



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 567 T2** 2009.05.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 228 095 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 567.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA00/01254**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 971 185.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/030847**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.10.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.05.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/705** (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

160879 P **22.10.1999** **US**

223325 P **07.08.2000** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Sanofi Pasteur Ltd., Toronto, Ontario, CA

(72) Erfinder:

**BERINSTEIN, Neil, Toronto, Ontario M5P 1V1, CA;
TARTAGLIA, James, Schenectady, NY 12303, US;
MOINGEON, Philippe, F-69480 Pommiers, FR;
BARBER, Brian, Mississauga, Ontario L5G 3T5,
CA; TINE, John A., Scotia, NY 12302, US**

(74) Vertreter:

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

(54) Bezeichnung: **MODIFIZIERTES GP100 UND DESSEN VERWENDUNG**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Fachgebiet der Immuntherapie und betrifft die Konstruktion neuer Formen von gp100, welche für die Erzeugung von Immunantworten in vivo geeignet sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Das Auftreten von kutanem bösartigen Melanom und die Sterblichkeit hieran haben über die letzten Jahrzehnte dramatisch zugenommen (Liu, T., et al. (1996) Surg Clin North Am 76: 1205; Gloster, H. M., et al. (1996) Dermatol Surg 22: 217). Derzeitig beträgt das geschätzte Lebenszeit-Risiko für einen Amerikaner, ein Melanom zu entwickeln, ungefähr 1 zu 90 (Rigel, D. S., et al. (1979) Mayo Clin Proc 72: 367). Während die meisten Melanome im Frühstadium erfolgreich durch einfaches chirurgisches Herausschneiden behandelt werden können (Greenstein, D. S., et al. (1995) Dermatol Surg 21: 927; Whooley, B. P., et al. (1995) Dermatol Surg 4: 187; Urist, M. M., et al. (1996) Ann Rev Med 47: 211), werden Patienten mit einer fortgeschrittenen Krankheit selten geheilt, selbst bei aggressiver Chemotherapie und/oder Immuntherapie (Falkson, C. I., et al. (1995) Anticancer Drugs 6: 709).

[0003] Obwohl Melanom als ein aggressiver Primärschaden vorhanden sein kann, welcher innerhalb von Wochen metastasiert, findet seine Entwicklung typischerweise über eine Zeitperiode von mehreren Monaten bis Jahren statt und nimmt seinen Fortgang über eine Reihe von getrennten pathologischen Stadien. Das früheste Stadium ist das Melanom der radialen Wachstumsphase (RGP), welches als ein intradermales Neoplasma (Melanom in situ) beginnt. RGP-Melanome können Monate oder sogar Jahre lang in relativer Ruhe verbleiben und werden im Allgemeinen durch einfaches Herausschneiden geheilt. Schließlich entwickeln die meisten RGP-Melanome eine Komponente des vertikalen Wachstums (Melanom der vertikalen Wachstumsphase, VGP), welche einen aggressiveren Tumor kennzeichnet, der mit geringerer Wahrscheinlichkeit durch einfaches Herausschneiden geheilt werden kann. Die metastatische Ausbreitung ist das Endstadium in der Tumprogression und deutet auf ein sehr schlechtes Endergebnis hin (Reintgen, D. (1997) Ann Surg 225: 1).

[0004] Der wichtigste prognostische Faktor in der Bestimmung des Überlebens bei einem Patienten mit primärem Melanom ist die Tiefe der Läsion. Während das Fünf-Jahre-Überleben für Patienten mit Tumoren von $\leq 0,75$ mm Dicke ungefähr 96% beträgt, weisen Individuen mit Tumoren $> 4,5$ mm Tiefe ein Fünf-Jahre-Überleben von nur ungefähr 38% auf (Whooley, B. P., et al. (1995) Dermatol Surg 4: 187; Urist, M. M., et al. (1996) Ann Rev Med 47: 211). Da die Entwicklung eines VGP-Melanoms aus seinem RGP-Vorläufer im Allgemeinen wenigstens einige Monate beansprucht, existiert ein "Zeitfenster", innerhalb dessen das chirurgische Herausschneiden einen dramatischen Effekt auf das Patientenergebnis aufweisen kann. Geht man noch weiter, ist es vernünftig, vorzuschlagen, dass neue Herangehensweisen zum Umgang mit der Restkrankheit zu dieser Zeit am erfolgreichsten sind.

[0005] Mehrere Beweislinien legen nahe, dass eine Manipulation von Immunantworten gegen Melanom therapeutisch sein kann: 1. Klinische Beobachtungen einer spontanen Regression von metastatischem Melanom können durch eine Anti-Melanom-Immunantwort verursacht werden (Nelson, C. A., et al. (1976) Natl Cancer Inst Monogr 44: 145). 2. Eine Regression von metastatischem Melanom ist auch in einigen Patienten beobachtet worden, denen man hohe Dosen an IL-2 mit oder ohne Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) oder tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL's) verabreichte (Rosenberg, S. A., et al. (1998) J Natl. Cancer Inst 90: 1894). 3. Noch kürzlicher ist eine Anzahl von Melanom-spezifischen und -assoziierten Tumorantigenen kloniert worden (Van den Eynde, B., et al. (1997) Curr Opin Immunol 9: 684). Die Verfügbarkeit dieser Reagenzien hat zur Hoffnung geführt, dass spezifische Impfstoffe entwickelt werden können, um die Fähigkeit von tumorspezifischen T-Zellen zu steigern, Melanomzellen zu eliminieren. Diese Antigene können in einer Vielzahl von Zugführungsvehikeln verabreicht werden, und das effektivste Dosierungsschema für eine Optimierung einer Anti-Tumor-Antwort ist derzeit nicht eindeutig.

[0006] Herkömmliche Impfstoffe für viele Infektionskrankheiten haben gezeigt, dass eine primäre infektiöse Herausforderung eine effektive schützgebende Gedächtnis-Immunantwort induzieren kann. Ein kritisches Ereignis, das zum Initiieren einer Immunantwort erforderlich ist, selbst in Gegenwart von zirkulierenden Tumor-reaktiven T-Zellen, besteht darin, dass Tumorantigene Zugang in die sekundären Lymphoidstrukturen der Milz und der Lymphknoten erlangen (Zinkernagel, R. M., et al. (1997) Immunol Rev 156: 199). Ein Melanom, welches sich lokal in der Haut entwickelt, ist vor dem Immunsystem verborgen, solange die Tumorantigene die sekundären Lymphoidorgane nicht erreichen. Der Tumor kann dann zu einer so großen Masse heranwachsen,

dass zu der Zeit, an welcher eine Immunantwort ausgelöst wird, selbige rasch von dem Tumor überlastet wird (Moskophiis, D., et al. (1993) Nature 362: 758). Alternativ dazu können Melanomzellen, welche ausbrechen und zu dem örtlichen Lymphknoten gelangen, nicht in der Lage sein, eine Immunantwort auszulösen, weil sie schlechte Antigen-präsentierende Zellen sind, d. h. keine hohen Spiegel an HLA-Klasse I-Molekülen (Ferrone, S. (1995) Immunology Today 61: 487) oder costimulatorischen Molekülen, wie Mitglieder der B7-Familie (Bluestone, J. A., et al. (1995) Immunity 2: 555), exprimieren. Erneut kann der Tumor eine Tolerierungs-Größe erreichen, bevor eine Immunantwort initiiert wird. Eine erfolgreiche Impfungsstrategie in Patienten mit tiefem, aber nicht-metastatischen, Melanom sollte sowohl die Zahl an Tumor-reaktiven T-Zellen erhöhen als auch diese aktivieren, sodass sie in die Peripherie wandern und ihre zytotoxische Effektorfunktion ausüben können.

[0007] gp100 wird normalerweise in Melanosomen vorgefunden und in Melanozyten, retinalen Zellen und anderen Abkömmlingen der Neuralrinne exprimiert (Kawakami, Y., et al. (1997) Int Rev Immunol 14: 173). Die Funktion von gp100 ist derzeit unbekannt (Rosenberg, S. A., et al. (1998) Nature Med 4: 321). Durch Massenspektrometrie sind drei immundominante HLA-A2-bindende gp100-Peptide identifiziert worden: g9-154 (Aminosäuren 154-162), g9-209 (Aminosäuren 209-217) und g9-280 (Aminosäure 280-288) (Kawakami, Y., et al. (1995) J Immunol 154: 3961). Insbesondere sind zwei dieser Peptide synthetisch verändert worden, sodass eine stärkere Immunantwort im ursprünglichen T-Zellklon induziert wird: das Threonin an der Position 2 in g9-209 wurde zu einem Methionin verändert, und der Alaninrest an der Position 9 in g9-280 wurde zu einem Valin verändert (Parkhurst, qqM. R., et al. (1996) J Immunol 157: 2539). Diese Änderungen erhöhen die Bindungsaffinität der Peptide an das HLA-A2-Molekül ohne Änderung der vom T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannten Epitope. Rosenberg et al. haben bereits erfolgreich Melanompatienten mit einem dieser modifizierten Peptide immunisiert und objektive klinische Antworten in einigen Patienten erzielt (Rosenberg, S. A., et al. (1998) Nature Med 4: 321).

[0008] Es wurde gezeigt, dass ein Pocken- bzw. Poxvirusvektor, der eine Nukleinsäure umfasst, die gp100 codiert, welches an den Codons 210 (T210M) und 288 (A288V) modifiziert ist, eine gp100-spezifische Immunantwort in Mäusen induziert (Irvine, K., et al. (1999) Cancer Research 59: 2536).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben eine pharmazeutische Zusammensetzung entwickelt, umfassend ein Poxvirus, das darin inseriert eine gp100M codierende, in [Fig. 1](#) gezeigte, Nukleinsäuresequenz, definiert durch SEQ. ID. Nr.: 1, aufweist, zum Primen, und die Peptide, die aus Aminosäuresequenzen gemäß SEQ. ID. Nr.: 124 und SEQ. ID. Nr.: 125 bestehen, zum Boosten, wobei die Zusammensetzung für die getrennte Verabreichung des Vektors und der Peptide hergerichtet ist. Diese Zusammensetzung kann für die Erzeugung einer Immunantwort gegen humanes Melanom durch sequentielle Verabreichung verwendet werden.

[0010] Die Nukleinsäuresequenz von gp100M ist in [Fig. 1](#) gezeigt, und ist hierin ebenfalls als SEQ. ID. Nr.: 1 bekannt. Die von der Nukleinsäuresequenz von gp100M codierte, entsprechende Aminosäuresequenz ist in der [Fig. 2](#) gezeigt, welche hierin als SEQ. ID. Nr.: 2 bezeichnet wird.

[0011] Es wird ein isoliertes Nukleinsäuremolekül beschrieben, welches bereitgestellt wird, wobei es eine Sequenz, wie in der [Fig. 1](#) gezeigt (SEQ. ID. Nr.: 1), aufweist.

[0012] Vorzugsweise umfasst das gereinigte und isolierte Nukleinsäuremolekül:

- (a) eine Nukleinsäuresequenz, wie gezeigt in SEQ. ID. Nr.: 1, worin T ebenfalls U sein kann;
- (b) Nukleinsäuresequenzen, die zu (a) komplementär sind;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die zu (a) oder (b) homolog sind;
- (d) ein Fragment von (a) bis (c), das mindestens 15 Basen, vorzugsweise 20 bis 30 Basen lang ist und das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen an (a) bis (d) hybridisiert; oder
- (e) ein Nukleinsäuremolekül, das sich von jeder der Nukleinsäuren von (a) bis (c) hinsichtlich der Codonsequenzen auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes unterscheidet.

[0013] Es werden ein isoliertes gp100M-Protein und/oder immunogene Fragmente davon, codiert von einem Nukleinsäuremolekül der Erfindung, beschrieben. Das gp100M besitzt die Aminosäure[sequenz], wie in der [Fig. 2](#) gezeigt (SEQ. ID. Nr.: 2).

[0014] Bevorzugte Fragmente schließen ein Fragment ein, welches eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 124 oder gemäß SEQ. ID. Nr.: 125 aufweist.

[0015] Auch wird ein Verfahren zum Modulieren des Immunsystems eines Tiers beschrieben, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge eines gp100 oder gp100, welches modifiziert worden ist, um ein Molekül bereitzustellen, welches das Immunsystem moduliert, an ein hierfür bedürftiges Tier. Vorzugsweise handelt es sich bei dem modifizierten gp100 oder gp100 um gp100M bzw. gp100M, am stärksten bevorzugt weisen das modifizierte gp100 oder gp100 die Sequenzen von SEQ. ID. Nr.: 1 bzw. 2 auf.

[0016] Ebenfalls beschrieben wird ein Verfahren zum Modulieren des Immunsystems eines Tiers, umfassend das Verabreichen, an ein hierfür bedürftiges Tier, einer wirksamen Menge eines Vektors, in welchen ein gp100 inseriert worden ist, das modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem moduliert, wobei der Vektor vorzugsweise viral ist, [und] das Virus vorzugsweise ein Adenovirus, Alphavirus oder Poxvirus ist. Stärker bevorzugt handelt es sich bei dem Virus, falls es ein Poxvirus ist, um Vaccinia, Fowlpox bzw. Geflügelpocken, Avipox bzw. Vogelpocken, TROVAC, ALVAC, NYVAC oder MVA, vorzugsweise ALVAC.

[0017] Das modifizierte gp100 oder gp100 können mit einem zweiten Mittel, vorzugsweise einem Lymphokin, Cytokin oder costimulatorischen Molekül, wie einem Mitglied der B7-Molekülfamilie, verabreicht werden, wobei das Cytokin vorzugsweise GM-CSF, IL-2, IL-12, TNF oder IFN γ 1 ist.

[0018] Es wird ein Verfahren zum Stimulieren des Immunsystems eines Tiers beschrieben, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge eines gp100 oder gp100, welches modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem stimuliert, vorzugsweise gp100M bzw. gp100M, an ein hierfür bedürftiges Tier, wobei das modifizierte gp100 oder gp100 am stärksten bevorzugt die Sequenzen von SEQ. ID. Nr.: 1 bzw. 2 aufweisen.

[0019] Es wird ein Verfahren zum Steigern der Effizienz eines Gen-Impfstoffs bei der Behandlung eines Tiers beschrieben, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge eines gp100, welches modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem stimuliert, vorzugsweise gp100M; zum Beispiel in bevorzugter Weise, wenn das Tier Krebs hat.

[0020] Es wird eine Zusammensetzung zum Modulieren des Immunsystems eines Tiers beschrieben, umfassend eine effektive Menge eines gp100, das modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem stimuliert, vorzugsweise gp100M, in einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel oder Träger, wobei das modifizierte gp100 am stärksten bevorzugt die Sequenz von SEQ. ID. Nr.: 1 aufweist.

[0021] Es werden Verfahren für prophylaktische oder therapeutische Anwendungen beschrieben, welche eine Nukleinsäuresequenz beteiligen, die ein modifiziertes gp100, vorzugsweise gp100M, weiter bevorzugt ein gp100M mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 2, codiert.

[0022] Es wird ebenfalls ein Melanomimpfstoff beschrieben, der eine Nukleinsäuresequenz umfasst, codierend ein modifiziertes gp100, zum Verhindern oder Behandeln von Krebs, vorzugsweise gp100M, weiter bevorzugt ein gp100M mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 2.

[0023] Ebenfalls beschrieben wird ein Melanomimpfstoff, der eine Nukleinsäuresequenz umfasst, codierend ein modifiziertes gp100, zum Verhindern oder Behandeln von Melanom, vorzugsweise gp100M, weiter bevorzugt ein gp100M mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 2.

[0024] Es wird eine modifizierte gp100-Proteinsequenz, welche modifiziert ist, um ihre Immunogenizität zu erhöhen oder ihre Induktion einer Anti-Melanom-Immunantwort durch Verbesserung der Bindung an MHC-Moleküle zu steigern, zur Verwendung in hierin beschriebenen prophylaktischen oder therapeutischen Verfahren beschrieben.

[0025] Es wird ein Impfstoff beschrieben, umfassend eine modifizierte gp100-Nukleinsäuresequenz oder ihr entsprechendes Protein, fähig zum Hervorrufen der Produktion von Antikörpern in einem Säugetier gegen entsprechende Antigene, vorzugsweise gp100M bzw. gp100M, weiter bevorzugt ein gp100M mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 1 und ein gp100M mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. Nr.: 2.

[0026] Es wird eine antigene, immunologische oder Impfstoff-Zusammensetzung oder eine therapeutische Zusammensetzung zur Induzierung einer antigenen oder immunologischen Antwort in einem mit der Zusammensetzung inokulierten Wirtstier beschrieben, wobei der Impfstoff ein modifiziertes rekombinantes Virus einschließt, bei welchem nicht-essenzielle Virus-codierte genetische Funktionen inaktiviert sind, sodass das rekombinante Virus eine abgeschwächte Virulenz und eine verbesserte Sicherheit aufweist.

[0027] Es wird eine immunogene Zusammensetzung beschrieben, enthaltend ein modifiziertes rekombinantes Virus, bei welchem nicht-essenzielle Virus-codierte genetische Funktionen inaktiviert sind, sodass das rekombinante Virus eine abgeschwächte Virulenz und eine verbesserte Sicherheit aufweist.

[0028] Es wird ein modifiziertes rekombinantes Virus beschrieben, bei welchem nicht-essenzielle Virus-codierte genetische Funktionen darin inaktiviert sind, sodass das Virus eine abgeschwächte Virulenz aufweist, und wobei das modifizierte rekombinante Virus ferner DNA aus einer heterologen Quelle in einer nicht-essenziellen Region des Virusgenoms enthält.

[0029] Es wird ein rekombinantes Virus beschrieben, umfassend ein Virus, in welches eine Nukleinsäure gemäß der Erfindung inseriert ist, wobei die Nukleinsäure ein Polypeptid codiert, wobei das rekombinante Virus die Expression des Polypeptids in einer infizierten Zelle verursacht.

[0030] Es wird ein rekombinantes Virus beschrieben, in welches eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung inseriert ist, wobei die Nukleinsäure ein modifiziertes gp100-Polypeptid codiert, wobei mit dem rekombinanten Virus infizierte Zellen zur Hervorrufung einer Immunantwort direkt gegen ein Mitglied in der Lage sind, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:

- (1) dem Polypeptid;
- (2) einem Fragment des Polypeptids;
- (3) einer Zelle, welche das Polypeptid oder ein Fragment davon exprimiert; oder
- (4) Zellen, welche das Protein oder Fragment davon binden, wobei das Virus vorzugsweise Adenovirus, Alphavirus oder Poxvirus ist, wobei das Virus, falls es Poxvirus ist, vorzugsweise Vaccinia, Fowlpox, Avipox, TROVAC, ALVAC, NYVAC oder MVA ist, wobei das Virus bevorzugt ALVAC ist.

[0031] Ein derartiges rekombinantes Virus kann Teil einer Zusammensetzung sein, welche das jeweilige rekombinante Virus und ein pharmazeutisch annehmbares Verdünnungsmittel oder Träger umfasst.

[0032] Gleichfalls werden das Produkt der Expression eines rekombinanten Virus, das eine Nukleinsäure einschließt, codierend ein modifiziertes gp100, wobei das Virus vorzugsweise ein Adenovirus, Alphavirus oder Poxvirus ist, wobei das Virus, sofern es Poxvirus ist, weiter bevorzugt Vaccinia, Fowlpox, Avipox, TROVAC, ALVAC, NYVAC oder MVA, vorzugsweise ALVAC, ist, und Anwendungen dafür, wie etwa zur Bildung antigener, immunologischer oder Impfstoff-Zusammensetzungen zur Behandlung, Prävention, Diagnose oder zum Testen; sowie DNA aus dem rekombinanten Poxvirus, welche beim Konstruieren von DNA-Sonden und PCR-Primern brauchbar ist, beschrieben.

[0033] Andere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der nachstehenden ausführlichen Beschreibung offensichtlich. Es versteht sich jedoch, dass die ausführliche Beschreibung und die spezifischen Beispiele lediglich zur Veranschaulichung angegeben sind, obgleich sie bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angeben.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0034] Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf die Zeichnung(en) besser verständlich, worin:

[0035] [Fig. 1](#) die Nukleinsäuresequenz von gp100M-cDNA zeigt.

[0036] [Fig. 2](#) zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz für das gp100M-Protein.

[0037] [Fig. 3](#) zeigt die Nukleinsäuresequenz von C5H6gp100M, der H6-Protomorph-gesteuerten humanen gp100M-Insertionskassette.

[0038] [Fig. 4](#) zeigt eine schematische Wiedergabe des ALVAC(2)-gp100M(vCP1584)-Genoms.

[0039] [Fig. 5](#) zeigt die Nukleotidsequenz der Oligonukleotidprimer, die zum Sequenzieren von pBS/1584 verwendet werden.

[0040] [Fig. 6](#) zeigt Immunopräzipitat-Ergebnisse aus nicht-infizierten HeLa-Zellen oder Zellen, welche entweder mit parentalem ALVAC-Virus, ALVAC-gp100 oder ALVAC(2)-gp100M infiziert waren.

[0041] [Fig. 7](#) zeigt einen Western-Blot von HeLa-Zellen, welche mit einem von parentalem ALVAC-Virus, AL-

VAC-gp100 oder ALVAC(2)-gp100M infiziert waren, wobei die Expression von Volllängen-gp100 in ALVAC-gp100- oder ALVAC(2)-gp100M-infizierten Zellen veranschaulicht ist.

[0042] [Fig. 8](#) ist eine Säulengrafik, welche die Ergebnisse einer IFN- γ -ELISPOT-Analyse eines Tiers zeigt, das eine intranodale Injektion des Tumorantigens empfängt.

[0043] [Fig. 9](#) ist eine Säulengrafik, welche die Ergebnisse einer IFN- γ -ELISPOT-Analyse eines Tiers zeigt, das eine intranodale Injektion des Tumorantigens empfängt.

[0044] [Fig. 10](#) ist eine Säulengrafik, welche die Ergebnisse einer IFN- γ -ELISPOT-Analyse eines Tiers zeigt, das eine subkutane Injektion des Tumorantigens empfängt.

[0045] [Fig. 11](#) ist eine Säulengrafik, welche die Ergebnisse einer IFN- γ -ELISPOT-Analyse eines Tiers zeigt, das eine subkutane Injektion des Tumorantigens empfängt.

[0046] [Fig. 12](#) ist eine Grafik, welche die Antikörperantwort nach einem Dosierungsschema von intranodaler (Gruppe 2) und subkutaner (Gruppe 3) Verabreichung von ALVAC-modifiziertesgp100/modifiziertes-gp100-Peptid-Immunogenen zeigt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0047] Wie bereits erwähnt, haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung entwickelt, die ein Poxvirus, das darin inseriert eine Nukleinsäuresequenz, die gp100M codiert, wie gezeigt in der [Fig. 1](#), definiert durch SEQ. ID. Nr.: 1, aufweist, zum Primen, und die Peptide, bestehend aus den Aminosäuresequenzen gemäß SEQ. ID. Nr.: 124 und SEQ. ID. Nr.: 125, zum Boosten, umfasst, wobei die Zusammensetzung für die getrennte Verabreichung des Vektors und der Peptide hergerichtet ist. Diese Zusammensetzung ist zur Erzeugung einer Immunantwort gegen humanes Melanom durch sequentielle Verabreichung brauchbar.

I. IN DER ERFINDUNG VERWENDETE NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE

[0048] Wie oben erwähnt, haben die Erfinder das Gen (gp100M) und sein Genprodukt (gp100M) beschrieben und charakterisiert.

[0049] Allgemein ausgedrückt, wird ein isoliertes Nukleinsäuremolekül beschrieben, umfassend eine Sequenz, die ein Protein mit der Aktivität eines gp100 codiert, das modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem stimuliert. Wie hierin verwendet, schließt ein gp100, das modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem stimuliert, diejenigen gp100-Sequenzen mit modifizierten Sequenzen bei etwa den Aminosäuren 209 und/oder bei etwa 280 (wie dargestellt in Parkhurst, M. R., et al., J. Immunol. 157: 2539–2548 (1996)) und/oder immunogene Fragmente davon ein.

[0050] Es wird ein isoliertes Nukleinsäuremolekül beschrieben, das ein modifiziertes gp100 codiert, welches zum Modulieren des Immunsystems in der Lage ist. Der Begriff "isoliert" bezieht sich auf eine Nukleinsäure, die von zellulärem Material oder Kulturmedium, falls sie durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt wird, oder von chemischen Vorläufern oder anderen Chemikalien, falls sie chemisch synthetisiert wird, im Wesentlichen frei ist. Der Begriff "Nukleinsäure" schließt beabsichtigtermaßen DNA und RNA ein, und diese kann entweder doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül wird beschrieben, wobei es eine Sequenz, wie in der [Fig. 1](#) gezeigt, aufweist.

[0051] Vorzugsweise umfasst das gereinigte und isolierte Nukleinsäuremolekül:

- (a) eine Nukleinsäuresequenz, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, worin T ebenfalls U sein kann;
- (b) Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zu (a) sind;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die homolog zu (a) oder (b) sind;
- (d) ein Fragment von (a) bis (c), das wenigstens 15 Basen, vorzugsweise 20 bis 30 Basen lang ist und das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen an (a) bis (c) hybridisiert; oder
- (e) ein Nukleinsäuremolekül, das sich von jeder der Nukleinsäuren von (a) bis (c) hinsichtlich Codonsequenzen auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes unterscheidet.

[0052] Es werden Nukleinsäuremoleküle beschrieben, welche Verkürzungen der Proteine der Erfindung sowie Analoge und Homologe der Proteine der Erfindung und Verkürzungen davon, wie nachstehend beschrie-

ben, codieren.

[0053] Es werden ebenfalls Nukleinsäuremoleküle beschrieben, welche Nukleinsäuresequenzen mit einer wesentlichen Sequenzhomologie zu der Nukleinsäuresequenz, wie in der [Fig. 1](#) gezeigt, und Fragmenten davon, aufweisen. Der Begriff "Sequenzen mit wesentlicher Sequenzhomologie" bezeichnet diejenigen Nukleinsäuresequenzen, welche geringfügige oder folgenlose Sequenzabweichungen von diesen Sequenzen aufweisen, d. h. die Sequenzen funktionieren auf im Wesentlichen die gleiche Weise, um funktionell äquivalente Proteine herzustellen. Die Abweichungen können auf lokale Mutationen oder strukturelle Modifikationen zurückzuführen sein.

