



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 36 552 T2 2008.06.26**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 198 250 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 36 552.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/19816**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 950 483.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/007081**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **01.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.06.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/39 (2006.01)**

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

144965 P 21.07.1999 US

(73) Patentinhaber:

Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GILLIES, Stephen D., Carlisle, MA 01741, US; LO,
Kin Ming, Lexington, MA 02420, US;
WESOLOWSKI, John S., Weymouth, MA 02189, US**

(54) Bezeichnung: **FC-FUSIONSPROTEINE ZUR ERHÖHUNG DER IMMUNOGENITÄT VON PROTEIN- UND PEP-
TID-ANTIGENEN**

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

Technischer Bereich

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen Zusammensetzungen für die Verstärkung der Immunisierungskraft eines vorgewählten Protein- oder Peptidantigens in einem Säugetier. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die für Fusionsproteine kodierende Nucleinsäuren und die Fusionsproteine definierende Aminosäuresequenzen umfassen, wobei die Fusionsproteine eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette und ein vorgewähltes Antigen enthalten, wobei das vorgewählte Antigen im dem Fusionsprotein in der Lage ist, bezogen auf das vorgewählte Antigen allein eine stärkere Immunantwort in dem Säugetier hervorzurufen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Impfstoffentwicklung hat sich traditionell auf die Erzeugung von schützenden Antikörpern konzentriert, die Krankheitserreger neutralisieren können. Bis heute umfassen die als Impfstoffe verwendeten Mittel typischerweise inaktivierte oder abgeschwächte Mikroorganismen (zum Beispiel Bakterien oder Viren), deren Produkte (zum Beispiel Toxine) oder gereinigte Antigene. Mit dem Aufkommen der modernen Molekularbiologie und den Methoden des Genklonens wurde es möglich, reinere und offensichtlich spezifischere Impfstoffe herzustellen. Darüber hinaus hat die Kenntnis des Immunsystems auf einem molekularen Niveau die Isolierung und Charakterisierung von Immunantworten ermöglicht, die durch Krankheitserreger stimuliert werden. Zwei Komponenten des Immunsystems, von denen angenommen wird, dass sie für die erfolgreiche Erzeugung von Immunantworten von zentraler Bedeutung sind, umfassen: die Schlüsselrollen der regulatorischen und cytotoxischen T-Zellen; und die Art, durch die ein Antigen diesen Zellen durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) präsentiert wird. Siehe, zum Beispiel, W. E. Paul, Hrg. (1993) FUNDAMENTALS OF IMMUNOLOGY, Raven Press, Ltd., New York.

[0003] Typischerweise wird ein Protein- oder Peptidantigen, das von außerhalb einer APC (exogenes Antigen) empfangen wird, innerhalb eines endozytischen Vesikels oder Endosoms der APC abgebaut, worauf die resultierenden Peptidfragmente einen Komplex mit Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse II bilden. Der resultierende Komplex wird an die Zelloberfläche gebracht, wo er den Immunzellen in der Nachbarschaft der APC präsentiert wird. Das Peptidfragment passt in eine Furche, die durch das MHC-Molekül definiert wird, und der Komplex kann durch eine T-Zelle, die einen T-Zellrezeptor mit Bindungsspezifität für den Komplex exprimiert, erkannt werden. Wechselwirkung zwischen einem Peptid-beladenen MHC-Klasse-II-Molekül und einer T-Helferzelle, die im Fachgebiet als eine CD4-T-Zelle bezeichnet wird, wird weiter durch eine weitere Wechselwirkung zwischen dem MHC-Klasse-II-Molekül selbst und einem CD4⁺-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zelle stabilisiert. So wird exogenes Antigen, das innerhalb von APC-Zellen prozessiert wird, auf der Zelloberfläche über ein xxx xxx MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert. Der MHC-Klasse-II-Komplex, wenn er den CD4⁺-T-Zellen präsentiert wird, führt dazu, dass CD4⁺-Helferzellen Cytokine sezernieren, die B-Zellen dazu stimulieren, Antikörper gegen das Peptid zu produzieren. Siehe, Paul, supra.

[0004] Impfung mit exogenem Antigen führt typischerweise zu einer CD4-Zell-vermittelten T-Zellantwort, die im Allgemeinen zu Antikörperproduktion führt. Cytotoxische T-Zellen (CTL) werden durch einen solchen Weg typischerweise nicht stimuliert. Offensichtlich werden CTL in Situationen stimuliert, in denen das Antigen von innerhalb der APC selbst stammt (endogenes Antigen), zum Beispiel, über Produktion von viralen Proteinen in einer viral infizierten Zelle oder krebs-spezifische Proteinen in einer Krebszelle. Tatsächlich nimmt man an, dass bei vielen viralen Erkrankungen die Erzeugung von CTL für die Eliminierung von virus-infizierten Zellen und so für die Erholung von der Infektion kritisch ist.

[0005] Studien deuten darauf hin, dass endogene und exogene Antigene unterschiedlich prozessiert werden. Während der Synthese von naszierenden Polypeptiden wird ein Teil des Polypeptids durch eine intrazelluläre Struktur abgebaut, die ein Proteosom genannt wird. Fragmente aus diesem Prozess komplexieren eher mit neu synthetisierten MHC-Klasse-I- als mit MHC-Klasse-II-Molekülen, worauf die resultierenden, Antigen enthaltenden MHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert werden. Wiederum binden T-Zellen mit Spezifität für das spezifische Peptidfragment T-Zellen, aber in diesem Fall tritt die erforderliche Corezeptor-Wechselwirkung zwischen MHC-Klasse-I-Molekül und einem CD8-Molekül auf. Demzufolge wird endogenes Antigen auf der Oberfläche der APC CD8-T-Zellen präsentiert. Obwohl es einige Arten von CD8⁺-T-Zellen gibt, die nicht cytotoxisch sind, machen die CD8-T-Zellen die Mehrheit der CTL aus.

[0006] Demzufolge scheint der Entwurf eines Impfstoffes, der starke CTL-Antworten induzieren kann, zu er-

fordern, dass das Antigenmolekül (im Allgemeinen ein Protein) entweder innerhalb der Zelle erzeugt wird oder in das entsprechende Zellkompartiment geliefert wird, so dass es in den MHC-Klasse-I-Verarbeitungsweg gelangen kann. Eine Strategie ist der Einbau eines Gens, das für ein Protein oder Peptid von Interesse kodiert, in einen Virus und die anschließende Verwendung des gentechnisch veränderten Virus als ein Impfstoff (Lorenz et al. (1999) HUM. GENE THER. 10:623-631). Eine weitere Strategie ist, einen für ein Protein kodierenden DNA-Vektor in eine Zelle zu injizieren, und die Zelle dann dem Tier oder Patienten zu verabreichen, wo es von innerhalb der Zelle exprimiert und dann auf der Zelloberfläche über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert wird (Donnelly et al. (1997) ANNU. REV. IMMUNOL. 15:617). Es wurde nachgewiesen, dass eine einfachere Technik, DNA-Vektoren direkt in den Muskel oder die Haut zu injizieren, CTL- und/oder Antikörperantworten auf mehrere Antigene induziert (Lai et al. (1988) CRIT. REV. IMMUNOL. 18:449-84 und U.S. Patent Nr. 5,589,466). Studien haben gezeigt, dass das Antigen aufgenommen und durch APC verarbeitet wird, wo es dem Immunsystem präsentiert wird (Lai et al., supra).

[0007] Die Lieferung von exogenen Peptiden oder Proteinen an den MHC-Klasse-I-Weg war durch die Verwendung von chemischen Hilfsstoffen wie Freundesches Adjuvans und Mischungen von Squalen und Detergenzien (Hilgers et al. (1999) VACCINE 17:219-228), und erst kürzlich durch die Verwendung von kleinen, mit Antigen beschichteten Beads teilweise erfolgreich, die durch Makrophagen phagozytiert wurden und CTL-Antworten über einen alternativen MHC-Klasse-I-Weg induzierten (De Bruijn et al. (1995) EUR. J. IMMUNOL. 25:1274-1285). Darüber hinaus können weitere Verfahren zur Verstärkung der Immunantworten auf ein Antigen die Verwendung von chemischen Hilfsstoffen zusammen mit rekombinanten immunstimulierenden Cytokinen, zum Beispiel, IL-2, IL-12, GM-CSF, und anderen umfassen. Zum Beispiel setzt ein Verfahren einen Anti-Hapten-Antikörper ein, der an IL-2 fusioniert ist, als einen Weg dieses Cytokin mit einem Proteinantigen zu verbinden, das chemisch mit dem Hapten zur Reaktion gebracht wurde (Harvill et al. (1996) J. IMMUNOL. 157:3165).

[0008] Eine weitere Technik nutzt Antikörper-„Antigenisierung“ aus, wodurch ein Teil einer variablen Region von Immunglobulin durch ein Peptidantigen ersetzt wird. Das Peptidantigen des Hybridmoleküls wird einer APC präsentiert, sobald der rekombinante Antikörper die APC über Wechselwirkung mit Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der APC bindet (Lanza et al. (1993) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 90:11683-11687). Eine Ausweitung dieser Vorgehensweise verwendet Injektion von Plasmid-DNA, die für eine „antigenisierte“ schwere Immunglobulinkette kodiert, in die Milz, wonach von der Milz abstammende B-Zellen den rekombinanten Antikörper sezernieren, sobald ein Partner für die leichte Immunglobulinkette geliefert wird.

[0009] Die Immunisierungskraft des Antigen-Liefersystems ist jedoch eine der hauptsächlich technischen Hürden bei der Entwicklung von modernen Impfstoffen. Das Ziel einer Impfung ist das Hervorrufen einer starken Immunantwort. Da das Wirtsimmunsystem sich auf die Bekämpfung von Bakterien und Viren hin entwickelt hat, wird jedoch, wenn Bakterien oder Viren als Vektoren verwendet werden, der Bote typischerweise zusammen mit der Botschaft zerstört. Darüber hinaus schränken starke Immunantworten auf bestimmte virale Vektoren, zum Beispiel Vaccinia und Adenovirus, ihre Verwendbarkeit ein, und es wird überlegt, dass ähnliche Probleme während der Verwendung von bakteriellen Toxinen als Proteinvektoren auftreten können. Ebenso sind auf Antikörpern basierende „Proteinvektoren“, die variable Regionen verwenden, die durch gerade ihre Natur durch das Immunsystem nicht als „eigen“ betrachtet werden, potenziell immunogen. Es wird in Erwägung gezogen, dass multiple Verwendungen dieser Trägermoleküle anti-idiotypische Antworten induzieren können, wodurch ihre wirksame Verwendung ausgeschlossen wird. Demzufolge ist es ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, einen Impfstoff zu schaffen, der eine starke und lang anhaltenden Immunität gegenüber einem vorgewählten Protein- oder Peptidantigen erzeugt.

[0010] Lo et al (Protein Engineering 1998, 4, 495-500) beschreibt ein Fusionsprotein, das aus einem Fc-Teil eines Immunglobulins und einem Zielprotein (PSMA) besteht. Dieses Fusionsprotein wurde zusammen mit einem Hilfsstoff in einer nicht-spezifischen, standardmäßigen Immunisierungsvorgehensweise verwendet.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Diese Erfindung basiert zum Teil auf der Entdeckung, dass es möglich ist, die Immunisierungskraft eines vorgewählten Peptid- oder Proteinantigens in einem Säugetier zu verstärken, indem das vorgewählte Antigen mit einer konstanten Region einer schweren Immunglobulinkette fusioniert wird. Das resultierende Fusionsprotein (hierein auch als ein „Fc-Antigen-Fusionsprotein“ oder ein „Antigen-Fusionsprotein“ bezeichnet) kann dann dem Säugetier in der Form eines Impfstoffs verabreicht werden, um gegen das vorgewählte Antigen eine Immunantwort hervorzurufen, wobei die Stärke und die Art der gegen das vorgewählte Antigen hervorgerufenen Immunantwort durch die Verabreichung eines spezifischen Hilfsstoffs zusammen mit dem Fc-Anti-

gen-Fusionsprotein moduliert werden kann.

[0012] Demzufolge schafft die Erfindung Zusammensetzungen für die Verstärkung der Immunisierungskraft eines vorgewählten Antigens in einem Säugetier. In einem Aspekt umfasst die Zusammensetzung ein Fc-Antigen-Fusionsprotein, das eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält, die durch eine Polypeptidbindung an das vorgewählte Antigen gebunden ist, in einer Menge, die für das Hervorrufen einer Immunantwort ausreicht. Das vorgewählte Antigen ist, wenn es Teil eines Fc-Antigen-Fusionsproteins ist, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Immunantwort in dem Säugetier stimulieren kann, die stärker ist als eine vergleichbare Menge (z. B. nach Gewicht oder Anzahl an Molekülen) des vorgewählten Antigens allein, d. h. das vorgewählte Antigen, das nicht an eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette fusioniert ist.

[0013] Darüber hinaus werden Immunantworten, die gegen das vorgewählte Antigen des Fc-Antigen-Fusionsproteins hervorgerufen werden, durch die Verabreichung des Fc-Antigen-Fusionsprotein zusammen mit einem Hilfsstoff verstärkt oder moduliert. In der Ausführung der Erfindung umfassen Hilfsstoffe, die mit Fc-Antigen-Fusionsproteinen verwendet werden sollen, ein zweites Fc-Fusionsprotein (hierin als ein „Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein“ oder ein „Hilfsstoff-Fusionsprotein“ bezeichnet). Bevorzugte Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine enthalten eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette, die durch eine Polypeptidbindung mit einem Hilfsprotein, zum Beispiel einem Cytokin, verknüpft ist. Bevorzugte Cytokine, die bei der Konstruktion von Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen von Nutzen sind, umfassen, zum Beispiel, Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-12 (IL-12), IL-18, Tumornekrosefaktor (TNF), Granulozyt-Makrophagenkolonie stimulierenden Faktor (GMCSF). Eine weitere Klasse von Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein umfasst eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette, die an eine Hilfsstoffeinheit fusioniert ist, die einer extrazellulären Domäne eines Proteins entspricht, das üblicherweise partikulär oder ausschließlich membrangebunden ist. Zum Beispiel ist der CD40-Ligand an eine Fc-Einheit fusioniert, die als ein verstärktes Hilfsprotein verwendet werden soll.

[0014] Die Co-Verabreichung der Fc-Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine, entweder gleichzeitig oder nacheinander (zum Beispiel Fc-Antigen gefolgt von Fc-Hilfsstoff oder Fc-Hilfsstoff gefolgt von Fc-Antigen), kann verwendet werden, um die Art der Immunantwort, die gegen das vorgewählte Antigen stimuliert wird, zu modulieren. Es werden zwei Klassen von Immunantworten, bezeichnet mit Th1 und Th2, als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli initiiert und umfassen unterschiedliche Cytokine. Th1-vermittelte Immunantworten sind von ihrer Art typischerweise zellulär, während Th2-vermittelte Immunantworten typischerweise von ihrer Art humoral sind. Demzufolge kann eine Th1-Antwort beim Angriff von veränderten Zellen, wie z. B. Krebszellen oder virus-infizierte Zellen, von Nutzen sein, während eine Th2-Antwort beim Angriff auf extrazelluläre Erreger wie z. B. Parasiten von Nutzen sein kann. Oftmals ist die Verabreichung von Cytokinen, die an die konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette fusioniert sind, von Nutzen, um entweder eine allgemeine Immunantwort zu stimulieren, oder um spezifische Th1- oder Th2-Antworten zu initiieren oder zu modulieren.

[0015] Zum Beispiel ist ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein, das eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält, die durch eine Peptidbindung mit GMCSF verknüpft ist, ein wirksames allgemeines Stimulans für Immunantworten, die sowohl Th1- als auch Th2-Antworten umfassen. Ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein, das IL-12 oder IFN- γ enthält, kann co-verabreicht werden, um eine vorwiegend zelluläre oder Th1-vermittelte Immunantwort zu stimulieren. Alternativ kann ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein, das IL-4 enthält, verabreicht werden, um eine vorwiegend humorale oder Th2-vermittelte Immunantwort zu stimulieren.

[0016] Darüber hinaus kann die Wahl eines bestimmten Cytokins, das in einem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein vorkommt, die Antikörperklasse beeinflussen, die gegen das vorgewählte Antigen des Fc-Antigen-Fusionsproteins produziert wird. Zum Beispiel kann ein IL-12 enthaltendes Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein T-Helferzellen und die Produktion von Antikörpern der IgG2a-Klasse stimulieren. Alternativ kann ein IL-4 enthaltendes Hilfsstoff-Fusionsprotein die Produktion von Antikörpern der IgE-Klasse stimulieren.

[0017] Wie vorher diskutiert, umfassen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen das Fc-Antigen-Fusionsprotein in Kombination mit einem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein. Durch Verwendung von zwei Fusionsproteinen, von denen jedes eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält, ist es möglich, sowohl das vorgewählte Antigen als auch das Hilfsprotein (zum Beispiel ein Cytokin) an gleichen oder ähnlichen Zellarten in dem Säugetier zu co-lokalisieren. Zum Beispiel exprimieren Makrophagen, B-Zellen, Granulozyten und dendritische Zellen Fc-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Demzufolge ist es durch gleichzeitige Verabreichung von Fc-Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen, die Fc-Rezeptoren binden können, möglich, das Antigen des Antigen-Fusionsproteins und den Hilfsstoff des Hilfsstoff-Fusionsproteins an den gleichen Zellarten zu co-lokalisieren. Der Hilfsstoff kann dann die Immunantwort in der Nachbarschaft des vorgewählten An-

tigens stimulieren, verstärken oder auf andere Weise modulieren.

[0018] Die Erfindung verwendet zwei unterschiedliche Formen der Lokalisierung oder Anreicherung. Erstens verwendet die Erfindung eine gemeinsame Einheit, die sowohl an das Antigen wie auch an den Hilfsstoff fusioniert ist, der in bestimmten Körperregionen angereichert wird. Auf diese Weise wird die wirksame lokale Anreicherung des Antigens in der Nachbarschaft des Hilfsstoffs erhöht. Zweitens lenkt die Erfindung das Antigen zur Antigen verarbeitenden und präsentierenden Maschinerie des Immunsystems. Der erste Anreicherungsschritt kann durch Fusionieren der Antigen- und Hilfsstoffproteine an eine Einheit durchgeführt werden, die in einigen Körperteilen zu einer Anreicherung führt, die für das Immunsystem zugänglich ist. Der zweite Lenkungsschritt kann durch Fusionieren des Antigenproteins an eine beliebige Einheit durchgeführt werden, die die Lieferung an oder das Verarbeiten durch das antigenpräsentierende System verstärkt.

[0019] Demzufolge erreicht die Erfindung diese Anreicherungswirkungen durch zwei alternative Verfahren. Ein Verfahren ist die Konstruktion und Verabreichung von zwei unterschiedlichen Fusionsproteinen, einer Antigen-lokalisierenden Proteinfusion und einer Hilfsstoff-lokalisierenden Proteinfusion. Ein zweites Verfahren ist die Konstruktion und Verabreichung einer Fusion, die das Antigen, den Hilfsstoff und das lokalisierende Protein enthält. Eine Fc-Einheit ist ein Beispiel für ein lokalisierendes Protein.

[0020] Ein wichtiges Merkmal der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette ist, dass sie im Gegensatz zum vorgewählten Antigen im Fc-Antigen-Fusionsprotein in dem beabsichtigten Empfänger vorzugsweise nicht immunogen oder nur schwach immunogen ist. Mit anderen Worten ist das vorgewählte Antigen im Fc-Antigen-Fusionsprotein so entworfen, dass es in dem Empfänger stärker immunogen ist als die konstante Region der schweren Immunglobulinkette. Ebenso wird in Erwägung gezogen, dass das Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein in dem beabsichtigten Empfänger ebenfalls nicht oder nur schwach immunogen sein sollte. Die Immunisierungskraft einer konstanten Region der schweren Immunglobulinkette kann vermindert, und in bestimmten Fällen eliminiert werden, indem Sequenzen der konstanten Immunglobulinregion verwendet werden, die von denen in der gleichen Spezies wie dem beabsichtigten Empfänger vorkommenden abstammen oder ihnen ähnlich sind. Zum Beispiel werden konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette vorzugsweise humanen Ursprungs verwendet, um Fusionsproteine zu erzeugen, die Menschen verabreicht werden sollen. Ebenso ist, wenn der beabsichtigte Empfänger ein Mensch ist, das Hilfsprotein in dem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein ebenfalls vorzugsweise humanen Ursprungs. Durch die Wahl von geeigneten Aminosäuresequenzen, die konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette und Hilfsproteine definieren, ist es möglich, eine Immunantwort direkt vorwiegend gegen das vorgewählte Antigen zu optimieren.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die konstante Region der schweren Immunglobulinkette des Fc-Antigen-Fusionsproteins eine Gelenk-Region von Immunglobulin und gegebenenfalls eine konstante Regionsdomäne des Immunglobulins, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer CH2-Domäne, einer CH3-Domäne und einer CH4-Domäne oder Kombinationen daraus. Der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette fehlt jedoch vorzugsweise mindestens eine CH1-Domäne. Darüber hinaus fehlt den erfindungsgemäßen Fc-Fusionsproteinen die variable Regionsdomäne der schweren Immunglobulinkette (V_H). Wenn das Fusionsprotein einem Menschen verabreicht werden soll, enthält die konstante Region der schweren Immunglobulinkette vorzugsweise eine Gelenk-Region und eine CH2-Domäne oder eine CH3-Domäne und am meisten bevorzugt enthält sie eine Gelenk-Region und sowohl eine CH2-Domäne wie auch eine CH3-Domäne. Es wird in Betracht gezogen, dass die für die Ausführung der Erfindung nützlichen konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette von Immunglobulinen abgeleitet werden können, die einer beliebigen der fünf Immunglobulinklassen angehören, die mit IgA ($Ig\alpha$), IgD ($Ig\delta$), IgE ($Ig\epsilon$), IgG ($Ig\gamma$) und IgM ($Ig\mu$) bezeichnet werden. Die konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette aus der IgG-Klasse sind jedoch bevorzugt.

[0022] Es wird in Erwägung gezogen, das jegliches vorgewählte Antigen von Interesse in dem erfindungsgemäßen Fc-Antigen-Fusionsprotein eingeschlossen werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das vorgewählte Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Prostata-spezifischem Membranantigen, einer Ektodomäne eines Cytokinrezeptors, einem viralen Protein und einem Krebs- oder Tumor-spezifischen Antigen.

[0023] Fc-Antigen-Fusionsproteine mit einer Vielfalt an Konfigurationen können bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sein. Zum Beispiel kann der N-Terminus des vorgewählten Antigens mittels einer Polypeptidbindung an den C-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette verknüpft werden. Alternativ kann der C-Terminus des vorgewählten Antigens mittels einer Polypeptidbindung an den N-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette verknüpft werden. Darüber hinaus wird in Erwägung

gezogen, dass die Fc-Antigen-Fusionsproteine eine Vielzahl von einem oder mehreren vorgewählten Antigenen enthalten können, von denen eines oder mehrere direkt oder über einen Polypeptidlinker miteinander oder mit der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette verknüpft sein können. Darüber hinaus können zwei oder mehr Fc-Antigen-Fusionsproteine miteinander verbunden sein, entweder nicht-kovalent oder kovalent, zum Beispiel über eine oder mehrere Disulfidbindungen, um dimere oder multimere Zusammensetzungen herzustellen. Es wird in Erwägung gezogen, dass die Fc-Antigen-Fusionsproteine in den dimeren Konstrukten die gleichen sein können oder voneinander verschieden. Obwohl zum Beispiel beide Fc-Antigen-Fusionsproteine die gleiche konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthalten können, können sich die vorgewählten Antigene unterscheiden. Es wird in Erwägung gezogen, dass ähnliche Konfigurationen auch bei den Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen eingesetzt werden können.

