



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 486 T2** 2008.06.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 035 865 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 486.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/07721**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 966 601.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/027958**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **10.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.09.2007**

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

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/21** (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

RM970743 01.12.1997 IT

(73) Patentinhaber:

Istituto Superiore di Sanita, Rom/Roma, IT

(74) Vertreter:

Jones Day Rechtsanwälte Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

ENSOLI, Barbara, I-00141 Rome, IT

(54) Bezeichnung: **HIV-1 TAT ODER DEREN DERIVATE FÜR PROPHYLAKTISCHE UND THERAPEUTISCHE IMPFUNG**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfstoff gegen HIV, gegen AIDS und gegen Tumore und Syndrome, die mit einer HIV-Infektion zusammenhängen, welcher als Immunogene HIV Tat, alleine oder assoziiert mit Proteinen, Peptide oder DNA anderer viraler Produkte (Nef, Rev, Gag) oder Cytokine, welche die antivirale Immunantwort potenzieren, verwendet.

[0002] Die Erfindung bezieht sich auch auf die Immunisierung von Tat, wie sie in den Ansprüchen definiert ist, mittels mukosaler Immunisierung oder ex-vivo-Immunisierung von peripheren Blutzellen, die durch Co-Stimulation mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern erweitert sind, und auf die Zuführung der oben erwähnten Immunogene unter Verwendung von Erythrozyten oder Nanopartikeln.

Hintergrund der Erfindung

[0003] AIDS (erworbenes Immunschwächesyndrom) wird durch HIV (menschliches Immunschwächevirus) verursacht und ist durch Immunschwäche, Tumore, wie das Kaposi-Sarkom (KS) und B-Zellenlymphome, opportunistische Infektionen und Störungen des zentralen Nervensystems gekennzeichnet. Da AIDS weltweit verbreitet ist und eine hohe Sterblichkeitsrate aufweist, ist eines der wichtigsten Ziele des Gesundheitswesens, einen prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfstoff gegen HIV oder AIDS zu entwickeln. Die meisten der früheren und aktuellen Strategien benutzten die Virushülle oder ihre Untereinheiten als Immunogene, aufgrund der hohen Variabilität der Virushülle jedoch mit unbefriedigenden Ergebnissen (Ref. 162, 112 – in gesamten vorliegenden Beschreibung sind verschiedene Literaturstellen in Klammern angegeben, um den Stand der Technik, dem die vorliegende Erfindung angehört, näher zu beschreiben. Vollständige bibliographische Angaben für jedes Zitat finden sich am Ende der Beschreibung, unmittelbar vor den Ansprüchen). Daher ist man allgemein der Meinung, dass es als Alternative zur sterilisierenden Immunität ausreichen könnte, die Progression einer Infektion und den Ausbruch der Krankheit zu blockieren. Darüber hinaus können Immunschutzantworten unter Verwendung von DNA-Regionen von HIV als Immunogenen (Ref. 91, 17) erhalten werden. Aufgrund der veröffentlichten Versuchsdaten geht die Erfinderin davon aus, dass es notwendig ist, einen Impfstoff zu produzieren, der andere virale Produkte als env verwendet. Insbesondere müssen die als Immunogene zu verwendenden viralen Proteine unter HIV-Isolaten besser konserviert sein, eine wirksame Immunantwort, sowohl humoral als auch zellulär, induzieren können und eine lebenswichtige Funktion für das Virus haben. Solche Produkte müssen im Modell von nicht-menschlichen Primaten getestet werden (da deren Immunsystem dem von Menschen im Vergleich zu phylogenetisch entfernteren Lebewesen ähnlicher ist), bei denen sich nach einer Virusinfektion AIDS entwickeln kann.

[0004] Das HIV-1-Tat-Protein hat alle Merkmale, um ein gutes Immunogen für Impfpurposes zu sein: es ist konserviert, immunogen und in den frühen Phasen der viralen Infektion essentiell. Darüber hinaus spielt Tat nicht nur bei der viralen Replikation, Transmission und Progression der Infektion eine Schlüsselrolle, sondern auch bei Ausbruch und Progression von AIDS-assoziierten Tumoren, beispielsweise KS, dem häufigsten AIDS-assoziierten Tumor, und anderen Syndromen und Symptomen, die sich nach einer HIV-Infektion entwickeln.

[0005] Tat ist ein Protein mit je nach Virusstamm 86-102 Aminosäuren, das von zwei Exonen kodiert wird. Tat wird bald nach der Infektion produziert, lokalisiert im Kern und transaktiviert die Expression aller viralen Gene durch Wechselwirkung mit dem „Tatreaktiven Element“ (TAR), das in den LTR (Ref. 25) vorliegt. Tat spielt auch eine Rolle für die HIV-Virulenz (Ref. 63, 113, 60, 84). Das Produkt des ersten Exons (Aminosäuren 1-72) ist unter verschiedenen viralen Isolaten konserviert (Ref. 112) und reicht für die Transaktivierung der HIV-1-Produkte aus (Ref. 25). Es enthält 4 Domänen. Die saure Domäne (Aminosäuren 1-21) ist für die Tat-Wechselwirkung mit zellulären Proteinen wichtig; die Cystein-reiche Region (Aminosäuren 22-37) stellt die Transaktivierungsdomäne dar. Diese Region ist unter den primären Isolaten (Ref. 108) von Cystein 22 am besten konserviert und hebt mit einem Glycin die Fähigkeit von Tat auf, die HIV-LTR zu transaktivieren (Ref. 166), wobei die Kerndomäne (Aminosäuren 38-48) ebenfalls konserviert und für die Funktion wichtig ist. Eine Substitution von Lysin 41 mit einem Threonin deaktiviert die Transaktivierungsaktivität von Tat gegenüber den HIV-LTR (Ref. 70); die basische Domäne (Aminosäuren 49-57), die reich an Arginin und Lysin ist, ist für die Kernlokalisierung von Tat notwendig und bindet ihr RNA-Ziel (TAR) spezifisch (Ref. 25). Darüber hinaus ist die basische Region für die Bindung von extrazellulärem Tat an Heparin und an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) verantwortlich (Ref. 26). Mutationen in der basischen Region heben solche Wechselwirkungen auf. Der carboxyterminale Abschnitt von Tat ist für die LTR-Transaktivierung nicht notwendig, enthält jedoch eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD), die üblicherweise in den extrazellulären Matrixproteinen (ECM) vorliegt und für die Bin-