[0054] Im Allgemeinen schließen Nukleinsäuresequenzen mit einer wesentlichen Homologie Nukleinsäuresequenzen mit wenigstens 70%, vorzugsweise 80–90% Identität zu der Nukleinsäuresequenz, wie in der [Fig. 1](#) gezeigt, ein.

[0055] Ebenfalls beschrieben sind ein Nukleinsäuremolekül und Fragmente davon mit wenigstens 15 Basen, welche an die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung unter Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise stringenten Hybridisierungsbedingungen, hybridisieren. Geeignete Stringenzbedingungen, welche die DNA-Hybridisierung fördern, sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt (zum Beispiel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6). Hybridisierungsvorgehen sind dem Fachmann ebenfalls durchaus bekannt (wie zum Beispiel beschrieben in Ausubel et. al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. (1994), Silhavy et al., Experiments with Gene Fusion, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1984); Davis et al., Methods in Enzymol. 65: 404 (1980)). Bedeutende Parameter, welche für die Optimierung von Hybridisierungsbedingungen in Betracht gezogen werden können, werden in einer Formel widergespiegelt, welche die Berechnung eines kritischen Werts, der Schmelztemperatur, über welcher zwei komplementäre DNA-Stränge sich voneinander trennen, gestattet (Davis et al., Methods in Enzymol. 65: 404 (1980)). Diese Formel ist wie folgend: $T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% G + C) + 16,6 \log (\text{tatsächliche Ionenkonzentration}) - 0,63 \times (\% \text{Formamid}) - 600/\text{Basenzahl}$. Unter geeigneten Stringenzbedingungen ist die Hybridisierungstemperatur (T_h) ungefähr 20 bis 40°C, 20 bis 25°C oder vorzugsweise 30 bis 40°C unter der berechneten T_m . Der Fachmann auf dem Gebiet wird verstehen, dass optimale Temperatur- und Salzbedingungen ohne Weiteres empirisch in Vorbereitungsexperimenten unter Anwendung herkömmlicher Verfahrensweisen bestimmt werden können.

[0056] Zum Beispiel können stringente Bedingungen sowohl für Vorhybridisierungs- als auch Hybridisierungssinkubationen (i) innerhalb von 4 bis 16 Stunden bei 42°C, in 6 × SSC mit 50% Formamid, oder (ii) innerhalb von 4–16 Stunden bei 65°C in einer wässrigen 6 × SSC-Lösung (1 M NaCl, 0,1 M Natriumcitrat (pH 7,0)) erzielt werden. Typischerweise werden Hybridisierungsexperimente bei einer Temperatur von 60 bis 68°C, z. B. 65°C, durchgeführt. Bei einer solchen Temperatur können stringente Hybridisierungsbedingungen in 6 × SSC, vorzugsweise in 2 × SSC oder 1 × SSC, weiter bevorzugt in 0,5 × SSC, 0,3 × SSC oder 0,1 × SSC (in Abwesenheit von Formamid) erreicht werden. 1 × SSC enthält 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat.

[0057] Für Polynukleotide mit 30 bis 600 Nukleotiden wird die oben genannte Formel verwendet und dann durch Subtrahieren von (600/Polynukleotidgröße in Basenpaaren) korrigiert. Stringenzbedingungen sind durch eine T_h definiert, welche 5 bis 10°C unter der T_m liegt.

[0058] Hybridisierungsbedingungen mit kürzeren Oligonukleotiden als 20 bis 30 Basen folgen nicht exakt den oben dargestellten Regeln. In solchen Fällen ist die Formel zur Berechnung der T_m wie folgend: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$. Zum Beispiel wird ein 18-Nukleotid-Fragment von 50% G + C eine ungefähre T_m von 54°C aufweisen.

[0059] Nukleinsäuremoleküle aus einem modifizierten gp100-Gen, wie dem gp100M-Gen, können durch Herstellen einer markierten Nukleinsäuresonde, basierend auf der Gesamtheit oder einem Teil der Nukleinsäuresequenz, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, und Verwenden dieser markierten Nukleinsäuresonde zum Screenen einer geeigneten DNA-Bibliothek (z. B. einer cDNA- oder einer genomischen DNA-Bibliothek) isoliert werden. Durch Screenen einer cDNA- oder genomischen DNA-Bibliothek isolierte Nukleinsäuren können durch Standardtechniken sequenziert werden.

[0060] Nukleinsäuremoleküle, wie beschrieben, können ebenfalls durch selektives Amplifizieren einer Nukleinsäure unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion(PCR)-Methode und von cDNA, genomischer DNA oder einer anderen Quelle von DNA isoliert werden. Es ist möglich, synthetische Oligonukleotidprimer aus dem Nukleinsäuremolekül, wie in der [Fig. 1](#) gezeigt, zur Verwendung in einer PCR zu entwerfen. Diese syntheti-

schen Oligonukleotidprimer können ebenfalls weiter modifiziert werden, um spezifische Abänderungen von der normalen Nukleinsäuresequenz einzubinden, sodass sie für eine ortsgerichtete Mutagenese verwendet werden können. Eine Nukleinsäure kann aus cDNA oder genomischer DNA unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer und von standardmäßigen PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Es ist davon auszugehen, dass cDNA aus mRNA durch Isolieren von zellulärer Gesamt-mRNA durch eine Vielzahl von Techniken, zum Beispiel durch Anwendung des Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsvorgehens von Chirgwin et al. (Biochemistry, 18, 5294–5299 (1979)), hergestellt werden kann. cDNA wird dann unter Anwendung von reverser Transkriptase aus der mRNA synthetisiert (zum Beispiel Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

[0061] Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, wie beschrieben, welches eine RNA ist, kann durch Klonierung einer cDNA, codierend ein neues Protein der Erfindung, in einen geeigneten Vektor, der die Transkription der cDNA gestattet, isoliert werden, um ein RNA-Molekül herzustellen, welches das gp100M-Protein codiert. Zum Beispiel kann eine cDNA stromabwärts eines Bakteriophagen-Promotors (z. B. eines T7-Promotors) in einen Vektor kloniert werden, cDNA kann in vitro mit T7-Polymerase transkribiert werden, und die resultierende RNA kann durch Standardtechniken isoliert werden.

[0062] Ein Nukleinsäuremolekül, wie beschrieben, kann auch chemisch unter Anwendung von Standardtechniken synthetisiert werden. Verschiedene Verfahren zum chemischen Synthetisieren von Polydesoxynukleotiden sind bekannt, einschließlich Festphasensynthese, welche, wie Peptidsynthese, in kommerziell verfügbaren DNA-Synthesizern vollständig automatisiert worden ist (siehe z. B. U.S.-Patent Nr. 4 598 049; U.S.-Patent Nr. 4 458 066 und U.S.-Patent Nr. 4 401 796 und 4 373 071).

[0063] Das Initiationscodon und untranslatierte Sequenzen der Nukleinsäuremoleküle, wie beschrieben, können unter Verwendung derzeitig verfügbarer Computersoftware bestimmt werden, welche für diesen Zweck entworfen wurde, wie PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Calif.). Regulatorische Elemente können unter Anwendung herkömmlicher Techniken identifiziert werden. Die Funktion der Elemente kann durch Verwendung dieser Elemente zum Expressieren eines Reportergens bestätigt werden, das funktionsfähig mit den Elementen verbunden ist. Diese Konstrukte können unter Anwendung von Standardvorgehen in kultivierte Zellen eingebracht werden. Zusätzlich zum Identifizieren regulatorischer Elemente in DNA können solche Konstrukte auch verwendet werden, um mit den Elementen wechselwirkende Proteine zu identifizieren, wobei im Fachgebiet bekannte Techniken angewandt werden.

[0064] Es werden ebenfalls Nukleinsäuren beschrieben, welche Fusionsproteine codieren, die ein Protein, wie beschrieben, und ein ausgewähltes Protein oder ein selektierbares Markerprotein (siehe nachstehend) umfassen.

II. VERFAHREN ZUM EXPRESSIEREN VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN ZUR VERWENDUNG IN DER ERFINDUNG

[0065] Ein Polynukleotidmolekül, wie beschrieben, welches RNA, DNA oder Modifikationen oder Kombinationen davon enthält, kann verschiedene Anwendungen haben. Zum Beispiel kann ein Polynukleotidmolekül verwendet werden in (i) einem Verfahren zur Herstellung des codierten Polypeptids in einem rekombinanten Wirtssystem, (ii) in der Konstruktion von Impfstoffvektoren (wie Poxviren), welche zum Modulieren von Immunsystemen verwendet werden; (iii) als Impfstoffvektoren, welche ferner in Verfahren und Zusammensetzungen zum Verhindern und/oder Behandeln von Melanom verwendet werden, (iv) als ein Impfstoffagens (sowie als ein RNA-Molekül) in einer nackten Form oder formuliert mit einem Zuführungsvehikel, und (v) als Nachweisreagenzien/Hybridisierungssonden in molekularen und/oder therapeutischen Assays.

[0066] Es werden ebenfalls beschrieben (i) eine Expressionskassette, enthaltend ein DNA-Molekül, wie beschrieben, das unter die Steuerung der zur Expression erforderlichen Elemente gebracht wurde, im Besonderen unter die Steuerung eines geeigneten Promotors; (ii) ein Expressionsvektor, der eine Expressionskassette, wie beschrieben, enthält; (iii) eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle, welche mit einer Expressionskassette und/oder einem Vektor, wie beschrieben, transformiert oder transfiziert ist, sowie (iv) ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids oder Polypeptidderivats, das von einem Polynukleotid, wie beschrieben, codiert ist, welches das Kultivieren einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle, die mit einer Expressionskassette und/oder einem Vektor, wie beschrieben, transformiert oder transfiziert ist, unter Bedingungen, welche die Expression des DNA-Moleküls, wie beschrieben, gestatten, und das Aufreinigen des codierten Polypeptids oder

Polypeptidderivats aus der Zellkultur beinhaltet.

[0067] Ein rekombinantes Expressionssystem kann aus prokaryotischen und eukaryotischen Wirten ausgewählt werden. Eukaryotische Wirte schließen Hefezellen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*), Säugerzellen (z. B. COS1-, NIH3T3- oder JEG3-Zellen), Arthropodenzellen (z. B. *Spodoptera frugiperda* (SF9)-Zellen) und Pflanzenzellen ein. Vorzugsweise wird ein prokaryotischer Wirt, wie *E. coli*, verwendet. Bakterielle und eukaryotische Zellen sind aus einer Anzahl unterschiedlicher Quellen, welche dem Fachmann bekannt sind, z. B. der Amerikanischen Kultur-Typ-Sammlung (American Type Culture Collection, ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA), erhältlich.

[0068] Die Wahl des Expressionssystems hängt von den für das exprimierte Polypeptid gewünschten Merkmalen ab. Zum Beispiel kann es nützlich sein, ein Polypeptid, wie beschrieben, in einer besonderen lipidierten Form oder irgendeiner anderen Form herzustellen.

[0069] Die Auswahl der Expressionskassette hängt von dem gewählten Wirtssystem sowie den für das exprimierte Polypeptid gewünschten Merkmalen ab. Typischerweise schließt eine Expressionskassette einen Promotor, der im gewählten Wirtssystem funktionell ist und konstitutiv oder induzierbar sein kann; eine Ribosomenbindungsstelle; ein Startcodon (ATG), falls notwendig; eine Region, welche ein Signalpeptid codiert (z. B. ein Lipidierungs-Signalpeptid); ein DNA-Molekül, wie beschrieben; ein Stopcodon; und gegebenenfalls eine 3'-terminale Region (Translations- und/oder Transkriptionsterminator) ein. Die Signalpeptid-codierende Region ist angrenzend an das Polynukleotid, wie beschrieben, und im richtigen Leseraster platziert. Die Signalpeptid-codierende Region kann homolog oder heterolog hinsichtlich des DNA-Moleküls, das das reife Polypeptid codiert, sein und kann spezifisch für den Sekretionsapparat des für die Expression verwendeten Wirts sein. Das offene Leseraster, aufgebaut von dem DNA-Molekül, wie beschrieben, allein oder zusammen mit dem Signalpeptid, ist unter die Steuerung des Promotors gestellt, sodass Transkription und Translation im Wirtssystem stattfinden. Promotoren (und Signalpeptid codierende Regionen) sind für den Fachmann auf dem Gebiet weit hin bekannt und erhältlich und schließen zum Beispiel den Promotor von *Salmonella typhimurium* (und Derivate), der durch Arabinose induzierbar (Promotor *araB*) und in gramnegativen Bakterien, wie *E. coli*, funktionsfähig ist (wie im U.S.-Patent Nr. 5 028 530 und in Cagnon et al., *Protein Eng.* 4: 843 (1991), beschrieben), den Promotor des RNA-Polymerase codierenden Gens von Bakteriophage T7, der in einer Anzahl von *E. coli*-Stämmen funktionsfähig ist, die T7-Polymerase (beschrieben im U.S.-Patent Nr. 4 952 496), *OspA*-Lipidierungs-Signalpeptid und das R1pB-Lipidierungs-Signalpeptid (Cagnon et al., *Protein Eng.* 4: 843 (1991)) exprimieren, ein.

[0070] Die Expressionskassette ist typischerweise Teil eines Expressionsvektors, welcher im Hinblick auf seine Fähigkeit, im gewählten Expressionssystem zu replizieren, ausgewählt wird. Expressionsvektoren (z. B. Plasmide oder virale Vektoren) können aus denjenigen ausgewählt werden, welche in Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* 1985, Ergänzungsband 1987) beschrieben sind. Sie können von verschiedenen kommerziellen Quellen erworben werden.

[0071] Verfahren zum Transformieren/Transfizieren von Wirtszellen mit Expressionsvektoren hängen von dem gewählten Wirtssystem ab, wie in Ausubel et. al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc. (1994), beschrieben.

[0072] Nach der Expression wird ein rekombinantes Polypeptid, wie beschrieben, (oder ein Polypeptidderivat) hergestellt und verbleibt im intrazellulären Kompartiment, wird in das extrazelluläre Medium oder in den periplasmatischen Raum sezerniert/ausgeschieden, oder wird in die zelluläre Membran eingebettet. Das Polypeptid kann dann in einer im Wesentlichen gereinigten Form aus dem Zellextrakt oder aus dem Überstand nach einer Zentrifugation der rekombinanten Zellkultur gewonnen werden. Typischerweise kann das rekombinante Polypeptid durch Antikörperbasierende Affinitätsreinigung oder durch jedwedes andere Verfahren, welches vom Fachmann auf dem Gebiet leicht angepasst werden kann, wie etwa durch genetische Fusion an eine kleine Affinitätsbindungsdomäne, gereinigt werden. Auch Antikörper-basierte Affinitätsreinigungsverfahren sind für die Reinigung eines Polypeptids, wie beschrieben, verfügbar. Antikörper, die für die Reinigung der Polypeptide, wie beschrieben, durch Immunität verwendbar sind, können wie unten beschrieben erhalten werden.

[0073] Hierin werden beschrieben (i) eine Expressionskassette, enthaltend ein DNA-Molekül, wie beschrieben, das unter die Steuerung der für die Expression erforderlichen Elemente, insbesondere unter die Steuerung eines geeigneten Promotors, gebracht wurde; (ii) ein Expressionsvektor, der eine Expressionskassette, wie beschrieben, enthält; (iii) eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle, die mit einer Expressionskassette und/oder einem Vektor, wie beschrieben, transformiert oder transfiziert ist, sowie (iv) ein Verfahren zur Herstel-

lung eines durch ein Polynukleotid, wie beschrieben, codierten Polypeptids oder Polypeptidderivats, welches das Kultivieren einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle, die mit einer Expressionskassette und/oder einem Vektor, wie beschrieben, transformiert oder transfiziert ist, unter Bedingungen, welche die Expression des DNA-Moleküls, wie beschrieben, gestatten, und das Gewinnen des codierten Polypeptids oder Polypeptidderivats aus der Zellkultur beinhaltet.

III. PROTEINE ZUR VERWENDUNG IN DER ERFINDUNG

[0074] Es wird ein isoliertes Protein beschrieben, das von Nukleinsäuremolekülen, wie beschrieben, codiert ist. Innerhalb dieses Zusammenhangs kann ein Protein, wie beschrieben, verschiedene strukturelle Formen des Primärproteins einschließen, welche biologische Aktivität beibehalten. Wie hierin verwendet, bedeutet "modifiziertes gp100" oder "modifiziertes gp100-Protein", "gp100M" oder "gp100M-Protein" ein gp100, das modifiziert worden ist, um ein Molekül vorzusehen, welches das Immunsystem moduliert.

[0075] Mit "Polypeptid" oder "Protein" ist jede Kette von Aminosäuren gemeint, ungeachtet der Länge oder posttranslationalen Modifikation (z. B. Glykosylierung oder Phosphorylierung). Beide Begriffe werden in der vorliegenden Anmeldung austauschbar verwendet.

[0076] Die Begriffe "modifiziertes gp100", "modifiziertes gp100-Protein", "gp100M" oder "gp100M-Protein", wie hierin verwendet, schließen beabsichtigtermaßen Analoge eines modifizierten gp100 oder gp100M, die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -insertionen und/oder -deletionen enthalten, ein. Aminosäuresubstitutionen können eine konservative bzw. konservierte oder nicht-konservierte Natur aufweisen. Konservierte Aminosäuresubstitutionen beinhalten das Ersetzen einer oder mehrerer Aminosäuren mit Aminosäuren von ähnlichen Ladungs-, Größen- und/oder Hydrophobizitäts-Merkmalen. Wenn lediglich konservative Substitutionen vorgenommen werden, sollte das resultierende Analog zu einem modifizierten gp100M funktionell äquivalent sein. Nicht-konservative Substitutionen beinhalten das Ersetzen einer oder mehrerer Aminosäuren mit einer oder mehreren Aminosäuren, welche unähnliche bzw. andersartige Ladungs-, Größen- und/oder Hydrophobizitäts-Merkmale besitzen.

[0077] Eine oder mehrere Aminosäureinsertionen können in die Aminosäuresequenz von modifiziertem gp100, vorzugsweise gp100M, eingeführt werden. Aminosäureinsertionen können aus einzelnen Aminosäureresten oder sequentiellen Aminosäuren bestehen.

[0078] Deletionen können aus der Entfernung einer oder mehrerer Aminosäuren oder diskreter Bereiche (d. h. Aminosäuren) aus der gp100M-Aminosäuresequenz bestehen. Dabei können die deletierten Aminosäuren zusammenhängend sein, oder nicht.

[0079] Ebenfalls im Ausdruck "gp100M", "modifiziertes gp100", "modifiziertes gp100-Protein" oder "gp100M-Protein", wie hierin verwendet, eingeschlossen sind Homologe von gp100M. Solche Homologe sind Proteine, deren Aminosäuresequenzen aus den Aminosäuresequenzen von gp100M-Regionen aus anderen Quellen aufgebaut sind, deren codierende Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Hybridisierungsbedingungen (wobei diese Bedingungen dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind) mit einer Nukleinsäuresonde, die zum Erhalten von gp100M verwendet wird, hybridisieren. Es lässt sich vorhersagen, dass ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die wenigstens zu 72%, vorzugsweise 75 bis 90% ähnlich zu der Aminosäuresequenz von gp100M ist, eine gp100M-Aktivität aufzeigt.

[0080] Wie hierin verwendet, betreffen die Begriffe "modifiziertes gp100", "modifiziertes gp100-Protein", "gp100M" oder "gp100M-Protein" ebenfalls Isoformen des modifizierten gp100- oder gp100M-Proteins. Eine Isoform enthält die gleiche Anzahl und Arten an Aminosäuren, wie das modifizierte gp100 oder gp100M, aber die Isoform weist eine andere Molekularstruktur auf. Die betrachteten Isoformen sind diejenigen, welche die gleichen Eigenschaften wie das hierin beschriebene Protein aufweisen. In dem Begriff sind ebenfalls andere Proteine eingeschlossen, die Ähnlichkeiten mit einem modifizierten gp100 oder gp100M gemeinsam haben.

[0081] Allgemein gesprochen, wird ein isoliertes Protein mit einer äquivalenten Aktivität zu derjenigen eines modifizierten gp100-, vorzugsweise eines gp100M-Proteins beschrieben. Vorzugsweise weist das Protein die Aminosäuresequenz, wie in der [Fig. 2](#) gezeigt, auf.

[0082] Zusätzlich zu Vollängen-Aminosäuresequenzen schließen die Proteine, wie beschrieben, ebenfalls Verkürzungen des Proteins und Analoge und Homologe des Proteins und Verkürzungen davon, wie hierin beschrieben, ein. Verkürzte Proteine können Peptide von wenigstens fünfzehn Aminosäureresten umfassen.

Analoge des Proteins mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz und/oder Verkürzungen davon, wie hierin beschrieben, können, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, eine Aminosäuresequenz einschließen, die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -insertionen und/oder -deletionen enthält. Aminosäuresubstitutionen können von konservativer oder nicht-konservativer Natur sein. Konservative Aminosäuresubstitutionen beinhalten das Austauschen von einer oder mehreren Aminosäuren der Proteine der Erfindung mit Aminosäuren von ähnlichen Ladungs-, Größen- und/oder Hydrophobizitäts-Merkmalen. Wenn lediglich konservative Substitutionen vorgenommen werden, sollte das resultierende Analog funktionell äquivalent sein. Nicht-konservative Substitutionen beinhalten das Austauschen von einer oder mehreren Aminosäuren der Aminosäuresequenz mit einer oder mehreren Aminosäuren, welche unähnliche Ladungs-, Größen- und/oder Hydrophobizitäts-Merkmale besitzen.

[0083] Eine oder mehrere Aminosäureinsertionen können in die in der [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenzen eingebracht werden. Aminosäureinsertionen können aus einzelnen Aminosäureresten oder einem Bereich sequentieller Aminosäuren bestehen.

[0084] Deletionen können aus der Entfernung einer oder mehrerer Aminosäuren oder einzelner Bereiche aus der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz bestehen. Die deletierten Aminosäuren können zusammenhängend sein, oder nicht. Die Untergrenze der Länge des resultierenden Analogs mit einer Deletionsmutation beläuft sich auf etwa 10 Aminosäuren, vorzugsweise 100 Aminosäuren.

[0085] Analoge eines Proteins, wie beschrieben, können hergestellt werden durch Einbringen von Mutationen in die Nukleotidsequenz, welche das Protein codiert. Mutationen in Nukleotidsequenzen, welche für die Expression von Analogen eines Proteins, wie beschrieben, konstruiert sind, müssen das Leseraster der codierenden Sequenzen beibehalten. Darüber hinaus wird es bevorzugt, dass die Mutationen keine komplementären Regionen erzeugen, welche hybridisieren könnten, wodurch sekundäre mRNA-Strukturen produziert werden, wie Schleifen oder Haarnadeln, welche die Translation der Rezeptor-mRNA nachteilig beeinflussen könnten.

[0086] Man kann Mutationen an bestimmten Loci einbringen, indem Oligonukleotide synthetisiert werden, welche eine mutierte Sequenz, flankiert von Restriktionsstellen zur Ermöglichung der Ligation an Fragmente der nativen Sequenz, enthalten. Im Anschluss an die Ligation codiert die resultierende rekonstituierte Sequenz ein Analog, das die gewünschte Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion aufweist.

[0087] Alternativ dazu können Verfahren zur Oligonukleotid-gerichteten ortsspezifischen Mutagenese angewandt werden, um ein verändertes Gen vorzusehen, bei welchem jeweilige Codons gemäß der erforderlichen Substitution, Deletion oder Insertion verändert sind. Die Deletion oder Verkürzung eines Proteins, wie beschrieben, kann auch durch Nutzen zweckmäßiger Restriktionsendonuklease-Stellen, welche benachbart zur gewünschten Deletion sind, konstruiert werden. Anschließend an die Restriktion können Überhänge aufgefüllt und die DNA wieder ligiert werden.

[0088] Beispielhafte Verfahren zur Herstellung der oben dargestellten Änderungen werden von Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) offenbart.

[0089] Die Proteine, wie beschrieben, schließen ebenfalls Homologe der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz und/oder Verkürzungen davon ein, wie hierin beschrieben. Solche Homologe sind Proteine, deren Aminosäuresequenzen aus Aminosäuresequenzen aufgebaut sind, deren codierende Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Hybridisierungsbedingungen (siehe Erörterung von stringenten Hybridisierungsbedingungen hierin) mit einer Nukleinsäuresonde hybridisieren, die zum Erhalten eines Proteins, wie beschrieben, verwendet wird.