[0024] Darüber hinaus kann eine Vielzahl an Nucleinsäuresequenzen, die für Fc-Fusionsprotein kodieren, bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sein. Zum Beispiel können die Nucleinsäuresequenzen in einer 5'-nach 3'-Richtung entweder für die konstante Region der schweren Immunglobulinkette und das vorgewählte Antigen oder für das vorgewählte Antigen und die konstante Region der schweren Immunglobulinkette kodieren. Darüber hinaus können die Nucleinsäuresequenzen gegebenenfalls auch eine „Leader“- oder „Signal“-Sequenz umfassen, die, zum Beispiel, auf einer Sequenz der leichten Immunglobulinkette basiert, die direkt an eine Gelenk-Region der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette fusioniert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform, wenn die Fc-Region auf IgG-Sequenzen basiert, kodiert die Fc-Region in einer 5'-nach 3'-Richtung mindestens für eine Immunglobulin-Gelenk-Region (d. h. eine Gelenk-Region, die mindestens eine Cystein-Aminosäure enthält, die mit einer zweiten Sequenz für eine Immunglobulin-Gelenk-Region eine Disulfidbindung bilden kann), eine Immunglobulin-CH2-Domäne und eine CH3-Domäne. Darüber hinaus kann auch eine für die Fc-Antigen-Fusionsproteine kodierende Nucleinsäuresequenz innerhalb eines replizierbaren Expressionsvektors eingebaut sein, der das Fc-Fusionsprotein zum Beispiel entweder in einem bakteriellen Wirt, in dem beabsichtigten Empfänger oder in beiden exprimieren kann.

[0025] Es wird in Erwägung gezogen, dass die Injektion von für das Fc-Antigen-Fusionsprotein kodierenden Nucleinsäuresequenzen, entweder allein oder in Kombination mit für das Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein kodierenden Nucleinsäuresequenzen zur Erzeugung einer zellulären Immunantwort, einer humoralen Immunantwort oder beiden führen kann. Kombinationen aus Nucleinsäure- und Protein-basierten Immunisierungen (z. B. Verabreichung eines Fc-Antigen-Fusionsproteins vor, während oder nach Verabreichung einer für das Fc-Antigen-Fusionsprotein kodierenden Nucleinsäure) können synergistisch miteinander wirken, um stärkere Immunantworten gegen das vorgewählte Antigen hervorzurufen, bezogen auf die Immunisierung mit entweder der Nucleinsäure oder dem Protein allein.

[0026] Die vorstehenden und andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung, den Abbildungen und Ansprüchen noch deutlicher.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0027] Die vorhergehenden und andere Gegenstände, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung sowie die Erfindung selbst können aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen in Zusammenhang mit den beigefügten Abbildungen genauer verstanden werden, in denen:

[0028] [Fig. 1A-Fig. 1G](#) schematische Darstellungen von beispielhaften Fc-Fusionsproteinen sind, die bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sind. [Fig. 1A](#) stellt ein Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein dar, bei dem die konstante Region der schweren Immunglobulinkette 1 an das N-terminale Ende des Antigens oder Hilfsstoffes 2 geknüpft ist. [Fig. 1B](#) stellt ein Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein dar, bei dem die konstante Region der schweren Immunglobulinkette 1 an das C-terminale Ende des Antigens oder Hilfsstoffes 2 geknüpft ist. [Fig. 1C](#) und [Fig. 1D](#) stellen ein dimeres Protein dar, bei dem eine oder beide der Polypeptidketten ein Fc-Antigen- oder ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein enthalten. In [Fig. 1C](#), ist in mindestens einer Polypeptidkette die konstante Region der schweren Immunglobulinkette 1 an das N-terminale Ende des Antigens oder Hilfsstoffes 2 geknüpft und in [Fig. 1D](#) ist die konstante Region der schweren Immunglobulinkette 1 an das C-terminale Ende des Antigens oder Hilfsstoffes 2 geknüpft. [Fig. 1E](#) stellt ein dimeres Protein dar, bei dem eine oder beide der Polypeptidketten ein Fc-Antigen-Antigen-, Fc-Hilfsstoff-Hilfsstoff-, Fc-Hilfsstoff-Antigen- oder ein Fc-Antigen-Hilfsstoff-Fusionsprotein enthalten. [Fig. 1F](#) stellt ein dimeres Fusionsprotein dar, bei dem eine oder beide der Polypeptidketten ein Antigen-Fc-Hilfsstoff-, oder ein Hilfsstoff-Fc-Antigen-Fusionsprotein enthalten. [Fig. 1G](#) stellt ein dimeres Fusionsprotein dar, bei dem eine oder beide der Polypeptidketten ein Antigen-Hilfsstoff-Fc-, oder ein Hilfsstoff-Antigen-Fc-Fusionsprotein enthalten.

[0029] [Fig. 2A-Fig. 2B](#) sind schematische Darstellungen von DNA-Sequenzen, die bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sind. [Fig. 2A](#) stellt einen Expressionsvektor für ein humanes Fc-Fusionsprotein dar. [Fig. 2B](#) stellt eine Genfusion für die Expression eines IgG2a-Fc-Fusionsproteins der Maus dar.

[0030] [Fig. 3A-Fig. 3F](#) sind Diagramme, die die Wirkung der chemischen und Fc-Cytokin-Hilfsstoffe auf die Antikörperproduktion in Mäusen zeigen, die mit dem Fc-Antigen-Fusionsprotein, Maus-Fc-humanes-IL-4-Rezeptortodomäne-Fusionsprotein (Fc-IL-4R) immunisiert wurden. In [Fig. 3A](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R und Fc-IL-2 in vollständigem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert. In [Fig. 3B](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) immunisiert. In [Fig. 3C](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R in CFA immunisiert. In [Fig. 3D](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R und Fc-IL-2 in PBS immunisiert. In [Fig. 3E](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R und Fc-GMCSF in CFA immunisiert. In [Fig. 3F](#) wurden die Mäuse mit Fc-IL-4R und Fc-GMCSF in PBS immunisiert. In den [Fig. 3A-Fig. 3F](#) stellen die Quadrate, Rauten und Dreiecke von drei einzelnen Mäusen abstammende Daten dar. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0031] [Fig. 4A-Fig. 4D](#) sind Diagramme, die die Wirkung der Immunisierung von Mäusen mit einem humanem Krebsantigen, PSMA, in der Form eines Fc-Antigen-Fusionsproteins unter Verwendung variierender Mengen an Fc-GMCSF als einen Hilfsstoff zeigen. In [Fig. 4A](#) wurden die Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA-Fusionsprotein allein immunisiert. In [Fig. 4B](#) wurden die Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA und 0,05 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In [Fig. 4C](#) wurden die Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA und 0,5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In [Fig. 4D](#) wurden die Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA und 5 µg Fc-GMCSF immunisiert. In den [Fig. 4A-Fig. 4D](#) stellen die Quadrate, Rauten und Dreiecke von drei einzelnen Mäusen abstammende Daten dar.

[0032] [Fig. 5A-Fig. 5F](#) sind Diagramme, die die spezifischen Antikörperantworten auf das PSMA-Antigen vergleichen, das entweder als ein natives Protein (5A-5C) oder als ein Maus-Fc-PSMA-Fusionsprotein (5D-5F) verabreicht wurde. In [Fig. 5A](#) wurden Mäuse mit 50 µg PSMA als ein Antigen immunisiert. In [Fig. 5B](#) wurden Mäuse mit 50 µg PSMA als ein Antigen und 0,2 µg GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In [Fig. 5C](#) wurden Mäuse mit 50 µg PSMA als ein Antigen und 0,5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In [Fig. 5D](#) wurden Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA als ein Antigen immunisiert. In [Fig. 5E](#) wurden Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA als ein Antigen und 0,2 µg GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In [Fig. 5F](#) wurden Mäuse mit 50 µg Fc-PSMA als ein Antigen und 0,5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert. In den [Fig. 5A – Fig. 5F](#) stellen die Quadrate, Rauten und Dreiecke von drei einzelnen Mäusen abstammende Daten dar. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0033] [Fig. 6](#) ist eine Grafik, die die helfende Wirkung von Fc-GMCSF oder Fc-F3L, die gemeinsam mit Fc-PSMA verabreicht wurden, auf die Antikörperproduktion gegen humanes PSMA vergleicht. Alle Tiere erhielten 50 µg Fc-PSMA entweder allein oder in Kombination mit dem angegebenen Fc-Cytokin als einem Hilfsstoff. Pro Experiment wurden drei Mäuse getestet.

[0034] [Fig. 7A-Fig. 7B](#) sind Diagramme, die die Immunisierungskraft des Fc-EpCAM-Fusionsproteins, entweder allein oder in Kombination mit einem Fc-GMCSF-Hilfsstoff bei einzelnen Mäusen zeigen. [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) stellen Antikörpertiter dar, die 7 bzw. 14 Tage nach einer Auffrischimpfung gemessen wurden. Die Auffrischimpfung wurde drei Wochen nach der ersten Immunisierung gegeben. In beiden Figuren stellen die offenen Rauten Mäuse dar, die subkutan mit 10 µg Fc-EpCAM allein immunisiert wurden, und die ausgefüllten Dreiecke stellen Mäuse dar, die subkutan mit 10 µg Fc-EpCAM und 1 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert wurden. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0035] [Fig. 8A-Fig. 8B](#) sind Diagramme, die die Immunisierungskraft des EpCAM-Fc (umgekehrte Orientierung der Fc-Region und des Antigens), entweder allein oder in Kombination mit einem Fc-GMCSF-Hilfsstoff-Fusionsprotein bei Mäusen zeigt. [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) stellen Antikörpertiter dar, die 14 bzw. 21 Tage (d. h. 7 Tage nach der Auffrischimpfung) nach Immunisierung gemessen wurden. In beiden Figuren stellen die offenen Rauten mittlere Titer von drei Mäusen dar, die mit 25 µg EpCAM-Fc-Fusionsproteinen allein immunisiert wurden, und die ausgefüllten Dreiecke stellen Mäuse dar, die mit 25 µg EpCAM-Fc und 2,5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert wurden. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0036] [Fig. 9](#) zeigte eine Grafik für die Konstruktion eines Plasmidvektors, der für ein EpCAM-Fc-GMCSF-Fusionsprotein kodiert. In diesem Fall ist das Antigen EpCAM an das aminoternale Ende der konstanten Regi-

on der schweren Immunglobulinkette (Fc-Region) und der Hilfsstoff GMCSF ist an das carboxyterminale Ende der Fc-Region fusioniert.

[0037] [Fig. 10A-Fig. 10D](#) sind Diagramme, die Antikörpertiter in Mäusen zeigen, denen die für das Fc-EpCAM-Fusionsprotein kodierenden Plasmidvektoren unter Verwendung von entweder PBS oder einer Saccharoselösung mit 25 Gew.-% als einem Trägervehikel injiziert wurden. [Fig. 10A-Fig. 10D](#) stellen Antikörpertiter dar, die 14 Tage, 27 Tage, 55 Tage bzw. 69 Tage nach der ersten Injektion gemessen wurden. In allen Figuren stellen die offenen Rauten Titer für einzelne Mäuse dar, denen für das Fc-EpCAM kodierendes Plasmid in PBS injiziert wurde, und die gefüllten Dreiecke stellen Titer für individuelle Mäuse dar, denen für Fc-EpCAM kodierendes Plasmid in Saccharose injiziert wurde. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0038] [Fig. 11A-Fig. 11B](#) sind Diagramme, die die Stimulierung des ³H-Thymidineinbaus als Reaktion auf in-vitro-Stimulierung mit Antigen in Splenozyten zeigen, die aus durch DNA-Impfung oder durch Proteinimpfung immunisierten Mäusen isoliert wurden. [Fig. 11B](#) zeigt eine vergrößerte Ansicht der Daten im unteren Teil von [Fig. 11A](#). In allen Figuren stellen die ausgefüllten Rauten Splenozyten dar, die von Mäusen geerntet wurden, die mit 100 µg einer für das CMV-Fc-EpCAM-Fusionsprotein kodierenden Plasmid-DNA immunisiert wurden, die offenen Kreise stellen Splenozyten dar, die von Mäusen geerntet wurden, die mit 100 µg einer für das CMV-EpCAM-Fc-Fusionsprotein kodierenden Plasmid-DNA immunisiert wurden, und die Kreuze stellen Splenozyten dar, die von Mäusen geerntet wurden, die mit 10 µg Fc-EpCAM-Protein immunisiert wurden. Die Milzen wurden an Tag 70 nach der ersten Injektion von Plasmid-DNA oder Protein und zwei Auffrischinjektionen in einem dreiwöchigen Intervall entfernt.

[0039] [Fig. 12A-B](#) sind Diagramme, die ein Cytotoxische-T-Lymphozyten-(CTL-)Killing-Assay unter Verwendung von Splenozyten aus mit Plasmid-DNA oder Fc-EpCAM-Protein immunisierten Mäusen zeigen. [Fig. 12A](#) zeigt die Aktivität von Splenozyten gegen CT26-Tumorzellen der Maus, die das humane EpCAM-Protein exprimieren. [Fig. 12B](#) zeigt die Aktivität von Splenozyten gegen parenterale CT26-Tumorzellen der Maus. In beiden Figuren stellen die offenen Rauten Splenozyten dar, die mit einer (CMV-Promoter)-EpCAM-Konstrukt tragenden DNA immunisiert wurden, offene Quadrate stellen Splenozyten aus Mäusen dar, die mit einer ein (CMV-Promoter)-Fc-EpCAM-Fusionskonstrukt tragenden DNA immunisiert wurden, offene Dreiecke stellen Splenozyten von Mäusen dar, die mit einer ein (CMV-Promoter)-EpCAM-Fc-Fusionskonstrukt tragenden DNA immunisiert wurden, und Kreuze stellen Splenozyten von Mäusen dar, die mit Fc-EpCAM-Fusionsprotein immunisiert wurden. Das CTL-Assay verwendete Splenozyten aus den immunisierten Mäusen, die für fünf Tage mit 10 U/ml IL-2 kultiviert wurden. Markierte Zielzellen wurden mit den angegebenen Effektoren vermischt und für vier Stunden inkubiert. Die Freisetzung von Radioaktivität wurde verwendet, um den Prozentsatz an spezifischer Lyse zu berechnen.

[0040] [Fig. 13](#) ist ein Diagramm, das Antikörpertiter in Mäusen zeigt, die subkutan mit 50 µg Fc-MCSP-Fusionsprotein in PBS entweder allein oder in Kombination mit 5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert wurden. Die gefüllten Rauten stellen Antikörpertiter in normalem Serum dar, die offenen Quadrate stellen Antikörpertiter im Serum von Mäusen dar, die mit Fc-MCSP-Fusionsprotein allein immunisiert wurden, und die gefüllten Dreiecke stellen Antikörpertiter im Serum von Mäusen dar, die mit Fc-MCSP-Fusionsprotein in Kombination mit einem Fc-GMCSF-Hilfsstoff immunisiert wurden. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

[0041] [Fig. 14A-B](#) sind Diagramme, die Antikörpertiter in Mäusen zeigen, die mit Fc-gp41-pep-626-Fusionsprotein entweder allein oder in Kombination mit einem Fc-Cytokin-Hilfsstoff immunisiert wurden. [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) stellen Antikörpertiter dar, die 7 bzw. 33 Tage nach einer zweiten Auffrischimpfung erreicht wurden. In allen Figuren stellen die offenen Rauten Antikörpertiter in Mäusen dar, die mittels intradermaler Injektion mit 25 µg Fc-gp41-pep-626-Antigen allein immunisiert wurden, offene Quadrate stellen Titer in Mäusen dar, die mittels intradermaler Injektion von 25 µg Fc-gp41-pep-626-Antigen in Kombination mit 2,5 µg Fc-GMCSF-Hilfsstoff immunisiert wurden, und ausgefüllte Dreiecke stellen Antikörpertiter in Mäusen dar, die mittels intradermaler Injektion von 25 µg Fc-gp41-pep-626-Antigen in Kombination mit 2,5 µg Fc-IL2-Hilfsstoff immunisiert wurden. Die Antikörperspiegel für ein Antigen wurden mittels ELISA gemessen; die Y-Achse gibt die optische Dichte der ELISA-Anzeigewerte an.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0042] Die vorliegende Offenbarung betrifft die effiziente Lieferung von Protein- oder Peptidantigenen in vivo zur Induzierung von humoralen (d. h. antikörper-basierten) oder Th2-Zellvermittelten Immunantworten, zellu-

lären oder Th1-Zell-vermittelten Immunantworten und in einigen Fällen von beiden Arten von Immunantworten in einem Säugetier. Es wurde nun gefunden, dass es möglich ist, die Immunisierungskraft eines vorgewählten Peptid- oder Proteinantigens in einem Säugetier zu verstärken, indem das vorgewählte Antigen mit einer konstanten Region einer schweren Immunglobulinkette fusioniert wird, um ein Fc-Antigen-Fusionsprotein zu erzeugen. Das resultierende Fc-Antigen-Fusionsprotein, oder die für Fc-Antigen-Fusionsproteine kodierenden Nucleinsäuresequenzen können dann dem Säugetier, zum Beispiel einem Menschen, in der Form eines Impfstoffs verabreicht werden, um gegen das vorgewählte Antigen eine Immunantwort hervorzurufen.

[0043] Das Fc-Antigen-Fusionsprotein liefert das Antigen selektiv an antigenpräsentierende Zellen (APCs). Wir möchten uns nicht auf eine Theorie festlegen, aber wir glauben, dass die Bindung des Fc-Antigen-Fusionsproteins an die APCs durch Fc-Rezeptoren vermittelt wird, die auf einer Vielzahl von Immunzellarten exprimiert werden, einschließlich, zum Beispiel: dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Granulozyten. Das Fc-Antigen-Fusionsprotein bindet, wenn es dem Säugetier verabreicht wird, Fc-Rezeptoren, wonach das Fc-Antigen-Fusionsprotein durch die APCs endozytiert wird. Das endozytierte Fusionsprotein, einschließlich des vorgewählten Antigens, wird dann vermutlich zu kleineren Peptiden abgebaut, die anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die präsentierten Peptide vermitteln dann eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort. Die bestimmte Art von stimulierter Immunantwort kann moduliert werden, indem das Fc-Antigen-Fusionsprotein gemeinsam mit einem Hilfsstoff, zum Beispiel einem Hilfsstoff-Fusionsprotein, verabreicht wird.

[0044] In einer Ausführung der Verabreichung wird dem Empfänger das Fc-Antigen-Fusionsprotein verabreicht. In einer weiteren Ausführung der Verabreichung wird dem Empfänger eine für das Fc-Antigen-Fusionsprotein kodierende Nucleinsäuresequenz verabreicht. Das vorgewählte Antigen, entweder im verabreichten Fc-Antigen-Protein oder exprimiert von der verabreichten Nucleinsäure, ist immunogener als das Antigen allein, d. h. nicht durch eine Polypeptidbindung an eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette fusioniertes Antigen. Darüber hinaus kann, unter bestimmten Umständen, eine aufeinander folgende Verabreichung von Fusionsprotein gefolgt von Verabreichung der für das gleiche Fusionsprotein kodierenden Nucleinsäure, oder alternativ Verabreichung von für das Fusionsprotein kodierender Nucleinsäure gefolgt von Verabreichung des gleichen Fusionsproteins verwendet werden, um die Immunisierungskraft des vorgewählten Antigens zu maximieren. Es ist bekannt, dass eine optimale Immunantwort hervorgerufen wird, wenn beide Komponenten der Fc-Antigen-Fusionsproteine aktiv sind. Mit anderen Worten ist das vorgewählte Antigen in dem Fc-Antigen-Fusionsprotein in der Lage, eine Immunantwort hervorzurufen und die konstante Region der schweren Immunglobulinkette ist in der Lage, einen Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von APCs zu binden.

[0045] Des Weiteren kann, wie diskutiert, die Stärke und Art der gegen das vorgewählte Antigen hervorgerufenen Immunantwort moduliert werden, indem spezifische Hilfsstoffe gemeinsam mit dem Fc-Antigen-Fusionsprotein verabreicht werden. Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung enthalten die Hilfsstoffe ein zweites Fc-Fusionsprotein, wobei eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette an ein Hilfsprotein fusioniert ist, um ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein herzustellen. Wie bei den Fc-Antigen-Fusionsproteinen versteht es sich, dass eine optimale Immunantwort hervorgerufen wird, wenn beide Komponenten eines Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins aktiv sind. Mit anderen Worten ist der Hilfsstoff in dem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein in der Lage, eine Immunantwort zu modulieren und die konstante Region der schweren Immunglobulinkette ist in der Lage, einen Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von APCs zu binden.

[0046] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden sowohl das Antigen als auch der Hilfsstoff als Fc-Fusionsproteine verabreicht. Mit anderen Worten wird das Antigen als ein Fc-Antigen-Fusionsprotein verabreicht und der Hilfsstoff wird als ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein verabreicht. Bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der für die Ausführung der vorliegenden Erfindung nützlichen Fc-Fusionsproteine sind in [Fig. 1A-Fig. 1G](#) dargestellt.

[0047] [Fig. 1A](#) stellt ein beispielhaftes Fc-Fusionsprotein dar, in dem der C-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1**, entweder direkt oder mittels eines Polypeptidlinkers, mit dem N-Terminus des vorgewählten Antigens oder Hilfsstoffes **2** verbunden ist. Wie hier verwendet, ist der Begriff „Polypeptidlinker“ so zu verstehen, dass eine Sequenz aus einem oder mehreren Aminosäureresten gemeint ist, die zwei Proteine miteinander koppeln. Der Polypeptidlinker ist oftmals eine Reihe von Aminosäuren mit einer Länge von etwa 10-15 Resten, die zum Beispiel sich wiederholende Glycin- und/oder Serinreste enthalten. [Fig. 1B](#) stellt ein beispielhaftes Fc-Fusionsprotein dar, in dem der C-Terminus des vorgewählten Antigens oder Hilfsstoffes **2**, entweder direkt oder mittels eines Polypeptidlinkers, mit dem N-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1** verbunden ist.

[0048] [Fig. 1C](#) zeigt ein dimeres Konstrukt, das zwei Fc-Fusionsproteine enthält, die kovalent mittels zweier Disulfidbindungen verknüpft sind. Das dimere Konstrukt enthält zwei Fc-Fusionsproteine, in denen der C-Terminus von jeder konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1** mit dem N-Terminus eines vorgewählten Antigens oder Hilfsstoffes **2** verbunden ist. Ebenso zeigt [Fig. 1D](#) ein dimeres Konstrukt, das zwei Fc-Fusionsproteine enthält, die kovalent mittels zweier Disulfidbindungen verknüpft sind. Das dimere Konstrukt enthält zwei Fc-Fusionsproteine, in denen der C-Terminus von jedem vorgewählten Antigen oder Hilfsstoff **2** mit dem N-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1** verbunden ist.

[0049] [Fig. 1E](#) zeigt ein dimeres Konstrukt, das zwei Fc-Fusionsproteine enthält, die kovalent mittels zweier Disulfidbindungen verknüpft sind. Das dimere Konstrukt enthält zwei Fc-Fusionsproteine, in denen der C-Terminus von jeder konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1**, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit dem N-Terminus eines vorgewählten Antigens oder Hilfsstoffes **2** verbunden ist, dessen C-Terminus, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit einem zweiten Antigen oder Hilfsstoff **2'** verbunden ist.

[0050] [Fig. 1F](#) zeigt ein dimeres Konstrukt, das zwei Fc-Fusionsproteine enthält, die ebenfalls mittels zweier Disulfidbindungen verknüpft sind. Das dimere Konstrukt enthält zwei Fc-Fusionsproteine, in denen der C-Terminus des Antigens oder Hilfsstoffes **2**, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit dem N-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1** verbunden ist, deren C-Terminus, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit dem N-Terminus eines unterschiedlichen Hilfsstoffes oder Antigens **2'** verbunden ist. Zum Beispiel können derartige Fusionsproteine, in einer N- nach C-terminalen Richtung, vorgewähltes Antigen – konstante Region der schweren Immunglobulinkette – Hilfsstoff umfassen.

