunisiert wurden, das aus Influenza (PR8)-infizierten Zellen oder aus Zellen, die mit dem NP-Gen des Influenzavirus transfiziert worden waren, erhalten worden war. Blachere et al., Journal of Immunotherapy 14: 353–356, 1993, beziehen sich auf die gleiche experimentelle Arbeit, die mit dem Influenza-NP-Gen transfizierte Zellen einsetzte, wie diejenige, die im Abstract von Blachere beschrieben wurde, und sie beziehen sich auch auf die Verwendung der SV40-transformierten Linie C57BL.6 SVB6, d. h. einer mit SV40 infizierten Mäusezelllinie. MLTCs, die aus den Milzen von Mäusen, die mit gp96 aus der SV40-infizierten Zelllinie SVB6 immunisiert worden waren, erzeugt wurden, zeigten eine CTL-Reaktivität gegen SVB6, aber nicht gegen eine nicht mit SV40-transformierte, syngene Zelllinie.

[0016] Da jedoch allgemein davon ausgegangen wird, dass zelluläre Reaktionen für eine Immunisierung gegen intrazelluläre Pathogene erforderlich sind (siehe zum Beispiel „Advanced Immunology", Male et al. (1991), Gower Medical Publishing; Raychaudhuri et al. (1993), Immunology Today 14: 344–348), stellt man sich davor, dass herkömmliche Untereinheiten-Impfstoffe und Impfstoffe aus inaktivierten ganzen Organismen bezüglich der Stimulierung von Immunreaktionen, insbesondere zytotoxischer T-Zell-Reaktionen, gegen intrazelluläre Pathogene unwirksam sein könnten.

[0017] Die Erfindung betrifft einen sicheren Untereinheiten-Impfstoff, der einen Stressprotein-Peptid-Komplex, der imstande ist über eine zytotoxische T-Zell-Reaktion eine Resistenz gegenüber einer Infektion durch ein ausgewähltes intrazelluläres Pathogen hervorzurufen, für die Verabreichung an ein Säugetier umfasst. Die gemäß der Erfindung hergestellten Impfstoffe können dazu verwendet werden, eine Immunreaktion gegen ein intrazelluläres Pathogen hervorzurufen, dessen antigene Determinanten identifiziert wurden, noch nicht identifiziert wurden oder bei dem es nicht machbar ist, jede der antigenen Determinanten zu isolieren und zu charakterisieren. Die gemäß der Erfindung hergestellten Impfstoffe können gegen ausgewählte Pathogene prophylaktisch und therapeutisch wirksam sein.

[0018] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Bewirkung einer Resistenz gegenüber einer Infektion durch ein intrazelluläres Pathogen bei einem Säugetier über die Verabreichung eines Untereinheiten-Impfstoffs aus einem Stressprotein und einem Peptid an das Säugetier. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur schnellen und kostengünstigen Erzeugung kommerziell herstellbarer Mengen der Stressprotein-Peptid-Impfstoffe aus einer mit dem intrazellulären Pathogen infizierten Zelle oder Zelllinie oder, alternativ, aus einer Zelle oder Zelllinie, die mit einem Gen transfiziert wurde, das für eine spezifische antigene Determinante codiert, und die dieses Gen exprimiert. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines immu-

nogenen Untereinheiten-Impfstoffs aus einem Stressprotein und einem Peptid über das Rekonstituieren von in vitro immunologisch nicht-reaktiven Stressproteinen und Peptiden, wodurch immunreaktive Komplexe erzeugt werden, die imstande sind, eine Immunreaktion gegen ein ausgewähltes intrazelluläre Pathogen zu stimulieren.

[0019] Diese und andere Ziele und Merkmale der Erfindung werden aus der Beschreibung und den Zeichnungen und Ansprüchen, die folgen, klarer werden.

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt einen gereinigten immunogenen Komplex aus einem Säugetier-Stressprotein und einem Peptid, wie er im Anspruch 1 definiert ist, bereit; die Verwendung eines gereinigten immunogenen Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexes für die Herstellung eines Medikaments, wie es im Anspruch 25 definiert ist; ein Verfahren zur Erzeugung eines gereinigten immunogenen, nicht-kovalenten Komplexes, wie es im Anspruch 29 definiert ist; einen gereinigten immunogenen, nicht-kovalenten Komplex, wie er im Anspruch 35 definiert ist; einen Komplex für die Verwendung als Medikament, wie er im Anspruch 39 oder im Anspruch 45 definiert ist; die Verwendung eines Komplexes für die Herstellung eines Medikaments, wie sie im Anspruch 40 oder im Anspruch 46 definiert ist; gereinigte immunogene Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexe, wie sie im Anspruch 41 oder im Anspruch 42 definiert sind; eine Zusammensetzung, wie sie im Anspruch 47 definiert ist; und die Verwendung einer Zusammensetzung, wie sie im Anspruch 49 definiert ist.

[0021] Es ist nun entdeckt worden, dass ein Untereinheiten-Impfstoff, der einen Stressprotein-Peptid-Komplex enthält, wenn er aus Zellen isoliert wird, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert wurden, und dann einem Säugetier verabreicht wird, wirkungsvoll zelluläre Immunreaktionen gegen Zellen, die mit dem gleichen Pathogen infiziert sind, stimulieren kann. Im Einzelnen wird die Immunreaktion über die zytotoxische T-Zell-Kaskade vermittelt, die auf Zellen gerichtet ist, die intrazelluläre Pathogene enthalten, und die diese zerstört.

[0022] Die gemäß den hier beschriebenen Verfahren hergestellten Impfstoffe stellen einen alternativen Ansatz zur Stimulierung der zellulären Immunität bereit, durch den die Verwendung lebender (abgeschwächter oder sonstiger) intrazellulärer Pathogene unnötig wird. Außerdem sind die hier beschriebenen Impfstoffe ideal für die Induktion von Immunreaktionen gegen intrazelluläre Pathogene, die entweder definierte oder noch undefinierte immunogene Determinanten besitzen. Weiterhin können die Impfstoffe dazu verwendet werden, Immunreaktionen gegen intrazelluläre Pathogene hervorzurufen, deren antigene Determinanten entweder verschiedenartig sind oder sich dauernd ändern, was die Isolierung und Charakterisierung antigener Determinanten nicht machbar erscheinen lässt.

[0023] In einem bevorzugten Aspekt umfasst die Erfindung einen Impfstoff, der einem Säugetier zur Hervorrufung einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion im Säugetier gegen ein ausgewähltes intrazelluläres Pathogen verabreicht werden kann. Man stellt sich auch vor, dass die Impfstoffe im Säugetier über, eine zytotoxische T-Zell-Reaktion eine Resistenz gegenüber einer Infektion durch das ausgewählte intrazelluläre Pathogen bewirken können. Die gemäß den hier beschriebenen Prinzipien hergestellten Impfstoffe enthalten einen immunogenen Stressprotein-Peptid-Komplex, der imstande ist, im Empfänger eine zytotoxische T-Zell-Reaktion hervorzurufen, die gegen Zellen gerichtet ist, die mit dem interessierenden Pathogen infiziert sind. Der Komplex kann, wenn er mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Adjuvans oder Hilfsstoff kombiniert wurde, einem Säugetier mittels Techniken, die auf diesem Gebiet bekannt sind, verabreicht werden.

[0024] Der Begriff „Impfstoff" soll, wie er hier verwendet wird, so verstanden werden, dass er eine beliebige Zusammensetzung bedeutet, die einen Stressprotein-Peptid-Komplex enthält, der wenigstens eine antigene Determinante aufweist, die, wenn sie einem Säugetier verabreicht wird, im Säugetier eine Immunreaktion gegen die antigene Determinante stimuliert.

[0025] Der Begriff „Stressprotein" soll, wie er hier verwendet wird, ein beliebiges zelluläres Protein bedeuten, das die folgenden Kriterien erfüllt. Es ist ein Protein, dessen intrazelluläre Konzentration ansteigt, wenn eine Zelle einem Stressstimulus ausgesetzt wird, das imstande ist, an andere Proteine oder Peptide zu binden, und das imstande ist, die gebundenen Proteine oder Peptide in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) oder bei niedrigem pH freizusetzen. Zu Stressstimuli gehören, ohne aber auf diese beschränkt zu sein, ein Hitzeschock, ein Nährstoffmangel, eine Störung des Metabolismus, Sauerstoffradikale und eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen.

[0026] Es wird einem Fachmann auf diesem Gebiet nach dem Lesen dieser Offenbarung klar sein, dass andere rekombinante Stressproteine, einschließlich nicht nativer Formen, verkürzter Analoge, von Muteinen, Fu-

sionsproteinen sowie anderen Proteinen, die imstande sind, die Bindung und die immunogenen Eigenschaften eines Stressproteins nachzuahmen, bei der Herstellung der hier offenbarten Stressprotein-Peptid-Impfstoffe eingesetzt werden können.

[0027] Die ersten Stressproteine, die identifiziert wurden, waren die Heat-Shock-Proteine (Hsp). Wie ihr Name nahe legt, werden Hsps durch eine Zelle als Reaktion auf einen Hitzeschock induziert. Es wurden drei Hauptfamilien von Hsp identifiziert und Hsp60, Hsp70 und Hsp90 genannt, und zwar aufgrund ihrer jeweiligen Molekulargewichte von ungefähr 60, 70 und 90 Kilodalton. Für viele Mitglieder dieser Familien wurde später gefunden, dass sie als Reaktion auf andere Stressstimuli, wie die oben erwähnten, induziert werden.

[0028] Stressproteine finden sich in allen Prokaryoten und Eukaryoten, und sie weisen ein bemerkenswertes Ausmaß einer Konservierung während der Evolution auf. Zum Beispiel zeigt DnaK, das Hsp70 aus E. coli, eine ungefähr 50%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit Hsp70-Proteinen aus Eukaryoten (Bardwell et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848–852). Die Hsp60- und Hsp90-Familien zeigen ebenfalls eine ähnlich hohe intrafamiliäre Konservierung (Hickey et al. (1989), Mol. Cell. Biol. 9: 2615–2626, Jindal (1989), Mol. Cell. Biol. 9: 2279–2283). Außerdem wurde entdeckt, dass die Hsp-60-, Hsp-70- und Hsp-90-Familien aus Proteinen bestehen, die hinsichtlich ihrer Sequenz mit den Stressproteinen verwandt sind und zum Beispiel mehr als 35% Aminosäureübereinstimmung zeigen, aber deren Expressionsausmaß typischerweise unter Bedingungen, die für die Wirtszelle mit Stress verbunden sind, unverändert bleibt. Ein Beispiel für ein derartiges Protein ist das konstitutiv exprimierte cytosolische Protein Hsc70, das bezüglich der Aminosäuresequenz mit dem durch Stress induzierten Protein Hsp70 verwandt ist. Dementsprechend stellt man sich vor, dass die Definition Stressprotein, wie sie hier verwendet wird, andere Proteine, Muteine, Analoge und Varianten von diesen umfasst, die wenigstens 35% bis 55%, vorzugsweise 55% bis 75% und am bevorzugtesten 75% bis 95% Aminosäureübereinstimmung mit Mitgliedern der drei Familien, deren Expression in einer Zelle als Reaktion auf Stressstimuli stimuliert wird, aufweisen.

[0029] Der Begriff „Peptid" soll, wie er hier verwendet wird, so verstanden werden, dass er jede beliebige Aminosäuresequenz bedeutet, die in einer eukaryotischen Zelle vorliegt, die mit einem intrazellulären Pathogen infiziert ist, die aber nicht in einer ähnlichen Zelle vorliegt, wenn die Zelle nicht mit dem gleichen Pathogen infiziert ist. Die Definition schließt Peptide ein, die vom intrazellulären Pathogen abstammen.

[0030] Der Begriff „immunogener Stressprotein-Peptid-Komplex" soll, wie er hier verwendet wird, jeden beliebigen Komplex bedeuten, der ein Stressprotein und ein Peptid enthält, das imstande ist, in einem Säugetier eine Immunreaktion hervorzurufen. Die Peptide sind mit dem Stressprotein nicht-kovalent assoziiert. Die Komplexe können, ohne auf diese beschränkt zu sein, Hsp60-Peptid-, Hsp70-Peptid- und Hsp90-Peptid-Komplexe umfassen. In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung kann ein Stressprotein, das zur Hsp90-Familie gehört, nämlich gp96, dazu verwendet werden, einen wirksamen Impfstoff zu erzeugen, der einen gp96-Peptid-Komplex enthält. Da die Peptide in Gegenwart von ATP oder bei niedrigem pH vom Komplex dissoziiert werden können, können potentiell antigene Peptide aus Zellen, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert wurden, isoliert werden. Demnach können die antigenen Determinanten für potentiell jedes beliebige interessante intrazelluläre Pathogen mittels der hier beschriebenen Verfahren leicht identifiziert werden.

[0031] Der Begriff „zytotoxische T-Zelle" soll, wie er hier verwendet wird, so verstanden werden, dass er jeden beliebigen T-Lymphozyten bedeutet, der den Glycoprotein-Marker CD8 auf der Zelloberfläche exprimiert und der imstande ist, eine Zelle zu erkennen und zu lysieren, die auf ihrer Zelloberfläche einen Klasse-I-Histokompatibilitätskomplex trägt und die mit einem intrazellulären Pathogen infiziert ist. Der Begriff „zytotoxische T-Zell-Reaktion" soll so verstanden werden, dass sie jede beliebige zytotoxische Aktivität bedeutet, die durch zytotoxische T-Zellen vermittelt wird.

[0032] So wie er hier verwendet wird, soll der Begriff „intrazelluläres Pathogen" so verstanden werden, dass er jeden beliebigen lebenden Organismus umfasst, einschließlich von, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und intrazellulären Parasiten, die imstande sind, innerhalb einer Säugetierzelle zu existieren und bei einem Säugetier eine Krankheit zu verursachen.

[0033] In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung haben die Stressprotein-Peptid-Impfstoffe einen besonderen Nutzen bei der Behandlung humaner Erkrankungen, die durch intrazelluläre Pathogene verursacht werden. Man stellt sich vor, dass die mittels der hier beschriebenen Prinzipien entwickelten Impfstoffe zur Behandlung von Erkrankungen anderer Säugetiere, zum Beispiel von Tieren auf dem Bauernhof, einschließlich von Rindern, Pferden, Ziegen, Schafen und Schweinen, sowie von Haustieren, einschließlich von Katzen und Hunden, nützlich sein werden.

[0034] Es können Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit Viren infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, gehören Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Influenza, Varicella, Adenovirus, Herpes simplex Typ I (HSV-I), Herpes simplex Typ II (HSV-II), Rinderpest, Rhinovirus, Echovirus, Rotavirus, respiratorisches Syncytialvirus, Papillomvirus, Papovavirus, Cytomegalovirus, Echinovirus, Arbovirus, Huntavirus, Coxsackie-Virus, Mumpsvirus, Masernvirus, Rubellavirus, Poliovirus, humanes Immunschwächevirus Typ I (HIV-I) und humanes Immunschwächevirus Typ II (HIV-II). Es können auch Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Bakterien infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Mycobacteria, Rickettsia, Mycoplasma, Neisseria und Legionella gehören. Es können auch Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Protozoen infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Leishmania, Kokzidioa und Trypanosoma gehören. Es können auch Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Parasiten infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Chlamydia und Rickettsia gehören.