[0090] Ein homologes Protein schließt ein Protein mit einer Aminosäuresequenz ein, welche wenigstens 70%, vorzugsweise 80–90% Identität mit der Aminosäuresequenz, wie gezeigt in [Fig. 2](#), aufweist. Die Homologie wird typischerweise unter Verwendung von Sequenzanalyse-Software gemessen (z. B. "Sequence Analysis Software Package" der Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Ähnliche Aminosäuresequenzen werden aligniert bzw. parallel zugeordnet, um den maximalen Grad an Homologie (d. h. Identität) zu erhalten. Zu diesem Zweck kann es notwendig sein, künstlich Lücken in die Sequenz einzuführen. Sobald die optimale Alignierung aufgestellt worden ist, wird der Grad an Homologie (d. h. Identität) durch Aufzeichnen aller Positionen, an welchen die Aminosäuren beider Sequenzen identisch sind, relativ zur Gesamtzahl an Positionen, bestimmt. Beispielsweise können Sequenz-Alignierungen unter Verwendung der Computerprogramme ALIGN (Handelsbezeichnung) oder GENA-

LIGN (Handelsbezeichnung) (Inteligenetics Suite 5.4, Oxford Molecular) durchgeführt werden. ALIGN verwendet den Needleman-Wunsch-Algorithmus (Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)) und seine späteren Modifikationen, um Regionen mit Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu lokalisieren. Das Auffinden von Regionen maximaler Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen kann in rigoroser Weise unter Verwendung der iterativen Matrix-Berechnung des Algorithmus von Needleman und Wunsch von 1997 bewältigt werden. Die Analyse ist auf Regionen ohne interne Deletionen oder Insertionen beschränkt, die durch eine minimale Zahl von Ausschlaufungen (Loop-outs) oder Deletionen verknüpft sind. Sellers (J. Appl. Math (Siam) 26: 787 (1974)) entwickelte ein echtes metrisches Maß der "Distanz" zwischen Sequenzen, und Waterman et al. (Advan. Math 20: 367 (1976)) erweiterte diesen Algorithmus, um Insertionen und Deletionen willkürlicher Länge einzuschließen. Smith (J. Mol. Biol. 147: 195 (1981)) verbesserte die frühen Algorithmen, um Teilsequenzen maximaler Ähnlichkeit aufzufinden. Der Algorithmus ist verwendet worden, um so lange Sequenzen wie 5000 Basen durch Unterteilen dieser Sequenzen in Segmente von 200 bis 400 Basen und danach erneutes Zusammenfügen davon zu einer endgültigen besten Übereinstimmung zu analysieren. Dieses Verfahren zur Unterteilung der Sequenz und nachfolgenden erneuten Zusammenfügung derselben hat sich als ziemlich zuverlässig erwiesen. Der Algorithmus gestattet die Festlegung der Größe des Segments, das von dem Programm nach Ähnlichkeiten durchsucht wird. Danach fügt das Programm die Segmente, nach Überprüfen der Überlappungen benachbarter Teilsequenzen, zusammen. Die Gewichtung von Deletionen und die relative Größe von Überlappungen kann reguliert werden. Das Programm gibt die Ergebnisse aus, um die Unterschiede in nah verwandten Sequenzen zu zeigen. GENALIGN ist ein Mehrfach-Alignierungs-Programm. Unter Anwendung der Verfahren von Martinez/Regions (Sobel und Martinez, Nucleic Acid Res 14: 363 (1985)) oder Needleman-Wunsch (Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)) können bis zu 99 Sequenzen hinsichtlich der Alignierung analysiert werden. GENALIGN bringt die Sequenzen in eine Reihenfolge, welche die am nächsten bzw. genauesten alignierten Sequenzpaare in Nachbarschaft zueinander setzt. Eine Konsensussequenz wird unter den Mehrfach-Sequenzalignierungen angezeigt. Die bei der Entwicklung der Konsensussequenz verwendeten Sequenzen werden zur Verwendung in anderen Programmen abgespeichert. GENALIGN gestattet eine derartige Änderung der Suchparameter, dass alternative Alignierungen der Sequenzen gebildet werden können.

[0091] Diese Programme werden unter Anwendung ihrer Standardeinstellungen verwendet. Die Standardeinstellungen sind wie folgend:

FastDB	
AMINO-Rest-Länge	= 2
Deletions-Gewichtung	= 5,00
Längen-Faktor	= 0
Übereinstimmungs-Gewichtung	= 1,00
NUKLEIN-Rest-Länge	= 4
Ausweitungsfaktor	= 50
Findseq	

Suchparameter:

Ähnlichkeitsmatrix	Unitär
K-Tupel	4
Fehlpaarungs-Strafwert	1
Verbindungs-Strafwert	30
Randomisierungs-Gruppenlänge	0
Ausschluss-Wert	5

Alignierungs-Parameter:

Fenstergröße	32
Lücken-Strafwert	1,00
Lückengrößen-Strafwert	0,33

[0092] Auch Isoformen der Proteine, wie beschrieben, werden berücksichtigt. Eine Isoform enthält dieselbe Anzahl und dieselben Arten von Aminosäuren, wie ein Protein, wie beschrieben, aber die Isoform besitzt eine

andere Molekularstruktur. Die hierin berücksichtigten Isoformen sind diejenigen, welche die gleichen Eigenschaften wie ein Protein, wie es hierin beschrieben wird, aufweisen.

[0093] Polypeptide, welche eine Sequenz aufweisen, die homolog zu der Sequenz eines modifizierten gp100 ist, wie diejenige, welche in der [Fig. 2](#) gezeigt ist, schließen natürlich vorkommende allelische Varianten sowie Mutanten oder jedwede anderen nicht-natürlich vorkommenden Varianten ein, welche in Hinsicht auf die Antigenizität zu einem Polypeptid mit einer Sequenz, wie in [Fig. 2](#) gezeigt, analog sind.

[0094] Wie es im Fachgebiet bekannt ist, ist eine allelische Variante eine alternative Form eines Polypeptids, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Substitution, Deletion oder Addition von einer oder mehreren Aminosäuren aufweist, welche die biologische Funktion des Polypeptids nicht verändert/verändern. Mit "biologischer Funktion" ist die Funktion des Polypeptids in den Zellen gemeint, in denen es natürlicherweise vorkommt, selbst wenn die Funktion nicht für das Wachstum oder Überleben der Zellen notwendig ist. Zum Beispiel besteht die biologische Funktion eines Porins darin, den Eintritt von im extrazellulären Medium vorliegenden Verbindungen in Zellen zu ermöglichen. Die biologische Funktion ist von der antigenischen Funktion unterschieden. Ein Polypeptid kann mehr als eine biologische Funktion besitzen.

[0095] Allelische Varianten sind in der Natur sehr häufig. Zum Beispiel wird eine Bakterienspezies (d. h. *C. pneumoniae*) üblicherweise durch eine Vielzahl von Stämmen repräsentiert, die sich voneinander durch kleinere allelische Variationen unterscheiden. Tatsächlich kann ein Polypeptid, welches dieselbe biologische Funktion erfüllt, in verschiedenen Stämmen eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche nicht in jedem der Stämme identisch ist. Eine derartige allelische Variation kann gleichermaßen auf der Polynukleotid-Ebene wiedergespiegelt werden.

[0096] Es wird ebenfalls ein Protein, wie beschrieben, welches mit einem ausgewählten Protein oder einem selektierbaren Markerprotein (siehe nachstehend) konjugiert ist, um Fusionsproteine herzustellen, beschrieben. Darüber hinaus werden immunogene Bereiche und/oder Fragmente eines modifizierten gp100 beschrieben.

[0097] Ein Beispiel für Fusionspolypeptide, wie beschrieben, schließt ein Polypeptid oder Polypeptidderivat, wie beschrieben, fusioniert an ein Polypeptid, welches eine Adjuvans-Aktivität aufweist, ein (wie zum Beispiel die Untereinheit B von entweder Cholera-toxin oder hitzelabilem Toxin von *E. coli*). Zum Erreichen einer Fusion bestehen mehrere Möglichkeiten. Zum Ersten kann das Polypeptid, wie beschrieben, an das N- oder, vorzugsweise, an das C-terminale Ende des Polypeptids mit Adjuvans-Aktivität fusioniert werden. Zum Zweiten kann ein Polypeptidfragment, wie beschrieben, innerhalb der Aminosäuresequenz des Polypeptids mit Adjuvans-Aktivität fusioniert werden.

[0098] Die Proteine, wie beschrieben (einschließlich Verkürzungen, Analogen etc.) können unter Anwendung von rekombinanten DNA-Methoden hergestellt werden. Demgemäß können die Nukleinsäuremoleküle, wie beschrieben, welche eine Sequenz aufweisen, die ein Protein, wie beschrieben, codiert, in einer bekannten Art in einen geeigneten Expressionsvektor eingebaut werden, der eine gute Expression des Proteins gewährleistet. Mögliche Expressionsvektoren schließen, ohne aber darauf eingeschränkt zu sein, Cosmide, Plasmide oder modifizierte Viren (z. B. Replikations-defekte Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren) ein, solange der Vektor mit der verwendeten Wirtszelle verträglich ist. Der Begriff "Vektoren sind für die Transformation einer Wirtszelle geeignet" bedeutet definitionsgemäß, dass die Expressionsvektoren ein Nukleinsäuremolekül, wie beschrieben, und begleitende regulatorische Sequenzen enthalten, die auf der Grundlage der für die Expression zu verwendenden Wirtszellen ausgewählt sind, wobei die regulatorische Sequenz funktionsfähig mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist. "Funktionsfähig verbunden" bedeutet beabsichtigtermaßen, dass die Nukleinsäure auf eine Weise mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, welche die Expression der Nukleinsäure gestattet.

[0099] Ebenfalls in Betracht gezogen wird ein rekombinanter Expressionsvektor, wie beschrieben, der ein Nukleinsäuremolekül, wie beschrieben, oder ein Fragment davon, sowie die notwendigen regulatorischen Sequenzen für die Transkription und Translation der inserierten Nukleotidsequenz enthält. Geeignete regulatorische Sequenzen können aus einer Vielzahl von Quellen, einschließlich bakteriellen, pilzlichen oder viralen Genen, abgeleitet sein (siehe zum Beispiel die regulatorischen Sequenzen, welche in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), beschrieben sind). Die Auswahl von geeigneten regulatorischen Sequenzen hängt von der gewählten Wirtszelle ab und kann vom Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet ohne Weiteres bewerkstelligt werden. Beispiele derartiger regulatorischer Sequenzen schließen die Folgenden ein: einen transkriptionellen Promotor und Enhancer, oder eine RNA-Po-

lymerase-Bindungssequenz, oder eine Ribosomenbindungssequenz (einschließlich eines Translationsinitiationsignals). Abhängig von der gewählten Wirtszelle und dem verwendeten Vektor können außerdem andere Sequenzen (wie ein Replikationsursprung, zusätzliche DNA-Restriktionsstellen, Enhancer, und Sequenzen, die eine Induzierbarkeit der Transkription vermitteln) in den Expressionsvektor eingebaut werden. Es ist ebenfalls davon auszugehen, dass die notwendigen regulatorischen Sequenzen auch von dem gp100/gp100M-Gen und/oder dessen flankierenden Regionen, zusätzlich zu den oben erwähnten regulatorischen Gensequenz(en), bereitgestellt werden können.

[0100] Ebenfalls beschrieben wird ein rekombinanter Expressionsvektor, umfassend ein DNA-Nukleinsäuremolekül, wie beschrieben, welches in den Expressionsvektor in einer Antisinn-Orientierung kloniert ist. D. h., das DNA-Molekül ist in einer Weise funktionsfähig mit einer regulatorischen Sequenz verbunden, welche, mittels Transkription des DNA-Moleküls, die Expression eines RNA-Moleküls gestattet, das den Antisinn zu einer Nukleotidsequenz darstellt, welche die Nukleotide, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, umfasst. Man kann mit der Antisinn-Nukleinsäure funktionsfähig verknüpfte regulatorische Sequenzen auswählen, welche die kontinuierliche Expression des Antisinn-RNA-Moleküls veranlassen.

[0101] Die rekombinanten Expressionsvektoren, wie beschrieben, können ebenfalls ein selektierbares Markergen enthalten, welches die Selektion von Wirtszellen erleichtert, die mit einem rekombinanten Molekül, wie beschrieben, transformiert oder transfiziert sind. Beispiele für selektierbare Markergene sind Gene, welche ein Protein, wie G418 und Hygromycin (die eine Resistenz gegenüber bestimmten Arzneistoffen verleihen), β -Galactosidase, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase oder Leuchtkäfer-Luciferase, codieren. Die Transkription des selektierbaren Markergens wird durch Änderungen in der Konzentration des selektierbaren Markerproteins, wie β -Galactosidase, Chloramphenicol-Acetyl-Transferase oder Leuchtkäfer-Luciferase, verfolgt. Falls das selektierbare Markergen ein Protein codiert, das Antibiotikum-Resistenz, wie etwa Neomycin-Resistenz, verleiht, können Transformantenzellen mit G418 selektiert werden. Wie es dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist, werden Zellen, die das selektierbare Markergen aufgenommen haben, überleben, wohingegen Zellen, die keinen derartigen aufgenommenen nachweisbaren Marker aufweisen, sterben. Dies macht es möglich, die Expression von rekombinanten Expressionsvektoren der Erfindung sichtbar zu machen und zu testen. Es wird ebenfalls erkannt, dass selektierbare Marker auf einem von der Nukleinsäure von Interesse getrennten Vektor eingebracht werden können.

[0102] Die rekombinanten Expressionsvektoren können auch Gene enthalten, welche eine Fusionseinheit codieren, die eine erhöhte Expression des rekombinanten Proteins; erhöhte Löslichkeit des rekombinanten Proteins bereitstellt und/oder bei der Reinigung eines rekombinanten Zielproteins durch Wirken als ein Ligand bei Affinitätsreinigung hilft. Zum Beispiel kann eine proteolytische Spaltungsstelle an dem rekombinanten Zielprotein hinzugefügt werden, um eine Trennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit anschließend an die Reinigung des Fusionsproteins zu gestatten.

[0103] Rekombinante Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingeführt werden, um eine transformierte Wirtszelle herzustellen. Der Begriff "transformierte Wirtszelle" beinhaltet beabsichtigtermaßen prokaryotische und eukaryotische Zellen, welche mit einem rekombinanten Expressionsvektor der Erfindung transformiert oder transfiziert worden sind. Die Begriffe "transformiert mit", "transfiziert mit", "Transformation" und "Transfektion" umfassen beabsichtigtermaßen das Einbringen von Nukleinsäure (z. B. eines Vektors) in eine Zelle durch eine von vielen möglichen, auf dem Fachgebiet bekannten, Techniken. Prokaryotische Zellen können mit Nukleinsäure zum Beispiel durch Elektroporation oder Calciumchlorid-vermittelte Transformation transformiert werden. Nukleinsäure kann mittels herkömmlicher Techniken, wie Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Co-precipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofectin, Elektroporation oder Mikroinjektion, in Säugerzellen eingebracht werden. Geeignete Verfahren zum Transformieren und Transfizieren von Wirtszellen kann man in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) und anderen Laboratoriums-Lehrbüchern nachschlagen.

[0104] Geeignete Wirtszellen schließen eine große Vielzahl von prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen ein. Zum Beispiel können die Proteine, wie beschrieben, in bakteriellen Zellen, wie *E. coli*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus), Hefezellen oder Säugerzellen exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen können in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991), gefunden werden.

[0105] Die Proteine, wie beschrieben, können ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden, wobei in der Chemie von Proteinen allgemein bekannte Techniken angewandt werden, wie etwa eine Festphasensynthese (Merrifield, J., Am. Chem. Assoc. 85: 2149–2154 (1964)) oder die Synthese in homogener Lösung

(Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry (1987), (Hrsg.: E. Wansch), Band 15, Punkte I und II, Thieme, Stuttgart).

IV. IMPFSTOFFE

[0106] Es wird ein Impfstoff zum Modulieren des Immunsystems eines Tiers beschrieben, wobei es sich bei dem Immunogen um eine effektive Menge eines gp100 oder modifizierten gp100 und/oder immunogene Fragmente davon, vorzugsweise in Vermischung mit einem geeigneten Verdünnungsmittel oder Träger, handelt.

[0107] Demgemäß wird ein Verfahren zum Modulieren der Immunantwort eines Tiers beschrieben, welches das Verabreichen einer wirksamen Menge eines gp100 oder modifizierten gp100 und/oder immunogener Fragmente davon, vorzugsweise in Vermischung mit einem geeigneten Verdünnungsmittel oder Träger, an ein hierfür bedürftiges Tier umfasst.

[0108] Die Impfstoffe, wie beschrieben, können zusätzlich geeignete Verdünnungsmittel, Adjuvantien und/oder Träger enthalten. Die Impfstoffe enthalten vorzugsweise ein oder mehrere andere Adjuvantien, welche die Immunogenität des Impfstoffs in vivo weiter erhöhen können. Diese anderen ein oder mehreren Adjuvantien können aus vielen auf dem Fachgebiet bekannten Adjuvantien ausgewählt werden, einschließlich zum Beispiel dem Lipid-A-Anteil des LPS aus gramnegativen Bakterien (Endotoxin), Trehalosedimycolat von Mykobakterien, dem Phospholipid Lysolecithin, Dimethyldiäcetylammmoniumbromid (DDA), bestimmten linearen Polyoxypropylen-Polyoxyäthylen (POP-POE)-Blockpolymeren, Aluminiumhydroxid (und anderen Aluminiumverbindungen) und Liposomen (siehe nachstehend).

[0109] Ein anderes bevorzugtes Adjuvans/Immunstimulans ist ein immunstimulatorisches Oligonukleotid, das nicht-methylierte CpG-Dinukleotide enthält ("CpG"). CpG ist eine Abkürzung für Cytosin-Guanosin-Dinukleotidmotive, welche in DNA vorhanden sind. Auf dem Fachgebiet ist CpG als ein Adjuvans bekannt, wenn es sowohl auf systemischen als auch mukosalen Wegen verabreicht wird (WO 9602555; Europäisches Patent EP 468520; Davies et al. (1998) J. Immunol. 160: 87; McCluskie und Davis (1998) J. Immunol. 161: 4463). In einer Anzahl von Untersuchungen ist ebenfalls gezeigt worden, dass aus BCG-Gensequenzen abgeleitete synthetische Oligonukleotide zum Induzieren immunstimulierender Effekte in der Lage sind (sowohl in vitro als auch in vivo; Krieg, (1995) Nature 374: 546). Ausführliche Analysen von immunstimulatorischen Oligonukleotidsequenzen haben gezeigt, dass das CG-Motiv in einem bestimmten Sequenzzusammenhang vorliegen muss, und dass derartige Sequenzen in bakterieller DNA häufig, aber in Wirbeltier-DNA selten sind (zum Beispiel handelt es sich bei der immunstimulatorischen Sequenz oft um: Purin, Purin, C, G, Pyrimidin, Pyrimidin, wobei das CG-Motiv nicht methyliert ist; allerdings sind andere nicht-methylierte CpG-Sequenzen bekanntermaßen immunstimulatorisch und können als solche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden).

[0110] Die Impfstoffe können auch Cytokine, von welchen bekannt ist, Immunantworten zu verstärken (einschließlich GM-CSF, IL-2, IL-12, TNF und IFN γ), costimulatorische Moleküle (wie diejenigen der B7-Familie) und/oder andere Lymphokine als Adjuvantien einschließen. Der Impfstoff kann ebenfalls Konservierungsstoffe wie Natriumazid, Thimerosol, Beta-Propiolacton und binäres Äthylenimin enthalten.

[0111] Die Impfstoffzusammensetzungen, wie beschrieben, sind zur Verabreichung an Subjekte in einer biologisch verträglichen Form in vivo geeignet. Der Ausdruck "biologisch verträgliche Form, die zur Verabreichung in vivo geeignet ist", wie hierin verwendet, bedeutet eine Form der zu verabreichenden Substanz, in welcher jedwede toxischen Effekte von den therapeutischen Effekten aufgewogen werden.

[0112] Die Dosis des Impfstoffs kann gemäß Faktoren, wie dem Krankheitszustand, Alter, Geschlecht und Gewicht des [Subjekts] und der Fähigkeit des Impfstoffs, eine gewünschte Antwort in dem Tier hervorzurufen, variieren. Ein Dosierungsschema kann hergerichtet sein, um die optimale therapeutische Antwort bereitzustellen. Zum Beispiel können mehrere unterteilte Dosen täglich verabreicht werden, oder die Dosis kann proportional reduziert werden, wie durch die Anforderungen der therapeutischen Situation vorgegeben. Die Dosis des Impfstoffs kann auch variiert werden, um eine optimale vorbeugende Dosis-Antwort, abhängig von den Umständen, bereitzustellen.

[0113] Die Impfstoffe können in einer zweckdienlichen Weise verabreicht werden, wie etwa durch Injektion (subkutan, intravenös, intermuskulär, intranodal etc.), orale Verabreichung, Inhalation, transdermale Verabreichung (wie topische Creme oder Salbe etc.) oder Suppositorien-Anwendungen.

[0114] Daher werden beschrieben (i) ein Impfstoff, der ein modifiziertes gp100 (oder immunogenes Fragment

davon), wie beschrieben, enthält; (ii) eine Stoffzusammensetzung, welche ein gp100 (oder immunogenes Fragment davon), wie beschrieben, zusammen mit einem Verdünnungsmittel oder Träger enthält; (iii) eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche eine therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Menge eines modifizierten gp100 (oder immunogenen Fragments davon), wie beschrieben, enthält; (iv) ein Verfahren zum Induzieren einer Immunantwort gegen ein modifiziertes gp100 (oder immunogenes Fragment davon) in einem Säugetier (zum Beispiel einem Menschen; alternativ dazu kann das Verfahren in tiermedizinischen Anwendungen eingesetzt werden), welches das Verabreichen einer immunogenisch wirksamen Menge eines modifizierten gp100 (oder immunogenen Fragments davon), wie beschrieben, an den Säuger zum Hervorrufen einer Immunantwort (zum Beispiel einer schutzgebenden oder therapeutischen Immunantwort gegen modifiziertes gp100) beinhaltet; (v) ein Verfahren zum Verhindern und/oder Behandeln von Melanom, welches das Verabreichen einer prophylaktischen oder therapeutischen Menge eines modifizierten gp100 (oder immunogenen Fragments davon), wie beschrieben, an ein bedürftiges Individuum beinhaltet. Außerdem umfasst die Erfindung die Verwendung eines modifizierten gp100 (oder modifizierten Fragments davon), wie beschrieben, in der Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung und/oder Behandlung von Melanom.

[0115] Ein Impfstoff der Erfindung kann ein Nukleinsäuremolekül enthalten, das ein modifiziertes gp100-Protein, wie beschrieben, codiert. Derartige Impfstoffe werden als Nukleinsäureimpfstoffe bezeichnet, werden jedoch ebenfalls genetische Impfstoffe, Polynukleotidimpfstoffe oder DNA-Impfstoffe genannt, welche sämtlich beschrieben werden. In einem solchen Fall wird das modifizierte gp100-Protein in vivo im Wirtstier hergestellt. Die Nukleinsäuren enthaltenden Impfstoffe können unter Verwendung eines geeigneten Vektors (d. h. "Impfstoffvektor"), einschließlich zum Beispiel retroviraler Vektoren, alphaviraler, adenoviraler Vektoren, poxviraler Vektoren, anderer viraler Vektoren, bakterieller DNA, Plasmiden oder freier/nackter DNA, zugeführt werden.

[0116] Folglich werden beschrieben (i) ein Impfstoffvektor, der ein DNA-Molekül, wie beschrieben, enthält, das unter die Steuerung von für die Expression benötigten Elementen platziert ist; (ii) eine Stoffzusammensetzung, enthaltend einen Impfstoffvektor, wie beschrieben, zusammen mit einem Verdünnungsmittel oder Träger; (iii) eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Menge eines Impfstoffvektors, wie beschrieben; (iv) ein Verfahren zum Induzieren einer Immunantwort gegen modifiziertes gp100 in einem Säugetier (zum Beispiel einem Menschen; alternativ dazu kann das Verfahren in Anwendungen der Tiermedizin eingesetzt werden), welches das Verabreichen einer immunogenisch wirksamen Menge eines Impfstoffvektors, wie beschrieben, an den Säuger zum Hervorrufen einer Immunantwort (zum Beispiel einer schutzgebenden oder therapeutischen Immunantwort gegen modifiziertes gp100) beinhaltet; (v) ein Verfahren zur Vorbeugung gegen und/oder Behandlung von Melanom, welches das Verabreichen einer prophylaktischen oder therapeutischen Menge eines Impfstoffvektors, wie beschrieben, an ein bedürftiges Individuum beinhaltet. Außerdem umfasst die Erfindung die Verwendung eines Impfstoffvektors, wie beschrieben, in der Herstellung eines Medikaments zur Vorbeugung gegen und/oder Behandlung von Melanom.

i Impfstoffvektor

[0117] Der Impfstoffvektor kann ein Poxvirus- oder anderer viraler Vektor, bakterielle DNA, Plasmid- oder eine freie/nackte DNA sein. Vorzugsweise ist der Impfstoffvektor zur Integration in Empfängerzertieren nicht in der Lage. Die Elemente zur Expression von dem Impfstoffvektor aus können einen für die Expression in Empfängerzertieren geeigneten Promotor einschließen.

[0118] Lebend-Impfstoffvektoren, welche auf dem Fachgebiet verfügbar sind, schließen virale Vektoren, wie Alphaviren, Adenoviren und Poxviren, sowie bakterielle Vektoren (zum Beispiel Shigella, Salmonella, Vibrio cholerae, Lactobacillus, Bacille Calmette Guérin (BCG) und Streptococcus) ein.

[0119] Ein Beispiel eines Adenovirusvektors sowie eines Verfahrens zum Konstruieren eines Adenovirusvektors, der fähig zum Expressieren eines DNA-Moleküls der Erfindung ist, wird im U.S.-Patent Nr. 4 920 209 (das hierin als Bezugsstelle einbezogen ist) beschrieben. Poxvirusvektoren, welche verwendet werden können, schließen zum Beispiel Fowlpox-, Vaccina- und Canarypox-Virus (wie beschrieben in U.S.-Patent Nr. 5 766 599 und U.S.-Patent Nr. 5 364 773, U.S.-Patent Nr. 5 756 103, (ALVAC(2), U.S.-Patent Nr. 5 990 091, U.S.-Patent Nr. 6 004 777) ein; Poxvirusvektoren, welche fähig zum Expressieren einer Nukleinsäure, wie beschrieben, sind, können durch homologe Rekombination erhalten werden, wie es dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist, sodass das Polynukleotid, wie beschrieben, unter zur Expression in Säugerzellen geeigneten Bedingungen (siehe nachstehend) in das virale Genom inseriert wird.

[0120] In einem bevorzugten Aspekt ist der manipulierte Poxvirusvektor ALVAC (welcher aus Canarypox-Vi-

rus abgeleitet worden ist). ALVAC repliziert nicht produktiv in Nicht-Vogel-Wirten, weshalb von diesem Merkmal angenommen wird, dass es sein Sicherheitsprofil verbessert.