[0051] [Fig. 1G](#) zeigt ein dimeres Konstrukt, das zwei Fc-Fusionsproteine enthält, die ebenfalls mittels zweier Disulfidbindungen verknüpft sind. Das dimere Konstrukt enthält zwei Fc-Fusionsproteine, in denen der C-Terminus des Antigens oder Hilfsstoffes **2**, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit dem N-Terminus eines unterschiedlichen Hilfsstoffes oder Antigens **2'** verbunden ist, dessen C-Terminus, entweder direkt oder über einen Polypeptidlinker, mit dem N-Terminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette **1** verbunden ist. Zum Beispiel können derartige Fusionsproteine, in einer N- nach C-terminalen Richtung, vorgewähltes Antigen – Hilfsstoff – konstante Region der schweren Immunglobulinkette umfassen.

[0052] Bei der Ausführung der Erfindung ist es im Allgemeinen bevorzugt, die Fc-Einheit bezogen auf die Hilfsstoffeinheit in einer N-terminale Position zu platzieren. Wenn die Hilfsstoffeinheit N-terminal zur Fc-Einheit platziert wird, dann kann die Hilfsstoff-Fc-Fusion an einen Hilfsstoffrezeptor auf einer Immunzelle binden und die Fc-Einheit wird in der gleichen Orientierung vorliegen, die bei der Bindung eines Antikörpers an eine Zelloberfläche eingenommen wird. ADCC oder Komplementfixierung können eine Folge sein. Wenn die Fc-Einheit jedoch N-terminal zur Hilfsstoffeinheit platziert wird, scheint dies keine ADCC und Komplementfixierung zur Folge zu haben.

[0053] Die in den [Fig. 1C–Fig. 1G](#) dargestellten Konstrukte werden als Dimere, die durch ein Paar an Disulfidbindungen zwischen Cysteinen an benachbarten Gelenk-Regionen vernetzt sind, beschrieben. In den Zeichnungen werden die Disulfidbindungen so dargestellt, dass sie die Teile zweier konstanter Regionen der schweren Immunglobulinkette über die Eigenschaften der Gelenk-Region der nativen Formen dieser Moleküle miteinander verknüpfen. Während Konstrukte, die Gelenk-Regionen von Immunglobulin einschließen, bevorzugt sind, zieht die Erfindung auch in Erwägung, dass wie gewünscht Vernetzung an anderen Positionen gewählt werden können. Darüber hinaus können, in einigen Fällen, zwei oder mehr Monomere nicht-kovalent assoziieren, um für die Ausführung der Erfindung nützliche Dimere oder Multimere zu erzeugen.

[0054] Wie hierin verwendet, wird der Begriff „konstante Region der schweren Immunglobulinkette“ austauschbar mit dem Begriff „Fc-Region“ verwendet, und ist so zu verstehen, dass der carboxylterminale Teil einer konstanten Region der schweren Immunglobulinkette gemeint ist, oder ein Analogon oder ein Teil davon, der in der Lage ist, einen Fc-Rezeptor zu binden. Wie bekannt ist, enthält jede konstante Region der schweren Immunglobulinkette vier oder fünf Domänen. Die Domänen werden nacheinander wie folgt bezeichnet: CH1-Gelenk-CH2-CH3(-CH4). CH4 kommt in IgM vor, das keine Gelenk-Region aufweist. Die bei der Ausführung der Erfindung nützliche konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält vorzugsweise eine Gelenk-Region des Immunglobulins und umfasst vorzugsweise auch eine CH3-Domäne. Die konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält am meisten bevorzugt eine Gelenk-Region des Immunglobulins, eine CH2-Domäne und eine CH3-Domäne. Wie hierin verwendet, ist der Begriff „Gelenk-Region“ des Immunglobulins so zu verstehen, dass eine vollständige Gelenk-Region eines Immunglobulins oder zumindest ein Teil der Gelenk-Region eines Immunglobulins gemeint ist, der ausreicht, um eine oder mehrere Disulfidbindungen

mit einer zweiten Gelenk-Region von Immunglobulin zu bilden.

[0055] Es wird in Betracht gezogen, dass geeignete konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette von Antikörpern abgeleitet werden können, die einer beliebigen der fünf Immunglobulinklassen angehören, die mit IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet werden, jedoch sind konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette der IgG-Klasse bevorzugt. Darüber hinaus wird in Betracht gezogen, dass konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette von einer beliebigen der IgG-Antikörper-Unterklassen abgeleitet werden können, die im Fachgebiet mit IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 bezeichnet werden.

[0056] Konstante Regionsdomänen der schweren Immunglobulinkette haben eine Kreuzhomologie unter den Immunglobulinklassen. Zum Beispiel ist die CH2-Domäne von IgG homolog zur CH2-Domäne von IgA und IgD, und zur CH3-Domäne von IgM und IgE. Bevorzugte konstante Regionen der schweren Immunglobulinkette umfassen Proteindomänen, die einer CH2-Region und einer CH3-Region von IgG oder funktionalen Teilen oder Derivaten davon entsprechen. Den konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette fehlt jedoch vorzugsweise mindestens die CH1-Domäne. Darüber hinaus fehlt den Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen eine variable Region von Immunglobulin. In einer bevorzugteren Ausführungsform enthält die konstante Region der schweren Immunglobulinkette, in einer N- nach C-terminalen Richtung, eine Gelenk-Region des Immunglobulins, eine CH2-Domäne und eine CH3-Domäne, die alle auf Sequenzen aus einem IgG-Molekül beruhen. Die Wahl von geeigneten konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette wird im Detail in den US-Patenten Nr. 5,541,087 und 5,726,044 diskutiert. Die Wahl von bestimmten Sequenzen für die konstante Region der schweren Immunglobulinkette von bestimmten Immunglobulinklassen und -unterklassen, um ein bestimmtes Ergebnis zu erzielen, gilt als innerhalb des Niveaus eines Fachmanns liegend.

[0057] Es kann, unter bestimmten Umständen, von Nutzen sein, die konstante Region der schweren Immunglobulinkette zu modifizieren, zum Beispiel durch Mutation, Deletion oder andere Veränderungen, die durch Gentechnik oder andere Vorgehensweisen vermittelt werden, so dass bestimmte Aktivitäten, wie z. B. Komplementfixierung oder die Stimulierung der antikörperabhängigen, zellvermittelten Cytotoxizität (ADCC) vermindert oder beseitigt werden. Es wird jedoch als notwendig erachtet, dass die Fähigkeit der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette, an Fc-Rezeptor zu binden, aufrecht erhalten wird.

[0058] Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung ist die konstante Regionskomponente der schweren Immunglobulinkette des Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins in dem beabsichtigten Empfänger vorzugsweise nicht immunogen oder nur schwach immunogen. Die Fc-Region wird als nicht oder schwach immunogen betrachtet, wenn die konstante Region der schweren Immunglobulinkette keine nachweisbare Antikörperantwort erzeugt, die gegen die konstante Region der schweren Immunglobulinkette gerichtet ist. Demzufolge sollte die konstante Region der schweren Immunglobulinkette von Immunglobulinen abgeleitet werden oder sollte auf Aminosäuresequenzen entsprechend von Immunglobulinen beruhen, die in der gleichen Spezies wie der beabsichtigte Empfänger des Fusionsproteins vorkommen. Mit anderen Worten sollten Sequenzen der humanen konstanten Region der schweren Immunglobulinkette verwendet werden, wenn das Fc-Fusionskonstrukt (das Fc-Antigen- und/oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein) einem Menschen verabreicht werden soll. Nucleotide und Aminosäuresequenzen von humanem Fc-IgG werden, zum Beispiel, in Ellison et al. (1982) NUCLEIC ACIDS RES. 10:4071-4079 beschrieben. Desgleichen sollten murine Fc-Sequenzen verwendet werden, wenn die Fc-Fusion Mäusen verabreicht werden soll. Nucleotide und Aminosäuresequenzen von murinem Fc-IgG2a werden, zum Beispiel, in Bourgois et al. (1974) EUR. J. BIOCHEM. 43:423-435 beschrieben. Die gleiche Logik würde angewandt, wenn die Fc-Fusionsproteine anderen Tieren verabreicht werden sollten, einschließlich Haustieren, zum Beispiel Katzen und Hunden, sowie Nutztieren, zum Beispiel Kühen und Pferden.

[0059] Wie hierin verwendet, ist der Begriff „vorgewähltes Antigen“ so zu verstehen, das ein beliebiges Protein oder Fragment davon, oder Polypeptid gemeint ist, das, entweder allein oder in Kombination mit anderen Reagenzien, eine Immunantwort in einem Säugetier induzieren kann. Es wird in Erwägung gezogen, das jeweilige vorgewählte Antigen von Interesse in dem erfindungsgemäßen Fc-Antigen-Fusionsprotein eingeschlossen werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das vorgewählte Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Prostata-spezifischem Membranantigen (PSMA), einer Ektodomäne eines Cytokinrezeptors, zum Beispiel einer Ektodomäne des humanen IL-4-Rezeptors; einem Tumor-spezifischen Antigen (zum Beispiel einem Antigen, das hochreguliert ist oder auf andere Weise in einer Tumorzelle in erhöhten Spiegeln bezogen auf eine normale Zelle vorkommt); und einem viralen Protein, zum Beispiel einem durch das Genom des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) kodierten Proteins.

[0060] Wie hierin verwendet, ist der Begriff „Hilfsstoff“ so zu verstehen, das jegliche Substanz gemeint ist, die als ein Immunmodulator wirken kann, indem sie, zum Beispiel, eine Immunantwort (entweder humoral oder zel-

lulär) gegenüber dem vorgewählten Antigen verstärken kann. Wie hierin verwendet, ist der Begriff „humorale“ Immunität so zu verstehen, dass eine Immunität gemeint ist, die durch in Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Plasma oder Lymphe, verteilten Antikörper vermittelt wird, während der Begriff „zelluläre“ Immunität, der auf dem Fachgebiet auch als „zell-vermittelte Immunität“ bezeichnet wird, so zu verstehen ist, dass immunologische Reaktionen gemeint sind, die durch T-Lymphozyten initiiert und durch Effektor-T-Lymphozyten und/oder Makrophagen vermittelt werden.

[0061] Wie bereits früher diskutiert, kann eine Vielzahl an chemischen Hilfsstoffen, z. B. vollständiges Freundsches Adjuvans, bei der Immunisierung von nicht-menschlichen Säugetieren von Nutzen sein. Obwohl es bei Tieren weit verbreitet verwendet wird, um hohe Antikörpertiter oder deutliche cytotoxische T-Lymphozyt-(CTL-)Antworten zu erzeugen, machen seine Nebenwirkungen, zum Beispiel Gewebevernarbung, es für Verwendung beim Menschen ungeeignet. Daher besteht ein Bedarf, starke Immunantworten ohne die begleitende Entzündung an der Injektionsstelle zu induzieren. Ein deutlicher Vorteil der Verwendung von erfindungsgemäßen Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen ist die Fähigkeit, eine starke Immunantwort ohne die Notwendigkeit von chemischen Hilfsstoffen wie dem Freundsches Adjuvans hervorzurufen.

[0062] Bevorzugte Hilfsstoffe, die bei der Ausführung der Erfindung von Nutzen sind, umfassen ein Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein oder eine dieses kodierende Nucleinsäure. Bevorzugte Hilfsproteine für den Einbau in die Fc-Fusionsproteine umfassen Cytokine. Wie hierin verwendet, ist der Begriff „Cytokin“ so zu verstehen, dass jegliches Protein oder Peptidanalogen oder funktionales Fragment davon gemeint ist, das die Aktivität der Immunzellen, zum Beispiel: T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile, dendritische Zellen und deren Vorläufer in einem Säugetier modulieren kann. Bevorzugte Cytokine umfassen, zum Beispiel, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, TNF und GM-CSF. Die extrazelluläre Domäne des CD40-Liganden ist ebenfalls ein bevorzugtes Protein für die Fusion an Fc zur Bildung eines Fc-Hilfsstoffs. Wenn es mit Fc-Hilfsstoff verabreicht wird, kann das Antigen in dem Fc-Antigen-Fusionsprotein eine Immunantwort hervorrufen, die stärker ist als wenn das Fc-Antigen-Fusionsprotein ohne das Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein verabreicht wird. In einigen Fällen ist der Antikörperspiegel, der nach nur zwei Immunisierungen von Fc-Antigen mit Fc-Hilfsstoff erreicht wird, genauso hoch oder höher als der, der mit Freundschem Adjuvans erreicht wird, und zwar ohne nachweisbare Hautreaktionen.

[0063] Wie auch bei den konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette des Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins ist das Hilfsstoffprotein in dem beabsichtigten Empfänger vorzugsweise nicht oder nur schwach immunogen. Dies kann erreicht werden, indem in die Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine Cytokine, die durch Aminosäuresequenzen definiert werden, die den aus den gleichen Spezies wie dem beabsichtigten Empfänger isolierbaren Cytokinen entsprechen, eingebaut werden. Zum Beispiel ist, wenn das Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein einem Menschen verabreicht werden soll, das Hilfsprotein (zum Beispiel Cytokin) vorzugsweise humanen Ursprungs.

[0064] Die Co-Verabreichung der Fc-Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine, entweder gleichzeitig oder nacheinander, kann verwendet werden, um die Art der Immunantwort, die gegen das vorgewählte Antigen stimuliert wird, zu modulieren. Es werden zwei Klassen von Immunantworten, bezeichnet mit Th1 und Th2, als Reaktion auf unterschiedliche Infektionsarten stimuliert und umfassen unterschiedliche Cytokine. Th1-vermittelte Immunantworten sind von ihrer Art typischerweise zellulär, während Th2-vermittelte Immunantworten typischerweise von ihrer Art humoral sind. Demzufolge kann eine Th1-Antwort beim Angriff von veränderten Zellen, wie z. B. Tumorzellen oder virus-infizierte Zellen, von Nutzen sein, während eine Th2-Antwort beim Angriff auf extrazelluläre Erreger wie z. B. Parasiten von Nutzen sein kann. Oftmals ist die Verabreichung von Cytokinen, die an die konstanten Regionen der schweren Immunglobulinkette fusioniert sind, von Nutzen, um entweder eine allgemeine Immunantwort zu stimulieren, oder um spezifische Th1- oder Th2-Antworten zu initiieren oder zu modulieren.

[0065] Darüber hinaus kann die Wahl eines bestimmten Cytokins, das in einem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein vorkommt, die Antikörperklasse beeinflusst, die gegen das vorgewählte Antigen des Fc-Antigen-Fusionsproteins produziert wird. Zum Beispiel stimuliert Fc-IL12 eine T-Helferzell-Antwort durch Stimulierung der Produktion von was als Th1-Cytokine bekannt ist, zum Beispiel IFN- γ , IL-2 und TNF, die wirksame zelluläre Immunität sowie die Produktion der IgG2a-Antikörperklasse fördern. Umgekehrt stimuliert Fc-IL4 die Produktion von Th2-Cytokinen, zum Beispiel, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-4, die humorale Immunität fördern.

[0066] Wie vorher diskutiert, umfassen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen das Fc-Antigen-Fusionsprotein in Kombination mit einem Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein. Durch Verwendung von zwei Fusionsproteinen, von denen jedes eine konstante Region der schweren Immunglobulinkette enthält, ist es möglich, sowohl

das vorgewählte Antigen als auch das Hilfsprotein (zum Beispiel ein Cytokin) an gleichen oder ähnlichen Zellarten in dem Säugetier zu co-lokalisieren. Zum Beispiel exprimieren Makrophagen, B-Zellen, Granulozyten und dendritische Zellen Fc-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Demzufolge ist es durch gleichzeitige Verabreichung von Fc-Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen, die Fc-Rezeptoren binden können, möglich, das Antigen des Antigen-Fusionsproteins und den Hilfsstoff des Hilfsstoff-Fusionsproteins am gleichen Zellkompartiment der APCs zu co-lokalisieren. Der Hilfsstoff kann dann die Immunantwort in der Nachbarschaft des vorgewählten Antigens verstärken oder auf andere Weise modulieren.

[0067] Kombinationen aus Fc-Cytokinen können auch auf eine synergistische Weise verwendet werden, um eine allgemeine Antwort zu stimulieren und dann zu beeinflussen, ob eine zelluläre (Th1) oder humorale (Th2) Antwort auftritt. Zum Beispiel ist Fc-GMCSF ein wirksames allgemeines Stimulans von Immunantworten. Um die Antwort jedoch weiter in Richtung zellulärer oder Th1-vermittelte Immunität zu modulieren, kann ein Fc-IL12 oder Fc-IFN γ -Hilfsprotein, zum Beispiel, gemeinsam mit Fc-GMCSF verabreicht werden. Um eine mehr humorale oder Th2-vermittelte Antwort zu fördern, kann ein Fc-IL4-Hilfsprotein, zum Beispiel, gemeinsam mit Fc-GMCSF verabreicht werden, um die Antwort in Richtung der Erzeugung von Th2-Zellen zu modulieren. Andere Th1- oder Th2-fördernde Cytokine, die als Fusionen an Fc verwendet werden, können auch in Abhängigkeit von der genauen Art der gewünschten physiologischen Reaktion eingesetzt werden. Es wird in Erwägung gezogen, dass diese allgemeinen Vorgehensweise auch verwendet werden kann, um bestehende pathogene Reaktionen wie z. B. Autoimmunität (eine Th1-vermittelte Erkrankung) und Allergie (eine Th2-vermittelte Erkrankung) durch Verschieben der Antwort in Richtung eines bestimmten Antigens und weg von einer schädlichen Antwort zu modulieren, indem für eine neue Antwort des entgegengesetzten Th-Typs immunisiert wird.

[0068] Unter bestimmten Umständen, wenn ein Tier mit einem Fc-Antigen-Fusionsprotein immunisiert wird, ist es nützlich, Nucleinsäuren als Hilfsstoffe zu verwenden. Nucleinsäuren, zum Beispiel Oligonucleotide, die eine Sequenz enthalten, die mit Cytosin-Phosphatdiester verknüpftem Guanosen (CpG) angereichert ist, können eine Immunantwort in Richtung einer Th1-Antwort beeinflussen und können gegebenenfalls in Kombination mit anderen Hilfsstoffen wie z. B. Cytokinen verwendet werden (siehe, zum Beispiel, Brazolot et al. (1998) PROC NATL ACAD SCI U. S. A. 95:15553-8; Liu et al. (1998) BLOOD 92:3730-6; und Klinman et al. (1997) IMMUNOL. 158:3635-3639). Demzufolge wird in Erwägung gezogen, dass Oligonucleotide, die CpG enthalten, mit einem Fc-Antigen-Fusionsprotein gemeinsam verabreicht werden können, um eine verstärkte und auf geeignete Weise modulierte Immunantwort zu erreichen. Derartige Nucleinsäuremoleküle können eine beliebige Länge aufweisen, jedoch sind Nucleotide mit einer Länge von mehr als 8 Nucleotiden bevorzugt. Die Nucleinsäuresequenzen enthalten vorzugsweise die Sequenz CpG und mehr bevorzugt die Sequenz Purin-Purin-C-G-Pyrimidin-Pyrimidin, in denen Cytosine im zentralen CpG unmethyliert sind. Die Frequenz der CpG-Dinucleotide in der Hilfsstoff-DNA beträgt vorzugsweise mindestens etwa 5% und mehr bevorzugt etwa 10%. Zum Beispiel kann eine doppelsträngige Form des Oligodesoxynucleotids TCCATGACGTTCTGACGTT (SEQ ID NO: 22) als ein Hilfsstoff verwendet werden. In Abhängigkeit von der Art der gesuchten Immunantwort kann es von Nutzen sein, die Nucleinsäure mit Alum zu kombinieren.

[0069] Die vorliegende Erfindung nutzt herkömmliche DNA-Rekombinationsmethoden zur Erzeugung von Fc-Fusionsproteinen, die für die Ausführung der Erfindung von Nutzen sind. Die Fc-Fusionskonstrukte werden vorzugsweise auf dem DNA-Niveau erzeugt und die resultierenden DNAs werden in Expressionsvektoren integriert und exprimiert, um das erfindungsgemäße Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein zu produzieren. Wie hierin verwendet, ist der Begriff „Vektor“ so zu verstehen, dass eine beliebige Nucleinsäure gemeint ist, die eine Nucleotidsequenz enthält, die für den Einbau in eine Wirtszelle und die Rekombination mit dem Wirtszellgenom und Integration darin kompetent ist, oder autonom als ein Episom replizieren kann. Derartige Vektoren umfassen lineare Nucleinsäuren, Plasmide, Phagemide, Cosmide, RNA-Vektoren, virale Vektoren und dergleichen. Nichteinschränkende Beispiele für einen viralen Vektor umfassen einen Retrovirus, einen Adenovirus und einen adenassozierten Virus. Wie hierin verwendet, ist der Begriff „Genexpression“ oder „Expression“ eines Fc-Fusionsproteins so zu verstehen, dass die Transkription einer DNA-Sequenz, Translation des mRNA-Transkripts und Sekretion eines Fc-Fusionsproteinprodukts gemeint ist. Fc-Fusionsproteine, die jeweils IL2, CD26, Tat, Rev, OSF-2, bIG-H3, IgE-Rezeptor, PSMA oder gp120 enthalten, wurden unter Verwendung von Expressionssystemen vom hier diskutierten Typ exprimiert. Die gleichen oder ähnliche Expressionskonstrukte werden in den U.S. Patenten Nr. 5,541,087 und 5,726,044 beschrieben.

[0070] Als eine Alternative zur Fusion von Proteinen mittels gentechnischer Verfahren kann chemische Konjugation unter Verwendung von herkömmlichen chemischen Vernetzungsmitteln verwendet werden, um Proteinheiten zu fusionieren.

[0071] Grundlegende Vektoren, die für die Ausführung der Erfindung von Nutzen sind, umfassen einen selektierbaren Marker, zum Beispiel ein für Dihydrofolatreduktase (DHFR) kodierendes Gen, das durch transkriptionelle regulatorische Sequenzen gesteuert wird, die, zum Beispiel, vom SV40-Virus abstammen, und bakterielle Plasmidsequenzen für Selektion und Aufrechterhaltung des Plasmids in *E. coli*. Expression der Fc-Fusionsproteinsequenzen werden durch Promotor- und gegebenenfalls Enhancer-Sequenzen, zum Beispiel der Promotor- und Enhancer-Sequenzen vom Cytomegalovirus (CMV) angetrieben.

[0072] Wenn das Fc-Fusionsprotein Menschen verabreicht werden soll, beginnen die für das Fc-Fusionsprotein kodierenden Sequenzen vorzugsweise in einer 5'- nach 3'-Richtung mit einer „Leadersequenz“, die zum Beispiel von einer leichten Antikörperkette (L) abstammt, die mit mindestens einem Teil einer schweren Immunglobulinkette oder einer mutierten Form davon im Rahmen fusioniert ist, vorzugsweise von der Fc γ 1-Region des humanen Immunglobulin g1-Gens. Die Fc γ 1-Region des Immunglobulin Fc γ 1-Gens umfasst vorzugsweise mindestens einen Teil der Gelenk-Domäne und eine CH3-Domäne und mehr bevorzugt umfasst sie mindestens eine Gelenk-Domäne, eine CH2-Domäne und eine CH3-Domäne. Wenn das Fc-Fusionsprotein Mäusen verabreicht werden soll, umfassen bevorzugte Nucleinsäuresequenzen, die für die konstante Region der schweren Immunglobulinkette kodieren, eine Nucleinsäuresequenz, die in einer 5'- nach 3'-Richtung für eine Gelenk-Region, eine CH2-Domäne und eine CH3-Domäne aus einem IgG2a-Antikörper der Maus kodiert. Der Carboxyterminus der konstanten Region der schweren Immunglobulinkette wird, sofern erforderlich, auf Nucleinsäure-Niveau für Ligation, im Rahmen, mit Sequenzen modifiziert, die entweder für das vorgewählte Antigen (im Falle von Fc-Antigen) oder einem immunstimulierenden Cytokin (im Falle eines Fc-Hilfsstoff Cytokins) kodiert. DNA, die für die Sekretionskassette kodiert, kann in ihrer genomischen Konfiguration oder in ihrer cDNA-Konfiguration vorliegen.