[0035] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann der Stressprotein-Peptid-Impfstoff auch eine therapeutisch wirksame Menge eines Cytokins enthalten. So wie er hier verwendet wird, soll der Begriff „Cytokin" er ein beliebiges sekretiertes Polypeptid bedeuten, das die Funktion anderer Zellen, die eine Immunreaktion vermitteln, beeinflusst. Derzeit gehören zu bevorzugten Cytokinen Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-9 (IL-9), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-12 (IL-12), Interferon α (IFNα), Interferon β (IFNβ), Interferon γ, (INFγ), Tumornekrosefaktor α (TNFα), Tumornekrosefaktor β (TNFβ), Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF-β). Man stellt sich vor, dass andere, noch nicht entdeckte Cytokine in dieser Erfindung wirksam sein können. Außerdem können herkömmliche Antibiotika zusammen mit dem Stressprotein-Peptid-Komplex verabreicht werden. Die Auswahl eines geeigneten Antibiotikums oder einer Kombination von solchen hängt jedoch von der jeweiligen Erkrankung ab.

[0036] Es wurde entdeckt, dass der Impfstoff die zytotoxische T-Zell-Reaktion über die Kaskade des Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klasse I stimuliert. Somit kann man sich vorstellen, dass die zytotoxische T-Zell-Reaktion durch die gleichzeitige Verabreichung des Impfstoffs mit einer therapeutisch wirksamen Menge eines Cytokins oder mehrerer Cytokine, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen potenzieren oder modulieren, weiter verstärkt werden kann.

[0037] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stimulierung einer zellulären Immunreaktion eines Säugetiers, insbesondere einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion gegen Zellen, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert sind. Das Verfahren beinhaltet das Verabreichen eines Impfstoffs, der gemäß den hier offenbarten Prinzipien hergestellt wurde, an ein Säugetier, und zwar in einer Menge, die ausreicht, in dem Säugetier eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das ausgewählte intrazelluläre Pathogen hervorzurufen.

[0038] Der Impfstoff kann einem Säugetier prophylaktisch verabreicht werden, um im Säugetier eine zytotoxische T-Zell-Reaktion zu stimulieren, die eine nachfolgende Infektion des Säugetiers mit dem intrazellulären Pathogen verhindert. Alternativ kann der Impfstoff einem Säugetier, das eine Krankheit hat, die durch ein intrazelluläres Pathogen verursacht wird, therapeutisch verabreicht werden. Man stellt sich vor, dass der Impfstoff eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen Zellen stimuliert, die zu diesem Zeitpunkt mit dem intrazellulären Pathogen infiziert sind.

[0039] Die Dosierung und die Art der Verabreichung der Familie von Stressprotein-Peptid-Impfstoffen hängen notwendigerweise von der Art des Komplexes des intrazellulären Pathogens und der Art der jeweiligen Erkrankung ab. Der Komplex sollte in einer Menge verabreicht werden, die ausreicht, eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das intrazelluläre Pathogen zu bewirken. Im Allgemeinen kann die Menge des Stressprotein-Peptid-Komplexes, die verabreicht wird, im Bereich von ungefähr 0,1 bis ungefähr 1000 µg Komplex/kg Körpergewicht des Tieres/Immunisierung liegen, und vorzugsweise im Bereich von ungefähr 0,5 bis 100 µg Komplex/kg Körpergewicht des Tieres/Immunisierung. Der Empfänger sollte vorzugsweise 4-mal in einwöchigen Abständen geimpft werden. Wenn es erforderlich ist, können die Reaktionen zu einem späteren Zeitpunkt durch eine nachfolgende Verabreichung des Impfstoffs aufgefrischt werden. Man stellt sich jedoch vor, dass die optimale Dosierung und der optimale Impfplan für jeden Stressprotein-Peptid-Impfstoffkomplex von einem Fachmann mittels herkömmlicher Techniken, die in diesem Fachgebiet gut bekannt sind, empirisch bestimmt werden kön-

nen.

[0040] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung verschiedene Verfahren zur Herstellung kommerziell verfügbarer Mengen des Stressprotein-Peptid-Impfstoffe bereit, die, wenn sie einem Säugetier verabreicht werden, im Säugetier eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen Zellen, die mit einem ausgewählten Antigen infiziert sind, induzieren. Bei einem Ansatz kann der Stressprotein-Peptid-Komplex mittels herkömmlicher Proteinreinigungsverfahren aus einer Gewebeprobe, einer isolierten Zelle oder einer immortalisierten Zelllinie, die mit dem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert ist, gewonnen werden, oder eine isolierte Zelle oder eine immortalisierte Zelllinie kann mit einem Gen, das für eine ausgewählte antigene Determinante codiert, transfiziert werden und dieses exprimieren. Der gereinigte Komplex kann anschließend gelagert oder für die Verabreichung als Impfstoff mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger kombiniert werden.

[0041] Alternativ kann der Stressprotein-Peptid-Komplex durch das Rekonstituieren eines potentiell antigenen Peptids und eines Stressproteins in vitro hergestellt werden. Zum Beispiel kann das antigene Peptid entweder aus einem gereinigten Stressprotein-Peptid-Komplex oder einem MHC-Peptid-Komplex mittels Verfahren, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, eluiert werden. Im Einzelnen können die Peptide aus dem Stressprotein-Peptid-Komplex durch das Inkubieren des Komplexes in Gegenwart von ATP oder bei niedrigem pH eluiert werden.

[0042] Alternativ können die Peptide aus dem MHC-Peptid-Komplex durch das Inkubieren des Komplexes in Gegenwart von Trifluoressigsäure (TFA) eluiert werden. Die resultierenden Peptide können mittels Reverse-Phase-HPLC gereinigt werden, und ihre Aminosäuresequenzen können mittels Standardverfahren der Proteinsequenzierung bestimmt werden. Peptide definierter Sequenz können dann mittels herkömmlicher Peptidsyntheseverfahren synthetisiert werden. Stressproteine können direkt aus Zellen, die natürlicherweise die Stressproteine exprimieren, gereinigt werden. Alternativ können rekombinante Stressproteine, einschließlich von nicht-nativen Formen, verkürzten Analogen, Muteinen, Fusionsproteinen sowie anderen Konstrukten, die imstande sind, die Peptidbindung und die immunogenen Eigenschaften von Stressproteinen nachzuahmen, mittels herkömmlicher gentechnologischer Verfahren exprimiert werden. Zum Beispiel kann ein rekombinantes Stressprotein von rekombinanter DNA entweder in einem eukaryotischen oder in einem prokaryotischen Expressionssystem exprimiert und dann aus dem Expressionssystem gereinigt werden. Die beiden gereinigten Komponenten können dann in vitro kombiniert werden, um einen synthetischen und vollständig definierten Stressprotein-Peptid-Komplex zu erzeugen. Die Immunogenität und die Spezifität der rekombinanten Komplexe können anschließend in vitro und in vivo getestet werden, um nützliche Komplexkandidaten zu identifizieren, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen ein ausgewähltes intrazelluläres Pathogen stimulieren. Nach der Identifizierung können die synthetischen Komplexe in jedem beliebigen Maßstab hergestellt werden, so wie sie sind gelagert werden oder mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern für die Verabreichung an Säugetiere kombiniert werden.

[0043] Das Vorangehende sowie andere Ziele und Merkmale der Erfindung sowie die Erfindung selbst können anhand der folgenden Beschreibung, wenn sie zusammen mit den begleitenden Zeichnungen gelesen wird, besser verstanden werden.

[0044] Fig. 1 zeigt die antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität von Splenozyten, die von Mäusen stammen, die mit einem gp96-Peptid-Komplex immunisiert wurden, der aus BALB/c-Fibroblasten gewonnen wurde, die mit dem Nucleoprotein-Gen (NP-Gen) aus dem PR8-Influenzavirus transfiziert worden waren. Die zytotoxische Aktivität wurde über die Freisetzung von ^{51}Cr aus BALB/c-Fibroblasten, die das NP-Gen exprimieren (ausgefüllte Kreise), aus BALB/c-Fibroblasten, die das NP-Gen exprimieren, aber mit dem Antiserum K44 gegen Anti-MHC-Typ-I behandelt wurden (offene Kreise), und aus der syngenen, nicht-NP-transfizierten Zelllinie 5117 (Sterne) getestet.

[0045] Fig. 2 zeigt die antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität von Splenozyten, die von Mäusen stammen, die mit einem gp96-Peptid-Komplex immunisiert wurden, der aus SV40-transformierten SVB6-Zellen gewonnen wurde. Die zytotoxische Aktivität wurde über die Freisetzung von ^{51}Cr aus SVB6-Zellen (ausgefüllte Kreise) und aus der nicht-SV40-transformierten, syngenen Zelllinie MCA (offene Kreise) getestet.

[0046] Fig. 3A–Fig. 3D zeigt die antigenspezifischen zytotoxischen T-Zell-Aktivitäten von Splenozyten, die aus zwei Mäusen stammen, die mit einem rekonstituierten Hsp70-Peptid-Komplex immunisiert wurden, wobei das Peptid die Sequenz SLSDLRGYVYQGL (SEQ ID NO: 1) hat. Vor der Durchführung des Tests wurden die Splenozyten der einzelnen Mäuse entweder einmal (Fig. 3A und Fig. 3C) oder zweimal (Fig. 3B und Fig. 3D) in vitro mit letal bestrahlten Zellen stimuliert, die mit dem Peptid SLSDLRGYVYQGL (SEQ ID NO: 1) transfiziert

waren und es exprimierten. Die zytotoxische Aktivität wurde über die Freisetzung von ^{51}Cr aus EL4-Zellen, die das Peptid exprimieren (ausgefüllte Dreiecke), und aus EL4-Zellen, die das Peptid nicht exprimierten (leere Dreiecke), bestimmt.

[0047] Die Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass ein Stressprotein-Peptid-Komplex, wenn er aus einer eukaryotischen Zelle isoliert wird, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert ist, und dann einem Säugetier verabreicht wird, eine zytotoxische T-Zell-Reaktion stimulieren kann, die gegen Zellen gerichtet ist, die mit dem gleichen Pathogen infiziert sind. Die Entdeckung stellt einen beträchtlichen Fortschritt auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung dar.

[0048] Gemäß der Erfindung wird die genannte Entdeckung dazu ausgenützt, eine Familie von Impfstoffen bereit zu stellen, die dazu verwendet werden können, Säugetiere gegen Krankheiten zu immunisieren, die durch intrazelluläre Pathogene verursacht werden. Im Prinzip können die Impfstoffe gegen jedes beliebige interessierende intrazelluläre Pathogen, zum Beispiel Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze oder intrazelluläre Parasiten, hergestellt werden. Allgemeine Verfahren, die für die Herstellung von Impfstoffen gegen alle diese Pathogenklassen nützlich sind, werden im Folgenden detailliert diskutiert.

[0049] Wie Fachleuten auf diesem Gebiet klar sein dürfte, haben die hier beschriebenen Stressprotein-Peptid-Impfstoffe mehrere Vorteile gegenüber den derzeit verfügbaren Impfstoffen. Erstens stellen die Stressprotein-Peptid-Impfstoffe einen alternativen Ansatz zur Stimulierung der zellulären Immunität bereit, und sie machen die Verwendung intakter intrazellulärer (abgeschwächter oder sonstiger) Pathogene unnötig. Zweitens enthalten die Impfstoffe keine intakten Organismen, und das vermindert das Risiko, dass sie die Krankheit verursachen, gegen die die Impfstoffe konstruiert wurden, um eine Immunität zu erzeugen. Drittens sind die hier beschriebenen Impfstoffe ideal für die Hervorrufung von Immunantworten gegen entweder definierte antigene Determinanten, die aus intrazellulären Pathogenen isoliert wurden, oder gegen noch undefinierte antigene Determinanten. Weiterhin können Impfstoffe hergestellt werden, die gegen Pathogene wirksam sind, die normalerweise das Immunsystem umgehen, indem sie neue antigene Hüllproteine entwickeln, d. h. gegen das Influenzavirus. Viertens können Impfstoffe dieses Typs im Prinzip gegen jedes beliebige interessierende intrazelluläre Pathogen hergestellt werden. Fünftens können die Impfstoffe synthetisch mittels Verfahren hergestellt werden, die hier im Folgenden beschrieben werden, wodurch vollständig definierte Impfstoffe bereit gestellt werden, die für eine Verabreichung an Menschen geeignet sind.

[0050] Man stellt sich vor, dass die Impfstoffe entweder prophylaktisch oder therapeutisch verabreicht werden können. Bei einer therapeutischen Verabreichung kann der Impfstoff im Säugetier eine zytotoxische T-Zell-Reaktion stimulieren, die es dem Geimpften ermöglicht, einer nachfolgenden Infektion mit dem intrazellulären Pathogen zu widerstehen. Alternativ kann der Impfstoff, wenn er therapeutisch verabreicht wird, im Säugetier eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen ein Pathogen, das beim Säugetier im Augenblick eine Infektion bewirkt und eine Erkrankung verursacht, stimulieren.

[0051] Die spezifische Komponente des Impfstoffs, die beim Empfänger eine spezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das Pathogen induziert, ist ein Stressprotein-Peptid-Komplex. Das Peptid kann jede beliebige Aminosäuresequenz sein, die in einer eukaryotischen Zelle vorliegt, die mit einem intrazellulären Pathogen infiziert ist, die aber nicht vorhanden ist, wenn eine derartige Zelle nicht mit dem gleichen Pathogen infiziert ist. Das schließt Peptide ein, die vom intrazellulären Pathogen abstammen.

[0052] Die immunogenen Komplexe können aus jeder beliebigen eukaryotischen Zelle gereinigt werden, einschließlich von ganzen Geweben, isolierten Zellen und immortalisierten eukaryotischen Zelllinien, die mit dem intrazellulären Pathogen infiziert sind. Die Komplexe können mittels herkömmlicher Techniken der Proteinreinigung, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, gereinigt werden. Zum Beispiel stellt man sich vor, dass ein immunogener Komplex, der imstande ist, eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das Influenzavirus zu stimulieren, aus einer eukaryotischen Zelllinie gewonnen werden kann, die mit dem Influenzavirus infiziert wurde.

[0053] Außerdem wurde gefunden, dass das Peptid von dem Stressprotein-Komplex entweder in Gegenwart von ATP oder bei niedrigem pH eluiert werden kann. Weder das Peptid noch das Stressprotein allein bewirkt eine Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion. Diese experimentellen Bedingungen können jedoch ausgenützt werden, um Peptide aus infizierten Zellen zu isolieren, die potentiell nützliche antigene Determinanten enthalten können. Nach der Isolierung kann die Aminosäuresequenz eines jeden antigenen Peptids mittels herkömmlicher Verfahren der Aminosäuresequenzierung bestimmt werden. Somit können die antigenen Determinanten für potentiell jedes beliebige intrazelluläre Pathogen, das interessiert, leicht mittels der hier beschriebenen Verfahren identifiziert werden. Wie im Detail später hier diskutiert wird, kann diese Eigenschaft für

die Herstellung vollständig synthetischer Impfstoffe ausgenützt werden.