dung von Tat an die Integrin-Rezeptoren $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ verantwortlich ist. Diese Wechselwirkungen vermitteln die Tat-Effekte gegenüber AIDS-assoziierten Tumoren und gegenüber dem Immun-, Gefäß- und Nervensystem (Ref. 11, 42, 170, 25). Während der akuten Infektion von T-Zellen mit HIV-1 oder nach Transfektion des tat-Gens in COS-1-Zellen wird das Tat-Protein ohne Zelltod in der extrazellulären Umgebung freigesetzt (Ref. 40, 41, 25). Die Tat-Freisetzung aus infizierten Zellen erfolgt auch *in vivo*, da extrazelluläres Tat im Serum infizierter Personen (Ref. 164) und in AIDS-KS-Läsionen (Ref. 42) vorhanden ist. Nach der Freisetzung bleibt das Protein teilweise löslich und bindet teilweise an die HSPG der ECM. An die HSPG gebundenes Tat kann durch Zugabe von Heparin in löslicher Form zurückgewonnen werden. Die Bindung mit Heparin ist durch die basische Tat-Region bedingt; sie verhindert die Effekte von extrazellulärem Tat und schützt das Protein vor Oxidation. Dieses Merkmal wurde von uns eingesetzt, um Tat mit einer hohen biologischen Aktivität zu reinigen (Ref. 26). Extrazelluläres Tat kann von Zellen internalisiert werden, kann in den Kern migrieren und eine Virusgenexpression transaktivieren (Ref. 49, 98, 100, 41). Die Internalisierung von Tat erfolgt durch Endozytose, die durch die Bindung der RGD-Region von Tat an $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ (Ref. 10, 42, Ensoli et al., unveröffentlichte Daten) und/oder durch die basische Region, welche an HSPG bindet, vermittelt ist.

[0006] Tat kann die virale Replikation und die Virusübertragung auch durch indirekte Mechanismen unter Beteiligung der Modulation der Expression zellulärer Gene, die eine Schlüsselrolle bei der Steuerung des Zellüberlebens und hinsichtlich der Expression inflammatorischer Cytokine (iC) mit einem Effekt auf die virale Replikation spielen, aktivieren (Ref. 25).

[0007] Neben seiner Bedeutung bei der viralen Replikation spielt Tat eine wichtige Rolle in der AIDS-Pathogenese. Tat ist in der Lage, das Überleben und die Proliferation infizierter und nicht-infizierter Zellen zu modulieren, indem es eine Aktivierung oder Unterdrückung von Cytokinen, wie IL-2 (Ref. 123, 163, 31) oder von Genen mit einer Schlüsselrolle im Zellzyklus (Ref. 145, 169, 164, 173) bewirkt. Die anti- oder proapoptotischen Effekte von Tat hängen von einer Reihe von Faktoren ab, wie dem Zelltyp, der Tatsache, dass Tat von der Zelle exprimiert oder der Zelle zugegeben wird, und von seiner Konzentration (Ref. 40, 41, 171).

[0008] Tat ist der Faktor, der für die verstärkte Häufigkeit und Aggressivität des KS in HIV-infizierten Personen verantwortlich ist (Ref. 43, 33). Das KS ist ein Tumor vaskulären Ursprungs und die häufigste Neoplasie in HIV-infizierten Individuen. Tat induziert KS-Zellen und durch IC aktivierte Endothelzellen dazu, zu migrieren, Kollagenase vom Typ IV zu exprimieren, in die ECM einzudringen und zu proliferieren, wobei diese Mechanismen für die Angiogenese und Tumorinvasion notwendig sind (Ref. 40, 41, 42, 2, 46). Solche Effekte von Tat werden durch IC induziert, da sie die Expression der Tat-Rezeptoren $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ stimulieren (Ref. 10). Tat ahmt den Effekt von ECM-Proteinen, wie Fibronectin und Vitronectin nach, und sowohl die RGD-Region als auch die basische Region sind für die Wirkungen von extrazellulärem Tat auf KS-Zellen, auf die Angiogenese und auf die Progression von KS notwendig. Die Fähigkeit von extrazellulärem Tat, *in vivo* an seine Rezeptoren in den AIDS-KS-Läsionen zu binden (Ref. 40), stützt die Überlegung, dass Tat am Ausbruch und am Aufrechterhalten des AIDS-assoziierten KS beteiligt ist. Darüber hinaus entwickeln Mäuse, die für das tat-Gen transgen sind, abhängig vom Expressionsgrad des Transgens das KS oder andere Phänotypen (Ref. 160, 34).

[0009] Es wurde nahegelegt, dass Tat eine Rolle bei den hyperproliferativen Phänomenen und bei der Pathogenese der B-Lymphome spielt, die häufig bei seropositiven Personen und bei tat-transgenen Mäusen beobachtet werden (Ref. 157), aufgrund von Mechanismen unter Beteiligung der Verstärkung der bcl-2- und Cytokin-Expression (Ref. 122). Andere Hinweise bestätigen eine wahrscheinliche Rolle von Tat in der Onkogenese (Ref. 72).

[0010] Tat kann auch die Expression viraler Promotoren, wie derer von Herpesviren und anderen Viren, aktivieren, die AIDS in Individuen reaktivieren, was Ausbruch und Progression opportunistischer Infektionen fördert (Ref. 25).