[0073] Der Teil der DNA, der für die Signalsequenz kodiert, kodiert vorzugsweise für ein Peptidsegment, das die Sekretion des Fc-Fusionsproteins steuert und anschließend vom Rest des Fc-Fusionsproteins abgespalten wird. Die erfindungsgemäße Signalsequenz ist ein Polynucleotid, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, die den Transport eines Proteins durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums initiiert. Signalsequenzen, die in der Erfindung von Nutzen sind, umfassen Signalsequenzen der leichten Antikörperkette, z. B. Antikörper 14.18 (Gillies et al. (1989) *J. OF IMMUNO. METH.*, 125:191), Signalsequenzen der schweren Antikörperkette, z. B. die Signalsequenz der schweren Kette des MOPC141-Antikörpers (Sakano et al. (1980) *NATURE* 286:5774), und beliebige andere Signalsequenzen, die im Fachgebiet bekannt sind (siehe, zum Beispiel, Watson (1984) *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 12:5145).

[0074] Signalsequenzen wurden im Fachgebiet gut charakterisiert und es ist bekannt, dass sie typischerweise 16 bis 30 Aminosäurereste enthalten und mehr oder weniger Aminosäurereste enthalten können. Ein typisches Signalpeptid besteht aus drei Regionen, einer basischen N-terminalen Region, einer zentralen hydrophoben Region und einer polarerer C-terminalen Region. Die zentrale hydrophobe Region enthält 4 bis 12 hydrophobe Reste, die das Signalpeptid während des Transport des naszierenden Polypeptids durch die Lipiddoppelschicht der Membran verankern. Im Anschluss an die Initiierung wird das Signalpeptid gewöhnlich innerhalb des Lumens des endoplasmatischen Retikulums durch zelluläre Enzyme, die als Signalpeptidasen bekannt sind, abgespalten. Mögliche Spaltungsstellen des Signalpeptids folgen im Allgemeinen der „(-3, -1)-Regel“. So hat ein typisches Signalpeptid kleine, neutrale Aminosäurereste in den Positionen -1 und -3 und es fehlen Prolinreste in dieser Region. Die Signalpeptidase wird ein derartiges Signalpeptid zwischen den Aminosäuren -1 und +1 spalten. So kann die Signalsequenz während der Sekretion vom Amino-Terminus des Fusionsproteins abgespalten werden. Dies führt zu der Sekretion eines Fc-Fusionsproteins. Signalpeptidsequenzen, die für die Ausführung der Erfindung von Nutzen sind, sind im Fachgebiet wohlbekannt. Siehe, zum Beispiel, von Heijne (1986) *NUCLEIC ACIDS RES.* 14:4683.

[0075] Wie einem Fachmann offensichtlich wäre, kann die Eignung einer bestimmten Signalsequenz für die Verwendung in der Sekretionskassette einige Routineexperimente erfordern. Derartige Experimente können die Bestimmung der Fähigkeit der Signalsequenz, die Sekretion eines Fc-Fusionsproteins zu steuern, und/oder die Bestimmung einer optimalen Konfiguration, genomisch oder cDNA, der zu verwendenden Sequenz umfassen, um eine effiziente Sekretion von Fc-Fusionsproteinen zu erreichen. Zusätzlich ist ein Fachmann in der Lage, ein synthetisches Signalpeptid zu erschaffen, indem er den von von Heijne vorgestellten Regeln folgt, die oben zitiert wurden, und auf die Effizienz einer derartigen synthetischen Signalsequenz mittels Routineexperimenten testet. Die Begriffe „Signalsequenz“, „Signalpeptid“, „Leadersequenz“ oder „Leaderpeptide“ werden hierin austauschbar verwendet.

[0076] Es wird in Betracht gezogen, dass eine Anzahl an unterschiedlichen Ausführungen der Verabreichung der Fc-Fusionsproteine verwendet werden kann, um einen Empfänger gegen ein vorgewähltes Antigen zu im-

munisieren. Es können zwei unterschiedliche Anwendungen der vorliegenden Offenbarung verwendet werden, um CTL-Antworten zu erzeugen, wobei eine auf der Injektion von für ein Fc-Antigen-Fusionsprotein kodierender DNA beruht und eine zweite auf der Verabreichung des Fc-Antigen-Fusionsproteins beruht, das ein Protein dem MHC-Klasse-I-Weg zuführen kann.

[0077] Die Injektion der Proteinantigene wird typischerweise verwendet, um in Säugetieren Immunantworten hervorzurufen. Verfahren, Antigen den APCs durch DNA-Injektion zuzuführen, können ebenfalls verwendet werden. Eine allgemein angewandte Technik ist, DNA-Expressionsvektoren, die für ein antigenes Protein kodieren, in Muskel zu injizieren. Berichte deuten darauf hin, dass das Proteinantigen durch Muskelzellen exprimiert wird, aber dass das Antigen durch diese Zellen nicht dem Immunsystem präsentiert wird. Stattdessen nimmt man an, dass spezialisierte APCs, zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen, an die Injektionsstelle wandern, das Antigen aufnehmen und durch einen bisher noch nicht aufgeklärten Prozess präsentieren. Die Verwendung von Fc-Antigen-Fusionsprotein-Expressionsvektoren macht diesen Prozess effizienter, da das sezernierte Fusionsprotein effizienter als natives Antigenprotein an APCs bindet.

[0078] Eine Folge der DNA-Injektionsvorgehensweise ist, dass sie oftmals zur Erzeugung von sowohl humoralen als auch zellulären Antworten führen kann. Typischerweise haben es exogen verabreichte Proteine schwerer, auf den Weg zur Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu gelangen. Dennoch verstärkt die Verabreichung der erfindungsgemäßen Fc-Fusionsproteine die Erzeugung von cytotoxischen Zellen, vermutlich durch MHC-Klasse-I-Präsentation des vorgewählten exogenen Antigens. Kombinationen von DNA-Immunisierung und Proteinimmunisierung können ebenfalls synergistisch arbeiten, um zunächst das Immunsystem zu aktivieren und dann den Antwortspiegel in der Form von sowohl Antikörperproduktion wie auch cytotoxischen zellulären Antworten zu verstärken. Die Co-Verabreichung von Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein, zum Beispiel Fc-IL-2, Fc-28-GMCSF, Fc-IL-12 und Fc-F1t3-Ligand, zusammen mit dem Fc-Antigen-Fusionsprotein gewährleistet die Co-Lokalisierung der Fusionsproteine am gleichen Zellkompartiment der APCs, wodurch eine wirksamere Immunantwort gegen das vorgewählte Antigen stimuliert wird.

[0079] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung (d. h. Fc-Antigen- und/oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein) können einem Tier mittels jeglichem geeigneten Mittel gegeben werden, direkt (z. B. lokal wie durch Injektion, Implantation oder topische Verabreichung auf einen Gewebeort) oder systemisch (z. B. parenteral oder oral). Wenn die Zusammensetzung parenteral gegeben werden soll, wie z. B. durch intravenöse, subkutane, ophthalmische, intraperitoneale, intramuskuläre, buccale, rektale, vaginale, intraorbitale, transdermale, intrazerebrale, intrakranielle, intraspinale, intraventrikuläre, intrathekale, intrazisternale, intrakapsuläre, intranasale Verabreichung oder über Aerosol, enthält die Zusammensetzung vorzugsweise Teile einer wässrigen oder physiologisch verträglichen Flüssigsuspension oder Lösung. So ist der Träger oder das Vehikel physiologisch unbedenklich, so dass dieser zusätzlich zur Lieferung der gewünschten Zusammensetzung an den Patienten keine ansonsten gegensätzliche Wirkung auf das Elektrolyt- und/oder Volumengleichgewicht des Patient hat. Das flüssige Medium für das Mittel kann so normale physiologische Kochsalzlösung enthalten (z. B., 9,85%ige wässrige NaCl, 0,15M, pH 7-7,4).

[0080] Bevorzugte Dosierungen des Fc-Antigen-Fusionsproteins pro Verabreichung liegen in dem Bereich von 50 ng/m² bis 1 g/m², mehr bevorzugt 5 µg/m² bis 200 mg/m² und am meisten bevorzugt 0,1 mg/m² bis 50 mg/m². Bevorzugte Dosierungen des Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins pro Verabreichung liegen in dem Bereich von 1 ng/m² bis 0,1 g/m², mehr bevorzugt 0,5 µg/m² bis 20 mg/m² und am meisten bevorzugt 10 µg/m² bis 5 mg/m². Bevorzugte Dosierungen der für die Fc-Antigen- oder Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine kodierenden Nucleinsäuren pro Verabreichung liegen in dem Bereich von 1 µg/m² bis 100 g/m², mehr bevorzugt 20 µg/m² bis 10 mg/m² und am meisten bevorzugt 400 µg/m² bis 4 mg/m².

[0081] Es wird in Betracht gezogen, dass eine maximale Immunisierung durch Ausführen zahlreicher einzelner Immunisierungen, zum Beispiel eine bis drei Inokulationen im Abstand von etwa 3 Wochen bis sechs Monaten erreicht werden kann. Darüber hinaus können, wie oben diskutiert, maximale Immunantworten unter bestimmten Umständen durch Alternieren zwischen der Verabreichung von Fc-Fusionsproteinen und für solche Fc-Fusionsproteine kodierende Nucleinsäuren erreicht werden. Es wird in Erwägung gezogen, dass das Fc-Antigen-Fusionsprotein vor, gleichzeitig mit oder nach der Verabreichung des Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins oder der für das Fc-Hilfsstoff-Fusionsprotein kodierenden Nucleinsäure an das Säugetier verabreicht werden kann. Es ist jedoch zu erwägen, dass die optimalen Arten der Verabreichung, Dosierungen und Auffrischschemata durch Routineexperimente ermittelt werden können, die gut innerhalb des Wissens des Fachgebiets liegen.

[0082] Die Erfindung wird weiter durch die folgenden nichteinschränkenden Beispiele erläutert.

Beispiel I. Konstruktion von Fc Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Expressionsvektoren

[0083] Um die Immunisierungskraft der Fc-Fusionsproteine in einem Mausmodell auf geeignete Weise zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren unter Verwendung von Nucleinsäuresequenzen, die für IgG2a-Fc-Regionen der Maus kodieren, konstruiert. Dies vermindert das Risiko, dass die Fc-Region von jedem Fusionsprotein in dem Säugetier eine Immunantwort induziert. Darüber hinaus wurden Maus-Cytokine als Fusionspartner für Fc-Hilfsstoff-Fusionskonstrukte verwendet, da deren biologische Aktivitäten hoch speziesspezifisch sein können. Daher wurden Vektoren, über die früher berichtet wurde (Lo et al. (1998) PROTEIN ENGINEERING 15 11:495-500) modifiziert (siehe Fig. 2), indem die humane IgG1-Fc-Sequenz durch Sequenzen aus für IgG2a-Fc der Maus kodierender cDNA (U.S. Patent Nr. 5,726,044) ersetzt wurden.

[0084] Die IgG2a-Fc-Sequenz der Maus wurde aus einer Maus-Milzzellen-Bibliothek mittels Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR) kloniert. Die PCR-Primer enthielten Adaptersequenzen für das Anfügen einer Leadersequenz am 5'-Ende und einer einmal vorhandenen Sma I/Xma I-Restriktionsstelle am 3'-Ende für Ligation mit Sequenzen, die entweder für Antigene oder Hilfsstoff-Cytokine kodieren. Die Antigen- und Hilfsstoff-(Cytokin-)Sequenzen wurden mit einer 5'-Sma I-Stelle hergestellt und unter Beibehaltung der Leserahmen zwischen Fc und Antigen- oder Hilfsstoffen und eine einmal vorhandene Xho I-Stelle wurde direkt hinter das Translationsstoppsignal positioniert.

[0085] Das resultierende DNA-Konstrukt kodierte für eine Leadersequenz der leichten Kette, die direkt an die Gelenk-Region der H-Kette des Maus-IgG2a fusioniert war und sich mit den CH2- und CH3-Exons des Maus-IgG2a und dem Fusionspartner (entweder dem Antigen oder dem Hilfsstoff Cytokin) fortsetzte. Transkription wurde durch den CMV-Promotor/Enhancer angetrieben, der sich als von Nutzen für Expression in den meisten Zelltypen in Kultur sowie für die Expression in Muskel- oder anderen Zellarten nach einer DNA-Injektion in vivo erwies. Ein selektierbares Dihydrofolatreduktase-(DHFR)Markergen wurde in jeden Vektor eingeschlossen, um die Selektion von stabil transfizierten Klonen zu erleichtern, und es wurden auch Sequenzen eingeschlossen, die für die Aufrechterhaltung der Plasmid-DNA in E. coli notwendig ist.

[0086] Die folgenden beispielhaften Fc-Antigenkonstrukte wurden durch Einführen von auf geeignete Weise angepasste Sequenzen zwischen der einmal vorhandenen Sma I- bis Xho I-Stellen in den pdCs-muFc bezeichneten Vektor geschaffen, wobei „mu“ darauf hindeutet, dass das Fc aus der Maus stammt: Die Ektodomäne (der extrazelluläre Teil) des humanen IL4-Rezeptors (IL-4R) wurde aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mittels PCR-Amplifizierung kloniert. Die verwendeten Primer waren 5' GTCCCGGGTATGAAGGTCTTGCAGGAGC (SEQ ID NO: 1) und 5' CCCCTCGAGCTAGTGCTGCTCGAAGGGCTCCCTG (SEQ ID NO: 2), die die Sma I- bzw. Xho I-Stellen für die Insertion in den pdCs-muFc-Vektor enthielten. Die hierfür und die folgenden Klonierungen verwendeten PCR-Reaktionsbedingungen, waren wie folgt. Es wurden Advantage KlenTaq und Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, CA) sowie spezifische Primer für die Amplifizierung der/des Gen(s/e) von Interesse verwendet. Die Reaktionsmischungen enthielten 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 Gew.-% Gelatine, jeweils 0,2 mM dNTPs und 1,25 Einheiten KlenTaq in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Es wurden dreißig PCR-Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus einer Hitzedenaturierung bei 94°C für 1 min, Hybridisieren bei 42°C für 45 sec, und Primerverlängerung bei 72°C für 1 min bestand. Das amplifizierte Produkt wurde dann in einen SK-Vektor (Stratagene, San Diego, CA) subkloniert und seine DNA-Sequenz mittels standardmäßiger Sequenzierungsmethoden verifiziert.

[0087] Die Ektodomäne des humanen Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA) wurde aus der Prostatakarzinom-Zelllinie LnCAP (ATCC CRL1740) mittels PCR unter Verwendung der Primer 5' AAGCTTAAATCCTCCAATGAAGC (SEQ ID NO: 3) und 5' CTCGAGTTAGGCTACTTCACTCAAAG (SEQ ID NO: 4), für den Sense- bzw. Antisensestrang kloniert. Die DNA-Sequenz wurde verifiziert und das PCR-Fragment in den pdCs-muFc-Vektor inseriert, um ein pdCs-muFc-PSMA-Fusionskonstrukt herzustellen.

[0088] Die Ektodomäne von humanem EpCAM (auch als KS-Antigen bekannt), einem Epithelialzelloberflächenprotein, das in den meisten Karzinomzellen hochreguliert ist, wurde aus LnCAP-Zellen mittels PCR unter Verwendung der Primer 5' CCCCGGGTAAACAGGAAGAATGTGTCTGTG (SEQ ID NO: 5) und 5' CTCGAGTCATTTAGACCCTGCATTGAG (SEQ ID NO: 6) für den Sense- bzw. den Antisensestrang kloniert. Die DNA-Sequenz wurde mittels standardmäßiger Sequenzierungsmethoden verifiziert und das PCR-Fragment in den pdCs-muFc-Vektor inseriert, um ein pdCs-muFc-EpCAM-Fusionskonstrukt herzustellen. Ein weiterer Vektor wurde unter Verwendung der EpCAM-Ektodomäne als der N-terminale Fusionspartner konstruiert, und

in diesem Fall umfasste das PCR-Produkt den natürlichen Leader der EpCAM-cDNA und die reife Ektodomänensequenz zur Grenze der membran-überspannenden Domäne. Das 3'-Ende dieses PCR-Produkts enthielt eine gentechnisch hergestellte Afl II-Stelle für Ligation an die 5'-Afl II-Stelle des murinen Fc-Fragments. Die verwendeten PCR-Primer umfassten 5' TCTAGAGCAGCATGGCGCCCCCGC (SEQ ID NO: 7) und 5' CCTTAAGCACCCCTGCATTGAGAATTCAG (SEQ ID NO: 8). In diesem Fall fehlte dem murinen Fc eine 3'-Insertionsstelle für die Insertion eines Fusionsproteins, enthielt aber ein Translationsstoppsignal am Ende der für Fc kodierenden Sequenz.

[0089] Ein relativ konservierter Teil der membran-proximalen Region von HIV gp41, die sich von einer Hind III-Stelle bis zum der membran-überspannenden Region benachbarten Lysinrest erstreckt, wurde als ein Fc-Fusionsprotein als ein Beispiel für eine kurze Polypeptidantigensequenz exprimiert. Obwohl die Proteinsequenz aus dem HIV-IIIB-Stamm verwendet wurde, wurde die kodierende Sequenz für eine optimale Expression durch Eukaryotenzellen unter Verwendung einer Codonbevorzugung mit hohem GC-Gehalt optimiert. Eine DNA-Sequenz, die für die Aminosäurereste 626 bis 669 mit der folgenden Sequenz kodiert: C CCG GGA TCC CTG ATC CAC TCC CTG ATC GAG GAA TCC CAG AAC CAG CAA GAG AAG AAC GAG CAG GAG CTG CTG GAG CTC GAC AAG TGG GCC TCC CTG TGG AAC TGG TTC AAC ATC ACC AAT TGG CTG TGG TAC ATC AAG TGA CTCGAG (SEQ ID NO: 9), wurde chemisch synthetisiert und in den pdCs-muFc-Vektor ligiert. Die Aminosäuresequenz des fusionierten Polypeptids war: SLIHSLIEESQNNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK (SEQ ID NO: 10).

[0090] Weitere HIV-Protein kodierende Sequenzen wurden verwendet, um Fc-Antigen-Fusionsproteine wie früher beschrieben (U.S. Patent Nr. 5,541,087 und 5,726,044) unter Verwendung eher des Maus-IgG2a-Fc als des originalen humanen IgG1-Fc konstruiert. Diese Konstrukte stellen weitere Ausführungsformen der Erfindung dar.

[0091] Eine Reihe von Fc-Hilfsstoff-(Cytokin-)Fusionsproteinen, die das IgG2a-Fc der Maus und einige Cytokine der Maus enthalten, wurde auf die gleiche Weise wie die Fc-Antigen-Fusionsproteine konstruiert. Die spezifischen Cytokine und die Klonierungsprimer werden unten diskutiert.

[0092] Maus-IL-2 wurde aus murinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer (Sense) 5' GGCCCGGGTAAAGCACCCACTTCAAGCTCC (SEQ ID NO: 11) und (Antisense) 5' CCCTCGAGTTATTGAGGGCTTGTG (SEQ ID NO: 12) kloniert.

[0093] Maus-GMCSF wurde aus murinen PBMCs mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer (Sense) 5' CCCGGGAAAAGCACCCGCCCGCTCACCC (SEQ ID NO: 13) und (Antisense) 5' CTCGAGTCATTTTTGGCTTGTTTTTTGC (SEQ ID NO: 14) kloniert.

[0094] Maus-F1t3-Ligand wurde aus murinem Thymus mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer (Sense) 5' CAAGCTTACACCTGACTGTTACTTCAGC (SEQ ID NO: 15) und (Antisense) 5' CTCGAGTCAAGGCTCTGGGAGCTCCGTGGC (SEQ ID NO: 16) kloniert.

[0095] Maus-IL-12p35 wurde aus murinen PBMCs mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer (Sense) 5' CCCCGGGTAGGGTCATTCCAGTCTCTGG (SEQ ID NO: 17) und (Antisense) 5' CTCGAGTCAGGCGGAGCTCAGATAGC (SEQ ID NO: 18) kloniert.

[0096] Maus-IL12p40 wurde aus murinen PBMCs mittels PCR unter Verwendung der PCR-Primer (Sense) 5' TCTAGACCATGTGTCTCAGAAAGCTAAC (SEQ ID NO: 19) und (Antisense) 5' CTCGAGCTAGGATCGGACCCTGCAG (SEQ ID NO: 20) kloniert.

[0097] Alle PCR-Produkte, außer dem für Maus-IL-12p40, wurden als Sma I- bis Xho I-Fragmente kloniert, mittels standardmäßiger DNA-Sequenzierungsmethoden analysiert und in den pdCs-muFc-Vektor, der murines Fc von IgG2a als seine Fc-Region enthält, ligiert. Das Maus-IL-12p40-PCR-Produkt wurde separat exprimiert (nicht als ein Fc-Fusionsprotein) in einem Vektor, der den gleichen CMV-Promotor-Enhancer, eine Leadersequenz der leichten Kette, die direkt an die reife p40-Unterheit der Maus-IL-12 fusioniert ist, und ein Neomycinresistenzgen an Stelle des DHFR-selektierbaren Markergens in dem pdCs-muFc-Vektor enthielt. Der resultierende Vektor wurde pNC-mp40 genannt, wobei „N“ ein Neomycin-Selektionsgen bezeichnet.

[0098] Alle Plasmidkonstrukte induzierten Synthese und Sekretion der spezifischen Fusionsproteine durch transiente Expression in humanen Nieren-293-Zellen. Kurz gesagt, wurden Plasmide in humane Monolager-Nieren-293-Zellen mittels Co-Fällung mit Calciumphosphat eingeführt (Sambrook et al. (1989) MOLECU-

LAR CLONING – A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor, N. Y.). Die Zellen wurden über Nacht (16 h) stehen gelassen, mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium gefüttert (DMEM, enthaltend 10% fötales Rinderserum (FBS)).

[0099] Nach weiteren 2-3 Tagen wurde das Kulturmedium auf sezernierte Fusionsproteine mittels eines Fc-spezifischen ELISA (Gillies et al. (1989) J. IMMUNOL. METHODS 125:191) unter Verwendung von für Maus-IgG-Fc-Protein spezifischen Antikörpern untersucht. Im Falle von Maus-Fc-IL12, wurden sowohl Fc-p35- als auch p40-Expressionsplasmid-DNAs in der gleichen Zellkultur transient exprimiert, so dass das heterodimerere Cytokin-Fusionsprotein sich vor Sekretion aus der Zelle anordnete (Gillies et al. (1998) J. IMMUNOL. 160:6195).

[0100] Anschließend wurden stabil transfizierte Zellen, die die verschiedenen Fc-Fusionsproteine exprimieren, mittels Einführung von linearisierter DNA in Maus-NS/0-Myelomzellen mittels standardmäßiger Elektroporationstechniken erzeugt. Kurz gesagt, wurden Zellen in einer Gene Pulser Küvette (BioRad) mit 10 Zellen/ml und 0,5 ml der Suspension mit 10 µg der DNA vermischt und die Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Elektroporation wurde unter Verwendung eines Gene Pulser (BioRad) mit Einstellungen bei 0,25 V und 500 µF ausgeführt. Die Zellen durften sich 10 Minuten auf Eis erholen, dann wurden sie in Wachstumsmedium resuspendiert und auf 96-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage, beginnend 2 Tage nach der Elektroporation, mit 0,1 µM Methotrexat enthaltendem Selektionsmedium gefüttert. Wirkstoff-resistente Kolonien, die auf den 96-Well-Platten wuchsen, wurden durch das Fc-ELISA-Protokoll auf Expression untersucht.

[0101] Für Expression des Maus-Fc-IL12-Fusionsproteins wurde eine transfizierte Zelllinie von NS/0, die bereits die p40-Untereinheit der Maus-IL-12 exprimiert, wie oben beschrieben mit dem Maus-Fc-p35-Unterheits-expressionsvektor transfiziert. Die p40 exprimierende Linie wurde mittels Elektroporation von NS/0-Zellen mit dem pNC-mp40-Vektor, wie oben beschrieben, und Selektion in das Neomycin-Analogon G418 (Life Sciences Technologies) enthaltendem Medium erhalten. Nach der zweiten Transfektion wurden überlebende Zellklone mittels eines Fc-ELISAs und eines Maus-IL-12-ELISA (Genzyme, Cambridge, MA) gescreent.