[0121] ALVAC ist ein abgeschwächter Canarypox-Virus-basierender Vektor, der ein Plaque-kloniertes Derivat des zugelassenen bzw. lizenzierten Canarypox-Impfstoffs Kanapox (Tartaglia et al., *Virol.* 188: 217 (1992)) (U.S.-Patent Nr. 5 756 103) war. ALVAC besitzt einige allgemeine Eigenschaften, welche die gleichen wie einige allgemeine Eigenschaften von Kanapox sind. Von ALVAC-basierten rekombinanten Viren, die extrinsische Immungene exprimieren, hat man ebenfalls gezeigt, als Impfstoffvektoren wirksam zu sein (Tartaglia, J., et al., in *AIDS Research Reviews* (Band 3), Koff, W., Wong-Staal, F., Kenedy, R. C. (Hrsg.), Marcel Dekker NY, S. 361–378 (1993); Tartaglia, J., et al., *J. Virol.* 67: 2370 (1993)). Zum Beispiel waren Mäuse, die mit einer ALVAC-Rekombinante immunisiert wurden, welche das Rabies-Virus-Glykoprotein exprimiert, vor einer letalen Herausforderung mit Rabies-Virus geschützt (Tartaglia, J., et al. (1992), *Virology* 188: 217), was das Potenzial für ALVAC als Impfstoffvektor verdeutlicht. ALVAC-basierende Rekombinanten haben sich auch in Hunden, welche mit dem kaninen Distemper-Virus (Taylor, J., et al., (1992), *Virology* 187: 321) und Rabies-Virus (Perkus, M. E., et al., in *Combined Vaccines and Simultaneous Administration: Current Issues and Perspective*, Annals of New York Academy of Sciences (1994)) herausgefordert wurden, in Katzen, welche mit felinem Leukämievirus herausgefordert wurden (Tartaglia, J., et al., *J. Virol.* 67: 2370 (1993)), und in Pferden, welche mit equinem Influenza-Virus herausgefordert wurden (Taylor, J., et al., in *Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza*, Univ. of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, S. 331–335 (1993)), als wirksam erwiesen.

[0122] ALVAC(2) ist ein ALVAC-Vektor der zweiten Generation in welchem Vaccinia-Transkriptionselemente E3L und K3L innerhalb des C6-Locus inseriert worden sind (U.S. 5 990 091; U.S. 6 004 777). Das E3L codiert ein Protein, welches fähig zum spezifischen Binden an dsRNA ist. Der K3L-ORF besitzt signifikante Homologie zu E1F-2. Innerhalb von ALVAC(2) steht das E3L-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle seines natürlichen Promotors, wohingegen K3L unter die Kontrolle des frühen/späten Vaccinia-H6-Promotors gebracht worden ist. Die E3L- und K3L-Gene wirken zum Inhibieren der PKR-Aktivität in mit ALVAC(II) infizierten Zellen, was die Steigerung des Spiegels und der Persistenz von Fremdgenexpression gestattet.

[0123] Weitere Impfstoffvektorsysteme beinhalten die Verwendung von natürlich wirts-beschränkten Poxviren. Fowlpoxvirus (FPV) ist das prototypische Virus der Avipox-Gattung der Poxvirusfamilie. Aus Fowlpox abgeleitete Vektoren sind erzeugt worden (d. h. TROVAC, siehe U.S.-Patent Nr. 5 766 599). Die Replikation der Avipoxviren ist auf Vogelarten beschränkt (Matthews, *Inter Virol.* 17: 42 (1982)), und es gibt in der Literatur keine Berichte von Avipoxvirus, welches eine produktive Infektion in irgendeiner Nicht-Vogel-Spezies, einschließlich Mensch, verursacht. Diese Wirts-Einschränkung liefert eine inhärente Sicherheitsbarriere hinsichtlich der Übertragung des Virus auf andere Arten und macht den Einsatz von Avipoxvirus-basierenden Impfstoffvektoren in tiermedizinischen und humanen Anwendungen zu einem attraktiven Vorschlag.

[0124] FPV ist in vorteilhafter Weise als ein Vektor, welcher Antigene aus Geflügelpathogenen exprimiert, verwendet worden. Das Hämagglutinin-Protein eines virulenten Vogel-Influenza-Virus wurde in einer FPV-Rekombinante exprimiert. Nach Inokulierung der Rekombinante in Hühner und Truthähne wurde eine Immunantwort induziert, welche schutzgebend gegen entweder eine homologe oder eine heterologe virulente Influenzavirus-Herausforderung war (Taylor, J., et al., (1988) *Vaccine* 6: 504). FPV-Rekombinanten, welche die Oberflächenglykoproteine von "Newcastle Disease"-Virus exprimieren, sind ebenfalls entwickelt worden (Taylor, J., et al., (1990) *J. Virol.* 64: 1441; Edbauer, C., et al., (1990) *Virology* 179: 901).

[0125] Ein stark abgeschwächter Stamm von Impfstoffen, bezeichnet als MVA, ist ebenfalls als Vektor für Poxvirus-basierte Impfstoffe verwendet worden. Die Verwendung von MVA ist im U.S.-Patent Nr. 5 185 146 beschrieben.

[0126] Andere abgeschwächte Poxvirusvektoren sind durch genetische Modifikationen von Wildtypstämmen des Virus hergestellt worden. Zum Beispiel wird der NYVAC-Vektor durch Deletion von spezifischen Virulenz- und Wirtsbereichgenen aus dem Copenhagen-Stamm von Vaccinia abgeleitet (Tartaglia, J., et al. (1992) *Virology* 188: 217) und hat sich als ein rekombinanter Vektor bei der Hervorrufung einer schutzgebenden Immunantwort gegen ein exprimiertes Fremdantigen als nützlich erwiesen (U.S. 5 364 773). Der TROVAC-Vektor liefert noch ein weiteres Beispiel eines abgeschwächten Poxvirus, das verwendet werden kann (U.S. 5 766 599).

[0127] Rekombinante Poxviren können in zwei Schritten konstruiert werden, welche im Fachgebiet bekannt sind und analog zu den Verfahren zum Erzeugen synthetischer Rekombinanten von Poxviren, wie dem Vacci-

nia-Virus und Avipox-Virus, sind (beschrieben in den U.S.-Patenten Nr. 4 769 330; 4 744 848; 4 603 112; 5 100 587 und 5 179 993). In deutlicher Weise, basierend auf den Abschwächungsprofilen der NYVAC-, ALVAC- und TROVAC-Vektoren und ihrer nachgewiesenen Fähigkeit, sowohl humorale als auch zelluläre immunologische Antwortreaktionen gegen extrinsische Immunogene hervorzurufen (Tartaglia, J., et al., in *AIDS Research Reviews* (Band 3), Koff, W., Wong-Staal, F., Kenedy, R. C. (Hrsg.), Marcel Dekker NY, S. 361–378 (1993); Tartaglia, J., et al. (1993), *J. Virol.* 67: 2370; Taylor, J., et al., (1992) *Virology* 187: 321), bieten solche rekombinanten Viren einen klaren Vorteil gegenüber früher beschriebenen rekombinanten Viren auf Vaccinia-Basis. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Bereitstellen eines modifizierten gp100-Rekombinanten-Poxvirus sowie von Zusammensetzungen und Produkten davon (insbesondere ALVAC-modifiziertes-gp100-Rekombinanten und Zusammensetzungen und Produkten davon) einen in hohem Maße wünschenswerten Fortschritt gegenüber dem gegenwärtigen Stand der Technik darstellt.

[0128] Plasmide und/oder freie/nackte Nukleinsäuren (d. h. Polynukleotide (DNA oder RNA)), wie beschrieben, können ebenfalls als Impfstoffvektoren an ein Tier zu Zwecken einer (z. B. therapeutischen oder prophylaktischen) Impfung verabreicht werden (U.S.-Patent Nr. 5589466; McDonnell und Askari, *NEJM* 334: 42–45 (1996); Kowalczyk und Ertl, *Cell Mol. Life Sci.* 55: 751–770 (1999)). Wenn ein DNA-Molekül, wie beschrieben, verwendet wird, kann es in einer freien/nackten oder Plasmid-Form vorliegen. Typischerweise handelt es sich hierbei um eine Form, welche unfähig ist, in einer Säugerzelle zu replizieren, und unfähig ist, in das Säuger-genom zu integrieren. Das DNA-Molekül wird außerdem typischerweise unter die Kontrolle eines zur Expression in einer Säugerzelle geeigneten Promotors gebracht. Der Promotor kann ubiquitär oder gewebespezifisch funktionieren. Beispiele für nicht-gewebespezifische Promotoren schließen den frühen Cytomegalovirus(CMV)-Promotor (beschrieben im U.S.-Patent Nr. 4 168 062) und den Rous-Sarcom-Virus-Promotor ein. Der Desmin-Promotor ist gewebespezifisch und steuert die Expression in Muskelzellen. Nützliche Vektoren sind allgemeiner beschrieben worden (d. h. WO 94/21797).

[0129] Für DNA/RNA-Impfung kann das Polypeptid, wie beschrieben, eine Vorläufer- oder reife Form des modifizierten gp100 oder immunogenen Fragments davon codieren. Wenn es eine Vorläuferform codiert, kann die Vorläuferform homolog oder heterolog sein. Im letztgenannten Fall kann eine eukaryotische Leadersequenz verwendet werden, wie etwa die Leadersequenz des Gewebe-Typ-Plasminogenfaktors (tPA).

[0130] Bei der Herstellung der Polynukleotid-Aspekte, wie beschrieben, können Standardtechniken der Molekularbiologie zur Herstellung und Reinigung von Polynukleotiden angewandt werden. Zur Verwendung als Impfstoff kann ein Polynukleotid, wie beschrieben, gemäß verschiedenen Verfahren formuliert werden, welche dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind.

[0131] Zunächst kann ein Polynukleotid in einer nackten/freien Form, frei von irgendwelchen Zuführungsvehikeln (wie anionischen Liposomen, kationischen Lipiden, Mikropartikeln (z. B. Gold-Mikropartikeln), Fällungsmitteln (z. B. Calciumphosphat)) oder jedwedem anderen Transfektions-erleichternden Mittel, verwendet werden. In diesem Fall kann das Polynukleotid einfach in einer physiologisch annehmbaren Lösung (wie steriler Kochsalzlösung oder steriler gepufferter Kochsalzlösung) mit oder ohne Träger verdünnt werden. Falls vorhanden, ist der Träger vorzugsweise isotonisch, hypotonisch, oder schwach hypertonisch, und weist eine verhältnismäßig geringe Ionenstärke auf (wie von einer Saccharoselösung (z. B. einer Lösung mit 20% Saccharose) vorgesehen).

[0132] Alternativ dazu kann ein Polynukleotid mit Mitteln assoziiert sein, welche bei der zellulären Aufnahme helfen. Es kann u. a. (i) mit einem chemischen Agens ergänzt werden, das die zelluläre Permeabilität modifiziert (wie Bupivacain; siehe zum Beispiel die WO 94/16737), (ii) in Liposomen verkapselt sein, oder (iii) mit kationischen Lipiden oder Siliziumdioxid-, Gold- oder Wolfram-Mikropartikeln assoziiert sein.

[0133] Kationische Lipide sind im Fachgebiet allgemein bekannt und werden üblicherweise für Genzuführung verwendet. Derartige Lipide schließen Lipofectin (ebenfalls bekannt als DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), DOTAP (1,2-Bis(oleyloxy)-3-(trimethylammonio)propan), DDAB (Dimethyldioctadecylammoniumbromid), DOGS (Diocetadecylamidologlycylspermin) und Cholesterinderivate, wie DC-Chol (3-beta-(N-(N',N'-Dimethylaminomethan)carbamoylethyl)cholesterol), ein. Eine Beschreibung dieser kationischen Lipide kann man in EP 187 702, WO 90/11092, U.S.-Patent Nr. 5 283 185, WO 91/15501, WO 95/26356 und U.S.-Patent Nr. 5 527 928 finden. Kationische Lipide für die Genzuführung werden bevorzugt in Assoziation mit einem neutralen Lipid, wie DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) verwendet, wie es zum Beispiel in WO 90/11092 beschrieben ist.

[0134] Andere transfektionserleichternde Verbindungen können zu einer Formulierung, die kationische Li-

posomen enthält, hinzugefügt werden. Einige von ihnen sind zum Beispiel in WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 und WO 95/2397 beschrieben. Sie schließen z. B. Spermindervative, die zur Erleichterung des Transports von DNA durch die Kernmembran brauchbar sind (siehe zum Beispiel WO 93/18759), und membranpermeabilisierende Verbindungen, wie GALA, Gramicidin S und kationische Gallensalze (siehe zum Beispiel WO 93/19768), ein.

[0135] Gold- oder Wolfram-Mikropartikel können ebenfalls für die Genzuführung verwendet werden (wie es in WO 91/359 und WO 93/17706 beschrieben ist). In diesem Fall können die Mikropartikelbeschichteten Polynukleotide über intradermale oder intraepidermale Routen injiziert werden, wobei eine nadellose Injektionsvorrichtung ("Genkanone") verwendet wird, wie etwa diejenigen, die zum Beispiel in U.S.-Patent Nr. 4 945 050, U.S.-Patent Nr. 5 015 580 und in der WO 94/24263 beschrieben sind.

[0136] Anionische und neutrale Liposomen sind ebenfalls allgemein im Fachgebiet bekannt (siehe zum Beispiel, *Liposomes: A Practical Approach*, RPC New Ed, IRL Press (1990), für eine ausführliche Beschreibung von Verfahren zur Herstellung von Liposomen) und sind für die Zuführung eines großen Bereichs von Produkten, einschließlich Polynukleotiden, verwendbar.

[0137] Ein Impfstoffvektor, wie beschrieben, kann auch ein Cytokin (wie zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-12 (IL-12), Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF)) und/oder costimulatorische Moleküle (wie zum Beispiel die B7-Molekülfamilie) und/oder andere Lymphokine, welche die Immunantwort verstärken, exprimieren. Daher kann ein Impfstoffvektor eine zusätzliche, zum Beispiel ein Cytokin und/oder Lymphokin und/oder ein costimulatorisches Molekül codierende, DNA-Sequenz einschließen, welche unter die Kontrolle von geeigneten Elementen gebracht wurde, die für die Expression in einer Tierzelle erforderlich sind.

[0138] Alternativ dazu kann eine Zusammensetzung, wie beschrieben, mehrere Impfstoffvektoren einschließen, die jeweils zum Exprimieren eines Polypeptidderivats, wie beschrieben, eines Cytokins und/oder Lymphokins und/oder von costimulatorischen Molekülen in der Lage sind.

ii Art der Verabreichung

[0139] In Impfverfahren zum Behandeln oder Verhindern von Krebs in einem Tier kann ein Impfstoffvektor, wie beschrieben, durch jedweden herkömmlichen Weg, der auf dem Impfstoff-Fachgebiet in Gebrauch ist, verabreicht werden, wie es dem Fachmann bekannt ist. Dies kann zum Beispiel die Verabreichung an eine (z. B. okulare, intranasale, orale, gastrische, pulmonäre, intestinale, rektale, vaginale oder Harnwegs-) Schleimhautoberfläche einschließen, über den parenteralen (z. B. subkutanen, intradermalen, intramuskulären, intravenösen oder intraperitonealen) Weg oder intranodal erfolgen. Bevorzugte Routen hängen von der Auswahl des Impfstoffvektors ab. Die Verabreichung kann in einer Einzeldosis oder wiederholt in Intervallen erreicht werden. Die geeignete Dosierung hängt von verschiedenen Parametern ab, welche der Fachmann kennt, wie etwa dem Impfstoffvektor selbst, dem Weg der Verabreichung und dem Zustand des zu impfenden Tiers (Gewicht, Alter und dergleichen).

[0140] Die Verabreichung des Impfstoffs oder Immunogens, wie beschrieben, kann entweder für einen prophylaktischen oder therapeutischen Zweck erfolgen. Bei prophylaktischer Bereitstellung wird das Immunogen im Voraus vor jedem Anzeichen oder im Voraus vor jedem Symptom auf Grund von Melanom, oder bei Patienten, welche durch herkömmliche Therapien krankheitsfrei gemacht wurden, aber bezüglich eines erneuten Auftretens erheblich gefährdet sind, bereitgestellt. Die prophylaktische Verabreichung des Immunogens dient zum Verhindern oder Abschwächen von Melanom in einem Säuger. Bei therapeutischer Bereitstellung wird das Immunogen bei (oder nach) nach dem Ausbruch der Krankheit oder beim Ausbruch irgendeines Symptoms der Krankheit bereitgestellt. Die therapeutische Verabreichung des Immunogens dient der Abschwächung der Krankheit.

[0141] Ein besonders bevorzugtes Impfverfahren umfasst ein Prime/Boost-Protokoll. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Protokoll, worin auf eine Immunisierung mit einer Poxvirus-Rekombinante, die ein Fremdgen-Produkt exprimiert (oder einer anderen Nukleinsäure, die ein Genprodukt codiert), ein Auffrischen bzw. Boost unter Verwendung einer gereinigten Untereinheit-Präparations-Form dieses Genprodukts (oder der dafür codierenden Nukleinsäure) folgt, eine gesteigerte Immunantwort im Verhältnis zu der Antwortreaktion hervorruft, welche mit jedem Produkt allein hervorgerufen wird. Folglich wird hierin die Verwendung eines modifizierten gp100 in einem Prime/Boost-Protokoll beschrieben. Beispiele für Methodiken, welche das Prime/Boost-Protokoll lehren, sind in WO 98/58956, WO 00/00216, WO 98/56919, WO 97/39771 und WO

98/58956 beschrieben.

[0142] Die Menge an nackter/freier DNA, welche in einem Impfstoffempfänger zu verwenden ist, hängt im Allgemeinen von der Stärke des im DNA-Konstrukt verwendeten Promotors, der Immunogenität des exprimierten Genprodukts, dem Zustand des für eine Verabreichung beabsichtigten Tiers (d. h. dem Gewicht, Alter und allgemeinen Gesundheitszustand des Tiers), der Art der Verabreichung und dem Typ der Formulierung ab. Im Allgemeinen kann menschlichen Erwachsenen eine therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Dosis von etwa 1 µg bis etwa 1 mg, bevorzugt von etwa 10 µg bis etwa 800 µg und weiter bevorzugt von etwa 25 µg bis etwa 250 µg verabreicht werden. Die Verabreichung kann in einer einzelnen Dosis, wiederholt in Intervallen, oder eingebunden in Prime/Boost-Protokollen (wie vorangehend beschrieben) erzielt werden.

iii. Orale Impfstoffe

[0143] Nicht-toxikogene *Vibrio-cholerae*-Mutantenstämme, welche als ein oraler Lebendimpfstoff nützlich sind, werden zum Beispiel in U.S.-Patent Nr. 4 882 278 (welches einen Stamm offenbart, in dem ein wesentlicher Anteil der codierenden Sequenz jedes der zwei *ctxA*-Allele deletiert worden ist, sodass kein funktionelles Cholera-toxin hergestellt wird); WO 92/11354 (ein Stamm, in dem der *irgA*-Locus durch Mutation inaktiviert ist; diese Mutation kann in einem einzigen Stamm mit *ctxA*-Mutationen kombiniert werden); und WO 94/1533 (Deletionsmutante, der funktionelle *ctxA*- und *attRS1*-DNA-Sequenzen fehlen) beschrieben. Diese Stämme können gentechnisch manipuliert werden, um heterologe Antigene zu exprimieren, wie in WO 94/19482 beschrieben. Eine effektive Impfstoffdosis eines *Vibrio-cholerae*-Stamms, der zum Exprimieren eines von einem DNA-Molekül, wie beschrieben, codierten Polypeptids oder Polypeptidderivats in der Lage ist, kann zum Beispiel etwa 1×10^5 bis etwa 1×10^9 , bevorzugt etwa 1×10^6 bis etwa 1×10^8 lebensfähige Bakterien in einem geeigneten Volumen für den gewählten Verabreichungsweg enthalten. Bevorzugte Verabreichungswege schließen alle mukosalen Wege ein; am stärksten bevorzugt werden diese Vektoren intranasal oder oral verabreicht.

[0144] Abgeschwächte *Salmonella-typhimurium*-Stämme, welche für die rekombinante Expression von heterologen Antigenen gentechnisch manipuliert wurden, oder nicht, und ihre Verwendung als orale Impfstoffe sind zum Beispiel in der WO 92/11361 beschrieben. Bevorzugte Verabreichungswege schließen alle mukosalen Wege ein; am stärksten bevorzugt werden diese Vektoren intranasal oder oral verabreicht.

[0145] Wie der Fachmann auf dem Gebiet leicht erkennt, können andere, als Impfstoffvektoren verwendbare, bakterielle Stämme ebenfalls *Shigella flexneri*, *Streptococcus gordonii* und *Bacille Calmette Guerin* (wie in WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 und WO 92/21376 beschrieben) einschließen.

[0146] In bakteriellen Vektoren kann ein Polynukleotid, wie beschrieben, in das bakterielle Genom inseriert werden, kann in einem freien Zustand verbleiben oder kann auf einem Plasmid getragen werden. Außerdem kann einer Zusammensetzung, die einen bakteriellen Impfstoffvektor enthält, ein Adjuvans zugesetzt werden. Der Fachmann auf dem Gebiet kennt eine Reihe von Adjuvantien. Geeignete Adjuvantien können vom Fachmann auf dem Gebiet ohne Weiteres ausgewählt werden.

V. ZUSAMMENSETZUNGEN

[0147] Ein modifiziertes gp100-Protein und -Gen, einschließlich des gp100M-Gens (gp100M) und gp100M-Proteins, sowie die unter Anwendung der hier beschriebenen Verfahren identifizierten Substanzen, einschließlich Impfstoffen, können in pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verabreichung an Subjekte in einer biologisch verträglichen Form, die zur Verabreichung in vivo geeignet ist, formuliert werden. Mit "biologisch verträgliche Form, geeignet zur Verabreichung in vivo" ist eine Form der zu verabreichenden Substanz gemeint, in welcher jedwede toxischen Effekte von den therapeutischen Effekten aufgewogen werden. Die Substanzen können an hierfür bedürftige Tiere verabreicht werden. Die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der pharmazeutischen Zusammensetzungen, wie beschrieben, oder einer "effektiven Menge", sind als eine Menge definiert, welche, bei den nötigen Dosierungen und Zeitdauern, wirksam ist, um das gewünschte Ergebnis des "Modulierens des Immunsystems eines Tiers" zu erreichen. Eine therapeutisch wirksame Menge einer Substanz kann gemäß Faktoren, wie dem Krankheitszustand, dem Alter, Geschlecht und Gewicht des Tiers, und der Fähigkeit des Immunogens, eine gewünschte Antwortreaktion in dem Tier hervorzurufen, variieren. Dosierungsschemen können angepasst sein, um die optimale therapeutische Antwort vorzusehen. Zum Beispiel können mehrere unterteilte Dosen täglich verabreicht werden, oder die Dosis kann proportional reduziert werden, wie es durch die Erfordernisse der therapeutischen Situation angezeigt ist. "Modulieren des Immunsystems eines Tiers" wird als die Fähigkeit definiert, eine Immunantwort in einem Zieltier zu

erzeugen. Diese Antwort umfasst sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten.

[0148] Die aktive Substanz kann in einer zweckdienlichen Weise verabreicht werden, wie etwa durch Injektion (intradermal, intramuskulär, subkutan, intravenös, intranodal usw.) oder durch orale Verabreichung, Inhalation, transdermale Aufbringung oder rektale Verabreichung oder jedwede andere Route der Verabreichung, welche die Modulation des Immunsystems eines Tiers ermöglicht. Abhängig vom Weg der Verabreichung kann die aktive Substanz mit einem Material überzogen sein, um die Verbindung vor der Wirkung von Enzymen, Säuren und anderen natürlichen Bedingungen, welche die Verbindung inaktivieren können, zu schützen.

[0149] Ein Verabreichungsweg, der vorzugsweise verwendet wird, ist derjenige der intranodalen Injektion eines modifizierten gp100-Proteins/immunogenen Fragments oder einer das Protein/Fragment codierenden Nukleinsäure oder einer beliebigen der Zusammensetzungen, wie beschrieben.

[0150] Die hierin beschriebenen Zusammensetzungen können durch per se bekannte Verfahren zur Herstellung von pharmazeutisch annehmbaren Zusammensetzungen, die Subjekten verabreicht werden können, hergestellt werden, sodass eine wirksame Menge der aktiven Substanz in einer Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Vehikel vereinigt wird. Geeignete Vehikel sind zum Beispiel in Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences (1985), Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA) oder im Handbook of Pharmaceutical Additives (zusammengestellt von Michael und Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, England (1995)) beschrieben. Auf dieser Grundlage umfassen die Zusammensetzungen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Lösungen der Substanzen in Assoziation mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Vehikeln oder Verdünnungsmitteln und können in gepufferten Lösungen mit einem geeigneten pH-Wert enthalten sein und/oder zu physiologischen Flüssigkeiten iso-osmotisch sein. Diesbezüglich kann man auf das U.S.-Patent Nr. 5 843 456 Bezug nehmen.

[0151] Die Nützlichkeit der Substanzen, Antikörper und Zusammensetzungen der Erfindung kann in experimentellen Modellsystemen bestätigt werden.

[0152] Die nachfolgenden, nicht-einschränkenden Beispiele sind veranschaulichend für die vorliegende Erfindung:

BEISPIELE

[0153] ALVAC(2)-gp100M (vCP1584) ist eine Präparation eines rekombinanten Canarypoxvirus, das eine modifizierte Version von humanem Melanomantigen gp100 exprimiert.