[0011] Tat scheint auch in der Lage zu sein, neurotoxische Effekte sowohl direkt (durch die basischen Regionen und die RGD-Regionen) und indirekt, durch Induktion von IC, die eine toxische Wirkung auf die Neuronen des zentralen Nervensystems oder auf die Blut-Hirn-Schranke haben, auszuüben (Ref. 25). Bezüglich der Immunantwort auf Tat legt eine Reihe von Studien nahe, dass Anti-Tat-Antikörper eine schützende Rolle bei der Steuerung der Evolution der Erkrankung *in vivo* spielen (Ref. 130, 135, 136, 149, 127). Darüber hinaus unterdrücken Anti-Tat-Antikörper *in vitro* nicht nur die Internalisierung, die transzelluläre Aktivierung von Tat und von Virusinfektionen (Ref. 41, 127), sondern sie inhibieren auch die Proliferation und die Tat-induzierte Migration von KS-Zellen sowie die Bildung von KS-artigen Läsionen in Mäusen (Ref. 40, 41, 42). Schließlich zeigen unsere vorläufigen Ergebnisse, dass Anti-Tat-Antikörper in AIDS-KS-Personen fehlen, was nahelegt, dass diese Personen die Aktivität von extrazellulärem Tat nicht blockieren können.

[0012] Die Entwicklung einer zellvermittelten Anti-Tat-Reaktion in der Anfangsphase der Infektion ist wichtig für die Steuerung der Infektion selbst (Ref. 161, 133, 59), und es besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Vorliegen von spezifischem Anti-Tat-CTL und der Progression der Erkrankung (Ref. 156). Diese Ergebnisse wurden in Studien mit Makaken erhalten, die mit SIVmac inokuliert waren (Ref. 91, 158). Darüber hinaus zeigten jüngste Daten in Mäusen unterschiedlicher Spezies, in die Tat entweder als Plasmid oder als Protein inokuliert wurde, dass es möglich ist, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Antwort auf das Protein zu induzieren (Ref. 61). Jedoch wurde zwischen verschiedenen Mausspezies eine Variabilität beobachtet, und diese Ergebnisse wurden mit den gleichen Immunogenen in nicht-menschlichen Primaten nicht reproduziert (Ref. 124). Die mangelnde Reproduzierbarkeit im nicht-menschlichen Primaten-Modell der Ergebnisse aus den Impfstoffversuchen, die bei Mäusen durchgeführt wurden, ist häufig und möglicherweise durch das unterschiedliche Immunsystem dieser beiden Spezies bedingt, die mit dem gleichen Immunogen unterschiedliche Immunantworten hervorrufen können, wie dies am HIV-Env-Protein gezeigt wurde. Somit müssen für Menschen in Frage kommende Impfstoffe in nicht-menschlichen Primaten, und nicht nur in niederen Spezies getestet werden.

[0013] Die Erfinderin geht davon aus, dass andere virale Proteine oder Teile davon mit Tat assoziiert werden könnten, um eine spezifische Immunantwort gegen HIV zu verstärken, und auch bei der Impfung gegen den Ausbruch von Tumoren und anderen Pathologien und Symptomen, die mit HIV-Infektion assoziiert sind, von Nutzen sein könnten. Diese Produkte sind die Nef-, Rev- und Gag-Proteine von HIV.

[0014] Nef ist ein weiteres virales Regulatorprotein, das für die Entwicklung einer Krankheit wichtig ist (Ref. 3, 48, 58). Nef wird früh nach der Infektion produziert und in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt (Ensoli, unveröffentlichte Daten). Im SIVmac/Makaken-System korreliert das Vorliegen von Nef mit einer hohen viralen Replikation und mit der Progression zu AIDS (Ref. 71). Nef ist variabler als Tat (Ref. 112). Nef ist ein immunogenes Protein (Ref. 53, 32, 35, 151) und in der Lage, CTL zu induzieren (Ref. 16, 36). Insbesondere wurde eine immundominante Region von Nef identifiziert (Region 73-144), die von den CTLs in den meisten HIV-infizierten Patienten erkannt wird.

[0015] Rev ist ein virales Regulatorprotein, das bei einer Infektion früh produziert (Ref. 51, 119) und in die extrazelluläre Umgebung zugeführt wird (Ensoli et al., unveröffentlichte Daten). Rev ist essenziell für die HIV-Replikation und für die Progression der Erkrankung und wird von zwei Exonen kodiert, welche die Tat-Codierungsregionen teilweise überlappen. Rev ist ein Kernprotein (Ref. 44), das für die Expression der viralen Boten-RNAs benötigt wird, welche für die späten Proteine kodieren (Ref. 97). Rev ist ein hoch konserviertes Protein unter den verschiedenen viralen Isolaten von HIV-1 (Ref. 111) und ist immunogen. Tatsächlich induziert es die Produktion spezifischer Antikörper, die gegen die beiden funktionalen Domänen des Proteins (Ref. 120) gerichtet sind, während der natürlichen Infektion beim Menschen (Ref. 131) und nach Inokulation in Mäusen (Ref. 61). Niedrigere Spiegel von Anti-Rev-Antikörpern in den Seren infizierter Individuen scheinen mit der Progression zu AIDS zu korrelieren (Ref. 131). Rev kann CTL sowohl beim Menschen als auch beim Affen induzieren (Ref. 156, 158), und es wurde berichtet, dass eine spezifische Anti-Rev-CTL-Antwort im frühen Infektionsstadium mit der Progression der Erkrankung invers korreliert (Ref. 156, 158).

[0016] Ein weiteres virales Ziel ist das gag-Gen, das im späten Infektionsstadium exprimiert wird und für eine Gruppe von hoch immunogenen Strukturproteinen des Kapsids kodiert (Ref. 18, 147). Die Anti-Gag-Antikörper sind während der asymptomatischen Infektionsphase hoch und stabil und erreichen sehr niedrige Werte, wenn die Infektion zu voll entwickeltem AIDS fortschreitet, in Kombination mit dem Abfall der CD4+-Lymphocyten und dem Vorliegen des Virus im peripheren Blut (Ref. 174, 73). Gag-Proteine induzieren bei einer Infektion sowohl beim Menschen als auch bei Primaten früh eine CTL-Aktivität (Ref. 103, 168), und ihr Vorliegen steht in deutlichem Zusammenhang mit der Steuerung der anfänglichen Virämie und mit der Progression der Erkrankung (Ref. 175, 6, 134, 167, 92). Schließlich enthalten die p17- und p24-Proteine immundominante Epitope, die in unterschiedlichen HIV-1- und HIV-2-Isolaten gehalten und von CTL erkannt werden (Ref. 89, 19, 114, 155, 115).