[0102] Die strukturelle Integrität der resultierenden Fusionsproteine wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Zunächst wurden die Fusionsproteine an ein kleines Volumen (10-20 µl pro ml Medium) Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) gebunden. Das gebundene Material wurde mit Tween-20 (0,01%) enthaltender PBS gewaschen, dann in SDS enthaltendem Gelpuffer eluiert und anschließend für 2 Minuten in der Gegenwart von 5% 2-Mercaptoethanol gekocht. Die reduzierten Proteine wurden auf vorgegossenen SDS-PAGE-Gelen getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Reinigungen in großem Maßstab aus stabilen Zellklonen wurden unter Verwendung von Protein A Sepharose-Säulen (Repligen, Needham, MA) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Beispiel 2. Immunisierungskraft eines Fc Antigens und die Wirkung von chemischen oder Fc-Cytokin-Hilfsstoffen auf die Antikörperproduktion

[0103] Das in Beispiel 1 hergestellte Maus-Fc-huIL-4R-alpha-Untereinheitskonstrukt wurde als ein Antigen verwendet, um die mögliche APC-ansteuernde Wirkung dieser Proteine in einem Tiermodell zu untersuchen. Die Ektodomäne der IL-4R-alpha-Untereinheit stellt ein recht konserviertes Molekül zwischen Spezies dar, das eine mehr als 50%ige Sequenzidentität zwischen Menschen und Mäusen aufweist.

[0104] Gruppen von Mäusen wurden subkutan 50 µg des Fc-Antigen-Fusionsproteins (Fc-IL-4R) in entweder PBS oder emulgiert in vollständigem Freundschens Adjuvans (CFA) injiziert. Einige Gruppen erhielten auch eine Dosis von 5 µg (vermischt mit dem Fc-IL-4R) eines Fc-Hilfsproteins von entweder Fc-IL2 oder Fc-GM-CSF. Zwei Wochen später wurde den Mäusen die gleiche Mischung injiziert, aber die Verabreichung erfolgt in die Peritonealhöhle. Die CFA-Formulierung erzeugt Mizellen, die dazu dienen, eine Quelle eines langsam freigesetzten Antigens zu bilden, was eine kontinuierliche Stimulierung des Immunsystems ermöglicht. Mykobakterielle Proteine in dem CFA induzieren auch eine starke entzündliche Reaktion durch Cytokinstimulierung, wodurch eine Immunantwort weiter verstärkt wird. CFA verursacht jedoch schwere Nebenwirkungen, einschließlich Hautschäden, was es für Menschen unbrauchbar macht. Die Mischungen mit den Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen in PBS schienen jedoch keinerlei sichtbare Hautreaktion oder keinerlei andere offensichtliche Zeichen für Toxizität in irgendeinem der Tiere hervorzurufen.

[0105] Zwei Wochen nach der Auffrischung (d. h. Tag 28 nach der ersten Injektion) wurde den Tieren Blut abgenommen und Seren hergestellt, indem man Vollblut in Microfuge-Röhrchen gerinnen ließ, Zellen und geronnenes Material mit hoher Geschwindigkeit von 12000 U/min für 5 Minuten auszentrifugierte und den Überstand

gewann. Die resultierenden Seren wurden mit Assaypuffer (PBS, enthaltend 0,01% Tween-20) verdünnt und auf Antikörper untersucht, die auf humanes IL-4R reagieren. Ein Antigen-spezifisches ELISA wurde unter Verwendung von 96-Well-Platten durchgeführt, die mit humanem Fc-huIL-4R beschichtet waren (100 µl von 5 µg/ml in PBS wurden zu jedem Well gegeben und bei 4°C (über Nacht) inkubiert. Die mit Antigen beschichteten Platten wurden dann gewaschen und vor der Verwendung mit Blockierungspuffer blockiert (1% BSA, 0,01% Tween-20 in PBS). Verdünnungen der Testseren wurden in den Wells für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, und dann wurden die Wells achtmal mit Assaypuffer gewaschen. Sekundärer Fc-spezifischer, mit Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper der Maus (1:2000 Verdünnung, Jackson Immuno-Research) wurde zugegeben und die Platten wurden für eine weitere Stunde inkubiert. Nach achtmaligem zusätzlichem Waschen mit Assaypuffer wurde eine Lösung aus o-Phenylendiamin-dihydrochlorid (OPD), die 25 mM Zitronensäure, 50 mM Na₂HPO₄, pH 5 und 0,03% frisch zugegebenes H₂O₂ enthielt, zugegeben. Die Reaktion wurde nach etwa 30 Minuten durch Zugabe von 100 µL 4N H₂SO₄ gestoppt. Die resultierenden Platten wurden bei 490 nm in einem Plattenleser ausgelesen, der die Untergrundausslesung bei 650 nm automatisch abzog. Die Ergebnisse wurden als optische Dichte gegen Verdünnung des Antiserums aufgetragen. Relative Antikörpertiter wurden durch die Menge bestimmt, mit der Serum verdünnt werden musste, bevor die optische Dichte unterhalb eines willkürlichen Werts fiel, von zum Beispiel 1 O. D.-Einheit.

[0106] Die Ergebnisse der Immunisierungsprotokolle sind in **Fig. 3** dargestellt. Injektion des Maus-Fc-IL-4R-Fusionsproteins allein in PBS durch dieses Protokoll induzierte nur in einer Maus (**Fig. 3B**) eine Antikörperantwort. Der Zusatz von CFA führte jedoch dazu, dass mehr Mäuse antworteten, aber die Titer waren annähernd die gleichen wie bei der antwortenden Maus, der Fc-IL4R-Fusionsprotein allein in PBS injiziert wurde (**Fig. 3C**). Co-Verabreichung von Maus-Fc-IL2-Hilfsstoff mit Fc-IL4R in PBS induzierte Antworten in allen Tieren, jedoch variierte die Menge an produziertem Antikörper in jedem Fall (**Fig. 3D**). Die Kombination aus CFA und dem Maus-Fc-IL2-Hilfsstoff zusammen (**Fig. 3A**) führte zu höheren Antikörpertitern als jedes Mittel allein (**Fig. 3C** und **Fig. 3D**). Co-Verabreichung des Maus-Fc-GMCSF-Hilfsstoffs in PBS induzierte die stärkste Immunantwort von allen Gruppen (**Fig. 3E**), einschließlich der Gruppe, die mit der Kombination von sowohl dem Fc-GMCSF-Hilfsstoffs als auch CFA (**Fig. 3F**) immunisiert wurde. Mit anderen Worten vermeidet der Maus-Fc-GMCSF-Hilfsstoff in PBS, wenn er mit dem Maus-Fc-IL4R-Antigen co-verabreicht wird, die Notwendigkeit, CFA zu verwenden. Es wird in Erwägung gezogen, dass ein solches Verfahren für die Verwendung bei Menschen besser geeignet wäre.

Beispiel 3. Wirkung einer Fc-GMCSF Hilfsstoffdosis auf Antikörper, die gegen das Krebsantigen PSMA in dem Fc-PSMA-Fusionsprotein produziert werden.

[0107] PSMA stellt gegenwärtig ein attraktives humanes, mit Tumor einhergehendes Zielantigen dar, aufgrund seiner eingeschränkten Verteilung in normalem Gewebe. PSMA wird derzeit in klinischen Studien als ein Kandidat für einen Tumorpfimpfstoff untersucht. In diesem Beispiel wurden die Immunisierungskraft des PSMA-Antigens in einem Fc-PSMA-Fusionsprotein untersucht.

[0108] Das Maus-Fc-PSMA-Fusionsprotein wurde wie in Beispiel 1 diskutiert hergestellt. Gruppen von Mäusen wurden subkutan 50 µg Maus-Fc-PSMA in PBS, zusammen mit variierenden Konzentrationen des Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins Fc-GMCSF, injiziert und dann 14 Tage später mittels intraperitonealer Injektion reimmunisiert. Antikörpertiter wurden mittels Fc-PSMA-Antigen-Capture-ELISA, wie in Beispiel 2 für das Fc-IL4R-Fusionsprotein beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse wurden in **Fig. 4** als Antikörpertiter (Verdünnung, bei der die OD auf 1 vermindert ist) gegen die Zeit nach der ersten Injektion aufgetragen.

[0109] In der Abwesenheit von Fc-GMCSF wiesen Mäuse Antikörpertiter gegen PSMA im Bereich von 1000 bis ungefähr 20.000 (**Fig. 4A**) auf. Co-Verabreichung von kaum mehr als 0,05 µg Fc-GMCSF führte jedoch zu Titern im Bereich von 30.000 bis 140.000 (**Fig. 4B**). Eine zehnfache Erhöhung von Fc-GMCSF stimulierte Antikörpertiter gegen dieses Krebsantigen noch weiter (**Fig. 4C** und **Fig. 4D**). Die höchste gegebene Dosis (5 µg des Fc-GMCSF-Fusionsprotein pro Maus) stellt noch immer nur etwa 2 µg GMCSF pro Injektion dar – eine Dosis ohne offensichtliche Wirkung auf die Mauhaut oder irgendwelche systemische Zeichen, dass das Tier immunisiert wurde (siehe, **Fig. 4D**). Darüber hinaus gab es, anders als mit CFA, keine offensichtliche Vergrößerung der Milz.

Beispiel 4. Wirkung des Fc-vermittelten Transports von PSMA auf die Antikörperantwort auf Immunisierung.

[0110] Die spezifischen Wirkungen der Fc-Komponente der Fc-Antigen- und Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine wurde untersucht, indem die induzierten Immunantworten in Mäusen, denen die Fusionsproteine, das nicht fusionierte Antigen oder Hilfsproteine oder Mischungen der vorhergehenden injiziert wurden, verglichen wurden.

Für diesen Zweck wurde das humane PSMA-System verwendet.

[0111] Unfusioniertes PSMA wurde durch proteolytischen Verdau von humanem Fc-PSMA-Fusionsprotein (Lo et al. (1998) PROTEIN ENGINEERING 11:495-500) mit Plasmin gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Freigesetztes Fc und unverdautes Fc-PSMA wurde mittels Adsorption an Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) entfernt.

[0112] Gruppen von Mäusen (n = 3) wurden eine einzelne subkutane Dosis von 50 µg PSMA entweder allein ([Fig. 5A](#)), oder in Kombination mit 0,2 µg freiem GMCSF ([Fig. 5B](#)) oder mit 0,5 µg Fc-GMCSF ([Fig. 5C](#)) (0,5 µg Fc-GMCSF enthält etwa 0,2 µg GMCSF) injiziert. In einem weiteren Satz an Mäusen wurde jeder Maus eine subkutan Dosis von 50 µg Maus-Fc-PSMA-Fusionsprotein allein ([Fig. 5D](#)), oder zusammen mit 0,2 µg freiem GMCSF ([Fig. 5E](#)) oder mit 0,5 µg Fc-GMCSF ([Fig. 5F](#)) injiziert. Alle Injektionsformulierungen waren in PBS ohne chemischen Hilfsstoff. Antikörper, die mit Maus-Fc-PSMA reagieren, wurden an Tag 14 nach Immunisierung gemessen.

[0113] Die Bedeutung der Fc-Komponente des Fc-Antigen-Fusionsprotein in dem Fc-PSMA-Fusionsprotein für die Immunisierungskraft von PSMA war auffallend, wenn Tieren PBS-Formulierungen ohne chemische Hilfsstoffe injiziert wurden. Es gab im Wesentlichen keine primäre Immunantwort auf das PSMA, das in PBS verabreicht wurde ([Fig. 5A](#)). Der Zusatz von GMCSF oder Fc-GMCSF bei der Immunisierung hatte sehr geringe Wirkung ([Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#)), außer einer schwachen Reaktion in einem Tier ([Fig. 5B](#)). Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, denen Fc-PSMA allein injiziert wurde, in allen Fällen starke primäre Immunantworten ([Fig. 5D](#)). Der Zusatz von freiem GMCSF zu Fc-PSMA erhöhte die Wirkung geringfügig ([Fig. 5E](#)), die Co-Verabreichung von sowohl Antigen als auch Cytokin als Fc-Fusionsproteine ergab jedoch den höchsten Spiegel an Antwort ([Fig. 5F](#)).

[0114] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kombination aus Fc-Antigen und Fc-Hilfsstoff insbesondere bei der Erzeugung einer Immunantwort von Nutzen ist und zeigt den offensichtlichen Nutzen der Co-Lokalisierung von Antigen und stimulierendem Cytokin in vivo, vermutlich auf den APCs.

Beispiel 5. Vergleich der Hilfsstoffwirkungen der Fusionsproteine Fc-GMCSF oder Fc-Flt3L

[0115] Es wurde gezeigt, dass der Ligand für Flt3, der im Fachgebiet auch als Flt3-Ligand (Flt3L) bezeichnet wird, eine kritische Rolle bei der Erzeugung und Reifung von dendritischen Zellen spielt (Soligo et al. (1998) BR. J. HAEMATOL. 101:352-63). Man nimmt an, dass dendritische Zellen, zusammen mit Makrophagenzellen des Gewebes, die wichtigsten APC sind. Studien an Mäusen haben gezeigt, dass tägliche Injektionen über 10 Tage die Anzahl und APC-Aktivität von dendritischen Zellen, die aus Lymphgewebe und Milz gewonnen werden können, erhöht und dass diese Zellen bei der Präsentation von Antigen gegenüber CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen äußerst wirkungsvoll sind. Man nimmt an, dass die Langerhans-Zellen der Haut eine Art der dendritischen Zelle darstellen, die nach Aufnahme und Wanderung zu den lokalen Lymphknoten Antigen präsentieren können. Da man annimmt, dass die meisten dendritischen Zellen nicht die Bandbreite an Fc-Rezeptoren exprimiert, die typischerweise auf Makrophagen gefunden werden (z. B. FcγRI), konnte nicht vorhergesagt werden, ob die co-lokalisierende Wirkung der Fc-Fusionsproteine diese APC-Linie betreffen würde.

[0116] Um zu untersuchen, ob Flt-3L als ein Hilfsstoff wirken könnte, wurden Gruppen von Mäusen Maus-Fc-PSMA und Maus-Fc-Flt3L anstelle der Verwendung von Maus-Fc-GMCSF-Fusionsprotein (einem potenten Stimulator von Makrophagen und Granulozyten) injiziert. In diesem Fall wurde erwartet, dass jegliche Hilfswirkung über Aktivierung und Aufnahme durch dendritische Zellen vermittelt würde, die schließlich zu einer Antikörperantwort auf PSMA führen würde. Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) zusammengefasst.

[0117] Diese Untersuchung deutet darauf hin, dass Maus-Fc-Flt3L ein wirkungsvoller Hilfsstoff ist, der anti-PSMA-Antikörper genauso gut, wenn nicht sogar besser als die gleiche Dosis Fc-GMCSF stimuliert. Die Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass eine Kombination aus Fc-Antigen und einem Fc-Hilfsstoff bei der Induzierung einer Immunantwort besonders wirksam sein kann. Die Ergebnisse zeigen auch, dass sowohl dendritische APC als auch Makrophagen-APC offensichtlich mit Fc-Antigen und Fc-Cytokin angesteuert werden können, was darauf hindeutet, dass mindestens eine Form des Fc-Rezeptors auf diesen Zellen vorkommt.

Beispiel 6. Immunantworten auf Fc-EpCAM und EpCAM--Fc-Fusionsproteine

[0118] Ein weiteres möglicherweise wichtiges, humanes Krebsantigen, EpCAM (das auch KSA und 17-1A-Antigen genannt wird) wurde als ein Fusionsprotein mit einer Maus-IgG2a-Fc-Region unter Verwendung

der in Beispiel 1 beschriebenen Plasmide und Verfahren hergestellt und wurde entweder allein oder in Kombination mit Fc-GMCSF als ein Hilfsstoff verabreicht. Mäusen wurde subkutan 10 µg Fc-EpCAM und 1 µg Fc-GMCSF in PBS injiziert und sie wurden nach 3 Wochen damit reimmunisiert. Kontrollmäuse erhielten kein Fc-GMCSF. Gegen EpCAM gerichtete Antikörpertiter wurden 7 Tage ([Fig. 7A](#)) und 14 Tage ([Fig. 7B](#)) nach der Reimmunisierung gemessen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fc-EpCAM, wenn es allein verabreicht wird, ein wirksames Immungen ist (offen Rauten), und dass Fc-GMCSF die Antwort auf dieses Antigen weiter verstärken kann (ausgefüllte Dreiecke).

[0119] Zusätzlich wurde EpCAM-Antigen in umgekehrter Orientierung bezogen auf das Fc-Fragment als EpCAM-muFc exprimiert (siehe Beispiel 1, [Fig. 1B](#)). Dieses Molekül wurde verwendet, um Ba1b/c-Mäuse mittels subkutaner Injektion zu immunisieren. Höhere Dosen an EpCAM-Fc-Fusionsprotein wurden verwendet (25 µg pro Dosis) und die Menge an Hilfsstoff (2,5 µg Fc-GMCSF) wurde ebenfalls erhöht. Gegen EpCAM gerichtete Antikörpertiter wurden 14 Tage ([Fig. 8A](#)) und 21 Tage ([Fig. 8B](#)) nach der Reimmunisierung gemessen. Das EpCAM-Fc-Fusionsprotein allein war in der Abwesenheit von Fc-GMCSF recht immunogen ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#), (offene Rauten)). Der Zusatz von Fc-Cytokin verbesserte Antikörpertiter um das 3fache ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#), (ausgefüllte Dreiecke)).

[0120] Um zu untersuchen, ob die Immunantwort gegen EpCAM Säugetiere vor Tumorzellen, die dieses Antigen exprimieren, schützen könnte, wurde nicht-immunisierten oder mit EpCAM-Fc-Fusionsprotein (und in einigen Fällen Fc-Cytokinen) immunisierten Mäusen 10⁵ CT26-Maus-Kolonkarzinomzellen, die mit humanem EpCAM transfiziert waren (Gillies et al.

[0121] (1998) J. IMMUNOL. 160:6195), in die Schwanzvene injiziert. Einundzwanzig Tage später wurden die Tiere geopfert und das Ausmaß an Lungenmetastasen wurde abgeschätzt durch (1) Stadienbestimmung bezüglich der Bedeckung der Lungenoberfläche; und (2) durch Wiegen der Lungen und deren Vergleich mit normalen Tierlungen, um den differentiellen Gewichtszuwachs, der der Tumormasse zugeschrieben werden kann, zu bestimmen. In Tabelle 1 zusammengefasste Ergebnisse zeigen, dass alle immunisierten Mäuse verglichen mit Kontrollmäusen eine statistisch signifikante Verminderungen bei Tumormetastasen zeigten, einschließlich von Tieren, die mit dem EpCAM-Fc-Fusionsprotein allein immunisiert wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung des Fc-EpCAM-Fusionsproteins als dem Antigen erreicht.

TABELLE 1

Behandlungsgruppe	metastatische Bewertung	mittl. Lungengewicht (mg)
Kontrolle	4, 4, 4, 1, 1	412+/-130
EpCAM-Fc	0, 0, 0, 0, 0	210+/-21
EpCAM-Fc + Fc-GM	0, 0, 0, 0, 0	240+/-19
EpCAM-Fc + Fc-IL2	0, 0, 0, 0, 0	230+/-19

[0122] Metastatische Bewertungen basierten auf der Oberflächenbedeckung der Lungen unter Verwendung der folgenden Einstufungen: 1 = 1 – 25% Bedeckung; 2 = 26 – 50% Bedeckung; 3 = 51 – 75% Bedeckung; und 4 = 76 – 100% Bedeckung.

Beispiel 7. Kombination von Antigen-Fc und Cytokin-Hilfsstoff in einem Einzelfusionsprotein

[0123] Das in Beispiel 6 beschriebene Protein EpCAM-Fc, stellt beispielhaft ein N-terminales Antigen dar, das als die Carboxylproteindomäne an eine Fc-Immunglobulinregion geknüpft ist. Dieses Protein, und andere wie dieses, können mit Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteinen, z. B. Fc-Cytokinen, co-verabreicht werden, um die Immunantwort auf das Antigen zu verstärken. Alternativ können das Antigen, die konstante Region der schweren Immunglobulinkette und das Hilfsprotein (zum Beispiel Cytokin) als ein Einzelfusionsprotein, zum Beispiel als ein EpCAM-Fc-GMCSF-Fusionsprotein hergestellt werden.

[0124] Das Expressionsplasmid für dieses Protein wurde unter Verwendung der murinen IgG2a-Fc und GM-CSF-Sequenzen konstruiert, so dass das Konstrukt in einem Mausmodell evaluiert werden konnte. Ein kleines Xba I- nach Sma I-Fragment, das die kodierenden Sequenzen Leader-EpCAM-Fc enthielt, wurde aus dem ursprünglichen EpCAM-Fc-Expressionsvektor (Beispiel 1) erhalten und in das große Sma I- nach Xba I-Fragment des Fc-GMCSF-Expressionsvektors ([Fig. 9](#)) ligiert.

[0125] Der resultierende Vektor pdCs-EpCAM-Fc-GMCSF wurde für transiente Expression unter Verwendung des Calciumphosphat-Fällungsverfahrens in 293-Zellen und für stabile Expression mittels Elektroporation in NS/O-Zellen eingeführt. Stabile Transfektanten wurden durch Kultivieren der Zellen in Methotrexat-haltigem Medium (0,1 µM) selektiert. Exprimierende Klone wurden mittels Fc-ELISA (siehe Beispiel 1) identifiziert und Produzenten mit hohen Spiegeln wurden in Kultur vermehrt. Das EpCAM-Fc-GMCSF-Protein wurde aus konditioniertem Medium durch Binden an und Elution von Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) gereinigt und strukturelle Integrität wurde mittels SDS-PAGE gefolgt von Reduktion mit 2-Mercaptoethanol analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Protein ein Molekulargewicht von etwa 90 kD aufwies, wie es für eine einkettige Fusion von EpCAM, Fc und GMCSF erwartet wurde.

[0126] Um die relative Immunisierungskraft des kombinierten Fusionsproteins zu vergleichen, wurden Mäusen subkutan äquivalente Dosen von EpCAM-Fc-GMCSF und den einzelnen Fusionsproteinen in Kombination: EpCAM-Fc und Fc-GMCSF injiziert. Die gleichen Injektionen wurden 14 Tage später gegeben und Serumproben wurden auf spezifische Antikörperreaktivität auf humanes EpCAM 7 Tage nach der Reimmunisierung untersucht. Die gleiche Vorgehensweise kann für andere Protein- oder Peptidantigene sowie für andere stimulatorische Cytokine wie IL-2, IL-12 und Flt3L verwendet werden.

Beispiel B. Immunisierung mit Fc Antigen mittels DNA-Injektion.

[0127] Die gleichen Expressionsvektoren, die für Transfektion und Produktion von Maus-Fc-EpCAM und EpCAM-Fc in Säugetierzellen (siehe Beispiel 1) verwendet wurden, wurden als „nackte“ Plasmid-DNA in den Muskel des Hinterlaufs von Ba1b/c-Mäusen injiziert. DNA wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml injiziert und es wurde eine Gesamtmenge von 100 µg entweder in PBS oder in einer Saccharoselösung mit 25 Gew.-% verabreicht. Injektionen wurden alle 3 Wochen für insgesamt 3 Injektionen wiederholt. Antikörperantworten wurden zu verschiedenen Zeiten gemessen und mittels ELISA unter Verwendung von mit humanem Fc-EpCAM beschichteten 96-Well-Platten für den Einfang und unter Verwendung eines HRP-konjugierten Fc-spezifischen polyklonalen anti-Maus-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch) zum Nachweis quantifiziert. Die in **Fig. 10** vorgestellten Daten stellen Antikörpertiter dar, die 14 Tage (**Fig. 10A**), 27 Tage (**Fig. 10B**), 55 Tage (**Fig. 10C**) und 69 Tage (**Fig. 10D**) nach Injektion gemessen wurden.