[0054] Ähnlich wurde gefunden, dass potentiell immunogene Peptide aus MHC-Peptid-Komplexen mittels Techniken eluiert werden können, die auf diesem Gebiet gut bekannt sind; siehe zum Beispiel Falk et al. (1990), Nature 348: 248–251, Rotzsche et al. (1990), Nature 348: 252–254, Elliott et al. (1990), Nature 348: 195–197, Falk et al. (1991), Nature 351: 290–296, Demotz et al. (1989), Nature 334: 682–684, Rotzsche et al. (1990), Science 249: 283–287. Zwar können die Peptide, die aus den MHC-Komplexen eluiert werden, eine potentiell protektive antigene Determinante definieren, aber es sollte klar sein, dass die Verabreichung des isolierten Peptids in einem herkömmlichen Untereinheiten-Impfstoff unwirksam bezüglich der Stimulierung einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion im Empfänger sein kann. Somit stellt man sich vor, dass die Peptide, die aus den MHC-Peptid-Komplexen eluiert werden, mittels der hier beschriebenen Verfahren mit einem Stressprotein rekonstituiert werden können, wodurch ein Stressprotein-Peptid-Komplex erzeugt wird, der wirksam bezüglich der Stimulierung einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion ist, die imstande ist, Zellen, die das antigene Peptid exprimieren, zu erkennen und sie zu lysieren,.

[0055] Ein Stressprotein, das für die Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich ist, kann als jedes beliebige zelluläre Protein, das die folgenden Kriterien erfüllt, definiert werden. Es ist ein Protein, dessen intrazelluläre Konzentration ansteigt, wenn eine Zelle einem Stressstimulus ausgesetzt wird, es ist fähig, andere Proteine oder Peptide zu binden, und es ist fähig, die gebundenen Proteine oder Peptide in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) oder bei niedrigem pH freizusetzen.

[0056] Die ersten Stressproteine, die identifiziert wurden, waren die Heat-Shock-Proteine (Hsp). Wie ihr Name sagt, werden Hsps durch eine Zelle als Reaktion auf einen Hitzeschock synthetisiert. Bis heute sind drei Hauptfamilien von Hsp identifiziert worden, und zwar basierend auf ihrem Molekulargewicht. Die Familien wurden Hsp60, Hsp70 und Hsp90 genannt, wobei die Zahlen das ungefähre Molekulargewicht der Stressproteine in Kilodalton widerspiegeln. Von vielen Mitgliedern dieser Familie wurde später gefunden, dass sie als Reaktion auf andere Stressstimuli induziert werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, ein Nährstoffmangel, eine Störung des Metabolismus, Sauerstoffradikale und eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen gehören; siehe zum Beispiel Welch (Mai 1993), Scientific American 56–64, Young (1990), Annu. Rev. Immunol. 8: 401–420, Craig (1993), Science 260: 1902–1903, Gething et al. (1992), Nature 355: 33–45 und Lindquist et al. (1988), Annu. Rev. Genetics 22: 631–677. Dementsprechend stellt man sich vor, dass Stressproteine, die zu allen drei Familien gehören, nützlich für die Durchführung der vorliegenden Erfindung sein können.

[0057] Die Haupt-Stressproteine können in sehr großen Mengen in gestressten Zellen akkumulieren, aber sie kommen in niedrigen bis mäßigen Mengen in Zellen vor, die nicht gestresst wurden. Zum Beispiel ist das stark induzierbare Hsp70 von Säugetieren bei normalen Temperaturen kaum nachweisbar, aber es wird nach einem Hitzeschock zu einem der am aktivsten synthetisierten Proteine in der Zelle (Welch et al. (1985), J. Cell Biol. 101: 1198–1211). Im Gegensatz dazu sind die Hsp90- und Hsp60-Proteine bei normalen Temperaturen in den meisten, jedoch nicht allen, Säugetierzellen häufig, und sie werden durch Hitze weiter induziert (Lai et al. (1984), Mol. Cell Biol. 4: 2802–10, van Bergen en Henegouwen et al. (1987), Genes Dev. 1: 525–531).

[0058] Stressproteine gehören zu den am stärksten konservierten Proteinen, die es gibt. Zum Beispiel zeigt DnaK, das Hsp70 aus E. coli, eine ungefähr 50%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit Hsp70-Proteinen aus Eukaryoten (Bardwell et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848–852). Die Hsp60- und Hsp90-Familien zeigen ebenfalls eine ähnlich hohe intrafamiliäre Konservierung (Hickey et al. (1989), Mol. Cell. Biol. 9: 2615–2626, Jindal (1989), Mol. Cell. Biol. 9: 2279–2283). Außerdem wurde entdeckt, dass die Hsp-60-, Hsp-70- und Hsp-90-Familien aus Proteinen bestehen, die hinsichtlich ihrer Sequenz mit den Stressproteinen verwandt sind und zum Beispiel mehr als 35% Aminosäureübereinstimmung zeigen, aber deren Expressionsausmaß typischerweise unter Bedingungen, die für die Wirtszelle mit Stress verbunden sind, unverändert bleibt. Ein Beispiel für ein derartiges Protein ist das konstitutiv exprimierte cytosolische Protein Hsc70, das bezüglich der Aminosäuresequenz mit dem durch Stress induzierten Protein Hsp70 verwandt ist. Man stellt sich deshalb vor, dass die Definition Stressprotein, wie sie hier verwendet wird, andere Proteine, Muteine, Analoge und Varianten von diesen umfasst, die wenigstens 35% bis 55%, vorzugsweise 55% bis 75% und am bevorzugtesten 75% bis 95% Aminosäureübereinstimmung mit Mitgliedern der drei Familien, deren Expression in einer Zelle als Reaktion auf Stressstimuli stimuliert wird, aufweisen. Die Reinigung von Stressproteinen, die zu diesen drei Familien gehören, wird unten beschrieben.

[0059] Die erfindungsgemäßen immunogenen Stressprotein-Peptid-Komplexe können jeden beliebigen Komplex umfassen, der ein Stressprotein und ein Peptid enthält, das imstande ist, in einem Säugetier eine Immunreaktion hervorzurufen, wobei in diesem Komplex das Peptid mit dem Stressprotein nicht-kovalent asso-

ziiert ist. Die bevorzugten Komplexen können, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, Hsp60-Peptid-, Hsp70-Peptid- und Hsp90-Peptid-Komplexe umfassen. Zum Beispiel kann ein gp96 genanntes Stressprotein, das im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen vorkommt und mit dem cytoplasmatischen Hsp90 verwandt ist, dazu verwendet werden, einen wirksamen Impfstoff zu erzeugen, der einen gp96-Peptid-Komplex enthält.

[0060] Eine weitere Familie von Heat-Shock-Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht ist kürzlich identifiziert und Hsp 25/Hsp 27 genannt worden. Die Reinigung dieser Proteine wird unten diskutiert. Man stellt sich vor, dass diese Proteine mit niedrigem Molekulargewicht ebenfalls für die vorliegende Erfindung nützlich sein können.

[0061] Es wurde auch entdeckt, dass die erfindungsgemäßen Stressprotein-Peptid-Komplexe aus Zellen präpariert werden können, die mit einem intrazellulären Pathogen infiziert sind, sowie aus Zellen, die durch ein intrazelluläres Pathogen transformiert wurden. Zum Beispiel können immunogene Stressprotein-Peptid-Komplexe aus eukaryotischen Zellen isoliert werden, die mit einem transformierenden Virus wie SV40 transformiert wurden (siehe unten).

[0062] In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung können die Impfstoffe aus gereinigten Stressproteinen und Peptiden besonders nützlich für die Behandlung humaner Erkrankungen sein, die durch intrazelluläre Pathogene verursacht werden. Es sollte jedoch klar sein, dass die mittels der hier beschriebenen Prinzipien entwickelten Impfstoffe zur Behandlung von Erkrankungen anderer Säugetiere, zum Beispiel von Tieren auf dem Bauernhof, einschließlich von Rindern, Pferden, Schafen, Ziegen und Schweinen, sowie von Haustieren, einschließlich von Katzen und Hunden, die ganz ähnlich durch intrazelluläre Pathogene verursacht werden, nützlich sein werden.

[0063] Gemäß den hier beschriebenen Verfahren können Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit Viren infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, gehören Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Influenza, Varicella, Adenovirus, HSV-I, HSV-II, Rinderpest, Rhinovirus, Echovirus, Rotavirus, respiratorisches Syncytialvirus, Papillomvirus, Papovavirus, Cytomegalovirus, Echinovirus, Arbovirus, Huntavirus, Coxsackie-Virus, Mumpsvirus, Masernvirus, Rubellavirus, Poliovirus, HIV-I und HIV-II. Ähnlich können auch Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Bakterien infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Mycobacteria, Rickettsia, Mycoplasma, Neisseria und Legionella gehören. Außerdem können auch Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Protozoen infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Leishmania, Kokzidioa und Trypanosoma gehören. Weiterhin können Impfstoffe hergestellt werden, die zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen Zellen stimulieren, die mit intrazellulären Parasiten infiziert sind, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Chlamydia und Rickettsia gehören.

I. Vermehrung infizierter eukaryotischer Zellen

[0064] Wie Fachleuten auf diesem Gebiet klar sein dürfte, können die hier beschriebenen Protokolle dazu verwendet werden, Stressprotein-Peptid-Komplexe aus beliebigen eukaryotischen Zellen zu isolieren, zum Beispiel aus Geweben, isolierten Zellen oder immortalisierten eukaryotischen Zelllinien, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert sind.

[0065] Wenn immortalisierte tierische Zelllinien als Quelle für die Stressprotein-Peptid-Komplexe verwendet werden, ist es natürlich wichtig, Zelllinien zu verwenden, die mit dem interessierenden Pathogen infiziert werden können. Außerdem wird es bevorzugt, Zellen zu verwenden, die von der gleichen Spezies wie derjenigen, zu der der vorgesehene Empfänger des Impfstoffs gehört, abstammen.

[0066] Zum Beispiel kann für die Herstellung eines Stressprotein-Peptid-Komplexes, der wirksam gegen HIV-1 sein könnte, für die Verabreichung an Menschen das Virus in humanen Zellen vermehrt werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, humane CD4+-T-Zellen, HepG2-Zellen und lymphoide U937-Zellen gehören. Für die Herstellung eines Stressprotein-Peptid-Komplexes, der wirksam gegen HIV-II sein könnte, für die Verabreichung an Menschen kann das Virus zum Beispiel in humanen CD4+-T-Zellen vermehrt werden. Ähnlich können Influenzaviren zum Beispiel in humanen Fibroblasten-Zelllinien und MDCK-Zellen vermehrt werden, und Mycobacteria können zum Beispiel in humanen Schwann-Zellen kultiviert werden.

[0067] Wenn die intrazellulären Pathogene die infizierten Zellen nicht lysieren, dann werden die infizierten

Zellen unter den gleichen Bedingungen wie die normalen, nicht-infizierten Zellen kultiviert. Zum Beispiel können Mycobacteria in Nervenkulturen der sensorischen Ganglien neugeborener weißer Swiss-Mäuse vermehrt werden. Die Nervenzellen werden in einem Wachstumsmedium kultiviert, das 70% Dulbecco's modified Eagle minimal essential Medium (DMEM) mit 0,006% Glucose, 20% fötalem Kälberserum, 10% Hühnerembryo-Extrakt und Cytosinarabinosid kultiviert. Nach 8 bis 10 Tagen werden die Kulturen mit 5–8 × 10^6 Mycobacteria angeimpft, die aus frischen Knötchen unbehandelter Patienten mit lepromatöser Lepra isoliert wurden. Die infizierten Zellen können bei 37°C bis zu 6 Wochen kultiviert werden, und danach werden die infizierten Zellen geerntet und die Stressprotein-Peptid-Komplexe isoliert; siehe zum Beispiel Mukherjee et al. (1985), R. Clin. Micro. 21: 808–814.

[0068] Wenn auf der anderen Seite die Wirtszellen durch das interessierende Pathogen lysiert werden (wie im Falle des Influenzavirus), dann können die Zellen immer noch unter Standardbedingungen gezüchtet werden, außer dass die Zellen unmittelbar vor der Lyse der Wirtszelle gewaschen und geerntet werden. Zum Beispiel werden bei der Reinigung von Stressprotein-Peptid-Komplexen aus Influenza-infizierten Zellen Fibroblasten (oder andere Zelltypen) 1 Stunde bei 37°C mit 5–10 Plaque Forming Units (PFU) des Virus pro Zelle infiziert. Die infizierten Zellen können in reinem DMEM-Medium 24 Stunden bei 37°C kultiviert werden. Nach 24 Stunden werden die Zellen gewaschen und vor der Lyse geerntet. Die Stressprotein-Peptid-Komplexe können mittels der unten dargelegten Verfahren isoliert werden.

[0069] Außerdem kann, wenn das Gen, das für eine bestimmte antigene Determinante codiert, identifiziert wurde, das interessierende Gen transfiziert und in einer immortalisierten humanen Zelllinie oder einer anderen Säugetierzelllinie mittels Techniken, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, exprimiert werden; siehe zum Beispiel „Current Protocols in Molecular Biology" (1989), Hrsg. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA und Struhl K., Wiley Interscience. Die transfizierten Zellen können unter Standardbedingungen gezüchtet und die Komplexe anschließend isoliert werden.

II Präparation von Stressproteinen und immunogenen Stressprotein-Peptid-Komplexen

[0070] Verfahren zur Präparation von Hsp70-Peptid-Komplexen, Hsp90-Peptid-Komplexen, gp96-Peptid-Komplexen, Hsp70, Hsp25/Hsp27 und Hsp60 werden unten dargelegt.

a) Reinigung von Hsp70-Peptid-Komplexen

[0071] Ein Pellet infizierter Zellen wird in 3 Volumina 1 × Lysispuffer resuspendiert, der aus 5 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$ und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) besteht. Das Pellet wird auf Eis sonifiziert, bis > 99% der Zellen lysiert sind, wie anhand einer mikroskopischen Überprüfung festgestellt wird. Alternativ können die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden. Bei diesem Verfahren werden die Zellen in 30 mM Natriumbicarbonat, pH 7,5, und 1 mm PMSF 20 min auf Eis inkubiert und dann in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert, bis > 95% der Zellen lysiert sind.

[0072] Das Lysat wird 10 min bei 1000 g zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Trümmer zu entfernen. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wird dann 90 Minuten bei 100 000 g erneut zentrifugiert.