[0017] Die Erfinderin geht davon aus, dass Cytokine oder Teile davon, wie IL-12 und IL-15 oder andere immun-modulierende Cytokine, wie IFN α oder IFN β , oder andere Proteine, welche die immunogene Wirkung von Tat verstärken, als Adjuvantien zur Formulierung des Anti-Tat-Impfstoffs verwendet werden können. IL-12 ist ein starkes immunregulatorisches Cytokin, das von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie B-Zellen und dendritischen Zellen, produziert wird (Ref. 154). IL-12 wird bald nach einer HIV-Infektion produziert und hat eine entzündungsfördernde Wirkung, die NK-Zellen und T-Lymphocyten zur Produktion von IFN γ induziert, welches Phagocyten aktiviert und die Induktion von Th1-Lymphocyten fördert. IL-12 spielt eine grundlegende Rolle für die Resistenz gegen eine Reihe von Infektionen, die durch Bakterien, Pilze und Viren verursacht wer-

den, und zeigt eine hohe Antitumor-Aktivität. Mehrere Indizien legen nahe, dass Viren, welche eine Immunsuppression induzieren, wie HIV- und Masern-Viren, auch durch Mechanismen wirken, welche die IL-12-Produktion unterdrücken (Ref. 57, 50, 144).

[0018] IL-15 ist ein pleiotropes Cytokin, das von nicht-lymphoiden Geweben, von aktivierten Monocyten/Makrophagen und von dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird (Ref. 125, 66). IL-15 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der NK-Aktivität, bei der Proliferation von T-Lymphocyten und bei der CTL-Aktivität (Ref. 67, 24). IL-15 induziert die Expression von CTLs gegen HIV-Antigene in Abwesenheit von IL-2 und funktionalen CD4+ T-Lymphocyten (Ref. 68, 1). Darüber hinaus induziert IL-15, ähnlich wie IL-2, die Expansion von Lymphocyten mit cytotoxischer Aktivität („Lymphokin-aktivierter Killer“, LAK) und stimuliert die Produktion von IFN γ in PBMCs von seropositiven Patienten (Ref. 93). IL-15 aktiviert Monocyten, um Chemokine zu produzieren, die eine Rolle beim Einsetzen entzündlicher Prozesse spielen (Ref. 8).

[0019] Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Co-Stimulation von CD4+-Lymphocyten mit paramagnetischen Kügelchen, die mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern beschichtet sind, eine logarithmische und polyklonale Expansion von Lymphocyten HIV-infizierter Personen bestimmt (Ref. 82), ohne eine Virusreplikation und -transmission zu aktivieren. Eine solche antivirale Aktivität ist eine Folge sowohl der negativen Modulation der Expression von CCR5, des Co-Rezeptors von HIV-1-monozytotropen Stämmen (Ref. 23), und in geringerem Maße der hohen Spiegel von Chemokinen, die durch die Co-Stimulation mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern induziert werden (Ref. 132). Die Erfinderin geht davon aus, dass durch die Möglichkeit, autologe Lymphocyten von HIV-infizierten Personen in Abwesenheit von viraler Replikation/Transmission zu expandieren, eine wirksame ex vivo-Immunisierung erhalten werden kann, die in den Beispielen beschrieben ist und äußerst hilfreich bei der Entwicklung eines Anti-Tat-Impfstoffs sein kann.

[0020] Innerhalb der unterschiedlichen Systeme, die auf die Herstellung wirksamer Antivirus- und Antitumor-Impfstoffe gerichtet sind, geht die Erfinderin davon aus, dass die Verwendung von dendritischen Zellen ein Schlüssel zur Induktion einer Immunantwort auf Tat sein könnte. Dies ist dadurch bedingt, dass diese Zellen am wirksamsten das Antigen präsentieren und als einzige in der Lage sind, naive Lymphocyten in Abwesenheit von Adjuvantien zu stimulieren (Ref. 150). Die Verwendung dendritischer Zellen ersetzt die Funktion mehrerer Adjuvantien, die in der Induktion einer nicht-spezifischen Immunantwort (natürliche Immunität) besteht, welche wiederum eine starke primäre, spezifische Antwort in Gegenwart des Antigens erzeugt.

[0021] Da die Übertragung der HIV-Infektion vorwiegend auf mukosaler Ebene (genital und rektal beim Erwachsenen, oral beim Neugeborenen) erfolgt, geht die Erfinderin davon aus, dass die Induktion schützender Immunität auf mukosaler Ebene ein vorrangiges Ziel ist. Zahlreiche Studien zeigten vor kurzem die Möglichkeit, eine mukosale Immunisierung lokal und systemisch zu induzieren. Insbesondere der nasale und der orale Weg haben sich als die wirksamsten Wege zur Induktion einer wirksamen mukosalen Immunantwort, selbst an entfernten Orten, wie der Genitalschleimhaut, gezeigt (Ref. 138, 118). Insbesondere geht die Erfinderin davon aus, dass die Verwendung von *S. Gordonii*- und *Lactobacillus*-Bakterien, die so modifiziert sind, dass sie die oben erwähnten viralen Antigene exprimieren, eine zulässige Strategie zum Induzieren oder Potenzieren einer spezifischen Immunantwort auf mukosaler Ebene beim Affen und beim Menschen sein könnte. Diese Bakterien sind tatsächlich in der Lage, die Mund- und Vaginalschleimhaut der Maus zu kolonisieren und eine spezifische, lokale und systemische Antikörperantwort gegen heterologe Antigene, die auf der Oberfläche rekombinanter Bakterien exprimiert werden, zu induzieren (Ref. 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). Schließlich wirken diese Bakterien als lebende Vektoren und können eine lang anhaltende Stimulation des Immunsystems induzieren. Darüber hinaus geht die Erfinderin davon aus, dass nicht-replizierende und nicht-pathogene, rekombinante virale Vektoren, wie Herpes simplex Typ 1-Viren (HSV-1) (Ref. 99), dazu verwendet werden können, virale Proteine zur systemischen (intradermalen) und mukosalen (oralen, vaginalen und nasalen Weg) Immunisierung zu exprimieren. Tatsächlich können diese Vektoren große exogene Sequenzen aufnehmen (Ref. 52, 64), wie mehrere HIV-Gene (regulatorisch, akzessorisch und strukturell). Zudem können Herpesvektoren auch auf oralem, nasalem oder vaginalem Wege verabreicht werden (Ref. 176, 75).