[0128] Die in **Fig. 10** vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass während des ersten Monats unter Verwendung beider Formulierungen geringe Titer an spezifischen anti-EpCAM-Antikörpern induziert wurden (**Fig. 10A** und **Fig. 10B**). Bis zum Tag 55 wurden viel höhere Titer erhalten (**Fig. 10C**) und noch höhere Spiegel bis zum Tag 69 (**Fig. 10D**). Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung von DNA-Injektion eines EpCAM-Fc exprimierenden Vektors erhalten, obwohl die Titer niedriger waren. Diese Daten zeigen, dass ein Antigen, das als ein Fusionsmolekül, das ein Proteinantigen und eine Immunglobulin-Fc-Region enthält, exprimiert wird, eine Immunantwort induzieren kann, wenn es durch Injektion von nackter DNA eingeführt wird, und dass anhaltende Antigenexposition bei den meisten Tieren zu verzögerten Antworten führt.

[0129] Zelluläre Immunantworten wurden untersucht, indem Splenozyten von Mäusen, die mit DNA geimpft oder mit Protein immunisiert wurden, (70 Tage nach Injektion) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fc-EpCAM-Protein in vitro stimuliert wurden. Die in **Fig. 11** vorgestellten Daten (oberes Panel) deuten auf eine proliferative Antwort (gemessen durch ³H-Thymidineinbau) auf Antigen in Tieren hin, die entweder mit Fc-EpCAM-Protein (Kreuze) oder DNA-Impfung mit CMV-Promotor-EpCAM-Fc (offene Kreise) oder CMV-Promotor-Fc-EpCAM (gefüllte Rauten) Expressionsvektoren immunisiert wurden. Die mit Protein immunisierten Tieren zeigten eine viel größere Antwort auf Antigen, sogar bei sehr geringen Dosen. Die Antworten von mit DNA geimpften Tieren (auch mit einer anderen Skala im unteren Panel der **Fig. 11** gezeigt) waren Dosis-abhängig, aber von geringerer Größenordnung als die mit Protein injizierten Mäuse. Diese Antworten waren für MHC-Klasse II beschränkte CD4⁺-T-Zellantworten charakteristisch.

[0130] Um auf cytotoxische Aktivität zu untersuchen (im Allgemeinen ein Indiz für auf MHC-Klasse I beschränkte T-Zellantworten) wurden Splenozytenkulturen aus mit DNA oder Protein immunisierten Mäusen für 5 Tage in der Gegenwart von etwa 10 U/ml IL-2 kultiviert. Die Effektorzellen waren die kultivierten Splenozyten und die Zielzellen waren entweder markierte humane EpCAM-exprimierende CT26-Kolonkarzinomzellen (syngeneisch für Ba1b/c-Mäuse) oder markierte parenterale (nicht transfizierte CT26-Zellen). Die Effektor- und Zielzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen vermischt und das Ausmaß der Lyse bestimmt. Der Wert von 100% Lyse wurde erreicht, indem die markierten Zielzellen in der Gegenwart von Detergens inkubiert wurden und die Menge an freigesetztem Marker gemessen wurde.

[0131] Die Ergebnisse werden in **Fig. 12** dargestellt, wobei **Fig. 12A** die Aktivität von Splenozyten gegen hu-

manes EpCAM exprimierende CT26-Zellen zeigt, während [Fig. 12B](#) die Aktivität von Splenozyten gegen parenterale CT26-Zellen zeigt. In beiden Figuren stellen die offenen Rauten Splenozyten dar, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit ein EpCAM-Konstrukt tragender DNA immunisiert wurden, offene Quadrate stellen Splenozyten dar, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit ein Fc-EpCAM-Fusionskonstrukt tragender DNA immunisiert wurden, offene Dreiecke stellen Splenozyten dar, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit ein EpCAM-Fc-Fusionskonstrukt tragender DNA immunisiert wurden, und Kreuze stellen Splenozyten dar, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit Fc-EpCAM-Fusionsprotein immunisiert wurden.

[0132] **Fig. 12** zeigt, dass, obwohl DNA-Impfung schwache cytotoxische Antworten gegen beide Zielzellen erzeugte, in den mit Protein immunisierten Mäusen eine deutlich höhere Cytotoxizität gesehen wurde. Sowohl die parenteralen CT26-Tumorzellen als auch die EpCAM exprimierenden CT26-Tumorzellen wurden in dem Assay getötet. Die gegen parenterale CT26-Zellen beobachtete Cytotoxizität tritt vielleicht auf, weil diese Zellen hohe Spiegel des EpCAM-Homologen der Maus exprimieren können, das auf dem Aminosäureniveau zu 81% mit dem humanen Protein identisch ist. Dennoch erzeugte Immunisierung mit Fc-EpCAM-Protein tatsächlich eine deutliche cytotoxische Aktivität gegen humanes EpCAM exprimierende CT26-Tumorzellen, wodurch die in Beispiel 6 beschriebene, wirksam vor Tumor schützende Aktivität erklärt wird.

Beispiel 9. Immunisierung mit einem Fc-Fusionsprotein, das eine Unterregion eines Protein-Krebsantigens enthält.

[0133] Obwohl einige vollständige Proteine vielleicht nicht als Antigene für eine Immuntherapie von Nutzen sind, können kleinere Unterregionen der Proteine sehr viel wirksamer sein. Zum Beispiel können Proteine Domänen enthalten, die posttranslational modifiziert werden, um sie weniger immunogen zu machen, wodurch Immunreaktivität auf die tatsächlichen Polypeptidbestandteile vermindert wird. Große Proteine können Antikörper induzieren, die nur mit Nicht-Polypeptidteilen des Antigens reagieren und die keine antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) vermitteln, ein potenziell wichtiger Bestandteil der Anti-Tumor-Immunantworten. Ein gutes Beispiel für diese Situation wird durch das humane Melanomspezifische Chondroitinsulfat-Proteoglykan-(MCSP)Antigen, das auf nahezu allen Melanomen sowie einigen Arten von Gehirnkrebs exprimiert wird, beispielhaft erläutert. Dieses Protein ist stark glykosyliert und wird weiter durch Bindung von mehreren Glukosaminoglykanketten modifiziert. Ein als 9.2.27 bekannter Antikörper (Bumol et al. (1982) PROC. NATL. ACAD. SCI. 79:1245-1249) bindet dieses Protein mit hoher Affinität, vermittelt aber keinerlei Effektorfunktion, entweder ADCC oder Komplement vermittelte Cytotoxizität (CDC). Sogar teilweise humanisierte (chimäre) Formen dieses Antikörpers versagen bei der Vermittlung von derartigen Aktivitäten.

[0134] Um stärker fokussierte Antworten hervorzurufen, um Zielregionen dieses großen Moleküls optimaler anzusteuern, wurden putative Glykanbindungsstellen in der Proteinsequenz identifiziert. (Pluske et al. (1996) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 93:9710-9715). Es wurde eine Unterregion nicht weit von der Zelloberflächenmembran-überspannenden Sequenz und in einiger Entfernung von den Glykanbindungsstellen gewählt.

[0135] Die Peptidsequenz:

QGATLRDPTVLDAGELANRTGVSVPFRLLLEGRHGRVVRVPRARTEPGGSQLVEQFT QQDLEDGRLGLEVGRPEGRAPGPGD (SEQ ID NO: 21) wurde revers translatiert, die resultierende DNA-Sequenz chemisch synthetisiert und in den pdCs-Fc-X-Expressionsvektor unter Verwendung der gleichen Restriktionsstellen, die in den früheren Beispielen verwendet wurden, ligiert. Eine Translationsstopstelle wurde am 3'-Ende direkt nach der für die letzte Aminosäure kodierenden Sequenz zugefügt, gefolgt von einer einmal vorhandenen Xho I-Stelle. Das fertige Expressionsplasmid wurde in NS/0-Myelomzellen elektroporiert und stabile Transfektanten, die das gewünschte Protein exprimieren, wurden wie in Beispiel 1 beschrieben erhalten.

[0136] Fc-MCSP-Protein wurde aus Kulturüberständen unter Verwendung von Protein A Sepharose-Chromatographie (Repligen, Needham, MA) gereinigt. Antikörpertiter wurden in Ba1b/c-Mäusen gemessen, die subkutan mit 50 µg Fc-MCSP-Fusionsprotein in PBS entweder allein oder in Kombination mit 5 µg Fc-GMCSF als einem Hilfsstoff immunisiert wurden. Die Ergebnisse sind in [Fig. 13](#) dargestellt. Die ausgefüllten Rauten bedeuten Antikörpertiter in normalem Serum, die offenen Quadrate bedeuten Antikörpertiter im Serum von Mäusen, die mit Fc-MCSP-Fusionsprotein immunisiert wurden, und die ausgefüllten Dreiecke bedeuten Antikörpertiter in einem Serum von Mäusen, die mit Fc-MCSP und einem Fc-GMCSF-Hilfsstoff immunisiert wurden.

[0137] Spezifische Immunantworten auf diese Unterregion von MCSP wurden bis zum Tag 14 nachgewiesen und stiegen deutlich nach einer Auffrischimmunisierung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit sowohl Fc-GMCSF als auch Fc-MCSP immunisierte Mäuse höhere Antikörpertiter gegen MCSP (ausgefüllte Dreiecke) stimulierten, als allein mit Fc-MCSP immunisierte Mäuse (offene Quadrate).

Beispiel 10: Immunisierung mit einem Fc-Fusionsprotein, enthaltend ein virales Antigen

[0138] Entwicklung eines wirksamen Impfstoffs gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV), das Virus, das AIDS verursacht, ist eines der wichtigsten Ziele in der Impfstoffforschung. In letzter Zeit haben einige Berichte darauf hingedeutet, dass bestimmte Eigenschaften der Virushülle dazu dienen, die Immunantwort durch einen Trick dazu zu bringen, auf irrelevante Epitope zu antworten, wodurch die wichtigen und potenziell neutralisierenden Regionen des Viruspartikels maskiert werden. Diese umfassen die Gegenwart von hoch immunodominanten, antigenen Regionen, die als Köder dienen und extensive Glykosylierung, die die Immunisierungskraft von wichtigen Epitopen physikalisch maskiert und vermindert (Wyatt et al. (1998) NATURE 393:705-11).

[0139] Ein möglicher Weg, den Ködermechanismus zu umgehen, ist, kleine Regionen des Virushüllgens zu exprimieren, um immundominante Antworten, die nicht schützen, zu vermeiden und eine neutralisierende Antwort zu induzieren. Ein Problem mit kleinen Subunit-Impfstoffen ist die verminderte Immunisierungskraft entweder als ein synthetisches Peptid oder ein kleines Protein. Eine Vorgehensweise war, die Proteine oder Peptide an immunogene Trägerproteine zu koppeln, wie z. B. Napschnecken-Hämocyanin (KLH). Dies induziert eine starke Antwort auch auf KLH, aufgrund des Proteins oder Peptids. Eine weitere Vorgehensweise ist die Herstellung eines Fusionsproteins mit Fc wie in Beispiel 1 beschrieben für eine Unterregion von, zum Beispiel, der Ektodomäne von gp41 (der Ankerdomäne der viralen Hülle, gp160). Anders als andere Träger wird die Immunglobulinregion als „eigen“ gesehen, wodurch jegliche immundominanten Effekte minimiert werden.

[0140] Das Fc-gp41pep626-Fusionskonstrukt enthielt ein Polypeptid aus 44 Aminosäuren, fusioniert an den Carboxyterminus einer Immunglobulin-Fc-Region der Maus. Die Sequenz des HIV-Stamms IIIB in dieser Region enthält ein Signal für N-verknüpfte Glykosylierung, so dass das Fc-gp41pep626-Fusionsprotein, das entweder in 293-Zellen mittels transienter Expression oder in NS/0-Myelomzellen mittels stabiler Transfektion produziert wurde, einen höheren Grad an Variation bei der Beweglichkeit auf SDS-PAGE-Analyse zeigte, wodurch auf die Heterogenität im Ausmaß der Glykosylierung hingedeutet wurde.

[0141] Trotz der Tatsache, dass dieses virale Antigen recht klein ist (eine Länge von 44 Aminosäuren) und heterogen glykosyliert war, war es möglich, eine Immunantwort in Ba1b/c-Mäusen (siehe **Fig. 14**) hervorzurufen. In diesem Fall wurden Gruppen von fünf Mäusen intradermal 25 µg Fc-gp41pep626 an Tag 1 und zwei weitere Male im Abstand von zwei Wochen, entweder allein (leere Rauten) oder in Kombination mit 2,5 µg des Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteins Fc-GMCSF (offene Quadrate) oder Fc-IL2 (ausgefüllte Dreiecke), injiziert. **Fig. 14A** und **Fig. 14B** stellen Antikörpertiter dar, die 7 bzw. 33 Tage nach einer zweiten Auffrischimpfung erreicht wurden.

[0142] Die Immunantworten waren abhängiger von der Co-Verabreichung der Fc-Cytokine und es dauerte länger, bis ein hoher Titer erreicht wurde. Es wird in Erwägung gezogen, dass stärkere Immunantworten unter Verwendung von Modifizierungen dieser Sequenz hervorgerufen werden könnten, die das Glykosylierungssignal nicht enthält (tatsächlich kodieren viele Stämme nicht für diese Stelle), oder indem die Kohlenhydratseitenketten enzymatisch *in vitro* entfernt werden.

Beispiel 11: Hilfsstoffaktivität eines Fc-Fusionsproteins, enthaltend die extrazelluläre Domäne eines Zelloberflächenmoleküls

[0143] Um Fc-Hilfsstoff-Fusionsproteine zu konstruieren, ist es manchmal von Nutzen, an das Fc der extrazellulären Domäne eines Proteins, das membrangebunden sein kann, zu fusionieren. Zum Beispiel wird ein CD40-Ligand (CD40L) an den N-Terminus des C-Terminus von Fc fusioniert. Optional wird ein Linker verwendet.

[0144] CD40L ist von Nutzen, da sein Rezeptor, CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert wird und an der Stimulierung von B-Zellen durch T-Zellen beteiligt ist. Wie der Tumornekrosefaktor ist CD40L ein Trimer, das Dimerisierung oder Trimerisierung seines Rezeptors auf einer Zelloberfläche verursacht. Als Folge werden intrazelluläre Rezeptordomäne in Kontakt gebracht und daraus folgt Signaltransduktion. Ebenso wie TNF kann CD40L membrangebunden sein, kann aber auch von der Zelloberfläche abgespalten werden und wie ein Cytokin wirken.

[0145] Ein Fc-CD40L-Fusionsprotein wird Tieren mit einem Fc-Antigen-Fusionsprotein gemeinsam verabreicht. In Kontrollexperimenten werden Fc-CD40L-Protein und das Fc-Antigen-Protein verschiedenen Reihen von Tieren verabreicht. Es wird in Betracht gezogen, dass Tiere, denen beide Fusionsproteine injiziert wurden, einen höheren Antikörpertiter produzieren als Tiere, denen jedes Fusionsprotein einzeln injiziert wurde.

[0146] Alternativ wird ein einzelnes Fc-Fusionsprotein, das sowohl ein Antigen als auch eine CD40L-Einheit enthält, mit optionalen Linker (L) zwischen dem Fc, CD40L und den Antigeneinheiten verwendet. Das Fusionsprotein kann die N-terminale nach C-terminale Reihenfolge Fc-(L)-Antigen-(L)-CD40L, FC-(L)-CD40L-(L)-Antigen, Antigen(L)-CD40L-(L)-Fc, CD40L-(L)-Antigen-(L)-Fc, Antigen-(L)-Fc-(L)-CD40L oder CD40L-Fc-(L)-Antigen-(L) sein. Das Fusionsprotein, das Fc, das Antigen und CD40L enthält, wird Tieren injiziert und dann werden Antikörpertiter gemessen. Es wird in Erwägung gezogen, dass Antikörpertiter, die durch Injektion des Fusionsproteins mit sowohl CD40L als auch Antigen erzeugt wurden, höher sind als die Titer, die durch Injektion von Fusionsproteinen erhalten werden, die nur Fc und Antigen oder Fc und CD40L enthalten.

[0147] In den oben genannten Verabreichungen der Fusionsproteine wird Tieren die Injektion intravenös, subkutan oder durch andere geeignete Arten der Verabreichung verabreicht. Die Zeiten zwischen der ersten Verabreichungen und den Auffrischimpfungen von Antigenen und/oder Hilfsstoffen und die Messung der Antikörpertiter sind wie in den vorherigen Beispielen beschrieben. Alternativ werden Standarddosierungs- und Assayschemata verwendet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Gillies, Stephen D.
 Lo, Kin-Ming
 Wesolowski, John
 Lexigen Pharmaceuticals Corp.

<120> Fc-Fusionsproteine zur Verstärkung der Immunisierungskraft von
 Protein- und Peptidantigenen

<130> LEX-007PC

<140>
 <141>

<150> US 60/144,965
 <151> 1999-07-21

<160> 22

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: IL-4R-Primer

<400> 1
 gtccccgggta tgaaggtctt gcaggagc 28

<210> 2
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: IL-4R-Primer

<400> 2
 cccctcgagc tagtgctgct cgaagggtc cctg 34

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PSMA-Primer

<400> 3
 aagcttaaat cctccaatga agc 23

<210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PSMA-Primer

<400> 4
 ctcgagttag gctacttcac tcaaag 26

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EpCAM-Primer

<400> 5
 ccccgggtaa acaggaagaa tgtgtctgtg 30

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EpCAM-Primer

<400> 6
 ctcgagtcac ttttagaccct gcattgag 28

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EpCAM-Primer

<400> 7
 tctagagcag catggcgccc ccgc 24

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EpCAM-Primer

<400> 8
 ccttaagcac cctgcattga gaattcag 28

<210> 9
 <211> 148
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA, kodierend für
 Aminosäurereste 626 - 669 von HIV IIIB gp41

<400> 9

cccgggatcc ctgatccact ccctgatcga ggaatcccag aaccagcaag agaagaacga 60
gcaggagctg ctggagctcg acaagtgggc ctccctgtgg aactggttca acatcaccaa 120
ttggctgtgg tacatcaagt gactcgag 148

<210> 10

<211> 44

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Fusioniertes
Polypeptid vom pdC-muFC-Vektor

<400> 10

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
1 5 10 15

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
20 25 30

Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
35 40

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
Maus-IL2

<400> 11

ggcccgggta aagcacccac ttcaagctcc 30

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
Maus-IL2

<400> 12

ccctcgagtt attgagggct tgttg 25

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
Maus-GMCSP

<400> 13

cccgggaaaa gcacccgccc gctcaccc 28

<210> 14

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
 Maus-GMCSF

<400> 14
 ctcgagtcac ttttggcttg gttttttgc 29

<210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
 Maus-Flt3-Ligand

<400> 15
 caagcttaca cctgactggt acttcagc 28

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
 Maus-Flt3-Ligand

<400> 16
 ctcgagtcaa ggctctggga gctccgtggc 30

<210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
 Maus-IL-12p35

<400> 17
 ccccggttag ggtcattcca gtctctgg 28

<210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für
 Maus-IL-12p35

<400> 18
 ctcgagtcag gcggagctca gatagc 26

<210> 19
 <211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Maus-IL12 p40

<400> 19

tctagaccat gtgtcctcag aagctaac 28

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für Maus-IL12 p40

<400> 20

ctcgagctag gatcggaccc tgcag 25

<210> 21

<211> 83

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: MSCP-Peptid

<400> 21

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

Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
20 25 30

Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly
35 40 45

Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly
50 55 60

Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro
65 70 75 80

Ala Gly Asp

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligodesoxynucleotid, das als ein Adjuvans verwendet werden kann

<400> 22

tccatgacgt tccatgacgtt 20

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zum Hervorrufen einer verstärkten Immunantwort gegen ein Peptid- oder Proteinan-

tigen in einem Säugetier, enthaltend

(i) ein Fusionsprotein, dem die variable Domäne der schweren Immunglobulinkette fehlt und das eine konstante Region einer schweren Immunglobulinkette, die durch eine Polypeptidbindung mit dem Antigen verknüpft ist, enthält, und

(ii) ein Fusionsprotein, dem die variable Domäne der schweren Immunglobulinkette fehlt und das eine konstante Region einer schweren Immunglobulinkette, die durch eine Polypeptidbindung mit einem Hilfsprotein verknüpft ist, enthält;

wobei diese konstanten Regionen des Immunglobulins von der gleichen Spezies abstammen und an einen Fc-Rezeptor binden können.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, enthaltend Sequenzen der schweren konstanten Region von humanem Immunglobulin.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Hilfsstoff ein Cytokin ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Cytokin ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, TNF und GM-CSF.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Cytokin GM-CSF ist.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1-5, wobei das Antigen aus der Gruppe bestehend aus Prostata-spezifischem Membranantigen (PSMA), einer Ektodomäne eines Cytokinrezeptors, einem viralen Protein und einem Krebs-spezifischen Antigen ausgewählt wird.

7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1-6, wobei jede konstante Region der schweren Immunglobulinkette dieser Fusionsproteine eine Gelenkregion enthält.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1-7, wobei jede konstante Region der schweren Immunglobulinkette dieser Fusionsproteine eine CH2- und eine CH3-Domäne enthält.

9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1-8, wobei der Immunglobulinteil von jedem Fusionsprotein Fc ist.

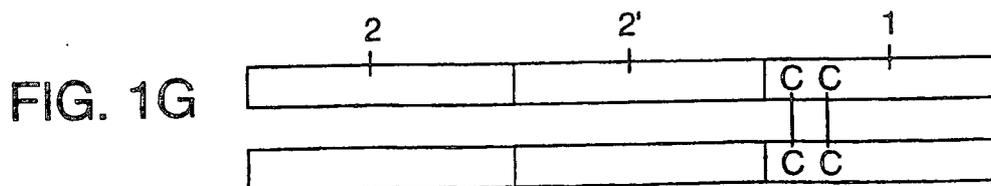
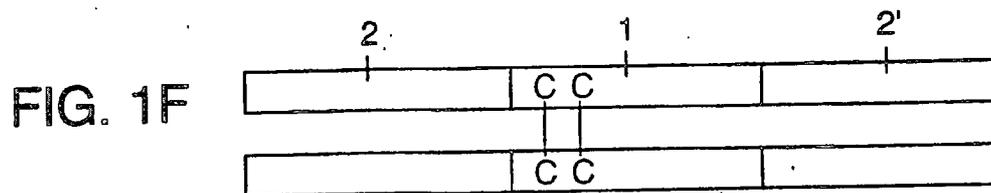
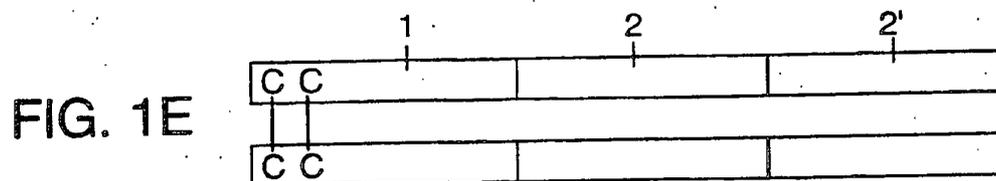
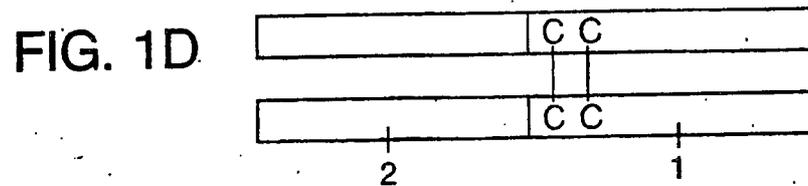
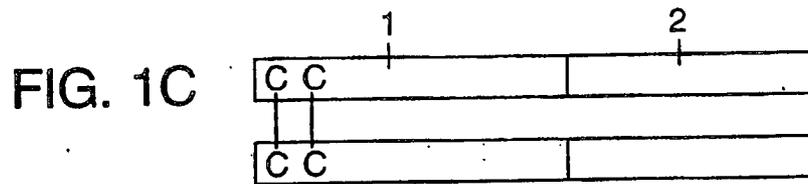
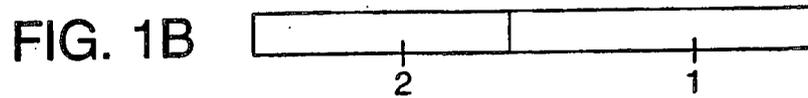
10. Verwendung einer Zusammensetzung wie in einem der Ansprüche 1-10 definiert, zur Herstellung eines Impfstoffs zum Hervorrufen einer verstärkten Immunantwort in einem Säugetier gegen ein vorgewähltes Antigen, verwendet in Form eines Antigen-Fusionsproteins der Zusammensetzung.