A. MOLEKULARE EIGENSCHAFTEN (IDENTITÄT)

1. Charakterisierung des Empfängers:

a. Parentaler Organismus:

[0154] Canarypoxvirus: Familie – Poxviridae, Subfamilie – Chordopoxviridae, Gattung – Avipoxvirus. Canarypoxvirus ist ein hüllentragendes Virus, das ein lineares dsDNA-Genom von ungefähr 325 kbp enthält. Dieses Virus repliziert sich ausschließlich in Vogelarten produktiv ((Tripathy D. Avian pox. In: Diseases of Poultry (9. Auflage: B. W. Calnek et al., Hrsg.) S. 583–596).

b. Beschreibung des Vektors:

[0155] ALVAC(2) ist ein modifiziertes abgeschwächtes Canarypoxvirus (U.S. 5 990 091). Der Ursprungstamm von Canarypoxvirus (Rentschler-Stamm) wurde durch 200 serielle Passagierungen auf primären Kükenembryo-Fibroblasten (CEFs) abgeschwächt. Das abgeschwächte Virus wurde Plaque-isoliert und als ALVAC bezeichnet. Zur Erzeugung von ALVAC(2) wurde der ALVAC-Vektor durch die Insertion von zwei codierenden Vacciniavirus-Sequenzen (E3L und K3L) modifiziert, um die Gesamteffizienz der viralen mRNA-Translation zu steigern. Das von E3L spezifizierte Genprodukt ist ein dsRNA-Bindungsprotein, und der offene Leserahmen (ORF) von K3L hat eine signifikante Sequenzähnlichkeit zum aminoterminalen Bereich von eIF-2 ((; Beattie et al., Virology 183: 419 (1991); Beattie et al., Virology 210: 254 (1995)). Sowohl K3L als auch E3L sind in der Lage zum Hemmen der Aktivität einer zellulären Proteinkinase (PKR), welche, sofern durch dsRNA aktiviert, den Translationsinitiationsfaktor eIF-2a phosphoryliert, was zu einer Inhibition der Initiation der mRNA-Translation führt. Ergebnisse aus mehreren Untersuchungen haben diesen vorgeschlagenen Mechanismus

nismus bewiesen, durch welchen die K3L- und E3L-Genprodukte von Vaccinia zur Herabregulierung der PKR-Aktivität und zu einer verstärkten virusspezifischen Genexpression (ihren (Tartaglia, J., et al., 11th Colloque des Cent Gardes, Elsevier Press (1997))).

c. Ableitung von Vektor aus dem Parental-Organismus:

[0156] Der parentale Stamm von Canarypoxvirus (Rentschler-Stamm) wurde 1970 in Deutschland isoliert und 1973 vom Institut Merieux erhalten. Das Virus wurde durch 200 serielle Passagierungen auf primären Kükembryo-Fibroblasten (CEFs) abgeschwächt. Das abgeschwächte Virus wurde 1975 in Frankreich unter dem Namen KANAPDX (ND) als Impfstoff registriert. Das Virus wurde vier aufeinander folgenden Plaque-Reinigungen unter Agarose unterzogen, und ein einzelnes Plaque-Isolat wurde selektiert und als ALVAC bezeichnet.

[0157] Die K3L codierende Sequenz wurde durch PCR-Amplifizierung unter Verwendung eines das Copenhagen-Vaccinia-HindIII-K-Fragment enthaltenden Plasmids als Matrize synthetisiert und unter die Kontrolle des Vaccinia-H6-Promotors gebracht. Die codierende Sequenz und das stromaufwärts gelegene regulatorische Element von E3L wurden aus einem Plasmid erhalten, welches einen Klon des HindIII-E-Fragments aus Copenhagen-Vaccinia enthält. Die vom H6-Promotor gesteuerten K3L- und die E3L-Sequenzen wurden in ein Donorplasmid inseriert, welches zum Lenken von deren Insertion in die C6-Stelle des Parental-Vektors in der Lage ist, und zwar gemäß den Einzelheiten, die im Beispiel 1 dargestellt sind. Zwischen dem Donorplasmid und ALVAC-Rettungsvirus wurde eine Rekombination durch In-vitro-Rekombination, wie früher beschrieben (Piccini et al., Methods of Enzymol. 153: 545 (1987)), durchgeführt. Die Expression von E3L und K3L im resultierenden rekombinanten Virus, vCP1468, wurde bestätigt, und vCP1468 wurde als ALVAC(2) bezeichnet.

d. Klonierungsstelle:

[0158] Der als C5 bezeichnete Locus wurde für die Insertion der modifizierten gp100 codierenden Sequenzen in den ALVAC(2)-Vektor verwendet. Dank des C5-Locus, der innerhalb der umfangreichen Invertierten-Terminalen-Repetitionen (ITRs) des Virusgenoms existiert, führt die Insertion in diesen Locus hinein zum Auftreten von zwei Kopien der inserierten Sequenz. Eine schematische Darstellung der Insertionsstelle ist in der [Fig. 4](#) gezeigt. Derzeit ist dem von C5 codierten Polypeptid keinerlei Funktion zugeschrieben worden, noch hat der abgeleitete offene Aminosäure-Leserahmen, der in dieser Region codiert ist, eine signifikante Homologie mit irgendeinem Eintrag in den bestehenden Proteindatenbanken gemeinsam.

2. Charakterisierung des Donors

a. Donororganismus:

[0159] Es wurden die Plasmide pCDNA3-gp100 und PCR11-gp100 verwendet, welche jeweils das Gen enthalten, das humanes gp100 (Melanom-Abstoßungsantigen) codiert.

b. Donorgene:

- (i) Exprimierte Donorgene: humanes gp100-Melanomantigen.
- (ii) Promotor: Vacciniavirus-früh/spät-H6-Promotor (Perkus, M. E., et al., J. Virol. 63: 3829 (1989)).

c. Donorgene im rekombinanten Organismus:

[0160] Die codierenden Sequenzen für ein modifiziertes humanes gp100 sind in das ALVAC(2)-Genom inseriert worden, um das modifizierte gp100-Antigen zu exprimieren, welches bezüglich der Wechselwirkung von zwei CTL-Epitopen mit HLA-Klasse I verbessert war.

BEISPIEL 1

[0161] Insertion der Vaccinia-E3L/K3L codierenden Sequenzen in die C6-Stelle von ALVAC Die K3L-codierenden Sequenzen wurden durch PCR-Amplifikation synthetisiert, wobei pSD407 (enthaltend das Copenhagen-Vaccinia-HindIII-K-Fragment) als Matrize verwendet wurde. Die Oligonukleotide MPSYN 763 (5'-CCCTCT AGATCG CGATAT CCGTTA AGTTTG TATCGT AATGCT TGCATT TTGTTA TTCGT-3') (SEQ. ID. Nr.: 109) und MPSYN 764 (5'-CCCGAA TTCATA AAAATT ATTGAT GTCTACA-3') (SEQ. ID. Nr.: 110) wurden als Primer für die PCR-Reaktion verwendet. Das ungefähr 325 bp große PCR-Fragment wurde mit XbaI und EcoRI verdaut, was ein 315 bp großes Fragment ergab. Dieses 315 bp große Fragment wurde durch Isolierung aus ei-

nem Agarosegel gereinigt und mit XbaI- und EcoRI-verdaulichem Vektor pBSSK+ von Stratagene (La Jolla, CA.) ligiert. Die Nukleinsäuresequenz wurde bestätigt. Dieses Plasmid wurde als pBS 763/764 bezeichnet. Ein Verdau von pBS 763/764 mit NruI und XhoI lieferte ein 340 bp großes Fragment, welches zur Klonierung in den Plasmidvektor pMM154 isoliert wurde. PMM154 enthält eine Kasette mit dem Vaccinia-H6-Promotor, der ein irrelevantes Gen im NYVAC-tk-Insertionsvektor-Hintergrund steuert. PMM154 wurde durch Verdau mit NruI (partiell) und XhoI vorbereitet, sodass das 340 bp große Fragment aus pBS 763/764, welches das K3L-Gen enthielt, benachbart zum H6-Promotor direktional orientiert werden konnte, wodurch man pMPTKH6K3L erzeugte. Das Plasmid pMP42GPT, welches das dominante selektierbare Eco-gpt-Markergen unter der Steuerung des Entomopox-42k-Promotors enthält, wurde mit SmaI und BamHI verdaut, wodurch man eine 0,7 Kbp große 42k-Eco-gpt-Expressionskasette erhielt. Dieses 0,7 Kbp große Fragment wurde gereinigt und in SmaI- und BamHI-geschnittenen pMPTKH6K3L ligiert, wodurch das Plasmid pMPTKH6K3Lgpt erzeugt wurde. Dieses Plasmid wurde mit XhoI verdaut, wodurch ein 1,2 Kbp großes Fragment erzeugt wurde, das die H6/K3L- und die 42k/Eco-gpt-Expressionskasette enthielt, welches dann über ein Gel gereinigt wurde. Das 1,2 Kbp große XhoI-Fragment wurde in die XhoI-Stelle des ALVAC-C6-Insertionsplasids pC6L inseriert, wodurch man pMPC6H6K3Lgpt erzeugte.

[0162] Das gesamte E3L-Gen ist innerhalb eines 2,3 Kbp großen EcoRI-Fragments enthalten, welches aus pSD401VC isoliert wurde, das einen Klon des HindIII-E-Fragments aus Copenhagen-Vaccinia enthielt. Das 2,3 Kbp große EcoRI-Fragment wurde dann in pMPC6H6K3Lgpt inseriert, der mit EcoRI partiell verdaut worden war, wodurch das Plasmid pMPC6H6K3E3gpt erzeugt wurde. Das Plasmid pMPC6H6K3E3gpt wurde mit XhoI verdaut. Das resultierende 6,8 Kbp große Vektorfragment wurde gereinigt und mit sich selbst ligiert, was zum Plasmid pMPC6E3 führt. Das Plasmid pMPTKH6K3L wurde mit PspAI verdaut, und das resultierende 560 bp große Fragment, enthaltend die H6/K3L-Expressionskasette, wurde in PspAI-verdautes pMPC6E3 ligiert, was zu dem Plasmidkonstrukt pMPC6H6K3E3 führt. Das Plasmid pMPC6H6K3E3 enthält die Vaccinia-H6/K3L-Expressionskasette und das Vaccinia-E3L-Gen mit dem endogenen Promotor, flankiert von den ALVAC-C6-Insertionsstellen-Sequenzen.

BEISPIEL 2

Genetische Modifikationen der Donorgene:

[0163] Das Plasmid pCDNA3-gp100 wurde in MN522 transformiert, wodurch man das Plasmid pMEL gp100 #1 erhielt. Ein generisches C5-Donorplasmid NVQH6C5LSP-18 wurde innerhalb der Polylinker-Region mit BamHI verdaut, mit alkalischer Phosphatase behandelt und an die kinasierten und annealten Oligonukleotide SPC5PL1 (5'-GAT-CGT-CGA-CGA-GCT-CGA-ATT-CG-3') (SEQ. ID. Nr.: 111) und SPC5PL2 (5'-GAT-CCG-AAT-TCG-AGC-TCG-TCG-AC-3') (SEQ. ID. Nr.: 112) ligiert, wodurch das Plasmid NVQH6MC5 #10 erzeugt wurde. Die Oligonukleotide MELgp01 (5'-CCC-TCG-CGA-TAT-CCG-TTA-AGT-TTG-TAT-CGT-AAT-GGA-TCT-GGT-GCT-AAA-AAG-3') (SEQ. ID. Nr.: 113) und MELgp02 (5'-CCC-CTC-GAG-ATA-AAA-ATC-AGA-CCT-GCT-GCC-CAC-TGA-3') (SEQ. ID. Nr.: 114) wurden in einer PCR mit dem Plasmid pMEL gp100 #1 verwendet, um ein 2 kb großes Fragment zu erzeugen, welches einen Teil des H6-Promotors, verknüpft an das 5'-Ende des gp100-Gens, enthält. Dieses Fragment wurde mit EcoRV und XhoI verdaut und in EcoRV/XhoI-verdautes NVQH6MC5 #10 kloniert, wodurch das Plasmid C5H6MELgp100 #5 erzeugt wurde, welches das gp100-Gen, verknüpft an den H6-Promotor, enthält.

[0164] Das gp100-Gen im Plasmid C5H6MELgp100 #5 wurde unter Verwendung von maßgeschneiderten Primern sequenziert. Eine 65bp große Deletion wurde in diesem Klon gefunden und ist gezeigtermaßen in pCDNA3-gp100 vorhanden. Das Plasmid PCRII-gp100 wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden MELgp05 (5'-CCC-ATC-TGG-CTC-TTG-GTC-3') (SEQ. ID. Nr.: 115) und MELgp13 (5'-TGA-CAT-CTC-TGC-CAG-TGT-GGT-3') (SEQ. ID. Nr.: 116) verwendet, um ein 0,6 kb großes Fragment zu erzeugen. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 verdaut und an ein 6,5 kb großes Asp718/BamHI(partiell)-Fragment aus C5H6MELgp100 #5 ligiert, wodurch man das Plasmid C5H6MELgp100 erzeugte, das das gesamte gp100-Gen unter der Steuerung des H6-Promotors enthält.

[0165] Das im Voraus bestehende Plasmid pC5H6MELgp100 wurde als Matrize für eine ortsgerichtete Mutagenese der zwei CTL-Epitope verwendet, beginnend an den Aminosäuren 209 bzw. 280. Die verwendeten Primer waren:

209-A

GCT CAG CCT TCA CCA TTA TGG ACC AGG TGC CTT TCT CC

(SEQ. ID. Nr.: 117)

209-B

GGA GAA AGG CAC CTG GTC CAT AAT GGT GAA GGC TGA CG

(SEQ. ID. Nr.: 118)

280-A

GAG CCT GGC CCA GTC ACT GTT CAG GTG GTC CTG CAG GC

(SEQ. ID. Nr.: 119)

280-B

GCC TGC AGG ACC ACC TGA ACA GTG ACT GGG CCA GGC TC

(SEQ. ID. Nr.: 120)

[0166] Ein Abschnitt, der die modifizierten Epitope enthält, wurde sequenziert und als ein 440 bp großes Nco1/MluN1-Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in mit Nco1 und MluN1 verdauten pC5H6MELgp100 ligiert, wodurch ein Plasmid mit dem vollständigen gp100 mit den modifizierten Epitopen 209-2M und 280-9V erzeugt wurde.

[0167] Sequenzdaten enthüllten eine G-nach-C-Substitution an bp #10, welche die Aminosäure #4 von einem Valin zu einem Leucin ändert. Dies wurde durch PCR unter Verwendung des folgenden Primerpaars korrigiert;

MEL25

GCT CCG GGA TCC CCG GCG ATG GTA GAC AGT CAC TTC CAT CGT GTG

TGT GCC CAG CAT TG (SEQ. ID. Nr.: 121)

MEL27

ATC GCG ATA TCC GTT AAG TTT GTA TCG TAA TGG ATC TGG TGC TAA

AAA GAT GCC TTC TT (SEQ. ID. Nr.: 122)

[0168] MEL25 ändert bp #549 von einem C zu einem G, wobei die einmalige Nco1-Stelle für ein leichteres Screening zerstört wird. Es verändert nicht die Aminosäure.

[0169] Das resultierende PCR-Fragment wurde mit BamH1 und EcoR5 verdaut und ersetzte das äquivalente Fragment, wobei der Fehler korrigiert wurde. Das resultierende Plasmid ist pC5gp100-M, welches in [Fig. 3](#) (SEQ. ID. Nr.: 123) gezeigt ist.

Genetische Modifikation des Empfängers:

[0170] Eine Rekombination zwischen dem Donorplasmid pC5gp100M und ALVAC(2)-Rettungs-Virus erzeugte das rekombinante Virus vCP1584, welches das Vaccinia-H6-Promotor-gesteuerte modifizierte humane gp100 im C5-Locus enthält.

BEISPIEL 3

Screening zur Identifizierung und Reinigung von rekombinanten Organismen:

[0171] Die Aspekte des Screenings für die Identifizierung und Reinigung eines rekombinanten Organismus der vorliegenden Erfindung sind nachstehend dargestellt.

(1) Plaque-Aufreinigung erfolgte unter Anwendung von In-situ-Plaque-Hybridisierung (Piccini et al., Methods of Enzymol. 153: 545 (1987)), [und] wurde angewandt, um rekombinante Viren zu identifizieren und die Reinheit von letztendlichen Viruspräparationen aufzuzeigen. Die In-situ-Plaque-Hybridisierungs-Analyse wurde mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt, die spezifisch für das gp100-Konstrukt (ein 580

bp großes Fragment) und den C5-Insertionslocus waren.

(2) Restriktionsanalyse: Virale genomische DNA wurde aus Zellen isoliert, die mit ALVAC-Stammform oder ALVAC(2)-gp100M (vCP1584) infiziert sind. Die genomische DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (HindIII, PstI oder BamHI) verdaut. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese durch ein Agarosegel fraktioniert und mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die Insertion der mod bzw. modifizierten gp100-Expressionskassette am C5-Locus wurde bestätigt.

(3) Immunpräzipitationsanalysen: Diese wurden unter Verwendung von radioaktiv markierten Lysaten durchgeführt, die aus nicht-infizierten HeLa-Zellen oder Zellen, welche entweder mit parentalem ALVAC-Virus, ALVAC-gp100 (vCP1465) oder ALVAC(2)-gp100M (vCP1584) infiziert waren, abgeleitet wurden, wie früher beschrieben (Taylor et al., J. Virol. 64: 1441 (1990)). Kurz gesagt, wurden HeLa-Zellkulturen bei einer m. o. i. bzw. Multiplizität der Infektion von 10 pfu/Zelle in Methionin-freien Medien, welche mit [35S]-Methionin (35 µCi/ml) ergänzt waren, infiziert. 18 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert. Eine Immunpräzipitation wurde unter Verwendung eines Kaninchen-Anti-gp100-Serums (AZN-LAM, erhalten von M. Schreurs University of Nijmegen, Niederlande) durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel fraktioniert. Das Gel wurde fixiert und für die Fluorographie mit 1M Na-Salicylat während 1/2 Stunde behandelt. Das getrocknete Gel wurde an Kodak XAR-2-Film exponiert, um die Proteinspezies sichtbar zu machen. Ergebnisse mit Anti-gp100 zeigen die Expression von gp100 in ALVAC-gp100-infizierten HeLa-Zellen, aber nicht für parental infizierte Zellen (Siehe [Fig. 6](#)).

(4) Western-Blot. HeLa-Zellen wurden 18 Stunden lang bei einer Multiplizität von 10 pfu/Zelle mit ALVAC(2)-gp100M (vCP1584), ALVAC-gp100 (vCP1465) oder ALVAC infiziert. Zelllysate wurden durch SDS-Page getrennt und auf Nitrozellulose überführt. Der Blot wurde mit AZN-LAM (Verdünnung 1/5000), gefolgt von HRP-konjugiertem Schwein-Anti-Kaninchen, unter Anwendung des verstärkten Chemolumineszenz(ECL)-Nachweisverfahrens (Amersham) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen die Expression von Vollängen-gp100 in ALVAC-gp100- und ALVAC(2)-gp100M-infizierten Zellen (Siehe [Fig. 7](#)).

(5) Plaque-Immunoscreen-Analyse. Diese wurde an vCP1584-Material durchgeführt, um die phänotypische Stabilität des Virus nach Passagierung zu bestimmen. Die phänotypische Stabilität von Produktionschargen-Material von ALVAC-gp100M (vCP1584) wurde durch einen immunologischen Plaque-Assay analysiert, welcher die Expression der inserierten Gene auf Plaque-Ebene misst. Der Assay unter Verwendung von permeabilisierten Zellen zum Nachweis von intrazellulärer sowie Oberflächen-Expression von Hgp100mod wurde für diesen Test gewählt.

[0172] Test- und Kontrollreagenzien (ALVAC(2)-gp100M (vCP1584) und ALVAC-Standard bzw. ALVAC-gp100M) wurden auf CEF-Monoschichten unter Agarose bei Verdünnungen ausplattiert, welche zu 40–200 Plaques pro 60-mm-Schale führten. 120 Stunden nach Inkubation bei 37°C wurden die infizierten Monoschichten durch Plaque-Immunoassay für den Nachweis der internen Expression von gp100M bearbeitet. Positive und negative Plaques wurden für Test- und Kontrollproben ausgezählt. Der verwendete Primärantikörper war monoklonaler Anti-HMB50 bei einer Verdünnung von 1:800. Ein verwendeter Sekundärantikörper war Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum, welches 1:500 verdünnt war.

[0173] Das Ergebnis der Analyse der internen Expression von humanem modifizierten gp100 durch individuelle Plaques, erzeugt durch (vCP1584), ist in der Tabelle 1 wiedergegeben.

[0174] Das Ergebnis zeigt, dass 98,7% der Plaque-Population von ALVAC-gp100M gp100M exprimiert, was darauf hinweist, dass ALVAC-gp100M phänotypisch stabil ist.

[0175] Die Ergebnisse der Plaque-Immunoscreen-Analyse zeigen, dass ALVAC(2)-gp100M phänotypisch in Hinblick auf die Expression von gp100 stabil ist.

(6) Nukleotidsequenz-Analyse. Diese wurde an vCP1584 durchgeführt, um die Nukleotidsequenz der H6-Promotor-gesteuerten Melanom-gp100M-Kassette zu bestätigen. Die Sequenzanalyse enthüllte keine Nukleotidunterschiede im Verhältnis zur erwarteten Sequenz, und daher sind keine Mutationen während der Herstellung von vCP1584 eingeführt worden. Um diese Analyse durchzuführen, wurde ein Pool von Plasmidklonen, enthaltend ein 2,2 kb großes PCR-abgeleitetes Fragment (umfassend die H6-Promotor-gesteuerte Melanom-gp100M-Kassette), das aus genomischer vCP1584-DNA erzeugt war, verwendet.

[0176] pBS/1584 wurde durch Vereinigen von 9 positiven Klonen erzeugt, welche durch die Ligation eines 2,2 kb großen PRC-Fragments (enthaltend die H6-Promotor-gesteuerte Melanom-gp100M-Kassette aus vCP1584) in pBS-sk-(Stratogene) erhalten wurden. Das 2,2 kb große PCR-Fragment wurde aus genomischer vCP1584-DNA mit den Oligonukleotidprimern IDC5-1 und IDC5-2 ([Fig. 5](#)) abgeleitet. Die Nukleotidsequenzen der zum Sequenzieren von pBS/1584 verwendeten Oligonukleotidprimer sind in der [Fig. 5](#) aufgeführt.

[0177] BEISPIEL 4 Dieses Beispiel stellt Ergebnisse aus der Injektion von modifizierten gp100-Molekülen in Cynomolgus-Affen bereit.

Verfahren und Experiment-Auslegung

Testsystem

[0178] Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*), für Versuchszwecke gezüchtete Tiere. Hersteller: Siconbrec "Simian Conservation Breeding & Research Center Inc.", Fema Building, 44 Gil Puyat Avenue Makati, Metro Manila, Philippinen.

[0179] Anzahl an Tieren in der Untersuchung: 12 (6 Männchen und 6 Weibchen).

[0180] Alter beim Beginn der Behandlung: 26 bis 38 Monate.
– Körpergewichtsbereich am Beginn der Behandlung (Tag-1):
– Männchen: 1,73 bis 2,34 kg
– Weibchen: 1,71 bis 2,65 kg.

Tierhaltung

- Unterbringung: ein Raum mit Air-Condition;
- Temperatur: 19 bis 25°C (Zielbereich),
- relative Luftfeuchtigkeit: > 40%
- Luftänderungen: Minimum von 8 Luftwechsel je Stunde,
- Lichtzyklus: 12 Stunden Licht (künstlich)/12 Stunden Dunkelheit.
- Käfig: die Tiere wurden einzeln in Käfigen aus nichtrostendem Stahl-Maschenwerk untergebracht (ungefähr 540 × 810 × 760 mm).
- Nahrung: erweiterte vollständige kommerzielle Primatennahrung (Mazuri-Diet, Special Diet Services Ltd., Witham, Essex, CM8, 3AD, Großbritannien), analysiert hinsichtlich chemischer und bakterieller Kontaminanten.

[0181] Abgegebene Menge: 100g Nahrung/Tier/Tag.

[0182] Darüber hinaus erhielten die Tiere täglich Früchte (Äpfel oder Bananen).

[0183] Die Tiere wurden mindestens 16 Stunden lang vor der Blutentnahme für klinische Laboratoriumsuntersuchungen und vor der Nekropsie fasten gelassen.
– Wasser: Trinkwasser nach Belieben (mittels Flaschen).
– Kontaminanten: in der Nahrung oder dem Wasser waren keine bekannten Kontaminanten bei Spiegeln vorhanden, welche die Erreichung des Ziels der Untersuchung beeinträchtigt haben könnten.

Vorbehandlungsprozeduren

- Tiergesundheits-Prozedur: alle Tiere erhielten eine klinische Untersuchung hinsichtlich Gesundheitsmängeln beim Eintreffen und eine veterinärmedizinische klinische Untersuchung während der Eingewöhnungsperiode.
- Eingewöhnungsperiode: mindestens 3 Wochen zwischen Ankunft der Tiere und Beginn der Behandlung.

Experimentelle Auslegung

- Die Zuordnung in Behandlungsgruppen wurde während der Eingewöhnungsperiode unter Anwendung einer statistischen Zuordnungsprozedur, basierend auf Körpergewichtsklassen, vorgenommen.
- Die Tiere wurden den in der Tabelle 2 gezeigten Behandlungsgruppen zugeordnet. Die verabreichten Dosis-Spiegel wurden in der Tabelle 3 gezeigt.

Verabreichung der Test/Kontroll-Artikel

Tiere der Gruppe 1 und 2

- Verabreichungsverfahren: Injektion in den linken inguinalen Lymphknoten. Die Tiere wurden vor jeder Ver-

abreichung durch eine intramuskuläre Injektion von Ketaminhydrochlorid (Imalgene® 500 – Merial, Lyon, Frankreich) leicht betäubt. Die Injektion wurde bei jeder Gelegenheit am selben Lymphknoten (linke Seite) vorgenommen. An jede Injektion schloss sich eine lokale Desinfektion mit Iod (Vétédine®-Vétoquinol, Lure, Frankreich) an.

Gruppe 3

- Route: subkutan.
- Verfahren zur Verabreichung: Bolusinjektion unter Verwendung einer sterilen Spritze und Nadel, welche subkutan eingeführt werden. Es wurden vier Injektionsstellen verwendet, woran sich eine lokale Desinfektion mit Iod (Vétédine®-Vétoquinol, Lure, Frankreich) anschloss. Außerdem wurden die Tiere vor jeder Verabreichung durch eine intramuskuläre Injektion von Keta minhydrochlorid (Imalgene® 500 – Merial, Lyon, Frankreich) leicht betäubt, um unter denselben Bedingungen wie die Tiere der Gruppen 1 und 2 vorzuliegen.