[0022] Die Erfinderin geht davon aus, dass Tat (entweder als Protein oder DNA), alleine oder in Kombination mit den anderen oben beschriebenen Immunogenen, auch unter Verwendung neuer Zuführungssysteme, wie Erythrozyten oder Nanopartikel, inokuliert werden kann. Insbesondere geht die Erfinderin davon aus, dass es möglich ist, Antigene abzugeben, die an die Membran autologer Erythrozyten gebunden sind (Ref. 95, 96). Da diese Erythrozyten von Makrophagen, professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, nach nur 120 Tagen aus dem Blut entfernt werden, kann dieses Merkmal für Impfstoffzwecke genutzt werden. Schließlich besteht eine weitere Zuführungsstrategie in der Verwendung von Nanopartikeln, die Proteine und DNA tragen können (Ref. 27, 172). Nanosphären sind polymere, kolloidale Partikel vielfältiger chemischer Zusammensetzung, die

von 10-1000 nm variieren können. Unterschiedliche Substanzen (Oligonukleotide, Arzneimittel, Proteine, Peptide, DNA) können auf ihre Oberfläche geladen oder in dem Partikel absorbiert und in das Cytoplasma oder den Kern der Zellen zugeführt werden, von wo sie langsam freigesetzt werden. Dies ermöglicht die Nutzung sehr kleiner Mengen der abzugebenden Substanz.

[0023] Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse geht die Erfinderin davon aus, dass die Immunisierung mit Tat, alleine oder in Kombination mit anderen viralen Produkten oder immun-modulierenden Cytokinen oder Teilen davon, gegebenenfalls in Gegenwart von Adjuvanzen, die virale Replikation in Personen, die nach der Impfung exponiert werden, und in den infizierten Personen blockieren könnte, wodurch die Infektion in einer Abbruchphase gehalten würde, die vom Immunsystem leichter kontrolliert werden kann. Daher geht die Erfinderin davon aus, dass ein Impfstoff auf Tat-Basis sowohl humoral als auch zellulär eine Immunantwort induzieren können sollte, die ausreicht, um die Replikation oder die Transmission des Virus zu blockieren oder zu verringern, und daher in der Lage sein sollte, die Virusreplikation zu kontrollieren und eine produktive Infektion, eine Progression zur Erkrankung und der Ausbruch von Tumoren und anderen mit AIDS assoziierten Syndromen und Symptomen zu blockieren. Daher ist es möglich, den Anti-Tat-Impfstoff sowohl für präventive als auch für therapeutische Zwecke zu verwenden. Tatsächlich könnte eine humorale Antwort gegen Tat die Effekte von extrazellulärem Tat, welches die Infektion vermindert und eingrenzt, neutralisieren, während die zellinduzierte Antwort gegen Tat sowie gegen andere virale Proteine, die in der Impfstoff-Formulierung enthalten sind, die mit dem Virus infizierten Zellen zerstören und damit zur Kontrolle der Infektion führen könnte. Dies gibt dem Immunsystem die notwendige Zeit, eine vollständige Antwort auf alle viralen Komponenten des infizierenden Virus, ohne irreversible Schäden aufgrund der viralen Replikation, zu entwickeln.

[0024] Die Verwendung von Tat als Immunogen ist vorbeschrieben (WO95/31999). Allerdings ist die Verwendung eines biologisch inaktiven Proteins offenbart; zudem findet sich in derselben Patentanmeldung kein Hinweis auf die biologische Aktivität des „nativen“ Tat-Proteins.

[0025] Die WO9415634 bezieht sich auf synthetische Oligopeptide, die homolog zu den Signalsequenzen von Tat- und Rev-Proteinen sind, und zur Behandlung von HIV-Infektionen verwendet werden können. Es finden sich jedoch weder Hinweise zur Herstellung noch Versuche, welche die Wirksamkeit der offenbarten Proteine zeigen.

[0026] Hinkula et al., Vaccine, Vol. 15, 8, 874-878 (1997) offenbart Impfversuche an Mäusen, ausgehend von Impfstoffen, die Tat enthalten, wobei jedoch die dortigen Ergebnisse, die bei niederen Spezies erhalten wurden, nicht direkt auf nicht-menschliche Primaten übertragbar sind.

[0027] Zudem gibt es insofern eine starke technische Voreingenommenheit gegen die Verwendung eines biologisch aktiven Tat-Proteins, als angenommen wird, dass es die virale Replikation bei infizierten Personen verstärkt und/oder bei seronegativen oder seropositiven Individuen eine Immunsuppression ergibt (A. Tonelli: Aids, un vaccino per seerare. "La Repubblica", S. 10, 24. Okt. 1998).

[0028] Wie aus dem Obigen ersichtlich ist, wurde trotz der unternommenen Anstrengungen noch kein wirksamer Anti-HIV-Impfstoff auf Basis von Tat entwickelt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0029] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Tat-Protein zur Verwendung als Impfstoff bereitzustellen, wie dies in den Ansprüchen definiert ist.