11. Verwendung nach Anspruch 11, wobei diese Immunantwort stärker ist, als wenn das Antigen-Fusionsprotein ohne das Hilfsfusionsprotein der Zusammensetzung verabreicht wird.

12. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Fusionsproteine gleichzeitig verabreicht werden.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



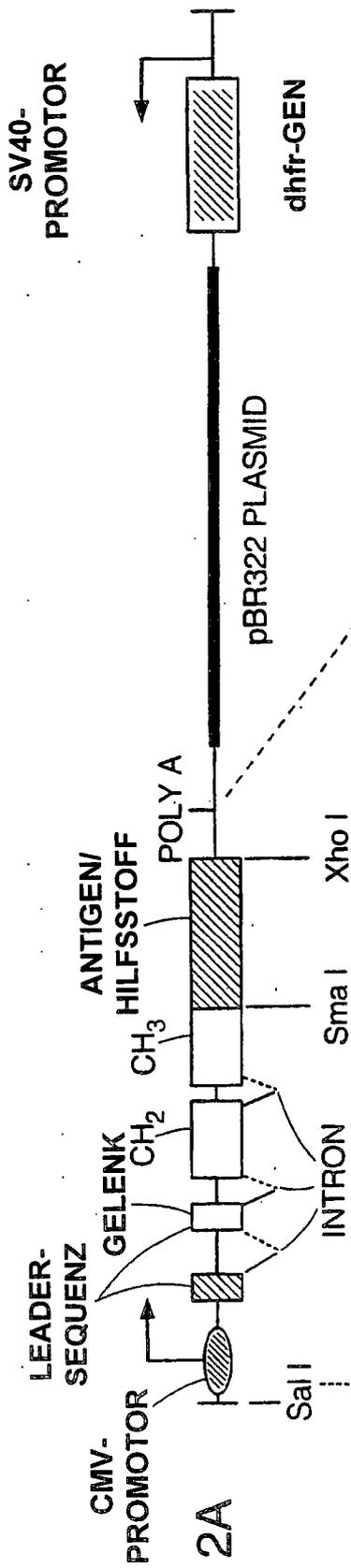


FIG. 2A

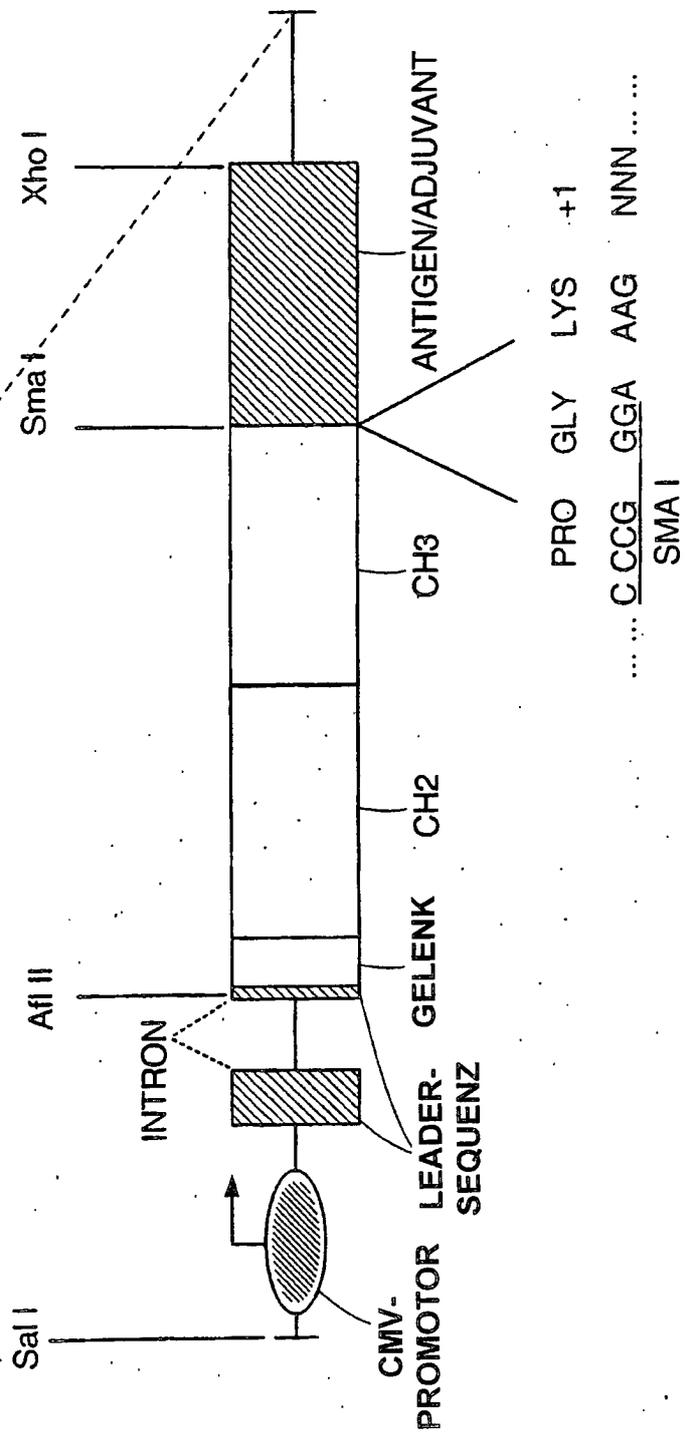
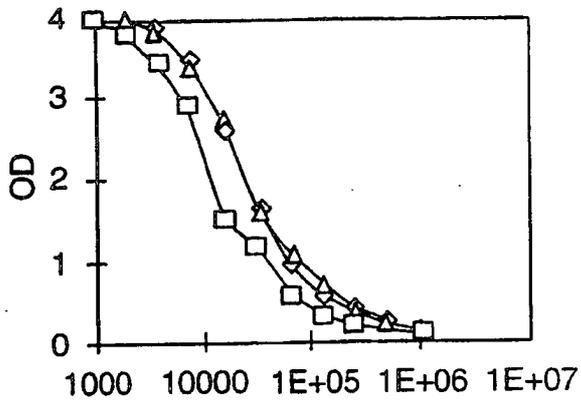
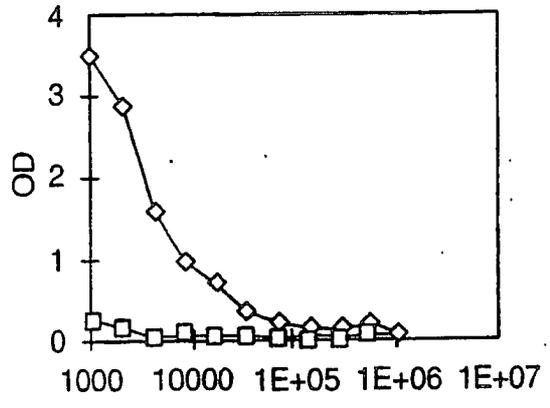


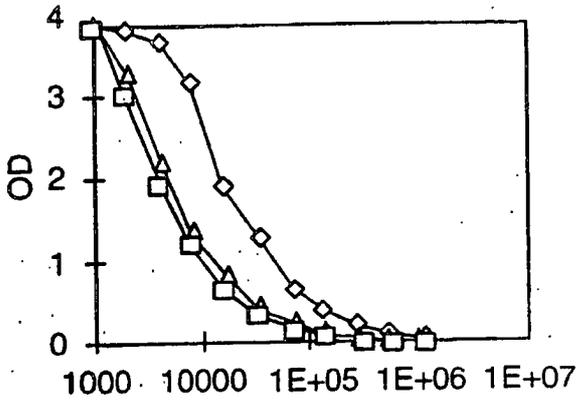
FIG. 2B



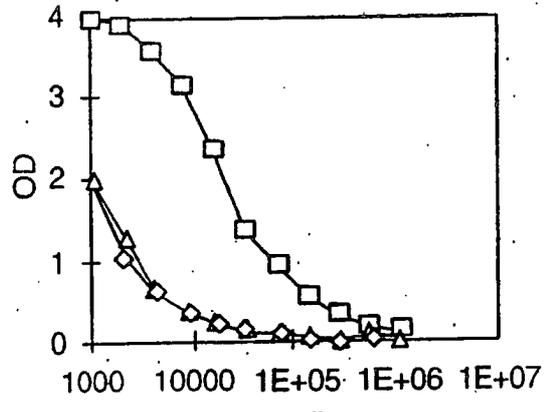
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3A



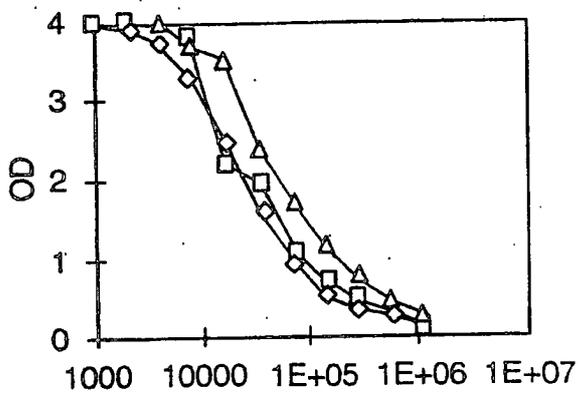
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3B



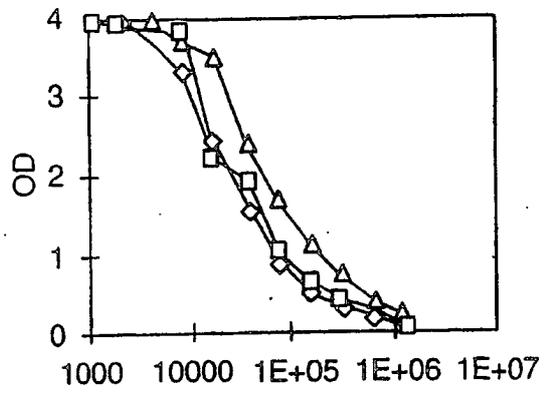
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3C



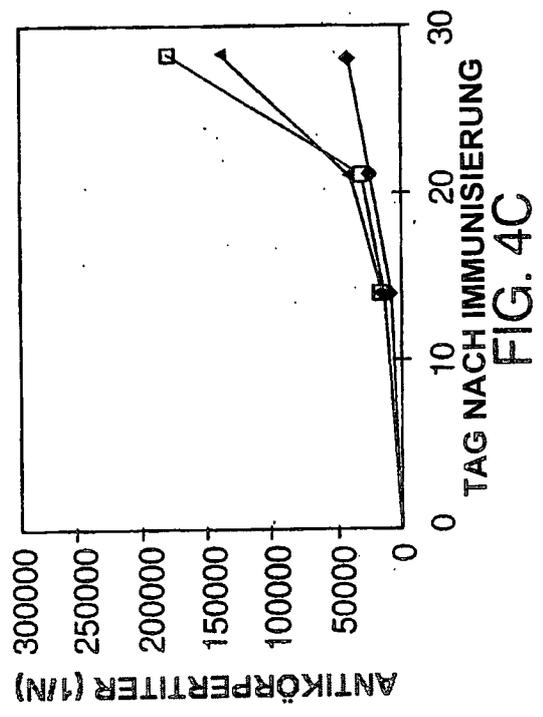
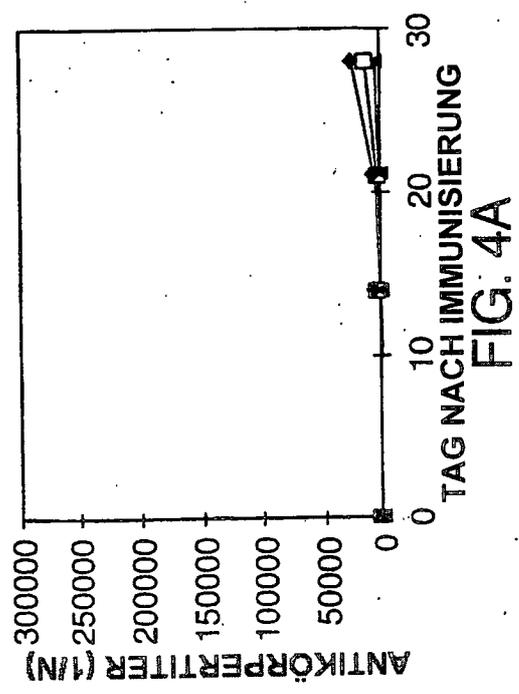
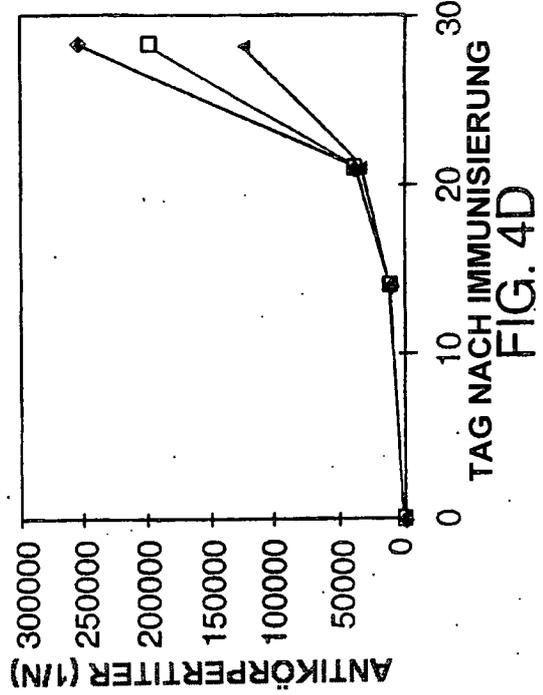
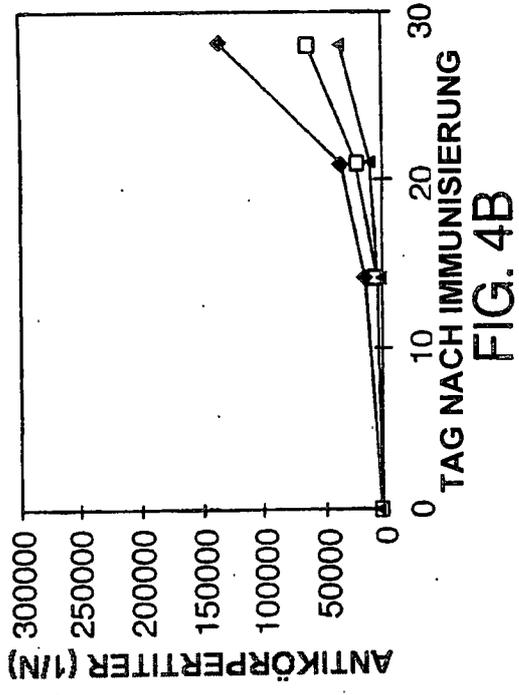
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3D

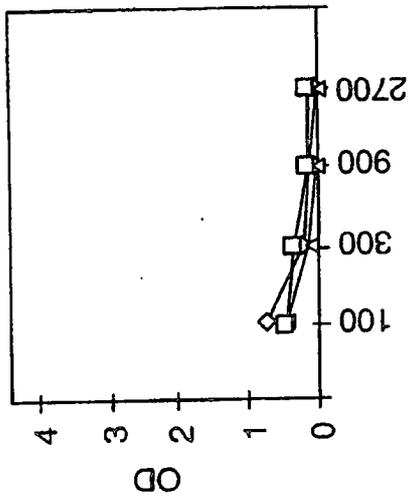


SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3E

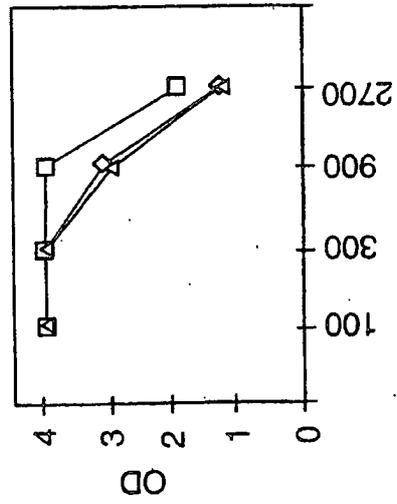


SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 3F

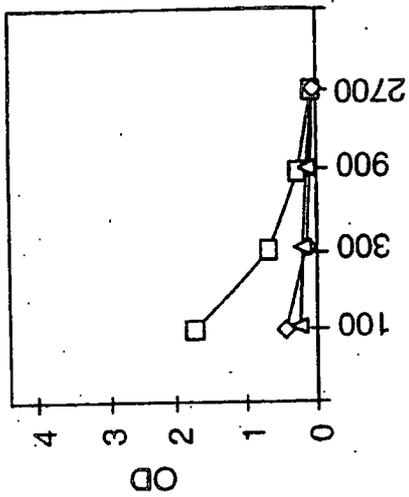




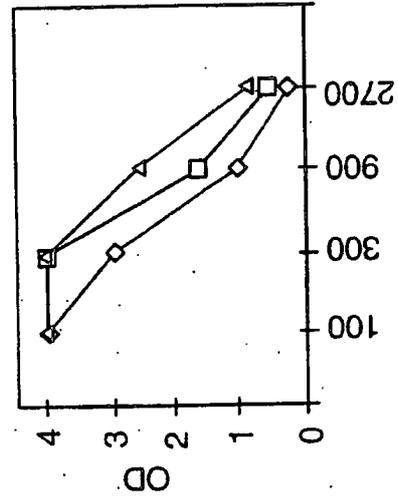
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5C



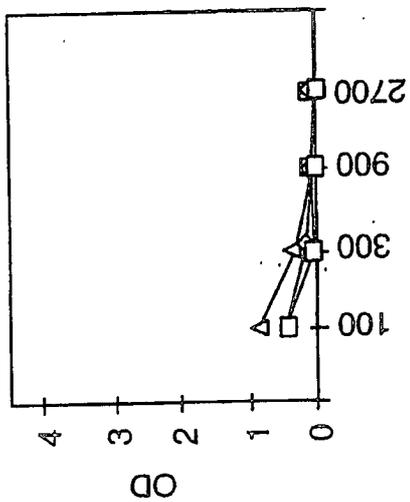
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5F



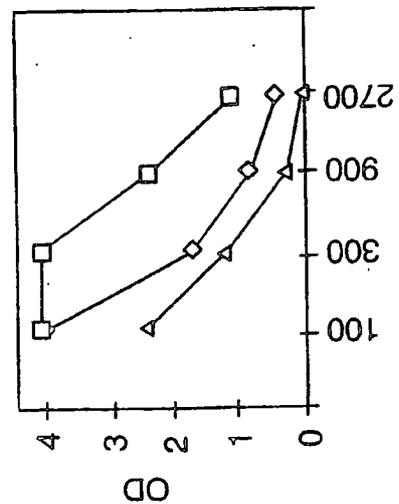
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5B



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5E



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5A



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 5D

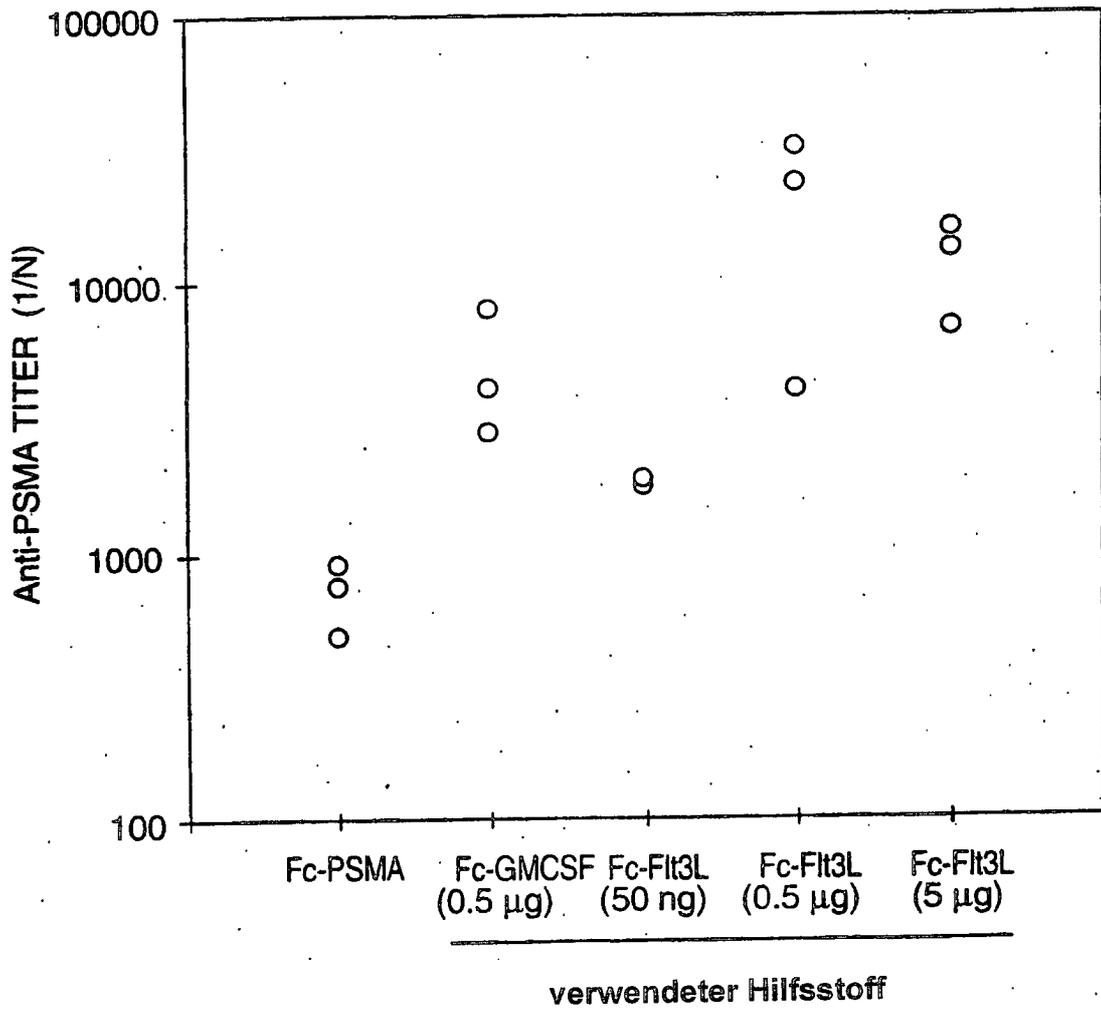
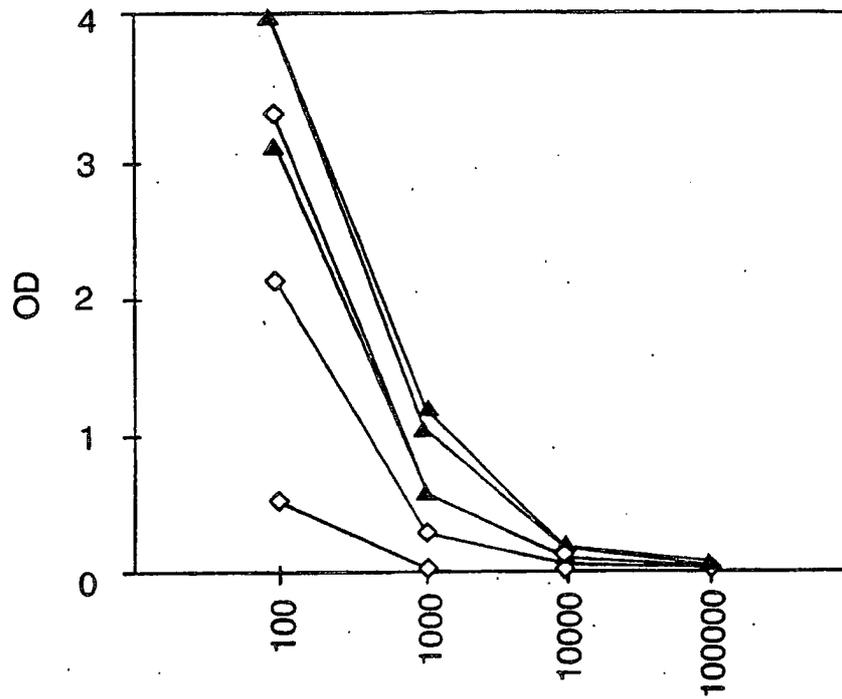
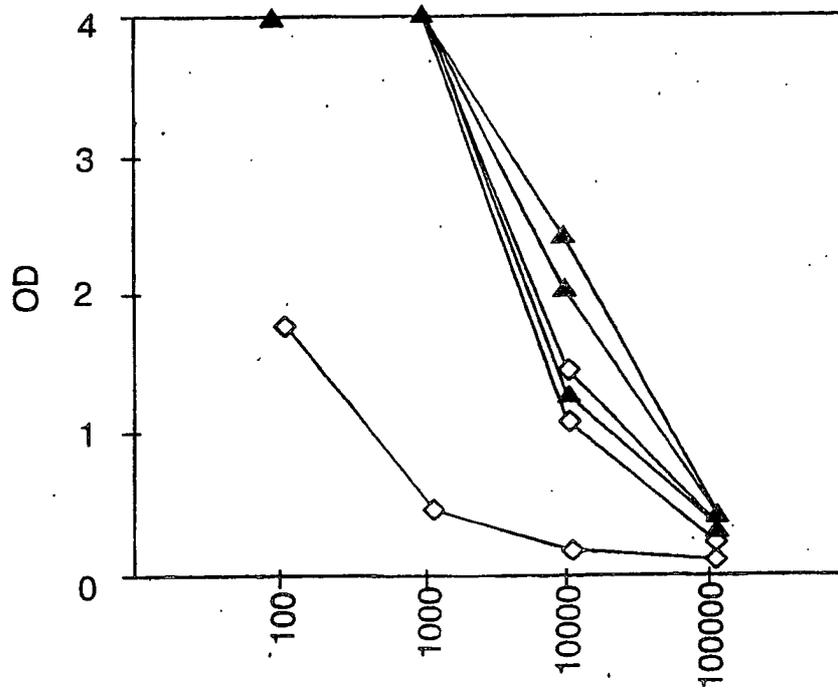