[0073] Der Überstand wird 2–3 Stunden bei 4°C mit Con-A-Sepharose gemischt, die mit PBS äquilibriert worden war, die 2 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} enthält. Wenn die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, wird der Überstand vor der Weiterverarbeitung mit einem gleichen Volumen 2 × Lysispuffer verdünnt. Dann wird die Aufschlämmung in eine Säule gepackt und mit 1 × Lysispuffer gewaschen. Das Material, das nicht bindet, wird 36 Stunden gegen 10 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10 mM NaCl und 1 mM PMSF dialysiert (dreimal, jedes Mal gegen 100 Volumina). Das Dialysat wird 20 min bei 17000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert, und der resultierende Überstand wird auf eine Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit 20 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol äquilibriert worden war. Dann werden die Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 20 mM bis 500 mM eluiert. Die Fraktionen werden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting unter Verwendung eines geeigneten Anti-Hsp70-Antikörpers (wie des Klons N27F3-4 von StressGen) charakterisiert.

[0074] Die Fraktionen, die stark immunreaktiv mit dem Antikörper sind, werden vereinigt, und die Hsp70-Peptid-Komplexe werden mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Der Komplex wird in der Ammoniumsulfat-Fraktion von

50% bis 70% ausgefällt. Das Proteinpellet wird durch Zentrifugation bei 17 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) geerntet und mit 70% Ammoniumsulfat gewaschen. Dann wird das Pellet solubilisiert, und das restliche Ammoniumsulfat wird durch Gelfiltration über eine Sephadex®-G25-Säule (Pharmacia) entfernt.

[0075] Der Hsp70-Peptid-Komplex kann mittels dieses Verfahrens zu apparenter Homogenität gereinigt werden. Bis zu 1 mg Hsp70-Peptid-Komplex kann aus 1 g Zellen/Gewebe gereinigt werden.

b) Reinigung von Hsp70

[0076] Das Hsp70-Polypeptid kann aus dem Hsp70-Peptid-Komplex durch ATP-Agarose-Chromatographie gereinigt werden; siehe zum Beispiel Welch et al. (1985), Mol. Cell. Biol. 5: 1229. Es wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, $MgCl_2$ zu dem zuvor isolierten Komplex bis zu einer Endkonzentration von 3 mM gegeben. Dann wird der Komplex auf eine ATP-Agarose-Säule (Sigma Chemical Co.) aufgetragen, die mit 20 mm Tris-Acetat (pH 7,5), 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 15 mM 2-Mercaptoethanol und 3 mM $MgCl_2$ äquilibriert worden war. Die Säule wird extensiv mit dem Äquilibrierungspuffer, der 0,5 M NaCl enthält, und dann mit dem Puffer ohne das NaCl gewaschen. Dann wird das Hsp70 mit dem Äquilibrierungspuffer, der 3 mM ATP (Sigma Chemical Col) enthält, von der Säule eluiert.

C) Reinigung von Hsp90-Peptid-Komplexen

[0077] Ein Pellet infizierter Zellen wird in 3 Volumina 1 × Lysispuffer resuspendiert, der aus 5 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$ und 1 mM PMSF besteht. Das Pellet wird auf Eis sonifiziert, bis > 95% der Zellen lysiert sind, wie anhand einer mikroskopischen Überprüfung festgestellt wird. Alternativ können die Zellen wie oben über ein mechanisches Scheren lysiert werden.

[0078] Das Lysat wird 10 min bei 1000 g zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Trümmer zu entfernen. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wird dann 90 Minuten bei 100 000 g erneut zentrifugiert.

[0079] Dann wird der Überstand 2–3 Stunden bei 4°C mit Con-A-Sepharose® gemischt, die mit PBS äquilibriert worden war, die 2 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} enthält. Wenn die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, wird der Überstand vor der Weiterverarbeitung mit einem gleichen Volumen 2 × Lysispuffer verdünnt. Dann wird die Aufschlämmung in eine Säule gepackt und mit 1 × Lysispuffer gewaschen. Das Material, das nicht bindet, wird 36 Stunden gegen 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 250 mM NaCl und 1 mM PMSF dialysiert (dreimal, jedes Mal gegen 100 Volumina). Das Dialysat wird 20 min bei 17 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird auf eine Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit Lysispuffer äquilibriert worden war, und die gebundenen Proteine werden mit einem Salzgradienten von 200 mM bis 600 mM NaCl eluiert.

[0080] Die eluierten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert, und die Hsp90-Komplexe werden durch Immunblotting unter Verwendung eines Anti-Hsp90-Antikörpers (z. B. 3G3 von Affinity Bioreagents) identifiziert. Hsp90 kann mittels dieses Verfahrens zu apparenter Homogenität gereinigt werden. Ungefähr 150–200 µg Hsp90 können routinemäßig aus 1 g Zellen/Gewebe gereinigt werden.

d) Reinigung von gp96-Peptid-Komplexen

[0081] Ein Pellet infizierter Zellen wird in 4 Volumina eines Puffer resuspendiert, der aus 30 mM Natriumbicarbonat-Puffer (pH 7,5) und 1 mM PMSF besteht, und man lässt die Zellen 20 min auf Eis schwellen. Das Zellpellet wird dann in einem Dounce-Homogenisator (die geeignete Clearance des Homogenisators hängt vom jeweiligen Zelltyp ab) auf Eis homogenisiert, bis >95% der Zellen lysiert sind.

[0082] Das Lysat wird 10 min bei 1000 g zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Trümmer zu entfernen. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wird dann 90 Minuten bei 100 000 g erneut zentrifugiert. Der gp96-Peptid-Komplex kann entweder aus dem 100 000-g-Pellet oder aus dem Überstand gereinigt werden.

[0083] Bei der Reinigung aus dem Überstand wird der Überstand mit einem gleichen Volumen 2 × Lysispuffer verdünnt, und der Überstand wird 2–3 Stunden bei 4°C mit Con-A-Sepharose gemischt, die mit PBS, die 2 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} enthält, äquilibriert worden war. Dann wird die Aufschlämmung in eine Säule gepackt und mit 1 × Lysispuffer gewaschen, bis der OD_{280}-Wert auf die Basislinie zurückgeht. Dann wird die Säule mit 1/2

Säulenbettvolumen an 10% α-Methylmannosid (α-MM), gelöst in PBS, die 2 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} enthält, gewaschen, die Säule wird mit einem Stück Parafilm verschlossen und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Säule wird dann auf Raumtemperatur abgekühlt, und der Parafilm wird von der Unterseite der Säule entfernt. Es werden fünf Säulenvolumina des α-MM-Puffers auf die Säule aufgetragen, und das Eluat wird mittels SDS-PAGE analysiert. Typischerweise ist das resultierende Material zu ungefähr 60–95% rein, aber das hängt vom Zelltyp und vom eingesetzten Verhältnis von Gewebe zu Lysispuffer ab. Dann wird die Probe auf eine Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit einem Puffer äquilibriert worden war, der 5 mM Natriumphosphat, pH 7, enthält. Die Proteine werden dann mit einem 0–1 M NaCl-Gradienten von der Säule eluiert, und die gp96-Fraktion eluiert zwischen 400 mM und 550 mM NaCl.

[0084] Dieses Verfahren kann jedoch durch zwei zusätzliche Schritte modifiziert werden, die entweder allein oder in Kombination eingesetzt werden, um reproduzierbar apparent homogene gp96-Peptid-Komplexe zu erzeugen. Ein optionaler Schritt beinhaltet eine Ammoniumsulfatfällung vor dem Reinigungsschritt mit Con A, und der andere optionale Schritt beinhaltet eine DEAE-Sepharose-Reinigung nach dem Con-A-Reinigungsschritt, aber vor dem Mono-Q-FPLC-Schritt.

[0085] Beim ersten optionalen Schritt wird der Überstand, der aus dem Zentrifugationsschritt bei 100 000 g resultiert, durch die Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 50% Ammoniumsulfat gebracht. Das Ammoniumsulfat wird zu der Lösung in einem Becher in einem Eiswasserbad unter langsamem Rühren zugegeben. Die Lösung wird ungefähr 2 bis 12 Stunden bei 4°C gerührt, und die resultierende Lösung wird bei 6000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert. Der aus diesem Schritt resultierende Überstand wird entfernt, durch die Zugabe von Ammoniumsulfatlösung auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 70% gebracht und bei 6000 Upm (Sorvall-Rotor SS35) zentrifugiert. Das aus diesem Schritt resultierende Pellet wird gewonnen und in PBS, die 70% Ammoniumsulfat enthält, suspendiert, um das Pellet zu waschen. Diese Mischung wird bei 6000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert, und das Pellet wird in PBS, die 2 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} enthält, gelöst. Nichtgelöstes Material wird durch eine kurze Zentrifugation bei 15 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) entfernt. Dann wird die Lösung mit Con-A-Sepharose® gemischt und wie zuvor beschrieben weiterverarbeitet.

[0086] Beim zweiten optionalen Schritt werden die von der Con-A-Säule eluierten gp96-haltigen Fraktionen vereinigt, und der Puffer wird durch Dialyse oder, vorzugsweise, durch einen Pufferaustausch auf einer Sephadex®-G25-Säule gegen einen Phosphatpuffer, 5 mM, pH 7, und 300 mM NaCl ausgetauscht. Nach dem Pufferaustausch wird die Lösung mit DEAE-Sepharose® gemischt, die zuvor mit 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, und 300 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Proteinlösung und die Beads werden sanft 1 Stunde gemischt und in eine Säule gegossen. Dann wird die Säule mit 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, 300 mM NaCl gewaschen, bis die Absorption bei 280 nM auf die Basislinie zurückgeht. Dann wird das gebundene Protein mit fünf Volumina 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, 700 mM NaCl von der Säule eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und mit 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, verdünnt, um die Salzkonzentration auf 175 mM abzusenken. Das resultierende Material wird dann auf die Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, äquilibriert worden war, und das Protein, das an die Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) bindet, wird wie oben beschrieben eluiert.

[0087] Es sollte jedoch klar sein, dass ein Fachmann auf diesem Gebiet über Routineexperimente den Nutzen der Aufnahme der optionalen Schritte in das Reinigungsprotokoll bestimmen kann. Außerdem sollte klar sein, dass der Nutzen aus der Aufnahme eines jeden optionalen Schritts von der Quelle des Ausgangsmaterials abhängt.

[0088] Wenn die gp96-Fraktion aus dem 100 000-g-Pellet isoliert wird, dann wird das Pellet in 5 Volumina PBS, die entweder 1% Natriumdesoxycholat oder 1% Octylglucopyranosid (aber ohne das Mg^{2+} und Ca^{2+}) enthält, suspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Suspension wird 30 min bei 20 000 g zentrifugiert, und der resultierende Überstand wird gegen mehrere Wechsel PBS (ebenfalls ohne das Mg^{2+} und Ca^{2+}) dialysiert, um das Detergens zu entfernen. Das Dialysat wird 90 min bei 100 000 g zentrifugiert, der Überstand wird gewonnen, und es werden dem Überstand Calcium und Magnesium zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 2 mM erhalten worden ist. Dann wird die Probe entweder mittels des nicht-modifizierten oder des modifizierten Verfahrens zur Isolierung des gp96-Peptid-Komplexes aus dem 100 000-g-Überstand wie oben gereinigt.

[0089] Die gp96-Peptid-Komplexe können mittels dieses Verfahrens bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Ungefähr 10–20 µg gp96 können aus 1 g Zellen/Gewebe isoliert werden.

e) Reinigung von HSP25 und HSP27

[0090] Die Reinigung von Hsp25- und Hsp27-Polypeptiden wurde bereits früher offenbart und wird deshalb hier nicht detailliert diskutiert; siehe zum Beispiel Jakob et al. (1993), J. Biol. Chem. 268: 15717–1520, wobei diese Offenbarung hier mit der entsprechenden Quellenangabe aufgenommen wird.

[0091] Es werden, um das ganze kurz zusammenzufassen, die Zelllysate mit 35% Ammoniumsulfat ausgefällt. Das Pellet wird durch Zentrifugation gewonnen, in Puffer solubilisiert und durch Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer DEAE-Sepharose®-CL-6B-Säule (Pharmacia Biotechnology Inc.) fraktioniert. Die Proteine werden mit einem NaCl-Gradienten von 50–200 mM eluiert. Die Fraktionen, die Hsp25 und Hsp27 enthalten, werden mittels Immunblotting unter Verwendung geeigneter Antikörper identifiziert. Die Fraktionen werden vereinigt und durch Größenausschlusschromatographie auf einer Superose-6-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) fraktioniert.

Reinigung von Hsp60

[0092] Die Reinigung von Hsp60 wurde bereits früher detailliert diskutiert und wird deshalb hier nicht detailliert diskutiert; siehe zum Beispiel Vitanen et al. (1992), J. Biol. Chem. 267: 695–698, wobei diese Offenlegung hier mit der entsprechenden Quellenangabe aufgenommen wird.

[0093] Es wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, ein Lysat der mitochondrialen Matrix auf eine Mono-Q-FPLC-Säule, die mit 50 mM Natriumphosphat, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,9, äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Proteine werden mit einem NaCl-Gradienten von 0–1 M eluiert. Die Fraktionen, die Hsp65 enthalten, werden vereinigt und mittels ATP-Agarose-Chromatographie wie oben diskutiert fraktioniert.

III. Präparation rekombinanter Stressproteine

[0094] Man stellt sich vor, dass rekombinante Stressproteine und Aminosäuresequenz-Varianten von diesen mittels herkömmlicher gentechnologischer Verfahren hergestellt werden können. Zum Beispiel können rekombinante DNAs, die entweder für ein bekanntes Stressprotein oder ein Homolog codieren, in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden, das Protein kann exprimiert, geerntet und, wenn erforderlich, renaturiert und gereinigt werden. Stressproteine, die derzeit auf diesem Gebiet bekannt sind, sind in der Tabelle I unten zusammengefasst.

[0095] Die Verfahren zur Manipulation, Amplifizierung und Rekombination von DNA, die für interessierende Aminosäuresequenzen codiert, sind in diesem Fachgebiet generell gut bekannt und werden deshalb hier nicht detailliert beschrieben. Methoden zur Identifizierung und Isolierung von Genen, die für Mitglieder der Stressproteinfamilien codieren, sind ebenfalls gut etabliert, und sie werden in der Patentliteratur und anderen Literaturstellen beschrieben.

[0096] Dementsprechend kann die Konstruktion von DNAs, die für biosynthetische Konstrukte, wie sie hier offenbart werden, codieren, mittels bekannter Techniken unter Einsatz von verschiedenen Restriktionsenzymen, die die DNA sequenzspezifisch schneiden und dabei stumpfe Enden oder kohäsive Enden produzieren, von DNA-Ligasen, von Techniken, die die enzymatische Anfügung von klebrigen Enden an DNA mit stumpfen Enden ermöglichen, mittels der Konstruktion synthetischer DNAs durch das Zusammenfügen von kurzen und mittellangen Oligonucleotiden, von Techniken der cDNA-Synthese und mittels synthetischen Sonden zur Isolierung von Genen und Mitgliedern der Stressproteinfamilien durchgeführt werden. Verschiedene Promotorsequenzen und andere regulatorische DNA-Sequenzen, die zur Erzielung einer Expression verwendet werden, und verschiedene Typen von Wirtszellen sind ebenfalls bekannt und verfügbar. Herkömmliche Transfektionstechniken sowie herkömmliche Techniken zur Klonierung und Subklonierung von DNA sind bei der Durchführung dieser Erfindung nützlich und Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt. Es können verschiedene Vektortypen verwendet werden, wie Plasmide und Viren, einschließlich von tierischen Viren und Bakteriophagen. Die Vektoren können verschiedene Markergene ausnützen, die einer erfolgreich transfizierten Zelle eine nachweisbare phänotypische Eigenschaft verleihen, die dazu verwendet werden kann, herauszufinden, welcher aus einer Familie von Klonen erfolgreich die rekombinante DNA des Vektors inkorporiert hat.