[0184] Es wurden vier Injektionsstellen in den dorsalen Zervikal/Interskapular-Regionen verwendet, wie es in der Tabelle 4 gezeigt ist.

ELISPOT-Analyse

[0185] Ein ELISPOT-Assay wurde angewandt, um die zellvermittelte Immunantwort zu untersuchen, welche in den Affen in den verschiedenen Behandlungsgruppen erzeugt wurde. Insbesondere wurde ein ELISPOT-IFN γ -Assay angewandt, um die IFN γ Produktion aus T-Lymphozyten, die aus den Affen erhalten wurden, in Antwort auf gp100-Antigene zu messen.

Materialien und Methoden

Platten: MILLIPORE-Multiscreen-HA-Platte/MAHR S45.10 (96 Vertiefungen).
Einfangantikörper: monoklonale MABTECH-Anti-IFN γ -Antikörper/G-Z4, 1 mg/ml.
Nachweisantikörper: monoklonale MABTECH-Anti-IFN γ -Antikörper/7-B6-1-Biotin, 1 mg/ml.
Enzym: SIGMA, Extravidin-PA-Konjugat/E2636
Substrat: BIORAD, NBT/BCIP – Alkalische-Phosphatase-Konjugatsubstrat, Kit/Ref: 170-64 32.

Aufbeschichten

[0186] Man bringt pro Vertiefung 100 μ l Einfangantikörper bei 1 μ g/ml, verdünnt zu 1/1000 in Carbonat/Bicarbonat-Puffer 0,1 M, pH 9,6, in die Mehrfachvertiefungsplatte ein. Es wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wird viermal in 1X PBS gewaschen.

Sättigung

[0187] Man bringt pro Vertiefung 200 μ l RPMI, supplementiert mit 10% FCS, nicht-essenziellen Aminosäuren, Pyruvat, HEPES-Puffer und Peni-Strepto, ein. Es wird 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Test

[0188] Zellen aus den immunisierten Tieren werden gegen (a) Medium allein; (b) vereinigte bzw. gepoolte Peptide bei einer Konzentration von 1 mg/ml; und (c) einen nicht-spezifischen Stimulus (PMA-Iono) getestet. Die in diesem Beispiel zum Stimulieren der IFN- γ -Produktion verwendeten vereinigten Peptide waren aus gp100 abgeleitet und sind in den Tabellen 5 bis 8 veranschaulicht. Das Endvolumen jeder Probe beträgt 200 μ l. Man inkubiert 20 Stunden lang bei 37°C. Es wird viermal in 1X PBS und 0,05% Tween 20 gewaschen.

Nachweis

[0189] 100 μ l Nachweisantikörper bei 1 μ g/ml, welche 1/1000 in 1X PBS, 1% BSA und 0,05% Tween 20 verdünnt sind, werden pro Vertiefung eingebracht. Es wird 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird viermal in 1X PBS und 0,05% Tween 20 gewaschen.

Reaktion

[0190] Pro Vertiefung werden 100 µl Extravidin-PA-Konjugat eingebracht, das 1/6000 in 1X PBS, 1% BSA und 0,05% Tween 20 verdünnt ist. Es wird 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird viermal in 1X PBS und 0,05% Tween 20 gewaschen.

Substratzugabe

[0191] Pro Vertiefung werden 100 µl im Voraus hergestelltes Substrat eingebracht. Zum Beispiel werden für 1 Platte vorbereitet: 9,6 ml destilliertes Wasser, 0,4 ml 25X-Puffer, 0,1 ml Lösung A (NBT) und 0,1 ml Lösung B (BCIP). Es wird 30–45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Waschen erfolgt in destilliertem Wasser. Es erfolgt eine Trocknung und Überführung auf eine Kunststoffolie. Die Anzahl an Spots wird unter Verwendung eines Zeiss-Bildanalysators ausgezählt. Jeder Spot entspricht einer individuellen IFN-γ-sezernierenden T-Zelle.

Ergebnisse

[0192] Die Ergebnisse der ELISPOT-Analyse sind in den [Fig. 8–Fig. 11](#) gezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass von den getesteten Tieren 2 von 2 (d. h. 100%) der Tiere, welche die intranodale Verabreichung des gp100-Antigens erhielten, und 2 von 4 (d. h. 50%) der Tiere, welche die subkutane Verabreichung des gp100-Antigens erhielten, eine positive zellvermittelte Immunantwort aufwiesen.

ELISA-Analyse

[0193] Der ELISA wurde unter Anwendung der auf dem Fachgebiet bekannten Standardmethodik durchgeführt. Kurz gesagt, wurde das humane gp100 ("hgp100"; hergestellt im Baculovirus) in Beschichtungspuffer bzw. Auftragspuffer (Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6) verdünnt und bei 0,5 µg/Vertiefung zu 96 Vertiefungen zugesetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C gelassen. Die Platten wurden dann gewaschen, und Blocking-Puffer (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung/0,5% Tween 20/1,0% BSA, pH 7,2) wurde 2 Stunden lang bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden dann gewaschen, und die Seren wurden in Verdünnungspuffer verdünnt (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung/0,5% Tween 20/0,1 BSA, pH 7,2). Für diese Untersuchung wurden Affenserum 1:800 verdünnt, und "7" serielle 3-fach-Verdünnungen wurden für jede getestete Probe durchgeführt. Die humanen Serumkontrollen wurden 1:50 in Verdünnungspuffer verdünnt, und "7" serielle 2-fach-Verdünnungen wurden durchgeführt. Jede Verdünnung erfolgte in zweifacher Ausfertigung. Die Platten wurden weitere 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden gewaschen, und der Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugierte Anti-Mensch-Sekundärantikörper (Anti-Human-Ig-Gesamtantikörper aus Schaf (Amersham Life Science, NA933)), der 1:100 in Verdünnungspuffer verdünnt war, wurde zu den Vertiefungen zugesetzt und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden gewaschen, und OPD (o-Phenylendiamindihydrochlorid)-Substrat mit H₂O₂ in Substratpuffer (50 mM Phosphat/25 mM Citrat, pH 7,2) wurde den Vertiefungen zugesetzt. Für einen kinetischen ELISA wurde die Platte wiederholt (2-Minuten-Intervalle während 15 Minuten) ungestoppt (ohne "Stop"-Puffer) abgelesen. Die Platten wurden bei 450 nm abgelesen.

Ergebnisse

[0194] Die Ergebnisse des oben genannten Experiments sind in der Tabelle 9 und in der [Fig. 12](#) präsentiert. Die Tiere von Gruppe 2 erhielten intranodale Injektionen von ALVAC(2)-gp100(mod), gefolgt von Boosts mit den modifizierten gp100-Peptiden 209(2M) und 290(9V); die Tiere in Gruppe 3 erhielten eine subkutane Injektion des ALVAC(2)-Konstrukts, gefolgt von Peptid-Boosts; die Tiere in der Gruppe 1 erhielten intranodale Injektionen mit Kochsalzlösung als Kontrolle.

[0195] Wie aus der [Fig. 12](#) ershen werden kann, induzierten beide Typen von Injektion der Antigene eine signifikante humorale Antwort auf das Antigen.

[0196] Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Beispiels, dass die Injektion eines Tumorantigens gemäß der Erfindung sowohl eine signifikante humorale als auch zellvermittelte Antwortreaktion induziert.

BEISPIEL 5

[0197] Dieses Beispiel präsentiert Daten, welche aus humanen Melanompatienten erhalten wurden, bei denen ein Priming mit ALVAC(2)-gp100M und ein Boosten mit modifizierten gp100-Peptiden (g209-2M und

g280-9V) vorgenommen wurde.

Immunisierungsprotokoll

[0198] 5 Patienten wurden subkutan in einem Prime-Boost-Schema mit ALVAC(2)-gp100M ("prime"; lyophilisiertes ALVAC(2)-gp100M, das in 1 ml 0,4% NaCl resuspendiert war; 0,5-ml-Injektionen (ungefähr $0,5 \times 10^{7,09}$ CCID₅₀ pro Injektion)) und den Peptiden g209-2M und g280-9V ("boost"; 1000 µg/Peptid in 1 ml Gesamtvolumen pro Woche (0,2 ml/Injektion täglich \times 5 Tage lang)) immunisiert. Alle Patienten: 1) waren HLA-A0201-positiv; 2) wiesen ein Alter zwischen 18 und 70 Jahren auf; 3) zeigten ein pathologisch bestätigtes bösartiges Melanom; 4) zeigten Immunkompetenz durch Reaktivität gegenüber mindestens 2 oder mehr von 7 Hauttests auf zellvermittelte Immunität (CMI); 5) besaßen Werte der Bluthämatologie und -chemie innerhalb der folgenden Bereiche:

I) Hämatologie:

Hämoglobin	> 100 g/l
Granulozyten	> $2,0 \times 10^9/l$
Lymphozyten	> $1,5 \times 10^9/l$
Blutplättchen	> $100 \times 10^9/l$

II) Chemie:

Serum-Kreatinin	< 150 µmol/l
Serum-Gesamt-Bilirubin	< 30 µmol/l
AST, ALT und ALP	müssen < 2x der normalen Obergrenze sein, oder < 5x der normalen Obergrenze, falls auf Leber-Metastasen beruhend.

[0199] Die Patienten wurden in den Wochen 1, 4 und 7 mit ALVAC(2)-gp100M "geprimt"; und in den Wochen 10 und 13 mit Peptiden "geboostert".

[0200] ELISPOT-Analyse: Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 10 und 11 wiedergegeben. Mononukleare Zellen des peripheren Bluts ("PBMNC") wurden mittels Dichtezentrifugation über Ficoll-Gradienten isoliert. Die Zellen wurden bei $3 \times 10^6/ml$ in AIM-V-Medien zusammen mit einer Mischung von g209-2M und g280-9V oder dem HLA-A*0201-Eindungs-Flu-Peptid (alle bei 50 µg/ml) 8 Tage lang in Massenkultur gehalten. An den Tagen 3 und 5 der Kultur wurde IL-2 zugegeben. Am Tag 9 wurden die Zellen geerntet, gezählt und 2×10^5 Zellen/Vertiefung plus 50 U/ml IL-2, mit und ohne die jeweiligen Peptide, wurden in Nitrozellulosemembran enthaltende ELISPOT-Platten ausplattiert, welche mit Anti-INF-γ-Antikörpern vorbeschichtet worden waren.

[0201] Die Platten wurden nach 48 Stunden Kultur entwickelt. Die aufgeführten Zahlen sind die Unterschiede zwischen dem Mittelwert von zwei Vertiefungen, welche mit Peptid und IL-2 restimuliert wurden, und zwei Vertiefungen, welche lediglich mit IL-2 behandelt wurden.

[0202] Bei den Antworten handelt es sich um die Anzahl der Spots (gezählt mit dem elektronischen ELISPOT-Lesegerät, jedoch in den meisten Fällen mit Bestätigung durch manuelles Auszählen) pro 2×10^5 PBMNC. Die Anzahl an CD8⁺-T-Zellen wurde nicht routinemäßig bestimmt, ist jedoch typischerweise um das 2-5-Fache niedriger als diese Zahl.

TABELLE 1

Analyse der Expression von gp100-Antigen durch ALVAC-gp100M

	Humanes gp100			
	Positive Plaques	Negative Plaques	Gesamtzahl der Plaques	% positiv
ALVAC-Std.	0	571	571	0
vCP1584	387	0	387	100
ALVAC gp100mod L	875	11	886	98,7

TABELLE 2

Gruppen-Nummer	Weg der Verabreichung	Behandlungstage und verabreichte Verbindung	Anzahl an Tieren
1	Intranodal	Kochsalzlösung (NaCl 0,9%): Tage 28, 42, 56 dann 70, 71, 72, 73, 74 dann 84, 85, 86, 87 und 88	4
2	Intranodal	ALVAC(2)-gp100mod: Tage 28, 42, 56 *mgp100-Peptide: Tage 70, 71, 72, 73, 74 dann 84, 85, 86, 87 und 88	4
3	Subkutan	Kochsalzlösung (NaCl 0,9%): Tag 1 AL-VAC(2)-gp100mod: Tage 28, 42, 56 *mgp100-Peptide: Tage 70 und 84	4

*209(2M)-IMDQVPFSY (SEQ. ID. Nr.: 124); 290(9V) YLEPGPVTV (SEQ. ID. Nr.: 125)

- Tiere der Gruppe 1 (Kontrolle) erhielten den Kontrollartikel (Kochsalzlösung zur Injektion (NaCl 0,9%)).
- Tiere der Gruppe 3 erhielten nur am Tag 1 den Kontrollartikel (Kochsalzlösung zur Injektion (NaCl 0,9%)).

TABELLE 3

Gruppen-Nummer	Dosishöhe	Dosisvolumen (ml/Verabreichung)
1	Kochsalzlösung (NaCl 0,9%): 0	0,250
2	Dosis: $0,25 \times 10^{7,4}$ CCID 50 ALVAC(2)-gp100mod: $0,25 \times 10^{7,4}$ CCID 50	0,250
	Dosis: 200 µg (gesamt) der Peptide IMDQVPFSY (209(2M)) und YLEPGPVTV (290(9V)) (je 100 µg)	0,2
3	Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	0,250
	ALVAC(2)-gp100mod: $0,25 \times 10^{7,4}$ CCID 50	0,250
	Dosis: 200 µg (gesamt) der Peptide IMDQVPFSY (209(2M)) und YLEPGPVTV (290(9V)) (je 100 µg)	0,2

TABELLE 4

Tage	verwendete Stellen
1 und 28	unten links
42	oben links
56	oben rechts
70	unten links
84	unten rechts

TABELLE 5

Peptid-Pool #1

Peptid	Sequenz	SEQ. ID. Nr.:
1329	HLAVIGALLAVGATK	SEQ.ID.NO.3
1330	GALLAVGATKVPRNQ	SEQ.ID.NO.4
1331	VGATKVPRNQDWLGV	SEQ.ID.NO.5
1332	VPRNQDWLGVSRQLR	SEQ.ID.NO.6
1333	DWLGVSRQLRTKAWN	SEQ.ID.NO.7
1334	SRQLRTKAWNRRQLYP	SEQ.ID.NO.8
1335	TKAWNRRQLYPEWTEA	SEQ.ID.NO.9
1336	RQLYPEWTEAQRLDC	SEQ.ID.NO.10
1337	EWTEAQRLDCWRGGQ	SEQ.ID.NO.11
1338	QRLDCWRGGQVSLKV	SEQ.ID.NO.12
1339	WRGGQVSLKVSNDGP	SEQ.ID.NO.13
1340	VSLKVSNDGPTLIGA	SEQ.ID.NO.14
1344	IALNFPGSQKVLDPG	SEQ.ID.NO.15
1345	PGSQKVLDPGQVIWV	SEQ.ID.NO.16
1346	VLPDGQVIWVNNTII	SEQ.ID.NO.17
1347	QVIWVNNTIINGSQV	SEQ.ID.NO.18
1348	NNTIINGSQVWGGQP	SEQ.ID.NO.19
1349	NGSQVWGGQPVYPQE	SEQ.ID.NO.20
1350	WGGQPVYPQETDDAC	SEQ.ID.NO.21
1351	VYPQETDDACIFPDG	SEQ.ID.NO.22
1352	TDDACIFPDGGPCPS	SEQ.ID.NO.23
1353	IFPDGGPCPSGSWSQ	SEQ.ID.NO.24
1355	GSWSQKRSFVYVWKT	SEQ.ID.NO.25
1356	KRSFVYVWKTWGQYW	SEQ.ID.NO.26
1357	YVWKTWGQYWQVLGG	SEQ.ID.NO.27
1358	WGQYWQVLGGPVSGL	SEQ.ID.NO.28
1359	QVLGGPVSGLSIGTG	SEQ.ID.NO.29

TABELLE 6

Peptid-Pool #2

Peptid	Sequenz	SEQ. ID. Nr.:
1360	PVSGLSIGTGRAMLG	SEQ.ID.NO.30
1361	SIGTGRAMLGHTME	SEQ.ID.NO.31
1362	RAMLGHTMEVTVYH	SEQ.ID.NO.32
1363	THTMEVTVYHRRGSR	SEQ.ID.NO.33
1364	VTVYHRRGSRSYVPL	SEQ.ID.NO.34
1365	RRGSRSYVPLAHSSS	SEQ.ID.NO.35
1366	SYVPLAHSSSAFTIT	SEQ.ID.NO.36
1368	AFTITDQVPFSVSVS	SEQ.ID.NO.37
1369	DQVPFSVSVSQLRAL	SEQ.ID.NO.38
1370	SVSVSQLRALDGGNK	SEQ.ID.NO.39
1372	DGGNKHFLRNQPLTF	SEQ.ID.NO.40
1373	HFLRNQPLTFALQLH	SEQ.ID.NO.41
1374	QPLTFALQLHDPSGY	SEQ.ID.NO.42
1375	ALQLHDPSGYLAHAD	SEQ.ID.NO.43
1379	DFGDSSGTLISRALV	SEQ.ID.NO.44
1380	STGLISRALVVTHTY	SEQ.ID.NO.45
1381	SRALVVTHTYLEPGP	SEQ.ID.NO.46
1382	VHTYLEPGPVTAQV	SEQ.ID.NO.47
1383	LEPGPVTAQVVLQAA	SEQ.ID.NO.48
1384	VTAQVVLQAAIPLTS	SEQ.ID.NO.49
1385	VLQAAIPLTSCGSSP	SEQ.ID.NO.50
1386	IPLTSCGSSPVP GTT	SEQ.ID.NO.51
1388	VP GTTDGHRPTAEAP	SEQ.ID.NO.52
1389	DGHRPTAEAPNTTAG	SEQ.ID.NO.53
1390	TAEAPNTTAGQVPTT	SEQ.ID.NO.54
1392	QVPTTEVVGTT PGQA	SEQ.ID.NO.55
1393	EVVGTT PGQAPTAEP	SEQ.ID.NO.56

TABELLE 7

Peptid-Pool #3

Peptid	Sequenz	SEQ. ID. Nr.:
1394	TPGQAPTAEPSTGTT	SEQ.ID.NO.57
1395	PTAEPSTGTTVQVPT	SEQ.ID.NO.58
1396	SGTTVQVPTTEVIS	SEQ.ID.NO.59
1397	VQVPTTEVISTAPVQ	SEQ.ID.NO.60
1398	TEVISTAPVQMPTAE	SEQ.ID.NO.61
1399	TAPVQMPTAESTGMT	SEQ.ID.NO.62
1400	MPTAESTGMTPEKVP	SEQ.ID.NO.63
1401	STGMTPEKVPVSEVM	SEQ.ID.NO.64
1402	PEKVPVSEVMGTTLA	SEQ.ID.NO.65
1403	VSEVMGTTLAEMSTP	SEQ.ID.NO.66
1404	GTTLAEMSTPEATGM	SEQ.ID.NO.67
1405	EMSTPEATGMTPAEV	SEQ.ID.NO.68
1408	SIVVLSGTTAAQVTT	SEQ.ID.NO.69
1409	SGTTAAQVTTTEWVE	SEQ.ID.NO.70
1410	AQVTTTEWVETTARE	SEQ.ID.NO.71
1411	TEWVETTARELPIPE	SEQ.ID.NO.72
1412	TTARELPIPEPEGPD	SEQ.ID.NO.73
1413	LPIPEPEGPDASSIM	SEQ.ID.NO.74
1414	PEGPDASSIMSTESI	SEQ.ID.NO.75
1415	ASSIMSTESITGSLG	SEQ.ID.NO.76
1416	STESITGSLGPLLDG	SEQ.ID.NO.77
1417	TGSLGPLLDGTATLR	SEQ.ID.NO.78
1418	PLLDGTATLRLVKRQ	SEQ.ID.NO.79
1419	TATLRLVKRQVPLDC	SEQ.ID.NO.80
1420	LVKRQVPLDCVLYRY	SEQ.ID.NO.81
1421	VPLDCVLYRYGSFSV	SEQ.ID.NO.82
1422	VLYRYGSFSVTLDIV	SEQ.ID.NO.83

TABELLE 8

Peptid-Pool #4

Peptid	Sequenz	SEQ. ID. Nr.:
1424	TLDIVQGIESAEILQ	SEQ.ID.NO.84
1425	QGIESAEILQAVPSG	SEQ.ID.NO.85
1426	AEILQAVPSGEGDAF	SEQ.ID.NO.86
1427	AVPSGEGDAFELTVS	SEQ.ID.NO.87
1428	EGDAFELTVSCQGGL	SEQ.ID.NO.88
1429	ELTVSCQGGLPKEAC	SEQ.ID.NO.89
1430	CQGGLPKEACMEISS	SEQ.ID.NO.90
1431	PKEACMEISSPGCQP	SEQ.ID.NO.91
1432	MEISSPGCQPPAQR	SEQ.ID.NO.92
1434	PAQRLCQFVLPSPAC	SEQ.ID.NO.93
1435	CQFVLPSPACQLVLH	SEQ.ID.NO.94
1436	PSPACQLVLHQILKG	SEQ.ID.NO.95
1437	QLVLHQILKGSGTY	SEQ.ID.NO.96
1441	LADTNSLAVVSTQLI	SEQ.ID.NO.97
1442	SLAVVSTQLIMPGQE	SEQ.ID.NO.98
1443	STQLIMPGQEAGLGQ	SEQ.ID.NO.99
1444	MPGQEAGLGQVPLIV	SEQ.ID.NO.100
1445	AGLGQVPLIVGILLV	SEQ.ID.NO.101
1448	LMAVVLASLIYRRRL	SEQ.ID.NO.102
1450	YRRRLMKQDFSVPQL	SEQ.ID.NO.103
1451	MKQDFSVPQLPHSSS	SEQ.ID.NO.104
1452	SVPQLPHSSSHWLRL	SEQ.ID.NO.105
1453	PHSSSHWLRLPRIFC	SEQ.ID.NO.106
1454	HWLRLPRIFCSCPIG	SEQ.ID.NO.107
1455	PRIFCSCPIGENSPL	SEQ.ID.NO.108

TABELLE 9

	TAG (MOD/min)			
Affe#	0	57	68	96
1	3	5	2	2
2	4	6	12	10
3	7	6	10	8
4	7	6	8	8
5	5	9	20	15
6	11	8	10	12
7	11	23	51	30
8	7	30	70	22
9	1	7	5	3
10	2	6	6	4
11	3	7	14	8
12	6	9	15	6

TABELLE 10

gp100-spezifische Antworten auf g209-2M und g280-9V*

Patient	vor 1. Injektion	vor 2. Injektion	vor 3. Injektion	vor 4. Injektion	vor 5. Injektion	4 Wochen nach Impfung
#1	0	0	0	ND	ND	2 ± 1,4
#2	0	14 ± 2,8	54 ± 6,4	16 ± 7,8	ND	ND
#3	0	0	ND	ND	ND	ND
#4	0	0	24 ± 13,4	1 ± 2,1	ND	ND
#5	ND	6 ± 6,4	ND	ND	ND	ND

TABELLE 11

Flu-Peptid-spezifische Antworten*

Patient	vor 1. Injektion	vor 2. Injektion	vor 3. Injektion	vor 4. Injektion	vor 5. Injektion	4 Wochen nach Impfung
#1	> 150	ND	> 70	ND	ND	12,5
#2	ND	0	24	0	ND	ND
#3	23,5	7	ND	ND	ND	ND
#4	0	29	13,5	11,5	ND	ND
#5	ND	> 200	ND	ND	ND	ND

* ND gibt an, dass die Werte für die Probe nicht bestimmt wurden.