[0030] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Proteinimpfstoff, der beim Menschen prophylaktisch oder therapeutisch gegen AIDS, AIDS-assoziierte Tumore und HIV-assoziierte Syndrome und Symptome verwendet werden soll und aus rekombinantem Wildtyp-Tat-Protein besteht (Sequenz ID 1), das wie beschrieben exprimiert und gereinigt und alleine, oder mit einem T-Helfer-Tetanustoxoidepitop oder anderen T-Helfer-Epitopen konjugiert, verabreicht wird.

[0031] Noch ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Impfstoff der oben beschriebenen Art in Kombination mit rekombinanten HIV-Nef-, -Rev- und/oder -Gag-Proteinen oder Peptiden von Nef, Rev und Gag, die als Tat/Nef-, Tat/Rev-, Tat/Gag-Fusionsproteine oder als Teile dieser Proteine verabreicht werden.

[0032] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Impfstoff der oben beschriebenen Art in Kombination mit rekombinanten Proteinen von immun-modulierenden Cytokinen, wie IL-12, IL-15 oder anderen Molekülen oder Teilen

davon, die in der Lage sind, die antivirale Immunantwort zu verstärken, oder ein Impfstoff, der durch Tat/IL-12, Tat/IL-15 oder Tat/andere Fusionsproteine oder Teile davon gebildet und in der Lage ist, die antivirale Immunantwort zu verstärken.

[0033] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff als Protein, alleine oder wie oben beschrieben kombiniert, zur Immunisierung mit autologen dendritischen Zellen durch ex vivo-Behandlung.

[0034] Noch ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff als Protein, alleine oder wie oben beschrieben kombiniert, zur mukosalen Immunisierung (nasal, oral, vaginal oder rektal).

[0035] Wieder ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff als Protein, alleine oder wie oben beschrieben kombiniert, zur ex vivo-Immunisierung von peripheren Blutzellen aus infizierten Personen, die durch Co-Stimulation mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern erweitert sind, welche mit paramagnetischen Kügelchen konjugiert sind und in den Wirt reinfundiert werden.

[0036] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff als Protein, wie oben beschrieben, kombiniert mit Inhibitoren der viralen Replikation.

[0037] Noch ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff der bereits beschriebenen Art, in Kombination mit Adjuvantien, welche die Immunantwort verstärken.

[0038] Wieder ein weiteres Ziel der Erfindung ist ein Anti-Tat-Impfstoff, alleine oder in Kombination, wie bereits beschrieben, verabreicht mittels spezifischer Zuführungssysteme, wie Nanopartikel, Herpesvektoren, rote Blutzellen, Bakterien oder irgendein anderes Zuführungssystem, durch das der oben beschriebene Impfstoff in all seinen Kombinationen verabreicht werden kann.

[0039] Weitere Ziele sind aus der detaillierten Beschreibung der Erfindung ersichtlich.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0040] [Fig. 1A](#). Inhibierung der Aufnahme von 10 ng/ml rhodaminiertem Tat-Protein durch Vorinkubation von Cytokin-aktivierten Endothelzellen mit Anti-Integrin-Antikörpern.

[0041] [Fig. 1A](#). Bild A, Zellen, vorinkubiert mit Puffer, inkubiert mit BSA.

[0042] [Fig. 1A](#). Bild B, Zellen, vorinkubiert mit Puffer, inkubiert mit Tat.

[0043] [Fig. 1A](#). Bild C, Zellen, vorinkubiert mit den monoklonalen Antikörpern CDw49e und CD29, inkubiert mit Tat.

[0044] [Fig. 1A](#). Bild D, Zellen, vorinkubiert mit den monoklonalen Antikörpern CD51 und CD61, inkubiert mit Tat.

[0045] [Fig. 1A](#). Bild E, Zellen, vorinkubiert mit Anti-Humanfaktor VIII-Antikörpern (Kontroll-Antikörper), inkubiert mit Tat.

[0046] [Fig. 1B](#). Fähigkeit von gereinigtem Tat-cys22 (Tat22)-Protein, um die Transaktivierungsaktivität von Wildtyp-Tat-Protein zu konkurrieren, überwacht durch CAT-Assays.

[0047] [Fig. 2A](#). Anti-Tat-spezifische IgG-Produktion in mit dem Tat-Protein geimpften Affen, bestimmt durch immunenzymatischen Assay (ELISA). Es wurden Ergebnisse von zwei Affen erhalten, die subkutan inokuliert waren mit 10 oder 100 µg rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI.

[0048] [Fig. 2B](#). Anti-Tat-spezifische IgG-Produktion bei mit dem Tat-Protein geimpften Affen, bestimmt durch immunenzymatischen Assay (ELISA). Ergebnisse für den Kontrollaffen (M3).

[0049] [Fig. 3](#). Titration von Anti-Tat-Antikörpern in Plasma von Affen, die mit 100 (M1) und 10 (M2) µg rekombinantem Tat-Protein inokuliert wurden, wie dies in [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) beschrieben ist.