Tabelle 1
Familien von Stressproteinen, aus Gething et al., unten

Organismus/Organelle	Hsp 60	Hsp 70	Hsp 90
E. coli	GroEL	DnaK	HtpG (C62.5)
Hefe			
/Cytosol		Ssal-4p	Hsp 83/Hsc 88
/endoplasmatisches Retikulum		Karp2 (BiP)	
/Mitochondrien	Hsp 60 (Mif4p)	Ssc1p	
Drosophila			
		Hsp 68	
		Hsp 70	
		Hsc 1.2.4	
Säugetiere			
/Cytosol		Hsp 70 (p73)	Hsp 90 (Hsp 83)
		Hsc 70 (p72)	Hsp 87
/endoplasmatisches Retikulum		BiP (Grp 78)	Grp 94 (Erp99)
			gp96
/Mitochondrien	Hsp 60 (Hsp 8)	Hsp 70 (Grp 75)	
Pflanzen			
/endoplasmatisches Retikulum		b70 (BiP)	
/Chloroplasten	RUSBP		

[0097] Alternative sind in Klammern angegeben.

[0098] DNA-Moleküle, die für potentiell nützliche Stressproteine codieren, können über verschiedene Verfahren erhalten werden. Interessierende Gene können aus Standard-cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Kolonie- oder Plaque-Hybridisierungstechniken oder über den Einsatz von Techniken der Polymerasekettenreaktion (PCR-Techniken) gereinigt werden, die alle in diesem Gebiet gut bekannt sind; siehe zum Beispiel „Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage", Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Press, wobei diese Offenbarung hier mit der entsprechenden Quellenangabe aufgenommen wird. Alternativ können die bevorzugten Gene über die Zusammenfügung synthetischer Oligonucleotide erzeugt werden, die mittels eines herkömmlichen, automatischen Polynucleotid-Syntheseapparates erzeugt werden, gefolgt von einer Ligation mit geeigneten Ligasen. Zum Beispiel können überlappende, komplementäre DNA-Fragmente von 15 Basen halbmanuell mittels der Phosphoramidit-Chemie synthetisiert werden, wobei die Endabschnitte unphosphoryliert gelassen werden, um eine Polymerisierung während der Ligation zu vermeiden. Ein Ende der synthetischen DNA enthält eine „klebriges Ende", das dem Ort der Wirkung einer speziellen Restriktionsendonuclease entspricht, und das andere Ende ist mit einem Ende versehen, das dem Ort der Wirkung einer anderen Restriktionsendonuclease entspricht. Alternativ kann dieser Ansatz vollständig automatisiert werden. Die DNA, die für die biosynthetischen Konstrukte codiert, kann durch das Synthetisieren langer, einzelsträngiger Fragmente (z. B. von

50–100 Nucleotiden Länge) beispielsweise mittels eines Oligonucleotid-Synthesizers von Applied Biosystems und das anschließende Ligieren der Fragmente erzeugt werden.

[0099] Die rekombinanten DNA-Konstrukte können dann in einen Expressionsvektor integriert und für die Proteinexpression in eine geeignete Wirtszelle transfiziert werden. Zu nützlichen Wirtszellen gehören E. coli, Saccharomyces, das Insekten/Baculovirus-Zellsystem, Myelomzellen und verschiedene andere Säugetierzellen. In E. coli und anderen mikrobiellen Wirten können die synthetischen Gene als Fusionsproteine exprimiert werden. Eine Expression in Eukaryoten kann über die Transfektion von DNA-Sequenzen, die für die interessierenden biosynthetischen Proteine codieren, in eine Myelomzelllinie oder eine andere Zelllinie erreicht werden.

[0100] Der Vektor kann zusätzlich verschiedene Sequenzen zur Unterstützung der korrekten Expression des rekombinanten Proteins enthalten, einschließlich von Promotor- und Terminationssequenzen für die Transkription, von Enhancersequenzen, von Sequenzen bevorzugter Ribosomenbindungsstellen, bevorzugten mRNA-Leadersequenzen, bevorzugten Protein-Prozessierungssequenzen, bevorzugten Signalsequenzen für die Proteinsekretion und dergleichen. Die DNA-Sequenz, die für das interessierende Gen codiert, kann ebenfalls manipuliert werden, um potentiell hemmende Sequenzen zu entfernen oder die Bildung einer unerwünschten Sekundärstruktur zu minimieren. Das rekombinante Protein kann auch als ein Fusionsprotein exprimiert werden. Nach der Translation kann das Protein aus den Zellen gereinigt werden oder aus dem Kulturmedium gewonnen werden.

[0101] Wenn zum Beispiel das Gen in E. coli exprimiert werden soll, dann könnte es zuerst in einen Expressionsvektor kloniert werden. Das wird durch das Anordnen des gentechnologisch veränderten Gens stromabwärts einer Promotorsequenz, wie Trp oder Tac, und eines Gens, das für ein Leaderpeptid, wie das Fragment B des Proteins A (FB) codiert, erreicht. Die resultierenden Fusionsproteine akkumulieren in „refractile bodies" Cytoplasma der Zellen und können nach dem Aufbrechen der Zellen mittels einer French-Press oder durch Sonifizieren gewonnen werden. Die „refractile bodies" werden solubilisiert, und die exprimierten Proteine werden mittels Verfahren, die bereits für viele andere rekombinante Proteine etabliert wurden. erneut gefaltet und gespalten.

[0102] Die Expression der gentechnologisch veränderten Gene in eukaryotischen Zellen erfordert die Etablierung geeigneter Zellen und Zelllinien, die leicht transfiziert werden können, die imstande sind, fremde DNA mit einer nicht-umgelagerten Sequenz stabil beizubehalten, und die die erforderlichen zellulären Komponenten für eine wirksame Transkription, Translation, posttranslationale Modifikation und Sekretion des Proteins besitzen. Außerdem ist auch ein geeigneter Vektor, der die interessierenden Gene trägt, erforderlich. Die Konstruktion des DNA-Vektors für die Transfektion in Säugetierzellen sollte auch geeignete Sequenzen für die Unterstützung der Expression des interessierenden Gens, wie es oben beschrieben wurde, aufweisen, einschließlich von geeigneten Sequenzen für die Initiation der Transkription, die Termination und Enhancersequenzen, sowie Sequenzen, die die Translationseffizienz verbessern, beispielsweise die Kozak-Konsensussequenz. Bevorzugte DNA-Vektoren enthalten auch ein Markergen und Mittel zur Amplifizierung der Kopienzahl des interessierenden Gens. Eine detaillierte Übersicht über den Stand der Technik zur Erzeugung fremder Proteine in Säugetierzellen, einschließlich nützlicher Zellen, von Sequenzen, die die Proteinexpression fördern, von Markergenen und Verfahren zur Genamplifikation wird in Genetic Engineering 7: 91–127 (1988) offenbart.

[0103] Die am besten charakterisierten Transkriptionspromotoren, die für die Expression eines fremden Gens in einer bestimmten Säugetierzelle nützlich sind, sind der frühe SV40-Promotor, der Adenovirus-Promotor (AdMLP), der Maus-Metallothionein-I-Promotor (mMT-1), das Long Terminal Repeat (LTR) des Rous-Sarcoma-Virus (RSV), das Long Terminal Repeat des Mouse-Mammary-Tumor-Virus (MMTV-LTR) und der Intermediate-Early-Promotor des humanen Cytomegalovirus (hCMV). Die DNA-Sequenzen für alle diese Promotoren sind in diesem Gebiet bekannt und kommerziell verfügbar.

[0104] Der Einsatz eines selektierbaren DHFR-Gens in einer dhfr$^-$-Zelllinie ist ein gut charakterisiertes Verfahren, das für die Amplifizierung von Genen in Säugerzellsystemen nützlich ist. Das DHFR-Gen wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, auf dem Vektor bereit gestellt, der das interessierende Gen trägt, und die Zugabe steigender Konzentrationen des zytotoxischen Arzneimittels Methotrexat führt zur Amplifizierung der Kopienzahl des DHFR-Gens sowie derjenigen des assoziierten interessierenden Gens. DHFR als ein selektierbarer, amplifizierbarer Marker in transfizierten Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO-Zellen) ist in diesem Gebiet besonders gut charakterisiert. Zu weiteren nützlichen amplifizierbaren Markergenen gehören die Adenosindesaminase (ADA)- und die Glutaminsythetase(GS)-Gene.

[0105] Die Wahl der Zellen/Zelllinien ist ebenfalls wichtig und hängt von den Bedürfnissen des Experimentators ab. Affennierenzellen (COS-Zellen) stellen eine hohe transiente Genexpression bereit, wodurch sie ein nützliches Mittel zur schnellen Testung von Vektorkonstruktionen und zur Expression klonierter Gene bereit stellen. Die COS-Zellen werden mit einem Simian-Virus-40-Vektor (SV40-Vektor) transfiziert, der das interessierende Gen trägt. Die transfizierten COS-Zellen sterben schließlich ab, wodurch die langfristige Produktion des gewünschten Proteinprodukts verhindert wird. Eine transiente Expression erfordert jedoch nicht den zeitraubenden Prozess, der für die Entwicklung einer stabilen Zelllinie nötig ist. Unter den etablierten Zelllinien sind CHO-Zellen möglicherweise die bis heute am besten charakterisierten. CHO-Zellen können Proteine vieler verschiedener Zelltypen exprimieren. Die generelle Anwendbarkeit von CHO-Zellen und die erfolgreiche Erzeugung einer Vielzahl menschlicher Proteine in nicht-verwandten Zelltypen unterstreicht die allen Säugetierzellen zugrundeliegende Ähnlichkeit.

[0106] Die verschiedenen Zellen, Zelllinien und DNA-Sequenzen, die für die Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten Stressproteinkonstrukte in Säugerzellen verwendet werden können, sind in diesem Gebiet gut charakterisiert und leicht verfügbar. Andere Promotoren, selektierbare Marker, Verfahren zur Genamplifikation und Zellen können ebenfalls eingesetzt werden, um die erfindungsgemäßen Proteine zu exprimieren. Spezielle Details der Transfektion, Expression und Reinigung rekombinanter Proteine sind in diesem Gebiet gut dokumentiert und werden von Fachleuten auf diesem Gebiet verstanden. Weitere Details der verschiedenen technischen Aspekte eines jeden Schrittes, der bei der rekombinanten Erzeugung fremder Gene in Säugetierzellexpressionssystemen eingesetzt wird, finden sich in verschiedenen Texten und Laborvorschriften auf diesem Gebiet, beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology (1989), Hrsg. Ausubel et al., Wiley Interscience.

IV. Isolierung potentiell immunogener Peptide

[0107] Wie zuvor erwähnt wurde, können potentiell immunogene Peptide entweder aus Stressprotein-Peptid-Komplexen oder MHC-Peptid-Komplexen isoliert werden. Protokolle zur Isolierung von Peptiden aus diesen beiden Komplexen werden im Folgenden bereit gestellt.

a) Peptide aus Stressprotein-Peptid-Komplexen

[0108] Zwei Methoden können zur Elution des Peptids aus einem Stressprotein-Peptid-Komplex eingesetzt werden. Ein Ansatz beinhaltet die Inkubation des Stressprotein-Peptid-Komplexes in Gegenwart von ATP, der andere beinhaltet die Inkubation des Komplexes in einem Puffer mit niedrigem pH.

[0109] Der interessierende Komplex wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, durch einen Centricon-10-Konzentrator (Millipore) zentrifugiert, um möglicherweise vorhandenes niedermolekulares Material, das locker mit dem Komplex assoziiert ist, zu entfernen. Die hochmolekulare Fraktion kann entfernt und mittels SDS-PAGE analysiert werden, während die niedermolekulare wie unten beschrieben mittels HPLC analysiert werden kann. Beim Protokoll der ATP-Inkubation wird der Stressprotein-Peptid-Komplex in der hochmolekularen Fraktion mit 10 mM ATP 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beim Protokoll mit dem niedrigen pH wird Essigsäure zum Stressprotein-Peptid-Komplex gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10% (Vol./Vol.) erreicht wird, und die Mischung wird in einem Bad mit siedendem Wasser 10 Minuten inkubiert; siehe zum Beispiel Van Bleek et al. (1990), Nature 348: 213–213 und Li et al. (1993), EMBO Journal 12: 3143–3151.

[0110] Die resultierenden Proben werden wie zuvor erwähnt durch einen Centricon-10-Konzentrator zentrifugiert. Es werden die hochmolekularen und niedermolekularen Fraktionen gewonnen. Die verbleibenden hochmolekularen Stressprotein-Peptid-Komplexe können erneut mit ATP oder bei niedrigem pH inkubiert werden, um möglicherweise verbliebene Peptide zu entfernen.

[0111] Die resultierenden niedermolekularen Fraktionen werden vereinigt, durch Eindampfen eingeengt und in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Dann wird das gelöste Material mittels Reverse-Phase-Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) fraktioniert, wobei zum Beispiel eine VYDAC®-C18-Reverse-Phase-Säule, die mit 0,1% TFA äquilibriert wurde, eingesetzt wird. Das gebundene Material wird anschließend durch das Entwickeln der Säule mit einem linearen Gradienten von 0 bis 80% Acetonitril in 0,1% TFA bei einer Flussgeschwindigkeit von ungefähr 0,8 ml/min eluiert. Die Elution der Peptide kann über die OD_{210} verfolgt werden, und die Fraktionen, die die Peptide enthalten, werden gesammelt.

b) Peptide aus MHC-Peptid-Komplexen

[0112] Die Isolierung potentiell immunogener Peptide aus MHC-Molekülen ist in diesem Gebiet gut bekannt, und deshalb wird sie hier nicht detailliert beschrieben; siehe zum Beispiel Falk et al. (1990), Nature 348: 248–251, Rotzsche et al. (1990) Nature 348: 252–254, Elliott et al. (1990), Nature 348: 195–197; Falk et al. (1991), Nature 351-290-296, Demotz et al. (1989), Nature 343: 682–684; Rotzsche et al. (1990), Science 249: 283–287.

[0113] MHC-Peptid-Komplexe können, um das ganze kurz zusammenzufassen, mittels eines herkömmlichen Immunaffinitätsverfahren isoliert werden. Dann werden die Peptide aus dem MHC-Peptid-Komplex durch das Inkubieren des Komplexes in Gegenwart von ungefähr 0,1 TFA in Acetonitril eluiert. Die extrahierten Peptide können fraktioniert und durch Reverse-Phase-HPLC wie zuvor gereinigt werden.