SEQUENZAUFLISTUNG

<110> Aventis Pasteur Limited,
Barber, Brian
Berinstein, Neil
Moingeon, Philippe
Tartaglia, James
Tine, John

<120> Modifiziertes GP100 und Verwendungen davon

<130> 11014-13

<140> PCT/CA00/01254

<141> 2000-10-20

<150> US 60/160 879

<151> 1999-10-22

<160> 125

<170> Patentinhaberin Version 3.0

<210> 1

<211> 1986

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Modifiziertes gp 100

<400> 1

```

atggatctgg tgctaaaaag atgccttctt catttggtctg tgataggctc tttgctggct 60
gtgggggcta caaaagtacc cagaaaccag gactggcttg gtgtctcaag gcaactcaga 120
accaaagcct ggaacaggca gctgtatcca gagtggacag aagcccagag acttgactgc 180
tggagaggtg gtcaagtgtc cctcaaggtc agtaatgatg ggcctacact gattgggtgca 240
aatgcctcct tctctattgc cttgaacttc cctggaagcc aaaagggtatt gccagatggg 300
caggttatct gggtaacaa taccatcatc aatgggagcc aggtgtgggg aggacagcca 360
gtgtatcccc aggaaactga cgatgcctgc atcttccctg atggtggacc ttgccatct 420
ggctcttggt ctcaagaag aagctttggt tatgtctgga agacctgggg ccaatactgg 480
caagttctag gggggccagt gtctgggctg agcattggga caggcagggc aatgctgggc 540
acacacacga tggaaagtac tgtctacat cgccggggat cccggagcta tgtgctctt 600
gctcattcca gctcagcctt caccattatg gaccaggtgc ctttctccgt gagcgtgtcc 660
cagttgcggg ccttggtatg agggaaaca cacttctga gaaatcagcc tctgacctt 720
gccctccagc tccatgacct cagtggctat ctggctgaag ctgacctctc ctacacctgg 780
gactttggag acagtagtgg aaccctgac tctcgggcac ttgtggtcac tcatacttac 840
ctggagcctg gccagtcac tgttcaggtg gtctgcagg ctgccattec tctcacttec 900
tgtggctoct cccagttcc aggcaccaca gatgggcaca ggccaactgc agaggccct 960
aacaccacag ctggccaagt gcctactaca gaagttgtgg gtactacacc tggtcaggcg 1020
ccaactgcag agccctctgg aaccacatct gtgcaggtgc caacctga agtcataagc 1080
actgcacctg tgcagatgcc aactgcagag agcacaggta tgacacctga gaagggtgcca 1140
gtttcagagg tcatgggtac cacactggca gagatgtcaa ctccagaggc tacagggtatg 1200
acacctgcag aggtatcaat tgtgggtgctt tctggaacca cagctgcaca ggtaacaact 1260
acagagtggg tggagaccac agctagagag ctacctatcc ctgagcctga aggtccagat 1320
gccagctcaa tcattgtctac ggaaggtatt acagggtccc tgggccccct gctggatggt 1380

```

```

acagccacct taaggctggt gaagagacaa gtccccctgg attgtgttct gtatogatat 1440
ggttcctttt cogtcacctt ggacattgtc cagggatttg aaagtgccga gatcctgcag 1500
gctgtgccgt ccggtgaggg ggatgcattt gagctgactg tgtcctgcc aaggcgggctg 1560
cccaaggaag cctgcatgga gatctcatcg ccaggggtgc agccccctgc ccagcgggctg 1620
tgccagccctg tgctaccag ccagcctgc cagctgggtc tgcaccagat actgaagggt 1680
ggctcgggga catactgcct caatgtgtct ctggctgata ccaacagcct ggcagtggtc 1740
agcaccagc ttatcatgcc tggtaagaa gcaggccttg ggcagggtcc gctgatcgtg 1800
ggcatcttgc tgggtgtgat ggctgtggtc cttgcatctc tgatataatag ggcagactt 1860
atgaagcaag acttctccgt acccagttg ccacatagca gcagtcactg gctgcgtcta 1920
ccccgatct tctgtcttg tccattggt gagaacagcc cctcctcag tgggcagcag 1980
gtctga 1986

```

<210> 2

<211> 661

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Modifiziertes gp 100

<400> 2

```

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile Gly
1           5           10          15

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp
          20          25          30

Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu
          35          40          45

Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly
          50          55          60

Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala
65          70          75          80

Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val

```

85					90					95						
Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Trp	Val	Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	
100					105					110						
Ser	Gln	Val	Trp	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	Gln	Glu	Thr	Asp	Asp	
115					120					125						
Ala	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Pro	Cys	Pro	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	
130					135					140						
Gln	Lys	Arg	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp	
145					150					155					160	
Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Arg	
165					170					175						
Ala	Met	Leu	Gly	Thr	His	Thr	Met	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	His	Arg	Arg	
180					185					190						
Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe	Thr	
195					200					205						
Ile	Met	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala	
210					215					220						
Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe	
225					230					235					240	
Ala	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp	Leu	
245					250					255						
Ser	Tyr	Thr	Trp	Asp	Phe	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Arg	
260					265					270						
Ala	Leu	Val	Val	Thr	His	Thr	Tyr	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Val	
275					280					285						
Gln	Val	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr	Ser	Cys	Gly	Ser	Ser	
290					295					300						
Pro	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asp	Gly	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Pro	
305					310					315					320	
Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Thr	Thr	
325					330					335						
Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Gln	
340					345					350						
Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Met	Pro	Thr	
355					360					365						
Ala	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Val	
370					375					380						

```

Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met
385                      390                      395                      400

Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala
                      405                      410                      415

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

Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu
                      435                      440                      445

Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu
                      450                      455                      460

Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
465                      470                      475                      480

Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala
                      485                      490                      495

Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu
                      500                      505                      510

Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
                      515                      520                      525

Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val
                      530                      535                      540

Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly
545                      550                      555                      560

Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
                      565                      570                      575

Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly
                      580                      585                      590

Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala
                      595                      600                      605

Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp
                      610                      615                      620

Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu
625                      630                      635                      640

Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu
                      645                      650                      655

Ser Gly Gln Gln Val
                      660

```

<210> 3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 3
 His Leu Ala Val Ile Gly Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 4
 Gly Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 5
 Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val
 1 5 10 15

<210> 6

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 6
 Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 7
 Asp Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 8
 Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 9

Thr	Lys	Ala	Trp	Asn	Arg	Gln	Leu	Tyr	Pro	Glu	Trp	Thr	Glu	Ala
1				5					10					15

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 10

Arg	Gln	Leu	Tyr	Pro	Glu	Trp	Thr	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Asp	Cys
1				5					10					15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 11

Glu	Trp	Thr	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Asp	Cys	Trp	Arg	Gly	Gly	Gln
1				5					10					15

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 12
 Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 13
 Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 14
 Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 15

Ile	Ala	Leu	Asn	Phe	Pro	Gly	Ser	Gln	Lys	Val	Leu	Pro	Asp	Gly
1				5					10	..				15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 16

Pro	Gly	Ser	Gln	Lys	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Trp	Val
1				5					10					15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 17

Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Trp	Val	Asn	Asn	Thr	Ile	Ile
1				5				10					15	

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 18

Gln	Val	Ile	Trp	Val	Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	Ser	Gln	Val
1				5				10					15	

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 19

Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Trp	Gly	Gly	Gln	Pro
1				5				10					15	

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 20

Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Trp	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 21

Trp	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	Gln	Glu	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys
1				5					10					15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 22

Val	Tyr	Pro	Gln	Glu	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly
1				5					10					15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 23

Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Pro	Cys	Pro	Ser
1				5					10					15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 24

Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Pro	Cys	Pro	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser	Gln
1				5					10					15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 25

Gly	Ser	Trp	Ser	Gln	Lys	Arg	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr
1				5					10					15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 26

Lys	Arg	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp
1				5				10						15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 27

Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Gly
1				5				10						15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 28

Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Leu
1				5				10						15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 29

Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 30

Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Arg	Ala	Met	Leu	Gly
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 31

Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Arg	Ala	Met	Leu	Gly	Thr	His	Thr	Met	Glu
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

223> gp 100-Peptid

<400> 32

Arg	Ala	Met	Leu	Gly	Thr	His	Thr	Met	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	His
1			5						10				15	

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 33

Thr	His	Thr	Met	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	His	Arg	Arg	Gly	Ser	Arg
1			5					10					15	

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 34

Val	Thr	Val	Tyr	His	Arg	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu
1			5					10					15	

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 35

Arg	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 36

Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe	Thr	Ile	Thr
1				5					10					15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 37

Ala	Phe	Thr	Ile	Thr	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ser
1				5					10					15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 38

Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu
1				5					10					15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 39

Ser	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys
1				5					10					15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 40

Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe
1				5					10					15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 41

His	Phe	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	Gln	Leu	His
1				5					10					15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 42

Gln	Pro	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Gly	Tyr
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 43

Ala	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 44

Asp	Phe	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Arg	Ala	Leu	Val
1				5				10					15	

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 45

Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	Ser	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Thr	His	Thr	Tyr
1				5					10				15	

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 46

Ser	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Thr	His	Thr	Tyr	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro
1				5					10				15	

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 47

Val	Thr	His	Thr	Tyr	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Ala	Gln	Val
1				5					10					15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 48

Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Gln	Ala	Ala
1				5					10					15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 49

Val	Thr	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr	Ser
1				5					10					15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 50

Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr	Ser	Cys	Gly	Ser	Ser	Pro
1				5					10					15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 51

Ile	Pro	Leu	Thr	Ser	Cys	Gly	Ser	Ser	Pro	Val	Pro	Gly	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 52

Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asp	Gly	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Pro
1				5					10					15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 53

Asp	Gly	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Pro	Asn	Thr	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 54

Thr	Ala	Glu	Ala	Pro	Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 55

Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Ala
1				5					10					15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 56

Glu	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Pro
1				5					10					15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 57

Thr	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser
1				5					10					15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 58

Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Gln	Val	Pro	Thr
1				5					10					15

<210> 59

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 59

Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ile	Ser
1				5				10					15	

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 60

Val	Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Val	Gln
1			5					10					15	

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 61

Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Met	Pro	Thr	Ala	Glu
1			5					10					15	

<210> 62

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 62

Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Met	Pro	Thr	Ala	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Thr
1				5					10				15	

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 63

Met	Pro	Thr	Ala	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Pro
1				5				10					15	

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 64

Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Val	Met
1				5				10					15	

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 65

Pro	Glu	Lys	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Val	Met	Gly	Thr	Thr	Leu	Ala
1				5					10					15

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 66

Val	Ser	Glu	Val	Met	Gly	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Met	Ser	Thr	Pro
1				5				10						15

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 67

Gly	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Met	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Thr	Gly	Met
1				5					10					15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 68

Glu	Met	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Ala	Glu	Val
1				5				10					15	

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 69

Ser	Ile	Val	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gln	Val	Thr	Thr
1				5				10					15	

<210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 70

Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gln	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Trp	Val	Glu
1				5				10					15	

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 71

Ala	Gln	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Trp	Val	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Glu
1				5					10					15

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 72

Thr	Glu	Trp	Val	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu
1				5					10					15

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstlich

<220>
 <223> gp 100-Peptid

<400> 73

Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp
 1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 74

Leu Pro Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met
 1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 75

Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu Ser Ile
 1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 76

Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 77

Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly
 1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 78

Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 79

Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	Lys	Arg	Gln
1			5						10					15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 80

Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	Lys	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Cys
1			5						10					15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 81

Leu	Val	Lys	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr
1			5						10					15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 82

Val	Pro	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Gly	Ser	Phe	Ser	Val
1				5					10					15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 83

Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Val
1				5					10					15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 84

Thr	Leu	Asp	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	Glu	Ser	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln
1				5					10					15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 85

Gln	Gly	Ile	Glu	Ser	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Ser	Gly
1				5				10						15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 86

Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Phe
1				5					10					15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 87

Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Phe	Glu	Leu	Thr	Val	Ser
1				5					10					15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 88

Glu	Gly	Asp	Ala	Phe	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Cys	Gln	Gly	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 89

Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Cys	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Cys
1				5					10					15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 90

Cys	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Cys	Met	Glu	Ile	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 91

Pro	Lys	Glu	Ala	Cys	Met	Glu	Ile	Ser	Ser	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro
1				5					10					15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 92

Met	Glu	Ile	Ser	Ser	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro	Pro	Ala	Gln	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 93

Pro	Ala	Gln	Arg	Leu	Cys	Gln	Pro	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Cys
1				5					10					15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 94

Cys	Gln	Pro	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Cys	Gln	Leu	Val	Leu	His
1				5					10					15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 95

Pro	Ser	Pro	Ala	Cys	Gln	Leu	Val	Leu	His	Gln	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 96

Gln	Leu	Val	Leu	His	Gln	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr
1				5					10					15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 97

Leu	Ala	Asp	Thr	Asn	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Ile
1				5					10				15	

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 98

Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	Gln	Glu
1			5						10				15	

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 99

Ser	Thr	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln
1				5					10				15	

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 100

Met	Pro	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Pro	Leu	Ile	Val
1			5					10					15	

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 101

Ala	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val
1			5					10					15	

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 102

Leu	Met	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu
1			5					10					15	

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 103

Leu	Met	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 104

Met	Lys	Gln	Asp	Phe	Ser	Val	Pro	Gln	Leu	Pro	His	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 105

Ser	Val	Pro	Gln	Leu	Pro	His	Ser	Ser	Ser	His	Trp	Leu	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 106

Pro	His	Ser	Ser	Ser	His	Trp	Leu	Arg	Leu	Pro	Arg	Ile	Phe	Cys
1				5					10					15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 107

His	Trp	Leu	Arg	Leu	Pro	Arg	Ile	Phe	Cys	Ser	Cys	Pro	Ile	Gly
1				5					10					15

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 108

Pro	Arg	Ile	Phe	Cys	Ser	Cys	Pro	Ile	Gly	Glu	Asn	Ser	Pro	Leu
1				5					10					15

<210> 109

<211> 59

<212> DNA
<213> Künstlich

<220>
<223> oligo-MPSYN 763

<400> 109
ccctctagat cgcgatatcc gttaagtttg tatcgtaatg cttgcatttt gttattcgt 59

<210> 110
<211> 31

<212> DNA
<213> Künstlich

<220>
<223> oligo-MPSYN 764

<400> 110
cccgaattca taaaaattat tgatgtctac a 31

<210> 111
<211> 23

<212> DNA
<213> Künstlich

<220>
<223> oligo-SPC5PL1

<400> 111
gatcgtcgac gagctcgaat tcg 23

<210> 112
<211> 23

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> oligo-SPC5PL2

<400> 112

gatccgaatt cgagctcgtc gac

23

<210> 113

<211> 51

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> oligo-MELgp01

<400> 113

ccctcgcgat atccgttaag tttgtatcgt aatggatctg gtgctaaaaa g

51

<210> 114

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> oligo-MELgp02

<400> 114

cccctcgaga taaaaatcag acctgctgcc cactga

36

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> oligo-MELgp05

<400> 115

cccatctggc tcttggtc

18

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> oligo-MELgp13

<400> 116

tgacatctct gccagtgtgg t

21

<210> 117

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer 209-A

<400> 117

gctcagcctt caccattatg gaccaggtgc cttctctc

38

<210> 118

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer 209-B

<400> 118

ggagaaaggc acctgggtcca taatggtgaa ggctgacg

38

<210> 119

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer 280-A

<400> 119

gagcctggcc cagtcactgt tcaggtggtc ctgcaggc

38

<210> 120

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer 280-B

<400> 120

gcctgcagga ccacctgaac agtgactggg ccaggctc

38

<210> 121

<211> 59

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer MEL25

<400> 121

gctccgggat ccccgcgat ggtagacagt cacttccatc gtgtgtgtgc ccagcattg 59

<210> 122

<211> 59

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> Primer MEL27

<400> 122

atcgcgatat ccgttaagtt tgtatcgtaa tggatctggt gctaaaaaga tgccttctt 59

<210> 123

<211> 2534

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<223> modifiziertes gp 100

<400> 123

ggctactttt caacaaagga gcagatgtaa actacatctt tgaaagaaat ggaaaatcat 60

atactgtttt ggaattgatt aaagaaagtt actctgagac acaaaagagg tagctgaagt 120

ggctactctca aaggtagctg actaattagc tataaaaagg atcgtcgacg agctcgaatt 180

cggatccggg ttaattaatt agtcacagg caggcgaga acgagactat ctgctcgta 240

attaattaga gcttctttat tctatactta aaaagtgaaa ataaatacaa aggttcttga 300

gggttgtgtt aaattgaaag cgagaaataa tcataaatta tttcattatc gcgatatccg 360

ttaagtttgt atcgtaatgg atctggtgct aaaaagatgc cttcttcatt tggctgtgat 420

aggtgctttg ctggctgtgg gggctacaaa agtaccaga aaccaggact ggcttgggtg 480

ctcaaggcaa ctcagaacca aagcctggaa caggcagctg tatccagagt ggacagaagc 540

ccagagactt gactgctgga gaggtgggtca agtgtccctc aaggtcagta atgatggggc 600
 tacactgatt ggtgcaaatg cctccttctc tattgccttg aacttccttg gaagccaaaa 660
 ggtattgcca gatgggcagg ttatctgggt caacaatacc atcatcaatg ggagccaggt 720
 gtggggagga cagccagtgt atccccagga aactgacgat gcctgcatct tccctgatgg 780
 tggaccttgc ccatctggct cttggtctca gaagagaagc tttgtttatg tctggaagac 840
 ctggggccaa tactggcaag ttctaggggg cccagtgtct gggctgagca ttgggacagg 900
 cagggcaatg ctgggcacac acacgatgga agtgactgtc taccatcgcc ggggatcccg 960
 gagetatgtg cctcttgctc attccagctc agccttcacc attatggacc aggtgccttt 1020
 ctccgtgagc gtgtccaggt tgcgggcctt ggatggaggg aacaagcact tccctgagaaa 1080
 tcagcctctg acctttgccc tccagctcca tgacccaggt ggctatctgg ctgaagctga 1140
 cctctctac acctgggact ttggagacag tagtgaacc ctgatctctc gggcacttgt 1200
 ggtcactcat acttaoctgg agcctggccc agtcactgtt caggtgggtcc tgcaggctgc 1260
 cattcctctc acctcctgtg gctcctcccc agttccaggc accacagatg ggcacaggcc 1320
 aactgcagag gccctaaca ccacagctgg ccaagtgcct actacagaag ttgtgggtac 1380
 tacacctggt caggcgccaa ctgcagagcc ctctggaacc acatctgtgc aggtgccaac 1440
 cactgaagtc ataagcactg cacctgtgca gatgccaaact gcagagagca caggatatgac 1500
 acctgagaag gtgccagttt cagaggtcat gggtagcaca ctggcagaga tgtcaactcc 1560
 agaggctaca ggtatgacac ctgcagaggt atcaattgtg gtgctttctg gaaccacagc 1620
 tgcacaggta acaactacag agtgggtgga gaccacagct agagagctac ctatccctga 1680
 gcctgaaggc ccagatgcca gctcaatcat gtctacggaa agtattacag gttccctggg 1740
 cccctgctg gatggtacag ccaccttaag gctggtgaag agacaagtcc ccctggattg 1800
 tgttctgtat cgatatggtt ccttttccgt caccctggac attgtccagg gtattgaaag 1860
 tgccgagatc ctgcaggctg tgccgtccgg tgagggggat gcatttgagc tgactgtgtc 1920
 ctgccaaaggc gggctgcccc aggaagcctg catggagatc tcatcgccag ggtgccagcc 1980
 ccctgcccag cggctgtgcc agcctgtgct accagccca gcctgccagc tggttctgca 2040
 ccagatactg aagggtggct cggggacata ctgcctcaat gtgtctctgg ctgataccaa 2100
 cagcctggca gtggtcagca cccagcttat catgcctggt caagaagcag gccttgggca 2160
 ggttccgctg atcgtgggca tcttgctggt gttgatggct gtggtccttg catctctgat 2220


```

atatagggcg agacttatga agcaagactt ctccgtaccc cagttgccac atagcagcag 2280
tcactggctg cgtctacccc gcatcttctg ctcttgtccc attggtgaga acagccccct 2340
cctcagtggg cagcaggtct gatctttatc tcgagtctag aatcgatccc gggtttttat 2400
gactagttaa tcacggccgc ttataaagat ctaaaatgca taatttctaa ataataaaaa 2460
aaaagtacat catgagcaac gcgtagtat attttacaat ggagattaac gctctatacc 2520
gttctatgtt tatt 2534

```

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 124

```

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Tyr
1             5

```

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> gp 100-Peptid

<400> 125

```

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
1             5

```

Patentansprüche

1. Verwendung (i) eines Poxvirusvektors, der darin inseriert eine in [Fig. 1](#) (SEQ ID NR: 1) gezeigte Nukleinsäuresequenz aufweist, und (ii) Peptide, bestehend aus den Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NR: 124 und SEQ ID NR: 125, zur Herstellung eines Medikaments für die Erzeugung einer Immunantwort gegen humanes Melanom durch sequentielle Verabreichung.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Poxvirusvektor ALVAC ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Poxvirusvektor ALVAC-2 ist.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Poxvirusvektor, der darin inseriert eine in [Fig. 1](#) (SEQ ID NR: 1) gezeigte Nukleinsäuresequenz zum Primen aufweist, und das Peptid der SEQ ID NR: 124 und das Peptid der SEQ ID NR: 125 zum Boosten, wobei die Zusammensetzung für die getrennte Verabreichung des Vektors und der Peptide hergerichtet ist.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei der Poxvirusvektor ALVAC ist.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei der Poxvirusvektor ALVAC-2 ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1

	ATGG	ATCTGGTGCT	AAAAAGATGC	CTTCTTCATT	TGGCTGTGAT
AGGTGCTTTG	CTGGCTGTGG	GGGCTACAAA	AGTACCCAGA	AACCAGGACT	GGCTTGGTGT
CTCAAGGCAA	CTCAGAACCA	AAGCCTGGAA	CAGGCAGCTG	TATCCAGAGT	GGACAGAAGC
CCAGAGACTT	GACTGCTGGA	GAGGTGGTCA	AGTGTCCCTC	AAGGTCAGTA	ATGATGGGCC
TACACTGATT	GGTGCAAATG	CCTCCTTCTC	TATTGCCTTG	AACTTCCCTG	GAAGCCAAAA
GGTATTGCCA	GATGGGCAGG	TTATCTGGGT	CAACAATACC	ATCATCAATG	GGAGCCAGGT
GTGGGGAGGA	CAGCCAGTGT	ATCCCCAGGA	AACTGACGAT	GCCTGCATCT	TCCCTGATGG
TGGACCTTGC	CCATCTGGCT	CTTGGTCTCA	GAAGAGAAGC	TTTGTTTATG	TCTGGAAGAC
CTGGGGCCAA	TACTGGCAAG	TTCTAGGGGG	CCCAGTGTCT	GGGCTGAGCA	TTGGGACAGG
CAGGGCAATG	CTGGGCACAC	ACACGATGGA	AGTGACTGTC	TACCATCGCC	GGGGATCCCC
GAGCTATGTG	CCTCTTGCTC	ATTCCAGCTC	AGCCTTCACC	ATTATGGACC	AGGTGCCTTT
CTCCGTGAGC	GTGTCCCAGT	TGCGGGCCTT	GGATGGAGGG	AACAAGCACT	TCCTGAGAAA
TCAGCCTCTG	ACCTTTGCCC	TCCAGCTCCA	TGACCCAGT	GGCTATCTGG	CTGAAGCTGA
CCTCTCCTAC	ACCTGGGACT	TTGGAGACAG	TAGTGGAACC	CTGATCTCTC	GGGCACTTGT
GGTCACTCAT	ACTTACCTGG	AGCCTGGCCC	AGTCACTGTT	CAGGTGGTCC	TGCAGGCTGC
CATTCTCTC	ACCTCCTGTG	GCTCCTCCCC	AGTTCCAGGC	ACCACAGATG	GGCACAGGCC
AACTGCAGAG	GCCCCTAACA	CCACAGCTGG	CCAAGTGCCT	ACTACAGAAG	TTGTGGGTAC
TACACCTGGT	CAGGCGCCAA	CTGCAGAGCC	CTCTGGAACC	ACATCTGTGC	AGGTGCCAAC
CACTGAAGTC	ATAAGCACTG	CACCTGTGCA	GATGCCAACT	GCAGAGAGCA	CAGGTATGAC
ACCTGAGAAG	GTGCCAGTTT	CAGAGGTCAT	GGGTACCACA	CTGGCAGAGA	TGTCAACTCC
AGAGGCTACA	GGTATGACAC	CTGCAGAGGT	ATCAATTGTG	GTGCTTCTCG	GAACCACAGC
TGCACAGGTA	ACAACCTACAG	AGTGGGTGGA	GACCACAGCT	AGAGAGCTAC	CTATCCCTGA
GCCTGAAGGT	CCAGATGCCA	GCTCAATCAT	GTCTACGGAA	AGTATTACAG	GTTCCCTGGG
CCCCCTGCTG	GATGGTACAG	CCACCTTAAG	GCTGGTGAAG	AGACAAGTCC	CCCTGGATTG
TGTTCTGTAT	CGATATGGTT	CCTTTTCCGT	CACCCTGGAC	ATTGTCCAGG	GTATTGAAAG
TGCCGAGATC	CTGCAGGCTG	TGCCGTCCGG	TGAGGGGGAT	GCATTTGAGC	TGACTGTGTC
CTGCCAAGGC	GGGCTGCCCCA	AGGAAGCCTG	CATGGAGATC	TCATCGCCAG	GGTGCCAGCC
CCCTGCCCAG	CGGCTGTGCC	AGCCTGTGCT	ACCCAGCCCA	GCCTGCCAGC	TGGTTCTGCA
CCAGATACTG	AAGGGTGGCT	CGGGGACATA	CTGCCTCAAT	GTGTCTCTGG	CTGATACCAA
CAGCCTGGCA	GTGGTCAGCA	CCCAGCTTAT	CATGCCTGGT	CAAGAAGCAG	GCCTTGGGCA
GGTTCCGCTG	ATCGTGGGCA	TCTTGCTGGT	GTTGATGGCT	GTGGTCCCTG	CATCTCTGAT
ATATAGGCGC	AGACTTATGA	AGCAAGACTT	CTCCGTACCC	CAGTTGCCAC	ATAGCAGCAG
TCACTGGCTG	CGTCTACCCC	GCATCTTCTG	CTCTTGTCCT	ATTGGTGAGA	ACAGCCCCCT
CCTCAGTGGG	CAGCAGGTCT	GA			

FIGUR 2

Met	Asp	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Cys	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Val	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Lys	Val	Pro	Arg	Asn	Gln	Asp	Trp
			20					25					30		
Leu	Gly	Val	Ser	Arg	Gln	Leu	Arg	Thr	Lys	Ala	Trp	Asn	Arg	Gln	Leu
		35					40					45			
Tyr	Pro	Glu	Trp	Thr	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Asp	Cys	Trp	Arg	Gly	Gly
	50					55				60					
Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Asn	Asp	Gly	Pro	Thr	Leu	Ile	Gly	Ala
65					70					75					80
Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Ile	Ala	Leu	Asn	Phe	Pro	Gly	Ser	Gln	Lys	Val
				85					90					95	
Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Trp	Val	Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly
			100					105					110		
Ser	Gln	Val	Trp	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	Gln	Glu	Thr	Asp	Asp
	115						120					125			
Ala	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Pro	Cys	Pro	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser
130						135					140				
Gln	Lys	Arg	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp
145					150					155					160
Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Arg
				165					170					175	
Ala	Met	Leu	Gly	Thr	His	Thr	Met	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	His	Arg	Arg
			180					185					190		
Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe	Thr
	195					200						205			
Ile	Met	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala
210						215					220				
Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe
225					230					235					240
Ala	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp	Leu
				245					250					255	
Ser	Tyr	Thr	Trp	Asp	Phe	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Arg
		260					265						270		
Ala	Leu	Val	Val	Thr	His	Thr	Tyr	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Val
	275						280					285			
Gln	Val	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr	Ser	Cys	Gly	Ser	Ser
290						295					300				
Pro	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asp	Gly	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Pro
305					310					315					320
Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Thr	Thr
				325					330					335	
Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Gln
			340				345					350			
Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Met	Pro	Thr
		355					360					365			

FIGUR 2 (Fortsetzung)