- [0050] **Fig. 4A.** Kartierung der Tat-Epitope, die von Anti-Tat IgG aus Affen, denen 100 (M1) und 10 (M2) µg rekombinantes Tat-Protein injiziert worden waren, wie in **Fig. 2A** und **Fig. 2B** beschrieben, erkannt wurden. Gezeigt sind die durchschnittlichen Ergebnisse von Plasma, das für jedes zweifach getestete Peptid 1:50 verdünnt war.
- [0051] **Fig. 4B.** Kartierung gemäß **Fig. 4A**. Gezeigt sind die Antikörpertiter im Plasma, ausgedrückt als Kehrwert der höchsten Verdünnung, bei welcher der Test noch positiv war.
- [0052] **Fig. 5.** Analyse der spezifischen humoralen Anti-Tat-IgM-Antwort in mit Tat-Protein inokulierten Affen, bestimmt mittels ELISA.
- [0053] **Fig. 6.** Analyse der spezifischen Anti-Tat IgG-Produktion in mit Tat-Protein inokulierten Affen, getestet mittels ELISA.
- [0054] **Fig. 7.** Titration von Anti-Tat-Antikörpern im Plasma der mit rekombinantischem Tat (10 µg) in Gegenwart von RIBI (MI-3) oder Alaun (M4-6) inokulierten Affen, wie in **Fig. 6** beschrieben.
- [0055] **Fig. 8A.** Epitope von Tat, die von Anti-Tat IgG aus Affen erkannt werden, welche wie in **Fig. 6** beschrieben inokuliert sind. Die Ergebnisse beziehen sich auf Proben mit einer Verdünnung von 1:50 und sind der Mittelwert aus zwei Vertiefungen.
- [0056] **Fig. 8B.** Epitope von Tat gemäß **Fig. 8A**. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Plasmatitration, die in **Fig. 8A** gezeigt ist, und sind als die höchste reziproke Plasmaverdünnung ausgedrückt, bei welcher der Test noch positiv war.
- [0057] **Fig. 9.** Analyse von Tat-spezifischen CTL.
- [0058] **Fig. 10.** Analyse der Antwort einer verzögerten Hypersensibilität gegenüber Tat mittels Hauttest.
- [0059] **Fig. 11A.** Humorale IgG-Antwort auf Tat in mit Tat-DNA geimpften Affen. Gezeigt sind die Ergebnisse, die von zwei Affen erhalten wurden, welche mit 200 (M1) und 500 (M2) µg pCV-Tat-Plasmid geimpft waren.
- [0060] **Fig. 11B.** Humorale IgG-Antwort auf Tat in mit Tat-DNA geimpften Affen. Ergebnisse für den Kontrollaffen (M3).
- [0061] **Fig. 12.** Titration von Anti-Tat-Antikörpern in Plasma des Affen M2, der i. d. mit 200 µg pCV-Tat inokuliert war.
- [0062] **Fig. 13.** Analyse der Anti-Tat IgG-Produktion in drei Affen (M9 bis M11), die mit 1 mg pCV-Tat inokuliert waren, und in einem Kontrollaffen (M12), inokuliert mit 1 mg des Kontrollvektors pCV-0.
- [0063] **Fig. 14.** Kinetik der proliferativen Antwort von PBMC aus *Macaca fascicularis* auf die Co-Stimulation mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern auf paramagnetischen Kügelchen (Anti-CD3/28-Kügelchen).
- [0064] **Fig. 15A.** Antiviraler Effekt der Co-Stimulation mit Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC von *Macaca fascicularis*. Affe MK 193.
- [0065] **Fig. 15B.** Antiviraler Effekt der Co-Stimulation mit Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC von *Macaca fascicularis*. Affe MK D91.
- [0066] **Fig. 15C.** Antiviraler Effekt der Co-Stimulation mit Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC von *Macaca fascicularis*. Affe MK 9301.
- [0067] **Fig. 15D.** Antiviraler Effekt der Co-Stimulation mit Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC von *Macaca fascicularis*. Affe MK 9401.
- [0068] **Fig. 16A.** Funktionale Charakterisierung dendritischer Zellen (DC), erhalten aus peripherem Blut von Affen. ³H-Thymidin-Aufnahme von allogener gemischter Leukozytenkultur (AMLR) an Tag 4.

[0069] Fig. 16B. Funktionale Charakterisierung dendritischer Zellen, erhalten aus peripherem Blut von Affen. APCs, wie DC und M \emptyset , die wie in Fig. 16A angegeben erhalten worden waren, wurden mit T-Lymphocyten eines anderen Affen angeregt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0070] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Tat, wie in den Ansprüchen definiert, als Wirkprinzip für einen prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfstoff gegen HIV-Infektion, gegen die Progression zu AIDS und gegen die Entwicklung von Tumoren und anderen Syndromen und Symptomen in HIV-infizierten Personen. Tat oder Wildtyp-Tat liegt in seiner aktiven Form oder, korrekter gesagt, in seiner biologisch aktiven Form (wie hier nachfolgend erläutert) als rekombinantes Protein vor. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf einen Impfstoff, der auf HIV-1 Tat als Immunogen beruht, welches als rekombinantes Protein, alleine oder in Kombination mit anderen Genen oder viralen Genprodukten (Nef, Rev, Gag) oder Teilen davon, oder in Kombination mit verschiedenen immun-modulierenden Cytokinen (IL-12, IL-15) oder mit dem Gen, das für ein immun-modulierendes Cytokin oder einen Teil davon kodiert, inokuliert wird. Tat, Nef, Rev, Gag und die immun-modulierenden Cytokine werden sowohl als Mischung rekombinanter Proteine, Peptide oder Fusionsproteine (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) wie auch als Plasmid-DNA verabreicht.

[0071] In der vorliegenden Beschreibung sind „Wildtyp-Tat“ und „Tat in seiner aktiven Form“ als Synonyme für „biologisch aktives Tat“ zu betrachten.

[0072] „Biologisch aktives Tat“ soll sich auf das Protein beziehen, das bei pikomolaren bis nanomolaren Konzentrationen (von 10 ng/ml oder weniger bis 1 μ g/ml, vorzugsweise 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml) in der Lage ist:

- (i) in die Kerne aktivierter Endothelzellen oder dendritischer Zellen einzudringen und sich dort zu lokalisieren, wie in Beispiel 1A bestimmt;
- (ii) die Proliferation, Migration und Invasion des Proteins von Kaposi-Sarkom(KS)-Zellen und Cytokin-aktivierten Endothelzellen zu aktivieren (Ref. 40,2);
- (iii) die Virusreplikation zu aktivieren, wenn es zu infizierten Zellen gegeben wird, bestimmt durch a) die Rettung von Tat-defizienten Proviren in HLM-1-Zellen nach Zugabe von exogenem Protein (Ref: 41); b) die Transaktivierung der HIV-1-Genexpression in mit einem HIV-1-Promotor-Reporterplasmid-Protein transfizierten Zellen (Ref. 41);
- (iv) in Mäusen die Entwicklung von KS-artigen Läsionen in Gegenwart angiogener Faktoren oder inflammatorischer Cytokine zu induzieren (Ref. 42).