FIG. 6



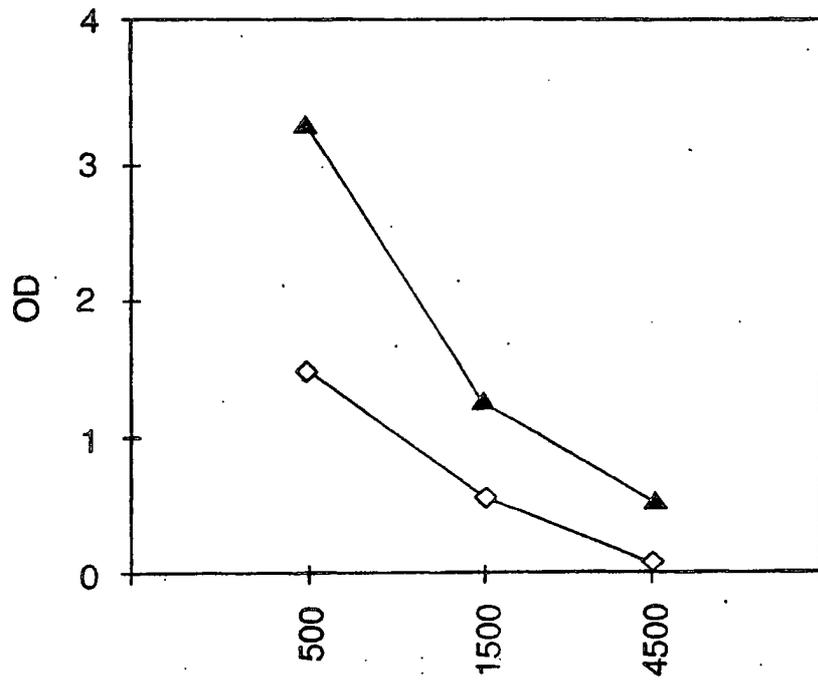
SERUMVERDÜNNUNG

FIG. 7A

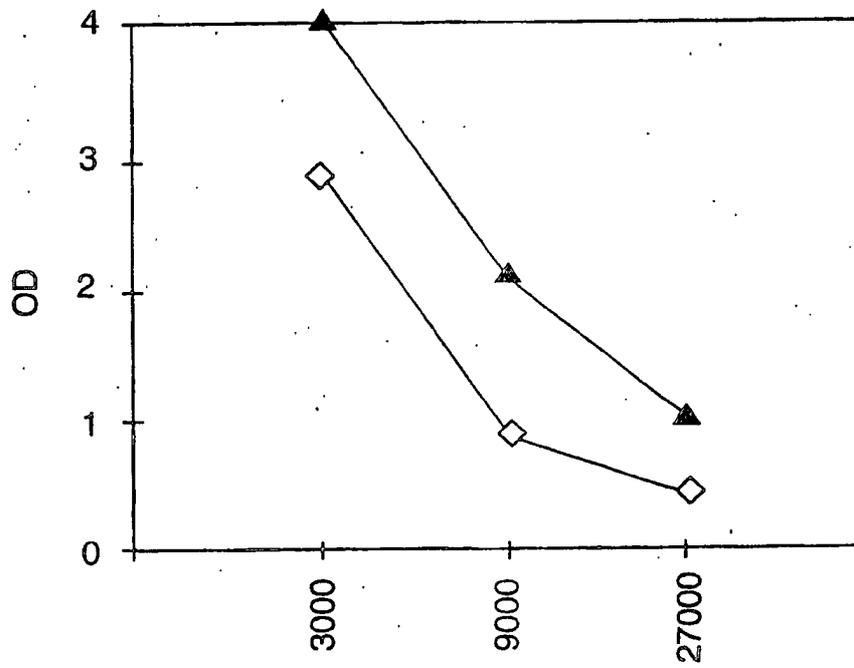


SERUMVERDÜNNUNG

FIG. 7b



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 8A



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 8B

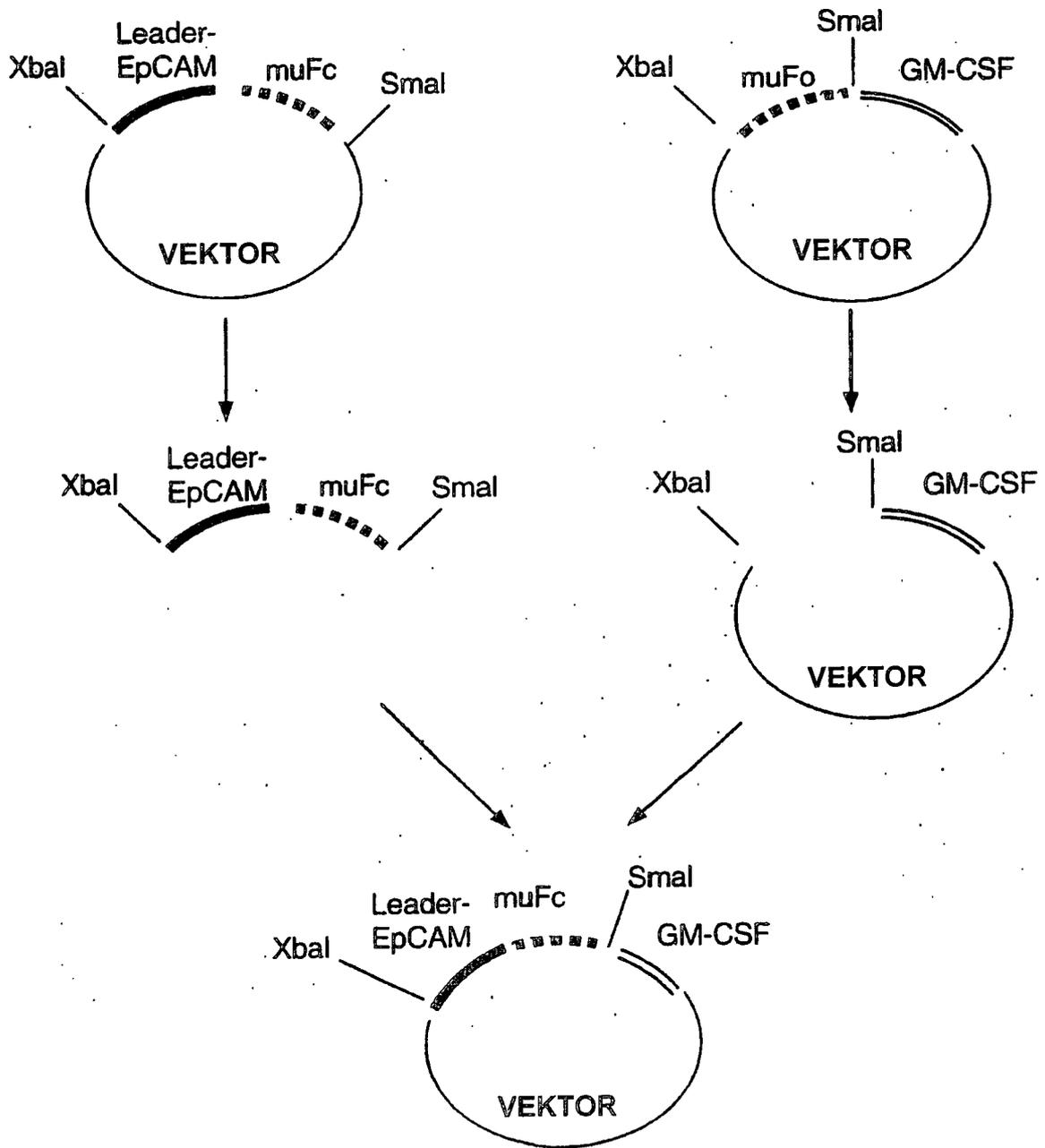
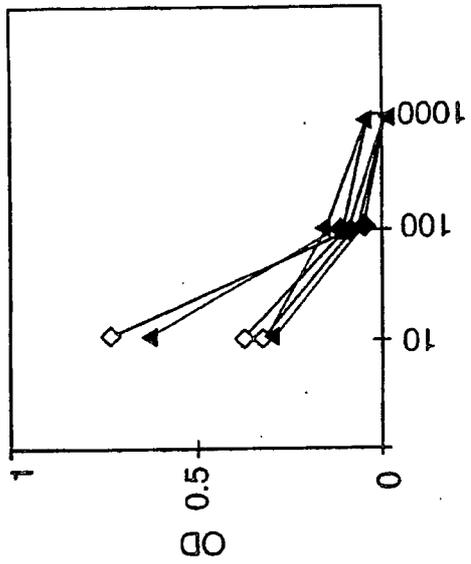
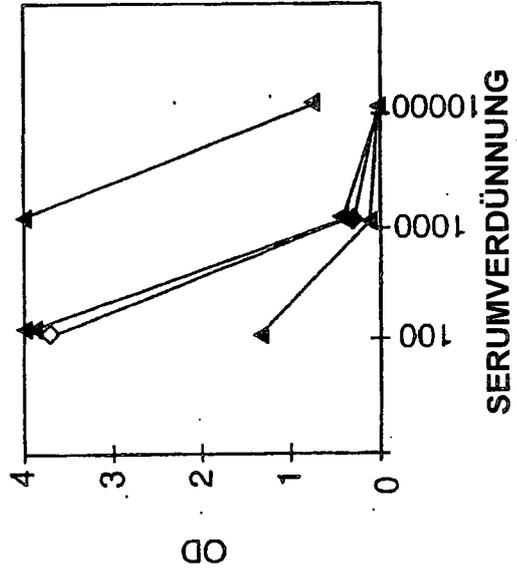


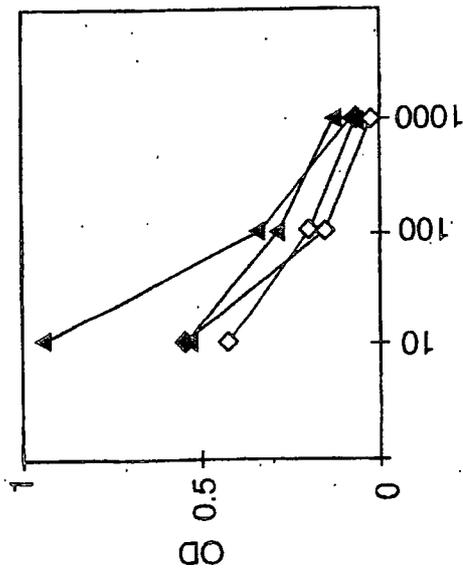
FIG. 9



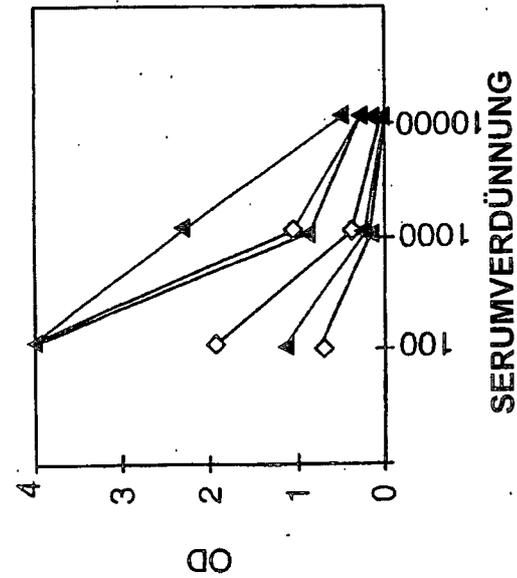
SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 10B



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 10D



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 10A



SERUMVERDÜNNUNG
FIG. 10C

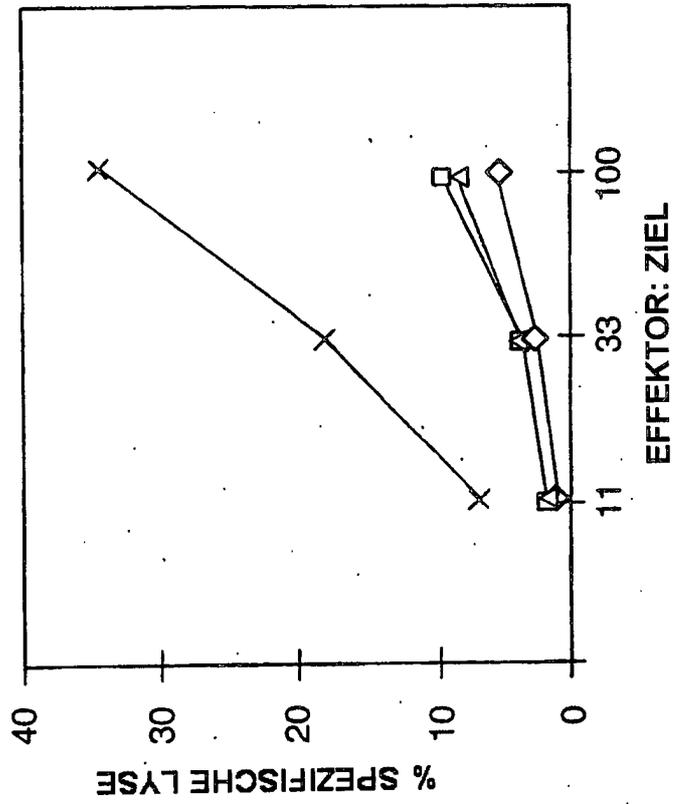


FIG. 12B

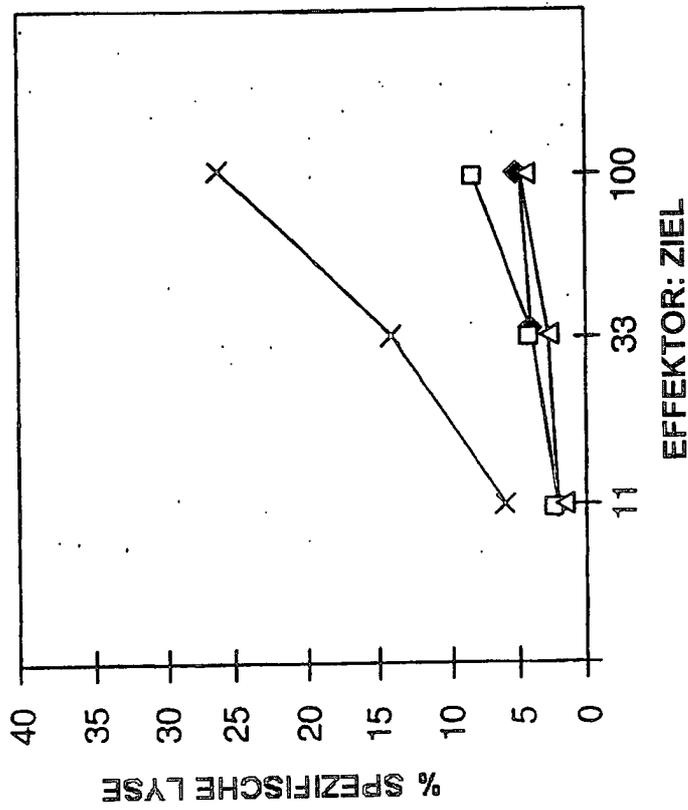


FIG. 12A

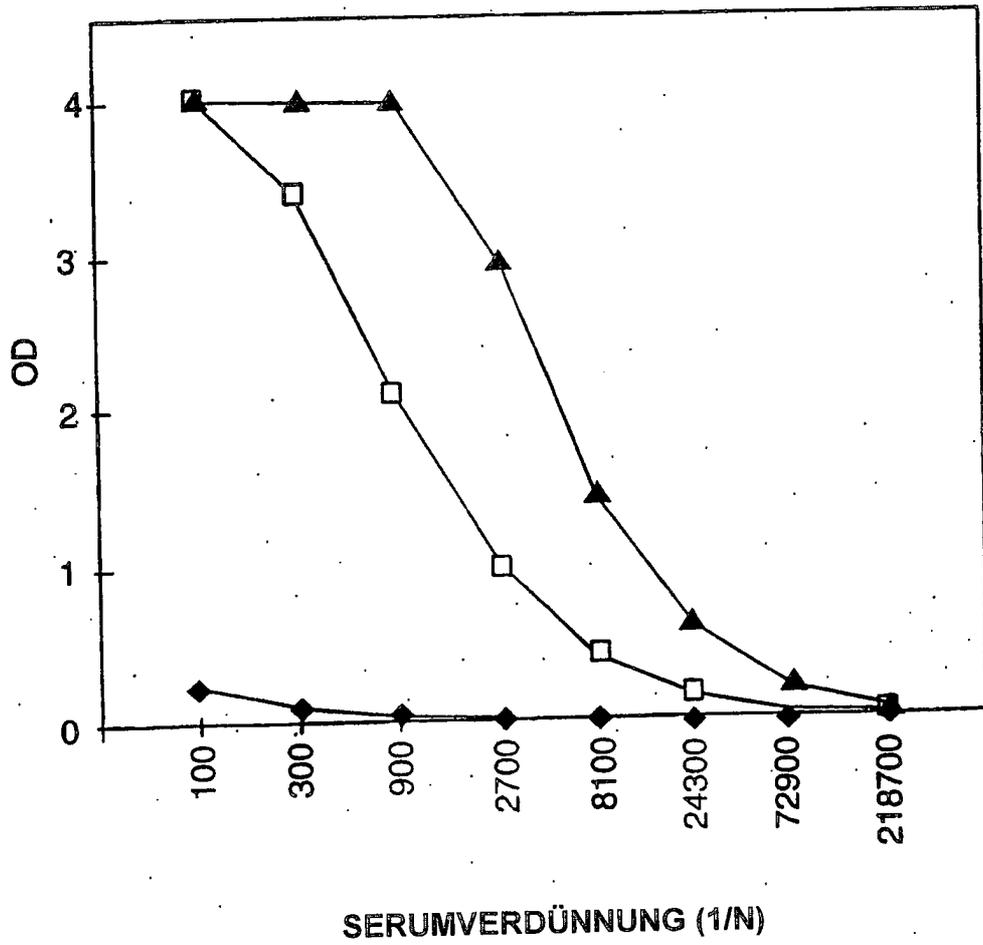


FIG. 13

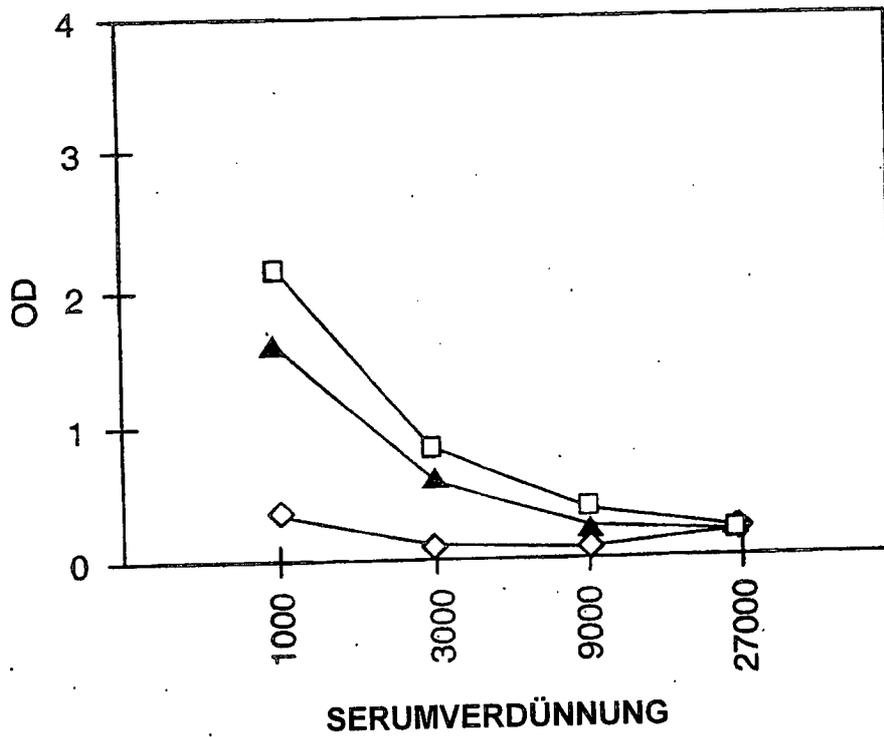


FIG. 14A

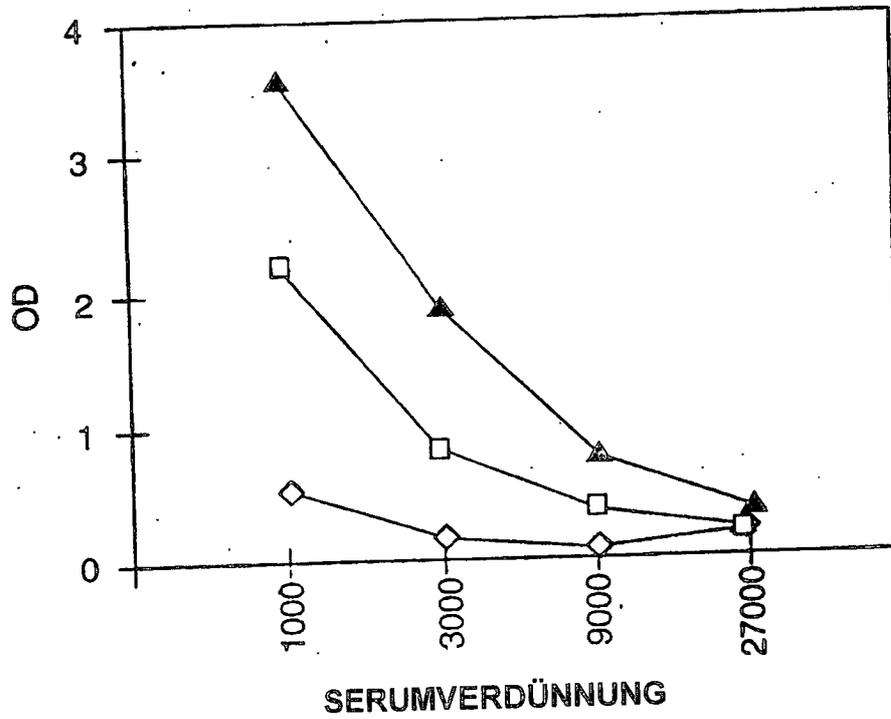


FIG. 14B