[0114] Die Aminosäuresequenzen der eluierten Peptide können entweder mittels manueller oder automatisierter Techniken der Aminosäuresequenzierung, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, bestimmt werden. Sobald die Aminosäuresequenz eines potentiell protektiven Peptids bestimmt worden ist, kann das Peptid in jeder gewünschten Menge unter Einsatz herkömmlicher Peptidsyntheseprotokolle oder anderer Protokolle, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, synthetisiert werden.

V. Synthese potentiell nützlicher immunogener Peptide

[0115] Peptide, die die gleiche Aminosäuresequenz haben wie die oben isolierten, können mittels Festphasen-Peptidsynthese durch Verfahren, die dem von Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, beschriebenen ähnlich sind, synthetisiert werden. Während der Synthese werden N-α-geschützte Aminosäuren mit geschützten Seitenketten schrittweise zu einer wachsenden Polypetidkette gegeben, die über ihr C-terminales Ende an einen unlöslichen polymeren Träger, zum Beispiel Polystyrolkügelchen, geknüpft ist. Die Peptide werden durch das Verknüpfen einer Aminogruppe einer N-α-entschützten Aminosäure an eine α-Carboxygruppe einer N-α-geschützten Aminosäure, die durch das Umsetzen mit einem Reagens wie Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wurde, synthetisiert. Die Knüpfung einer freien Aminogruppe an die aktivierte Carboxygruppe führt zur Bildung einer Peptidbindung. Zu den am häufigsten eingesetzten N-α-Schutzgruppen gehören Boc, das säurelabil ist, und Fmoc, das alkalilabil ist.

[0116] Es wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, die C-terminale, N-α-geschützte Aminosäure zunächst an den Polystyrolkügelchen befestigt. Die N-α-Schutzgruppe wird dann entfernt. Die entschützte α-Aminogruppe wird an die aktivierte α-Carboxylat-Gruppe der nächsten N-α-geschützten Aminosäure gekoppelt. Der Prozess wird wiederholt, bis das gewünschte Peptid synthetisiert ist. Die resultierenden Peptide werden dann vom unlöslichen Polymerträger abgespalten, und die Aminosäure-Seitenketten werden entschützt. Längere Peptide können über eine Kondensation geschützter Peptidfragmente gewonnen werden. Details einer geeigneten Chemie von Harzen, Schutzgruppen, geschützten Aminosäuren und Reagenzien sind in diesem Gebiet gut bekannt, und deshalb werden sie hier nicht detailliert diskutiert; siehe zum Beispiel Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1989), und Bodenszky, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2. Auflage, Springer Verlag (1993).

[0117] Die Reinigung der resultierenden Peptide wird mittels herkömmlicher Verfahren erreicht, beispielsweise mittels präparativer HPLC unter Einsatz einer Gel-Permeation mittels Partitions- und/oder Ionenaustauschchromatographie. Die Wahl der geeigneten Matrizes und Puffer kennt man in diesem Gebiet und deshalb werden sie hier nicht detailliert beschrieben.

VI. Rekonstitution von Stressprotein-Peptid-Komplexen

[0118] Wie Fachleuten auf diesem Gebiet klar sein dürfte, können die Peptide, die entweder aus den Komplexen mittels der oben genannten Verfahren isoliert wurden, oder die chemisch synthetisiert wurden, mit einer Vielzahl natürlich gereinigter oder rekombinanter Stressproteine in vitro rekonstituiert werden, um immunogene Stressprotein-Peptid-Komplexe zu erzeugen. Ein bevorzugtes Protokoll zur Rekonstitution eines Stressproteins und eines Peptids in vitro wird unten diskutiert.

[0119] Vor der Rekonstitution werden die Stressproteine mit ATP oder bei niedrigem pH vorbehandelt, um Peptide, die möglicherweise mit dem interessierenden Stressprotein assoziiert sind, zu entfernen. Wenn das ATP-Verfahren verwendet wird, dann wird überschüssiges ATP durch die Zugabe von Apyranase aus der Präparation entfernt, wie es bei Levy et al. (1991), Cell 67: 265–274 diskutiert wird. Wenn das Verfahren mit dem

niedrigen pH verwendet wird, dann wird der Puffer durch die Zugabe eines den pH verändernden Reagens wieder auf neutralen pH eingestellt.

[0120] Das Peptid (1 mg) und das vorbehandelte Stressprotein (9 mg) werden so gemischt, dass ein ungefähres Molverhältnis von 5 Peptiden auf 1 Stressprotein erreicht wird. Dann wird die Mischung 3 Stunden bei Raumtemperatur in einem Bindungspuffer inkubiert, der 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 350 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ und 1 mM PMSF enthält. Die Präparationen werden durch einen Centricon-10-Konzentrator (Millipore) zentrifugiert, um möglicherweise vorhandenes, nicht-gebundenes Peptid zu entfernten. Die Assoziation der Peptide mit den Stressproteinen kann mittels SDS-PAGE und Autoradiographie getestet werden, wenn radioaktiv markierte Peptide zur Rekonstitution der Komplexe eingesetzt werden.

[0121] Nach der Rekonstitution können die Kandidaten für immunogene Stressprotein-Peptid-Komplexe in vitro beispielsweise mittels des Mixed Lymphocyte Target Cell Assay (MLTC), der unten beschrieben wird, getestet werden. Sobald potentiell immunogene Konstrukte isoliert worden sind, können sie weiter in Tiermodellen charakterisiert werden, wobei die bevorzugten Verabreichungsprotokolle und Hilfsstoffe, die unten diskutiert werden, eingesetzt werden.

VII. Bestimmung der Immunogenität von Stressprotein-Peptid-Komplexen

[0122] Die gereinigten und rekonstituierten Stressprotein-Peptid-Komplexe können bezüglich ihrer Immunogenität mittels des Mixed Lymphocyte Target Cell Assay (MLTC), der in diesem Gebiet gut bekannt ist, getestet werden.

[0123] Es werden, um das ganze kurz zusammenzufassen, die Kandidaten für Stressprotein-Peptid-Komplexe Mäusen subkutan injiziert. Anderen Mäusen werden entweder andere Stressprotein-Peptid-Komplexe oder ganze infizierte Zellen, die als Positivkontrollen für diesen Test dienen, injiziert. Die Injektion erfolgt zweimal im Abstand von 7 bis 10 Tagen. 10 Tage nach der letzten Immunisierung werden die Milzen entfernt und Lymphozyten aus den herausgeschnittenen Milzen freigesetzt. Die freigesetzten Lymphozyten können in vitro durch die sich anschließende Zugabe von toten Zellen, die vor dem Tod den interessierenden Komplex exprimiert hatten, erneut stimuliert werden.

[0124] Zum Beispiel können 8×10^6 Immunmilzzellen in 3 ml RPMI-Medium, das 10% fötales Kälberserum enthält, entweder mit 4×10^4 Mitomycin-C-behandelten oder γ-bestrahlten (5–10 000 rad) Zellen stimuliert werden (wobei die Zellen mit dem intrazellulären Pathogen infiziert wurden oder mit einem geeigneten Gen transfiziert wurden). In bestimmten Fällen können im Kulturmedium 33% Überstand einer sekundären gemischten Lymphozytenkultur als Quelle für Wachstumsfaktoren für T-Zellen enthalten sein; siehe zum Beispiel Glasebrook et al. (1980), J. Exp. Med. 151: 876. Um auf die primäre zytotoxische T-Zell-Reaktion nach der Immunisierung zu testen, können Splenozyten ohne eine Stimulation kultiviert werden. In einigen Experimenten werden Splenozyten der immunisierten Mäuse auch erneut mit antigenisch unterschiedlichen Zellen stimuliert, um die Spezifität der zytotoxischen T-Zell-Reaktion zu bestimmen.

[0125] Sechs Tage später werden die Kulturen in einem 4-stündigen ^{51}Cr-Freisetzungstest auf Zytotoxizität getestet; siehe zum Beispiel Palladino et al. (1987), Cancer Res. 47: 5074–5079 und Blachere et al. (1993), J. Immunotherapy 14: 352–356. In diesem Test wird die gemischte Lymphozytenkultur zu einer Zielzellsuspension gegeben, so dass unterschiedliche Effektor : Target-Verhältnisse (E : T-Verhältnisse) (üblicherweise 1 : 1 bis 40 : 1) erhalten werden. Die Targetzellen werden durch das Inkubieren von 1×10^6 Targetzellen in Kulturmedium, das 200 mCi ^{51}Cr/ml enthält, für eine Stunde bei 37°C vormarkiert. Die Zellen werden nach der Markierung dreimal gewaschen. Jeder Testpunkt (E : T-Verhältnis) wird 3-fach bestimmt, und es werden geeignete Kontrollen mitgeführt, um die spontane ^{51}Cr-Freisetzung (kein Zusatz von Lymphozyten zum Test) und die 100%ige Freisetzung (Zellen mit Detergens lysiert) zu messen.

[0126] Nach dem 4-stündigen Inkubieren der Zellmischungen werden die Zellen durch Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Menge des in den Überstand freigesetzten ^{51}Cr wird mittels eines Gamma-Counters gemessen. Die prozentuale Zytotoxizität wird als cpm in der Testprobe minus der spontan freigesetzten cpm geteilt durch die mittels Detergens freigesetzten Gesamt-cpm minus der spontan freigesetzten cpm bestimmt.

[0127] Zur Blockierung der MHC-Klasse-I-Kaskade wird ein konzentrierter Hybridom-Überstand, der von K-44-Hybridomzellen stammt (einem Anti-MHC-Klasse-I-Hybridom) in einer Endkonzentration von 12,5% zu den Testproben gegeben.

VIII. Formulierung und Impfschemata

[0128] Sobald Stressprotein-Peptid-Komplexe identifiziert worden sind, können sie entweder einem Tiermodell oder dem vorgesehen Empfänger verabreicht werden, um zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen das gewählte intrazelluläre Pathogen zu stimulieren. Die erfindungsgemäßen Stressprotein-Peptid-Komplexe können entweder gelagert werden, oder sie können durch das Mischen mit physiologisch annehmbaren Trägern, Hilfsstoffen oder Stabilisatoren für eine Verabreichung zubereitet werden. Diese Materialien sollten bei den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch für den vorgesehen Empfänger sein.

[0129] Wenn der Komplex wasserlöslich ist, dann kann er in einem geeigneten Puffer formuliert werden, zum Beispiel Phosphat-gepufferter Saline (5 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,1) oder anderen physiologisch verträglichen Lösungen. Alternativ kann der resultierende Komplex, wenn er in wässrigen Lösemitteln schlecht löslich ist, mit einem nicht-ionischen Detergens, wie Tween oder Polyethylenglykol, formuliert werden.

[0130] Nützliche Lösungen für eine orale oder parenterale Verabreichung können mit beliebigen der Verfahren, die in der Pharmazie gut bekannt sind und zum Beispiel in Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., Hrsg.), Mack Pub., 1990, beschrieben werden, präpariert werden. Die Formulierungen können zum Beispiel Polyalkylenglykole wie Polyethylenglykol, Öle pflanzlichen Ursprungs, hydrierte Naphthaline und dergleichen enthalten. Formulierungen speziell für eine direkte Verabreichung können Glycerin und andere Zusammensetzungen hoher Viskosität enthalten. Biokompatible, vorzugsweise bioresorbierbare Polymere, zu denen zum Beispiel Hyaluronsäure, Collagen, Tricalciumphosphat, Polybutyrat, Polylactid, Polyglycolid und Lactid/Glycolid-Copolymere gehören, können nützliche Hilfsstoffe zur Steuerung der Freisetzung der Stressprotein-Peptid-Komplexe in vivo sein.

[0131] Formulierungen für eine inhalative Verabreichung können zum Beispiel Lactose als Hilfsstoff enthalten. Wässrige Lösungen können zum Beispiel Polyoxyethylen-9-laurylether, Glycocholat und Desoxycholat enthalten. Ölige Lösungen können für eine Verabreichung in Form von Nasentropfen nützlich sein. Gele können topisch und intranasal verabreicht werden.

[0132] Die hier bereit gestellten Zusammensetzungen können durch das Mischen mit pharmazeutisch annehmbaren, nicht-toxischen Hilfsstoffen und Trägern zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden. Außerdem können die Formulierungen gegebenenfalls ein Adjuvans oder mehrere Adjuvanzien enthalten. Zu bevorzugten Adjuvanzien gehören, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, Pluronic-Tri-Block-Copolymere, Muramyldipeptid und seine Derivate, entgiftetes Endotoxin, Saponin und seine Derivate, wie QS-21, sowie Liposomen. Die vorliegende Erfindung zielt ferner auf Formulierungen für eine verzögerte Freisetzung ab, bei denen der Komplex über einen längeren Zeitraum freigesetzt wird.

[0133] Die Dosierung und die Art der Verabreichung der Familie von Stressprotein-Peptid-Impfstoffen, die gemäß der Erfindung hergestellt wurden, hängen notwendigerweise von der Art des Komplexes, dem intrazellulären Pathogen und der Art der jeweiligen Erkrankung ab. Der Komplex sollte in einer Menge verabreicht werden, die ausreicht, eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das intrazelluläre Pathogen auszulösen. Die bevorzugte Dosis des Arzneimittels, die verabreicht werden soll, hängt wahrscheinlich auch von solchen Variablen ab wie dem Typ der Krankheit, dem Alter, dem Geschlecht und dem Gewicht des vorgesehenen Empfängers, dem gesamten Gesundheitszustand des jeweiligen Patienten, der relativen biologischen Wirksamkeit der ausgewählten Verbindung, der Formulierung der Verbindung, der Anwesenheit und den Typen von Hilfsstoffen in der Formulierung und dem Verabreichungsweg.

[0134] Ganz allgemein können die erfindungsgemäßen Verbindungen in einer wässrigen physiologischen Pufferlösung bereit gestellt werden, die ungefähr 0,001 bis 10% (Gew./Vol.) der Verbindung für eine parenterale Verabreichung enthält. Typische Dosen liegen bei ungefähr 0,1 bis ungefähr 1000 µg des Komplexes/kg Körpergewicht des Empfängers/Immunisierung, und vorzugsweise liegen sie bei ungefähr 0,5 bis ungefähr 100 µg des Komplex/kg Körpergewicht des Empfängers/Immunisierung. Man stellt sich vor, dass zwischen ungefähr 10 und ungefähr 250 µg des Komplexes pro Dosis an einen Menschen, der ungefähr 75 kg wiegt, verabreicht werden. Diese Mengen können jedoch in Abhängigkeit vom Adjuvans, das mit dem Komplex verabreicht wird, variieren.