Ala	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Val
370						375					380				
Met	Gly	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Met	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Thr	Gly	Met
385					390					395					400
Thr	Pro	Ala	Glu	Val	Ser	Ile	Val	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala
				405					410					415	
Gln	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Trp	Val	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Pro
			420					425					430		
Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Gly	Pro	Asp	Ala	Ser	Ser	Ile	Met	Ser	Thr	Glu
		435					440					445			
Ser	Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				
Arg	Leu	Val	Lys	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr
465					470					475					480
Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	Glu	Ser	Ala
				485					490					495	
Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Phe	Glu	Leu
			500					505					510		
Thr	Val	Ser	Cys	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Cys	Met	Glu	Ile
		515					520					525			
Ser	Ser	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro	Pro	Ala	Gln	Arg	Leu	Cys	Gln	Pro	Val
	530					535					540				
Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Cys	Gln	Leu	Val	Leu	His	Gln	Ile	Leu	Lys	Gly
545					550					555					560
Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Cys	Leu	Asn	Val	Ser	Leu	Ala	Asp	Thr	Asn	Ser
				565					570					575	
Leu	Ala	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly
			580					585					590		
Leu	Gly	Gln	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Ala
		595					600					605			
Val	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu	Met	Lys	Gln	Asp
	610					615					620				
Phe	Ser	Val	Pro	Gln	Leu	Pro	His	Ser	Ser	Ser	His	Trp	Leu	Arg	Leu
625					630					635					640
Pro	Arg	Ile	Phe	Cys	Ser	Cys	Pro	Ile	Gly	Glu	Asn	Ser	Pro	Leu	Leu
				645					650					655	
Ser	Gly	Gln	Gln	Val											
			660												

FIGUR 3

Nukleotidsequenz von C5H6gp100M

1-254 linker C5 flankierender Arm
 255-376 H6-Promotor
 377-2362 modifiziertes gp100-Gen
 2363-2534 rechter C5 flankierender Arm

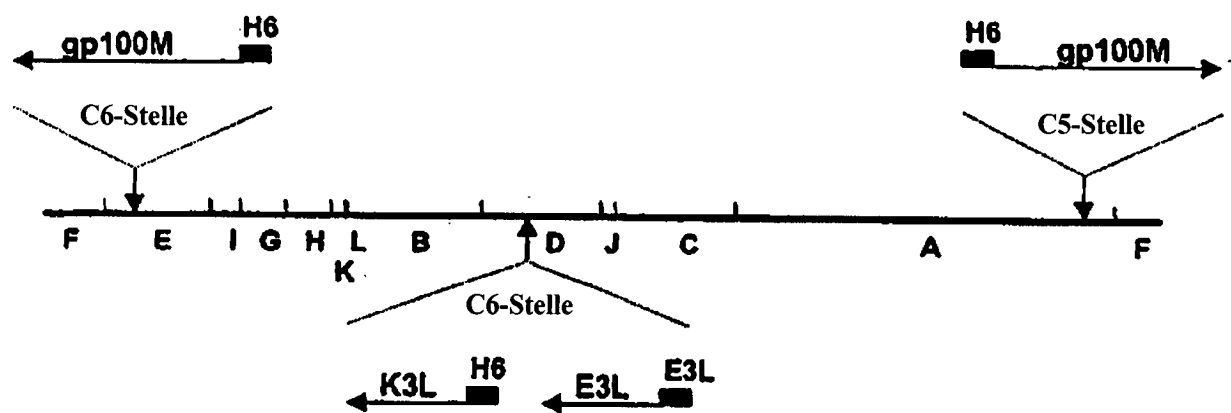
```

1 GGCTACTTTT CAACAAAGGA GCAGATGTAA ACTACATCTT TGAAAGAAAT GGAAAATCAT
61 ATACTGTTTT GGAATTGATT AAAGAAAGTT ACTCTGAGAC ACAAAGAGG TAGCTGAAGT
121 GGTACTCTCA AAGGTACGTG ACTAATTAGC TATAAAAAGG ATCGTCGACG AGCTCGAATT
181 CGGATCCGGG TTAATTAAAT AGTCATCAGG CAGGGCGAGA ACGAGACTAT CTGCTCGTTA
241 ATTAATTAGA GCTTCTTTAT TCTATACTTA AAAAGTGAAA ATAAATACAA AGGTTCTTGA
301 GGGTTGTGTT AAATTGAAAG CGAGAAATAA TCATAAATTA TTTCAATTATC GCGATATCCG
361 TTAAGTTTGT ATCGTAATGG ATCTGGTGCT AAAAAGATGC CTTCTTCATT TGGCTGTGAT
421 AGGTGCTTTG CTGGCTGTGG GGGCTACAAA AGTACCCAGA AACCAGGACT GGCTTGGTGT
481 CTCAGGCAA CTCAGAACCA AAGCCTGGAA CAGGCAGCTG TATCCAGAGT GGACAGAAGC
541 CCAGAGACTT GACTGCTGGA GAGGTGGTCA AGTGTCCCTC AAGGTCAGTA ATGATGGGCC
601 TACACTGATT GGTGCAAATG CCTCCTTCTC TATTGCCTTG AACTTCCCTG GAAGCCAAAA
661 GGTATTGCCA GATGGGCAGG TTATCTGGGT CAACAATACC ATCATCAATG GGAGCCAGGT
721 GTGGGGAGGA CAGCCAGTGT ATCCCAGGA AACTGACGAT GCCTGCATCT TCCCTGATGG
781 TGGACCTTGC CCATCTGGCT CTTGGTCTCA GAAGAGAAGC TTTGTTTATG TCTGGAAGAC
841 CTGGGGCCAA TACTGGCAAG TTCTAGGGGG CCCAGTGTCT GGGCTGAGCA TTGGGACAGG
901 CAGGGCAATG CTGGGCACAC ACACGATGGA AGTACTGTCT TACCATCGCC GGGGATCCCG
961 GAGCTATGTG CCTCTTGCTC ATTCCAGCTC AGCCTTCACC ATTATGGACC AGGTGCCTTT
1021 CTCCGTGAGC GTGTCCCAGT TGCGGGCCCT GGATGGAGGG AACAAAGCACT TCCTGAGAAA
1081 TCAGCCTCTG ACCTTTGCCC TCCAGCTCCA TGACCCAGT GGCTATCTGG CTGAAGCTGA
1141 CCTCTCTAC ACCTGGGACT TTGGAGACAG TAGTGGAACC CTGATCTCTC GGGCACTTGT
1201 GGTCACTCAT ACTTACCTGG AGCCTGGCCC AGTCACTGTT CAGGTGGTCC TGCAGGCTGC
1261 CATTCCTCTC ACCTCCTGTG GCTCCTCCCC AGTTCCAGGC ACCACAGATG GGCACAGGCC
1321 AACTGCAGAG GCCCTAACA CCACAGCTGG CCAAGTGCCCT ACTACAGAAG TTGTGGGTAC
1381 TACACCTGGT CAGGCGCCAA CTGCAGAGCC CTCTGGAACC ACATCTGTGC AGGTGCCAAC
1441 CACTGAAGTC ATAAGCACTG CACCTGTGCA GATGCCAACC GCAGAGAGCA CAGGTATGAC
1501 ACCTGAGAAG GTGCCAGTTT CAGAGGTCAT GGGTACCACA CTGGCAGAGA TGTCAACTCC
1561 AGAGGCTACA GGTATGACAC CTGCAGAGGT ATCAATTGTG GTGCTTCTCTG GAACCACAGC
1621 TGCACAGGTA ACAACTACAG AGTGGGTGGA GACCACAGCT AGAGAGCTAC CTATCCCTGA
1681 GCCTGAAGGT CCAGATGCCA GCTCAATCAT GTCTACGGAA AGTATTACAG GTTCCCTGGG
1741 CCCCTGCTG GATGGTACAG CCACCTTAAG GCTGGTGAAG AGACAAGTCC CCCTGGATTG
1801 TGTTCTGTAT CGATATGGTT CCTTTTCCGT CACCCTGGAC ATTGTCCAGG GTATTGAAAG
1861 TGCCGAGATC CTGCAGGCTG TGCCGTCCGG TGAGGGGGAT GCATTTGAGC TGACTGTGTC
1921 CTGCCAAGGC GGGCTGCCCA AGGAAGCCTG CATGGAGATC TCATCGCCAG GTTGCCAGCC
1981 CCCTGCCAG CGGCTGTGCC AGCCTGTGCT ACCCAGCCCA GCCTGCCAGC TGGTTCTGCA
2041 CCAGATACTG AAGGGTGGCT CGGGGACATA CTGCCTCAAT GTGTCTCTGG CTGATACCAA
2101 CAGCCTGGCA GTGGTCAGCA CCCAGCTTAT CATGCCTGGT CAAGAAGCAG GCCTTGGGCA
2161 GGTTCCGCTG ATCGTGGGCA TCTTGCTGGT GTTGATGGCT GTGGTCCCTG CATCTCTGAT
2221 ATATAGGCGC AGACTTATGA AGCAAGACTT CTCCGTACCC CAGTTGCCAC ATAGCAGCAG
2281 TCACTGGCTG CGTCTACCCC GCATCTTCTG CTCTTGTCCT ATTGGTGAGA ACAGCCCCCT
2341 CCTCAGTGGG CAGCAGGTCT GATTTTATC TCGAGTCTAG AATCGATCCC GGGTTTTTAT
2401 GACTAGTTAA TCACGGCCGC TTATAAAGAT CTAAATGCA TAATTCTAA ATAATGAAA
2461 AAAAGTACAT CATGAGCAAC CGGTTAGTAT ATTTTACAAT GGAGATTAAC GCTCTATACC
2521 GTTCTATGTT TATT

```

FIGUR 4

ALVAC(2)-gp100M (vCP1584)
(ALVAC *Xho*I – Restriktionskarte)



FIGUR 5

Oligonukleotid-Primer

IDC5-1

CGT GCC ATG GCA CAC AAA AGA GGT AGC TGA A

IDC5-2

CCA GGC GGC CGC ACT AAC GCG TTG CTC ATG ATG

CSL

CAC AAA AGA GGT AGC TGA AGT

MEL 01

ATG GAT CTG GTG CTA AAA AGA

MEL 05

ACC TTG CCC ATC TGG CTC TTG

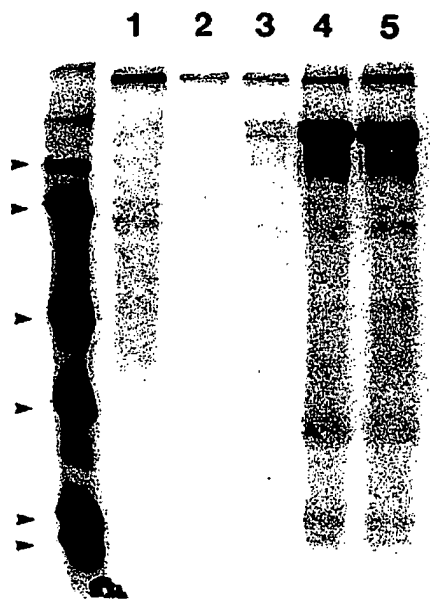
MEL 09

AGA TGC CAG CTC AAT CAT GTG

CSR

ATA GAT CTT TAT AAG CGG CCG

FIGUR 6



Molekulargewichtsmarker: 200, 98,6, 68, 43, 29, 18, 14 kDa

Spur 1: Nicht infizierte HeLa-Zellen

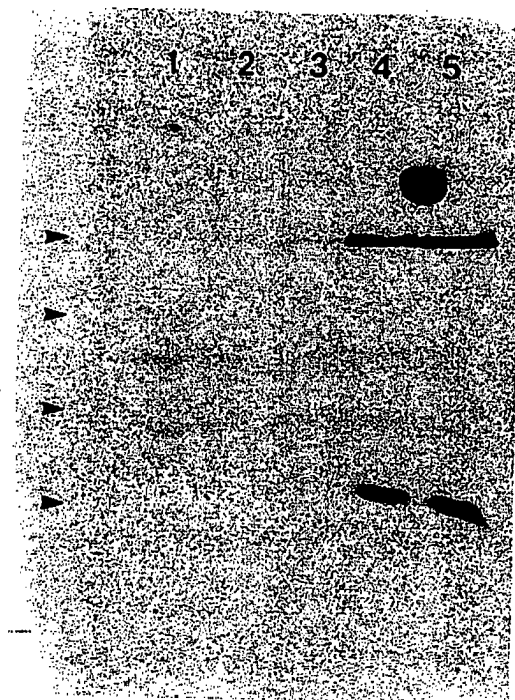
Spur 2: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC

Spur 3: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC-gp100 (vCP1465)

Spur 4: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC(2)-gp100M (vCP1584)

Spur 5: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC(2)-gp100M (Schwester von vCP1584)

FIGUR 7



Molekulargewichtsmarker: 97, 68, 43, 29 kDa

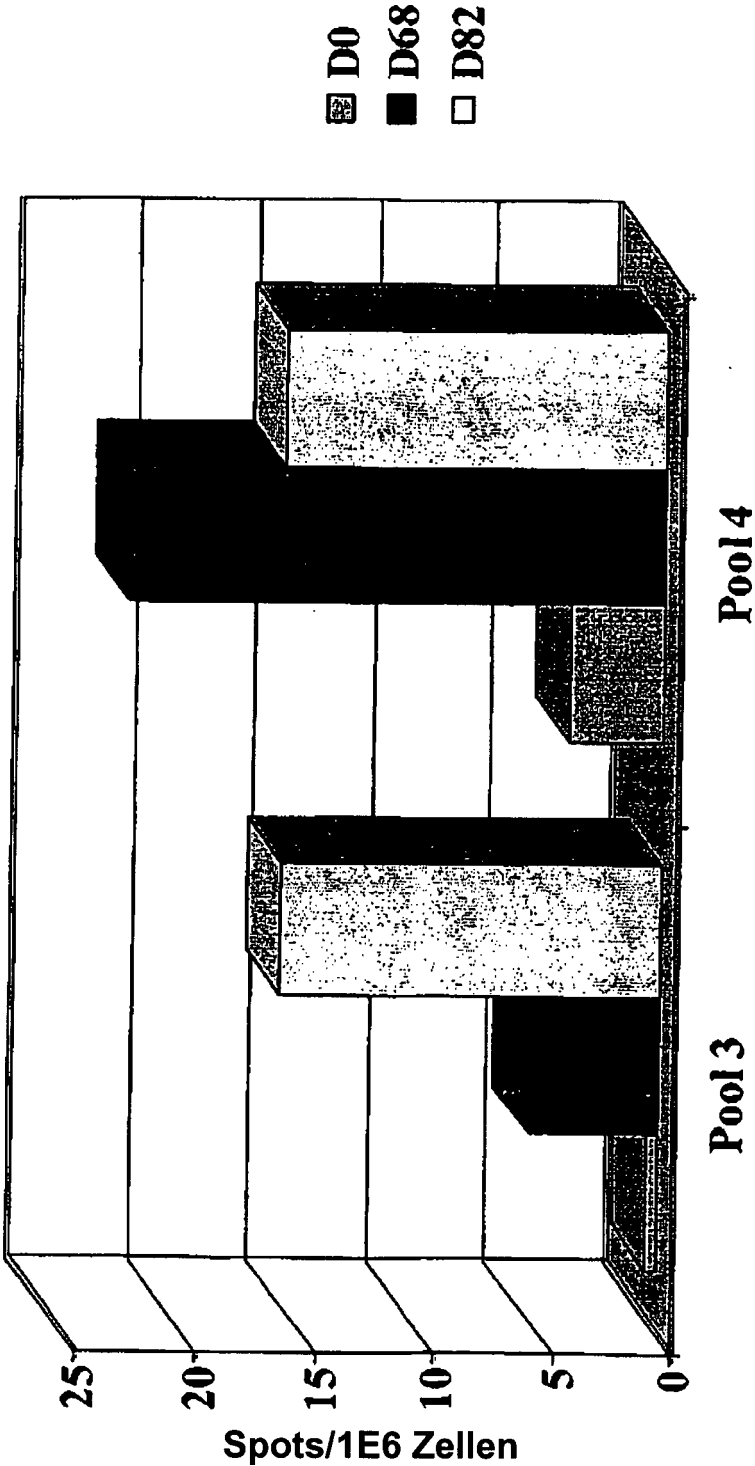
Spur 1: Nicht infizierte HeLa-Zellen

Spur 2: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC

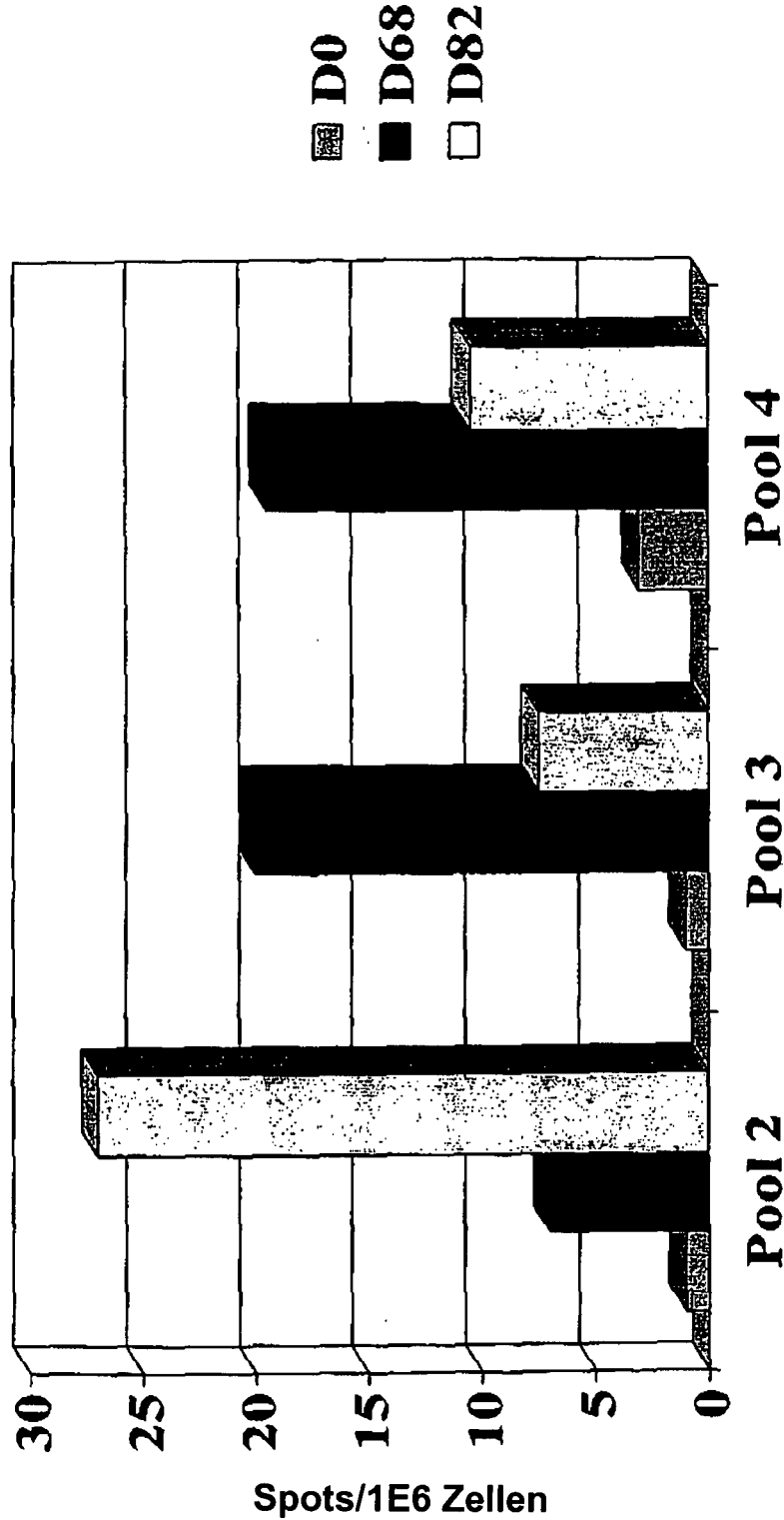
Spur 3: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC-gp100 (vCP1465)

Spur 4: HeLa-Zellen, infiziert mit ALVAC(2)-gp100M (vCP1584)

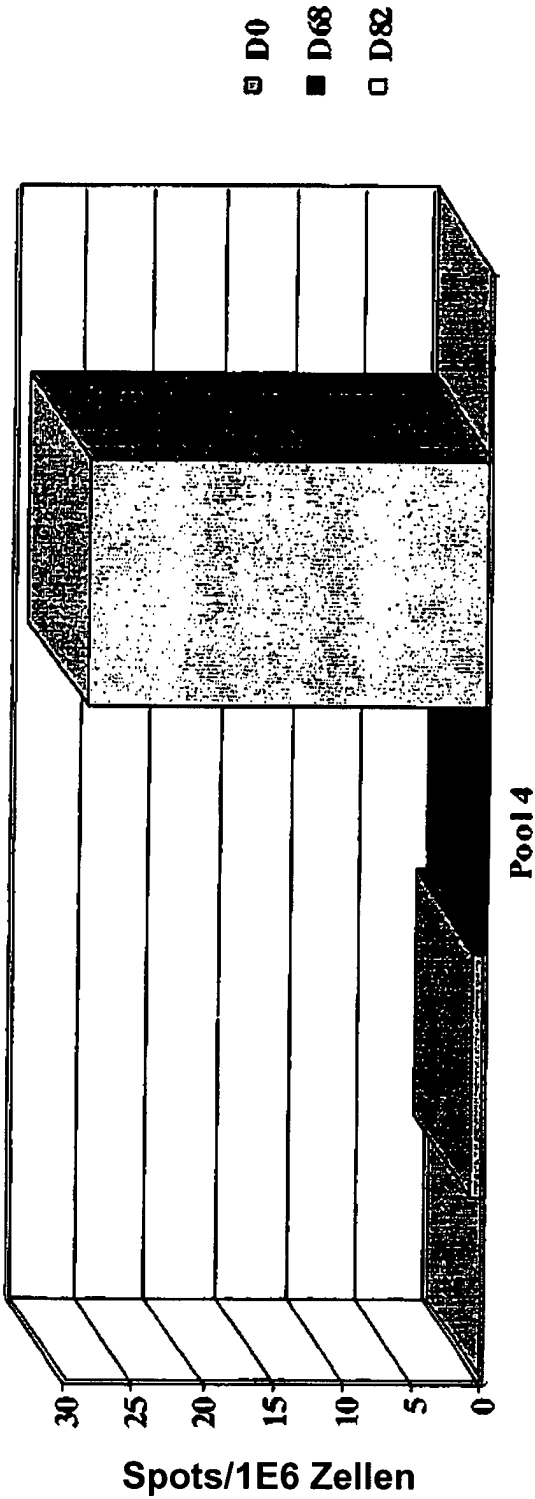
FIGUR 8
Affe #6 (Intranodale Verabreichung)



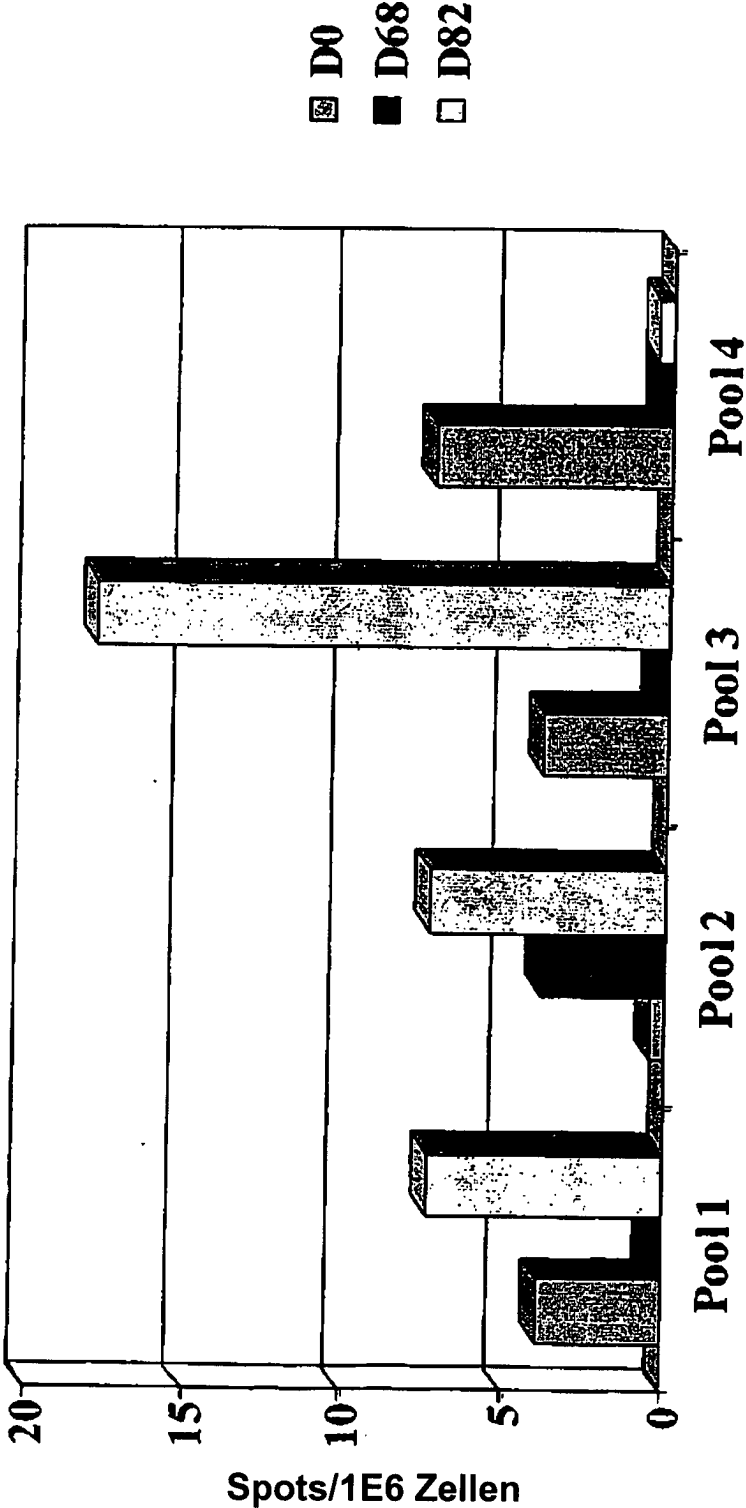
FIGUR 9
Affe #7 (Intranodale Verabreichung)



FIGUR 10
Affe #11 (Subkutane Verabreichung)



FIGUR 11
Affe #10 (Subkutane Verabreichung)



FIGUR 12