[0135] Die Impfstoffe können unter Einsatz von Standardprotokollen verabreicht werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, eine intramuskuläre, subkutane, intradermale, intraperitoneale, intravenöse, intravaginale, intrarektale, orale, sublinguale, transkutane und intranasale Verabreichung gehören. Vorzugsweise sollte der Empfänger viermal in Abständen von jeweils einer Woche geimpft werden. Falls erforderlich,

können die Reaktionen zu einem späteren Zeitpunkt durch die nachfolgende Verabreichung des Impfstoffs aufgefrischt werden. Man stellt sich vor, dass die optimale Dosierung und das optimale Impfschema für jeden Stressprotein-Impfstoff mittels Techniken, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, empirisch bestimmt werden.

[0136] Verschiedene Cytokine, Antibiotika und andere bioaktive Agenzien können ebenfalls mit den Stressprotein-Komplexen verabreicht werden. Zum Beispiel können verschiedene bekannte Cytokine, z. B. IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, TNFβ, G-CSF, GM-CSF und TGF-β zusammen mit den Komplexen verabreicht werden, um die physiologische Reaktion zu maximieren. Es wird jedoch vorausgesehen, dass auch andere, noch nicht entdeckte Cytokine in der Erfindung wirksam sein können. Außerdem können herkömmliche Antibiotika zusammen mit dem Stressprotein-Peptid-Komplex verabreicht werden. Die Auswahl geeigneter Antibiotika hängt ebenfalls von der jeweiligen Erkrankung ab.

[0137] Die folgenden, nicht-einschränkenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

Beispiel 1. Immunogenität von Stressprotein-Peptid-Komplexen, die aus Zellen isoliert wurden, die mit einem Gen, das für eine antigene Determinante codiert, transfiziert wurden

[0138] Fig. 1 zeigt die antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität von Splenozyten, die von Mäusen stammten, die mit einem gp96-Peptid-Komplex immunisiert wurden, der aus BALB/c-Fibroblasten gewonnen wurde, die mit dem Nucleoprotein-Gen (NP-Gen) des PR8-Influenzavirus transfiziert worden waren.

[0139] gp96-Peptid-Präparationen wurden, um das ganze kurz zusammenzufassen, aus BALB/c-Zellen, die mit dem NP-Gen des PR8-Influenzavirus transfiziert worden waren und dieses exprimieren, isoliert. Der gp96-Peptid-Komplex wurde aus dem 100 000-g-Überstand mittels des nicht-modifizierten Protokolls zur Reinigung des gp60-Peptid-Komplexes isoliert. Dann wurden die Präparationen zur Immunisierung naiver BALB/c-Mäuse eingesetzt. Den Mäusen wurden die gp96-Peptid-Komplexe zweimal in 10-tägigem Abstand subkutan injiziert. Die Mäuse wurden getötet, und die Splenozyten wurden gewonnen. Die Milzzellen wurden zweimal in vitro über die Zugabe letal bestrahlter BALB/c-Zellen, die das NP-Gen exprimieren, unter Einsatz des oben beschriebenen Mixed Lymphocyte Target Culture (MLTC)-Tests stimuliert. Sechs Tage später wurden die Kulturen mittels des ^{51}Cr-Freisetzungstests auf Zytotoxizität getestet. Zur Blockierung der MHC-Typ-I-Kaskade wurden die Milzzellen mit dem vom K-44-Hybridom stammenden Überstand (der Anti-MHC-Typ-I-Immunglobuline enthält) inkubiert.

[0140] Die zytotoxische Aktivität wurde über die Freisetzung von ^{51}Cr aus BALB/c-Fibroblasten, die das NP-Gen exprimieren (ausgefüllte Kreise), aus BALB/c-Zellen, die das NP-Gen exprimieren, aber mit dem Anti-MHC-Typ-I-Antiserum behandelt wurden (leere Kreise) und aus der syngenen, nicht-NP-transfizierten Zelllinie 5117 (Sterne) getestet. Die Milzen der Mäuse, die mit dem gp96-Komplex immunisiert worden waren, zeigten eine starke, auf MHC-Klasse-I-beschränkte zytotoxische T-Zell-Aktivität gegen BALB/c-Zellen, die das NP-Gen exprimieren, aber keine gegen die syngene, nicht-NP-transfizierte Zelllinie 5117. Weiterhin blockierten das Anti-MHC-Typ-I-Antiserum die Reaktion. Demnach sieht es so aus, dass die Immunisierung mit einem Stressprotein-Peptid-Komplex eine spezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen das Peptid im Komplex hervorruft, und dass die MHC-Klasse-I-Kaskade eine integrale Rolle bei der Stimulierung der zytotoxischen T-Zell-Reaktion gegen Zellen, die mit dem intrazellulären Pathogen infiziert sind, spielt.

Beispiel 2 Immunogenität von Stressprotein-Peptid-Komplexen, die aus SV40-transformierten Zellen isoliert wurden

[0141] Fig. 2 zeigt die antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität von Splenozyten, die von Mäusen stammten, die mit einem gp96-Peptid-Komplex immunisiert wurden, der aus SV40-transformierten SVB6-Zellen gewonnen worden war.

[0142] gp96-Peptid-Präparationen wurden, um das ganze kurz zusammenzufassen, aus SV40-transformierten SVB6-Zellen isoliert und zur Immunisierung naiver (57BL/6)-Mäuse eingesetzt. Der gp96-Peptid-Komplex wurde aus dem 100 000-g-Überstand mittels des nicht-modifizierten Protokolls zur Reinigung des gp60-Peptid-Komplexes isoliert. Den Mäusen wurde der Komplex zweimal in 10-tägigem Abstand subkutan injiziert. Die Mäuse wurden getötet, die Milzzellen wurden isoliert und in vitro durch die Zugabe letal bestrahlter, SV40-transformierter SVB6-Zellen mittels des MLTC-Verfahrens stimuliert. Sechs Tage später wurden die Zellen mittels des ^{51}Cr-Freisetzungstests auf Zytotoxizität getestet. Die zytotoxische Aktivität wurde über die Freisetzung von ^{51}Cr aus SVB6-Zellen (ausgefüllte Dreiecke) und aus der nicht-SV40-transfizierten syngenen Zell-

linie MCA (leere Dreiecke) getestet. Die MHC-Klasse-I-vermittelte Aktivität wurde auch über die Zugabe von Anti-MHC-Typ-I-Immunglobulinen, die von der K-44-Hybridomzelllinie stammten, zu den Milzzellen getestet.

[0143] Die Milzzellen, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit dem gp96-Komplex immunisiert worden waren, zeigten eine starke, auf MHC-Klasse-I-beschränkte Aktivität gegen die SV40-transfizierten SVB6-Zellen, aber keine gegen die nicht-NP-transfizierten Zellen.

Beispiel 3. Rekonstitution immunogener Stressprotein-Peptid-Komplexe in vitro

[0144] Fig. 3A–Fig. 3D zeigt die antigenspezifischen zytotoxischen T-Zell-Aktivitäten von Splenozyten, die aus zwei Mäusen stammten, die mit einem rekonstituierten Hsp70-Peptid-Komplex immunisiert worden waren.

[0145] Nicht-komplexiertes Hsp70 wurde, um das ganze kurz zusammenzufassen, mittels des oben beschriebenen Verfahrens gereinigt, und das Peptid (SLSDLRGYVYQGL, SEQ ID NO: 1) wurde durch Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert. Das Peptid (1 mg) und ATP-behandeltes Hsp70 (9 mg) wurden gemischt und 3 Stunden bei Raumtemperatur in einem Bindungspuffer inkubiert, der 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 350 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ und 1 mM PMSF enthielt. Die resultierende Präparation wurde durch einen Centricon-10-Konzentrator (Millipore®) zentrifugiert, um nicht-gebundenes Peptid zu entfernen.

[0146] Der resultierende Komplex wurde zur Immunisierung von zwei naiven Mäusen verwendet. Die Milzzellen wurden aus den Mäusen isoliert und zweimal in vitro durch die Zugabe von letal bestrahlten EL4-Zellen, die mit einem Minigen, das für das Peptid SLSDLRGYVYQGL (SEQ ID NO: 1) codiert, transfiziert waren und es exprimierten, mittels des MLTC-Verfahrens stimuliert. Die Zytotoxizitäten der Milzzellen der beiden Mäuse wurden nach der ersten (Fig. 3A und Fig. 3C) und der zweiten (Fig. 3B und Fig. 3D) Stimulation mittels des ^{51}Cr-Freisetzungstests getestet. Die Freisetzung von ^{51}Cr wurde aus EL4-Zellen (leere Dreiecke) und aus EL4-Zellen, die mit dem Peptid SLSDLRGYVYQGL (SEQ ID NO: 1) transfiziert waren und es exprimierten (ausgefüllte Dreiecke), gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass Stressproteine und Peptide in vitro erfolgreich unter Erzeugung immunogener Stressprotein-Peptid-Komplexe rekonstituiert werden können.

SEQUENZLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE

(B) STREET: 1 GUSTAVE L. LEVY PLACE

(C) CITY: NEW YORK

(D) STATE: NEW YORK

(E) COUNTRY: USA

(F) POSTAL CODE (ZIP): 10029

(G) TELEPHONE: 212-241-0826

(H) TELEFAX:

(I) TELEX:

(ii) TITLE OF INVENTION: STRESS PROTEIN-PEPTIDE COMPLEXES AS PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINES AGAINST INTRACELLULAR PATHOGENS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 1

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: PATENT ADMINISTRATOR, TESTA HURWITZ & THIBEAULT

(B) STREET: 53 STATE STREET, EXCHANGE PLACE

(C) CITY: BOSTON

(D) STATE: MA

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 02109

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:

(B) FILING DATE:

(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: PITCHER, EDMUND R

(B) REGISTRATION NUMBER: 27,829

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: ARM-001

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (617) 248-7000

(B) TELEFAX: (617) 248-7100

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Peptide

(B) LOCATION: 1..13

(D) OTHER INFORMATION: /label= PEPTIDE1

/note= "ANTIGENIC PEPTIDE I"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

Ser Leu Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu

1 5 10

Patentansprüche

1. Gereinigter immunogener Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplex, wobei der genannte Komplex ein Säugetier-Stressprotein umfaßt, das nicht kovalent mit einem Peptid assoziiert ist, das eine antigene Determinante eines intrazellulären Pathogens aufweist, zur Verwendung als Medikament.

2. Komplex nach Anspruch 1, zur Verabreichung an ein Säugetier zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, die durch das genannte Pathogen ausgelöst wird.

3. Komplex nach Anspruch 2, wobei die Prophylaxe oder Therapie eine cytotoxische T-Zell-Reaktion bewirkt.

4. Komplex nach Anspruch 3, wobei die Prophylaxe oder Therapie eine cytotoxische T-Zell-Reaktion bewirkt, die von dem Haupt-Histokompatibilitätskomplex der Klasse I vermittelt wird.

5. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Stressprotein ein Mitglied einer Stressproteinfamilie ist, die ausgewählt ist aus Hsp60, Hsp70 und Hsp90.

6. Komplex nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein gp96 ist.

7. Komplex nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein Hsp60 ist.

8. Komplex nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein Hsp70 ist.

9. Komplex nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein Hsp90 ist.

10. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Pathogen ein Virus ist.

11. Komplex nach Anspruch 10, wobei das Virus ausgewählt ist aus Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Influenza, Varicella, Adenovirus, Herpes simplex Typ I (HSV-I), Herpes simplex Typ II (HSV-II), Rinderpest, Rhinovirus, Echovirus, Rotavirus, respiratorischer Synzytialvirus, Papillomavirus, Papovavirus, Cytomegalovirus, Echinovirus, Arbovirus, Huntavirus, Coxsackie-Virus, Mumpsvirus, Masernvirus, Rubellavirus, Poliovirus, humaner Immunschwächevirus Typ I (HIV-I), und humaner Immunschwächevirus Typ II (HIV-II).

12. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Pathogen ein Bakterium ist.

13. Komplex nach Anspruch 12, wobei das Bakterium ausgewählt ist aus Mycobacteria, Rickettsia, Neisseria und Legionella.

14. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Pathogen eine Protozoe ist.

15. Komplex nach Anspruch 14, wobei die Protozoe ausgewählt ist aus Leishmania, Trypanosoma und Kokzidioa.

16. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Pathogen ein intrazellulärer Parasit ist.

17. Komplex nach Anspruch 16, wobei der Parasit ausgewählt ist aus Chlamydia und Rickettsia.

18. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Stressprotein ein humanes Stressprotein ist.

19. Komplex nach Anspruch 2 oder irgendeinem der Ansprüche 3 bis 18, wenn sie direkt oder indirekt von Anspruch 2 abhängig sind, wobei das Säugetier-Stressprotein ein humanes Stressprotein ist.

20. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 19, zur Verabreichung an ein Säugetier in einer Menge im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 1000 µg Komplex/kg Körpergewicht des Säugetiers pro Verabreichung.

21. Komplex nach Anspruch 20, wobei die genannte Menge im Bereich von etwa 0,5 bis etwa 100 µg Komplex/kg Körpergewicht des Säugetiers pro Verabreichung liegt.

22. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 21, zur Verwendung mit einem Cytokin.

23. Komplex nach Anspruch 22, wobei das Cytokin ausgewählt ist aus IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, TNFβ, G-CSF, GM-CSF und TGF-β.

24. Komplex nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, wobei der Komplex und jede Art von Cytokin in Form einer Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger, Adjuvans oder Corrigens verwendet werden.

25. Verwendung eines gereinigten immunogenen Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexes zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung bei einem Säugetier, die von einem intrazellulären Pathogen ausgelöst wird, wobei der Komplex ein Säugetier-Stressprotein umfaßt, das nicht kovalent mit einem Peptid assoziiert ist, das eine antigene Determinante des Pathogens aufweist.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die genannte Prophylaxe oder Therapie eine wie in Anspruch 3 oder Anspruch 4 definierte gegen ein intrazelluläres Pathogen ist.

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder Anspruch 26, wobei der Komplex wie in irgendeinem der Ansprüche 5 bis 21 definiert ist, wobei das Medikament außerdem ein Cytokin umfaßt, wie es in Anspruch 22 oder 23 definiert ist.

28. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 25 bis 27, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

29. Verfahren zur Herstellung eines gereinigten, immunogenen, nicht kovalenten Komplexes aus einem Säugetier-Stressprotein und einem Peptid, das eine antigene Determinante eines intrazellulären Pathogens aufweist, das die Komplexierung des Säugetier-Stressproteins und des Peptids in vitro umfaßt.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Komponenten des Komplexes wie in irgendeinem der Ansprüche 5 bis 19 definiert sind.

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder Anspruch 30, wobei das Streßprotein vor der genannten Komplexierung in Gegenwart von ATP isoliert wird.

32. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 29 bis 31, wobei das Stressprotein vor der Komplexierung mit einem niedrigen pH behandelt wird.

33. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 29 bis 32, wobei das Peptid dadurch erhalten wurde, daß man das Peptid aus einem MHC-Peptid-Komplex eluierte, der aus einer eukaryotischen Zelle isoliert wurde, die mit dem genannten Pathogen infiziert wurde oder mit einem Gen, das für die antigene Determinante kodiert, transfiziert wurde.

34. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 29 bis 33, wobei die erhaltenen Komplexe gereinigt werden.

35. Gereinigter, immunogener, nicht kovalenter Komplex aus einem Säugetier-Stressprotein und einem Peptid, wie er in Anspruch 1 definiert wird, der erhältlich ist durch Komplexieren des genannten Säugetier-Stressproteins und des genannten Peptids in vitro.

36. Komplex nach Anspruch 35, wobei die Komponenten des Komplexes wie in irgendeinem der Ansprüche 5 bis 19 definiert sind.

37. Komplex nach Anspruch 35 oder Anspruch 36, hergestellt nach einem Verfahren, wie es in irgendeinem der Ansprüche 29 bis 34 beansprucht wird.

38. Komplex, wie er in irgendeinem der Ansprüche 35 bis 37 beansprucht wird, und ein Cytokin, wie es in Anspruch 22 oder Anspruch 23 definiert wird.

39. Komplex zur Verwendung als ein Arzneimittel, wobei der Komplex einer ist, wie er in irgendeinem der Ansprüche 35 bis 38 beansprucht wird.

40. Verwendung eines Komplexes zur Herstellung eines Medikaments, wie sie in irgendeinem der Ansprüche 25 bis 28 beansprucht wird, wobei der Komplex einer gemäß irgendeinem der Ansprüche 35 bis 38 ist.

41. Gereinigte immunogene Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexe, wie sie in Anspruch 1 definiert sind, wobei die Komplexe aus einer eukaryotischen Zelle isoliert wurden, die mit dem intrazellulären Pathogen infiziert wurde oder mit einem Gen, das für eine antigene Determinante des intrazellulären Pathogens kodiert, transfiziert wurde, wobei das Säugetier-Stressprotein ein Mitglied einer Stressproteinfamilie ist, die aus Hsp60, Hsp70 und Hsp90, jedoch nicht gp96 der Hsp90-Familie ausgewählt ist.

42. Gereinigte immunogene Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexe, wie sie in Anspruch 1 definiert sind, wobei die Komplexe aus einer eukaryotischen Zelle isoliert wurden, die mit dem genannten Pathogen infiziert ist, oder die mit einem Gen, das für eine antigene Determinante des Pathogens kodiert, das jedoch in der Zelle nicht vorkommt, wenn die Zelle nicht mit dem Pathogen infiziert oder mit dem Gen transfiziert ist, transfiziert ist, wobei das Stressprotein ein gp96 ist und das Pathogen eine Bakterie, eine Protozoe, ein intrazellulärer Parasit oder ein Virus ist, das ausgewählt ist aus Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Varicella, Adenovirus, Herpes simplex Typ I (HSV-I), Herpes simplex Typ II (HSV-II), Rinderpest, Rhinovirus, Echovirus, Rotavirus, respiratorischer Synzytialvirus, Papillomavirus, Cytomegalovirus, Echinovirus, Arbovirus, Huntavirus, Coxsackie-Virus, Mumpsvirus, Masernvirus, Rubellavirus, Poliovirus, humaner Immunschwächevirus Typ I (HIV-I), oder humaner Immunschwächevirus Typ II (HIV-II).

43. Komplexe nach Anspruch 41, wobei die Komponenten wie in irgendeinem der Ansprüche 8 bis 18 definiert sind.

44. Komplexe nach Anspruch 42, wobei die Komponenten wie in irgendeinem der Ansprüche 13, 15, 17 und 19 definiert sind.

45. Komplex zur Verwendung als Medikament, wie er in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4 beansprucht wird, wobei der Komplex einer ist, wie er in irgendeinem der Ansprüche 41 bis 44 beansprucht wird.

46. Verwendung eines Komplexes zur Herstellung eines Medikaments, wie sie in irgendeinem der Ansprüche 25 bis 28 beansprucht wird, wobei der Komplex einer ist, wie er in irgendeinem der Ansprüche 41 bis 44 beansprucht wird.

47. Zusammensetzung mit einem gereinigten immunogenen Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplex, wie er in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 19 und 35 bis 37 beansprucht wird, oder gereinigten immunogenen Säugetier-Stressprotein-Peptid-Komplexen, wie sie in irgendeinem der Ansprüche 41 bis 44 beansprucht werden, und einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Adjuvans oder Corrigens.

48. Zusammensetzung, wie sie in Anspruch 47 beansprucht wird, die außerdem ein Cytokin umfaßt, wie es in Anspruch 22 oder Anspruch 23 definiert wird.

49. Verwendung einer Zusammensetzung, wie sie in Anspruch 47 oder Anspruch 48 beansprucht wird, zur Herstellung eines Medikaments zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung eines Säugetiers, die durch ein intrazelluläres Pathogen ausgelöst wird.

50. Verwendung nach Anspruch 49, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

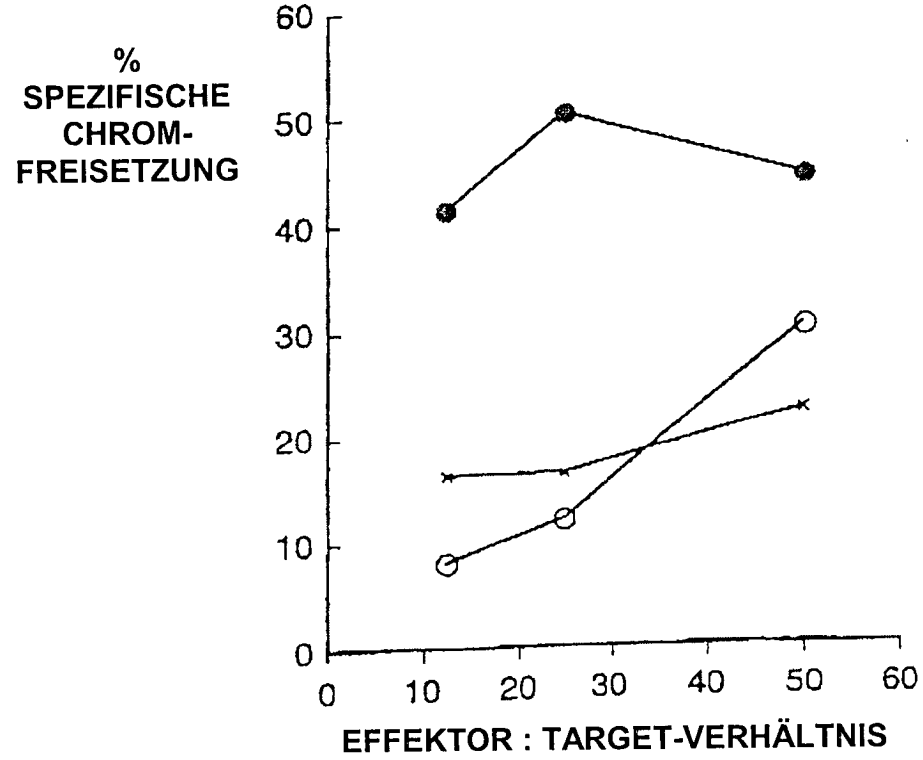

FIG. 1

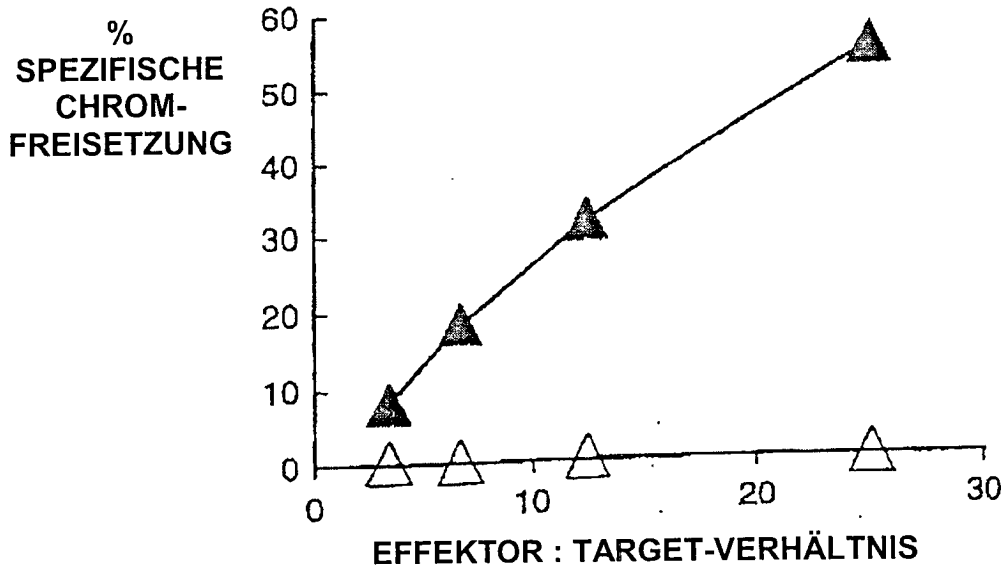

FIG. 2

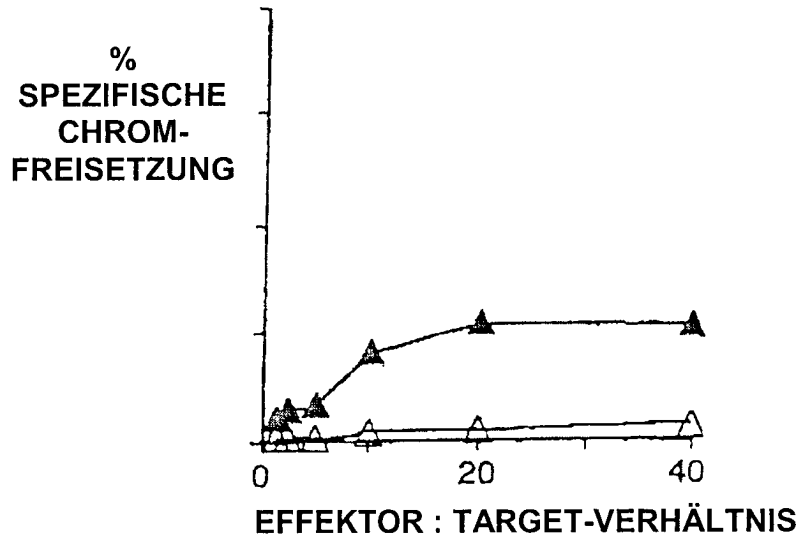
%
SPEZIFISCHE
CHROM-
FREISETZUNG
0
20
40
EFFEKTOR : TARGET-VERHÄLTNIS

FIG. 3A

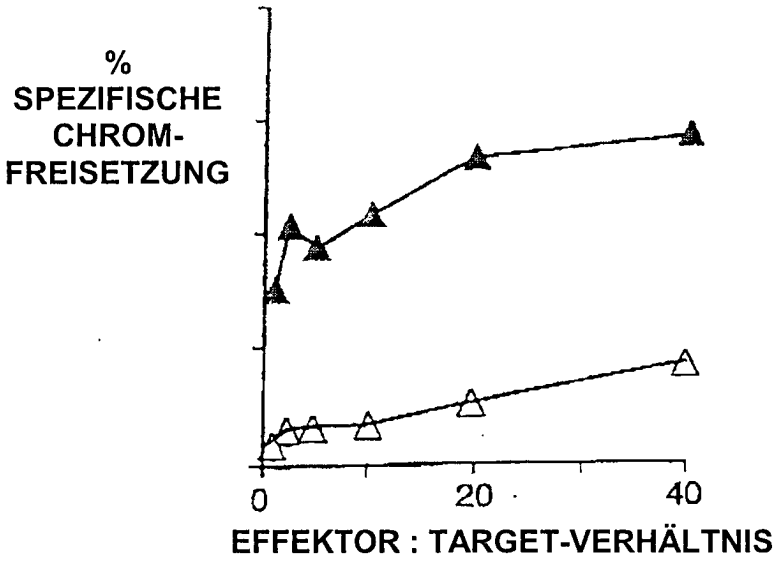
%
SPEZIFISCHE
CHROM-
FREISETZUNG
0
20
40
EFFEKTOR : TARGET-VERHÄLTNIS

FIG. 3B

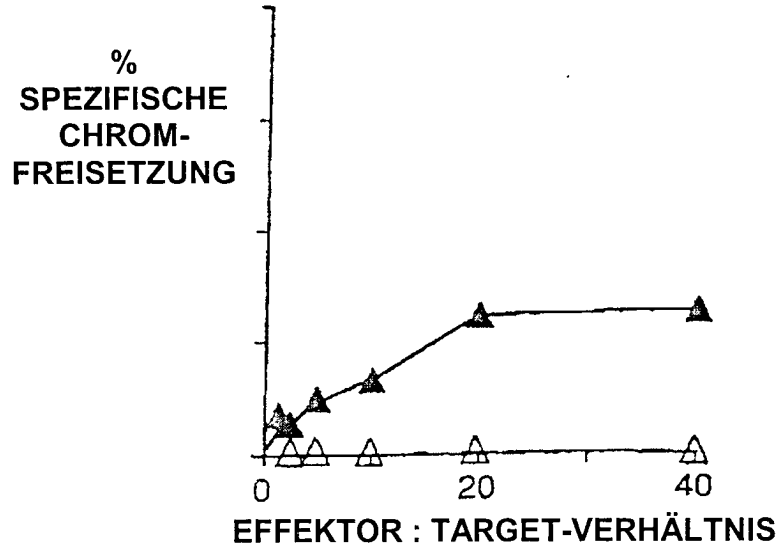
%
SPEZIFISCHE
CHROM-
FREISETZUNG
0
20
40
EFFEKTOR : TARGET-VERHÄLTNIS

FIG. 3C

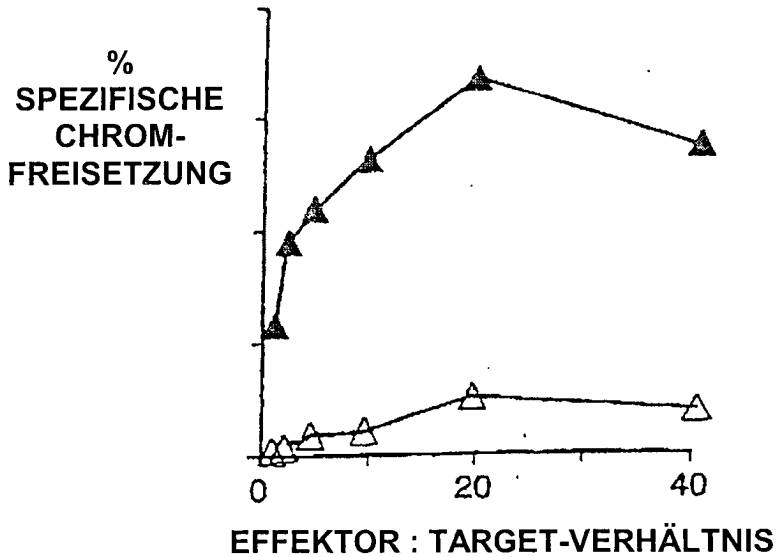
%
SPEZIFISCHE
CHROM-
FREISETZUNG
0
20
40
EFFEKTOR : TARGET-VERHÄLTNIS

FIG. 3D