[0073] Die Erfinderin erachtet es als grundlegend für biologisch aktives Tat, dass einer der Punkte (i) oder (ii) überprüft wird; vorzugsweise sollten beide überprüft werden, noch bevorzugter sollten Punkt (i) oder Punkt (ii) oder beide in Kombination mit Punkt (iii) a) und/oder (iii) b) überprüft werden. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn alle Punkte (i) bis (iv) überprüft werden. Ein Tat-Protein mit diesen Merkmalen ist in der Lage, in vivo eine cytotoxische und antivirale Immunantwort zu induzieren. Tatsächlich ist ein biologisch aktives Tat mit den oben erwähnten Merkmalen in der Lage, spezifische Zelloberflächenrezeptoren zu binden, und wird über diese Rezeptoren aufgenommen. Die Tat-Aufnahme ist essentiell für die Induktion einer cytotoxischen Antwort.

[0074] Frühere oder noch andauernde Studien, die sich mit der Entwicklung eines auf Tat basierenden Impfstoffs befassen, nutzten kein biologisch aktives Tat-Protein mit den oben erwähnten Merkmalen.

[0075] Ein Verfahren zum Erhalten und Handhaben von biologisch aktivem Tat gemäß der vorliegenden Erfindung ist in Beispiel 1 beschrieben.

[0076] Ebenso ist ein Immunisierungsverfahren beschrieben, das autologe dendritische Zellen einsetzt, die ex vivo mit rekombinantem Tat-Protein oder Peptiden davon, allein oder mit einer Mischung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden (Tat, Nef, Rev, Gag), oder mit dem Tat-Protein und einem oder mehreren immun-modulierenden Cytokin(en) oder Teilen davon behandelt oder mit eukaryontischen Vektoren transduziert sind, welche das tat-Gen allein oder in Kombination mit viralen Genen, welche für Nef, Gag oder Rev kodieren, oder tat und das Gen, das für ein immun-modulierendes Cytokin oder einen Teil davon kodiert, enthalten.

[0077] Strategien zum Induzieren einer Immunantwort auf mukosaler Ebene sind ebenfalls beschrieben.

[0078] Tat wird alleine oder in Kombination mit viralen Proteinen und/oder Cytokinen auf mukosaler Ebene inokuliert, um die lokale Immunantwort zu verstärken und zu induzieren. Das HIV-1 Tat-Protein wird auch zur

ex vivo-Immunisierung von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphocyten eingesetzt, die aus dem peripheren Blut infizierter Personen isoliert sind. Dann werden die Tat-antigenspezifischen Zellen in vitro durch Co-Stimulation mit monoklonalen Antikörpern, die gegen CD3 und CD28 gerichtet sind, erweitert und reinfundiert. Schließlich ist auch die Verwendung von in den Beispielen angegebenen Tat-Mutanten beschrieben, die als Immunogene alternativ zum Tat-Wildtyp zu verwenden sind.

[0079] Die Tat-Mutanten liegen vor in i) der Cysteinregion (cys22) und ii) der Kernregion (lys41), iii) der in der RGD-Sequenz deletierten Mutante; iv) der bei Lysin 41 und in der RGD deletierten Doppelmutante. Alternativ zur Verwendung von Tat-Mutanten oder Tat-Peptiden (Wildtyp oder mutiert als Protein) im Falle einer therapeutischen Impfung werden Inhibitoren der viralen Replikation zusammen mit dem Immunogen eingesetzt.

[0080] In diesem Zusammenhang sollen „Inhibitoren der viralen Replikation“ alle derzeit bekannten Moleküle oder solche sein, die später noch entdeckt werden (Nukleosid- und Nicht-Nukleosidinhibitoren von reverser Transkriptase, Proteaseinhibitoren, Antisense-RNA und im allgemeinen alle Moleküle, welche in der Lage sind, die HIV-Genexpression zu blockieren) und in der Lage sind, die HIV-Replikation zu verringern oder zu blockieren. Wie zuvor erwähnt, sind unterschiedliche Immunisierungsverfahren beschrieben, die Tat-Protein, -Peptide und Tat-DNA in Verbindung mit anderen viralen Genen oder Proteinen oder einem Teil davon oder immun-modulierende Cytokine oder Gene, welche für immun-modulierende Cytokine kodieren, oder einen Teil davon einsetzen. Ein „Teil davon“ sollen Segmente von Genen oder Proteinen der oben beschriebenen Art sein, deren Wirksamkeit zur Induktion derselben immunogenen Effekte wie beim ganzen Gen oder Protein bewiesen ist. Da zudem die Wirksamkeit von Adjuvantien bei Impfstoffstrategien bekannt ist, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung bekannter später noch zu entdeckender Adjuvantien, die zusammen mit Tat (Protein oder DNA) und mit Kombinationen von Tat und anderen Genen oder viralen oder zellulären Proteinen verabreicht werden.

[0081] Entsprechend wird die Wirksamkeit unterschiedlicher Zuführungssysteme für Tat (Protein oder DNA) und Kombinationen von Tat und anderen Genen oder viralen oder zellulären Proteinen zur Induktion sowohl einer systemischen als auch einer lokalen Immunantwort auf Tat (mukosale Immunisierung) angenommen.

[0082] Von der Erfinderin erhaltene (unveröffentlichte) Ergebnisse zeigen, dass nur das Tat-Protein in seiner biologisch aktiven Form in der Lage ist, spezifische zelluläre Rezeptoren zu binden und in die Zelle einzudringen. Dieses Merkmal liegt der Immunantwort akzessorischer Zellen und allgemeiner der Immunzellen zugrunde, und laut der Erfinderin ist es von grundlegender Bedeutung für die Induktion einer deutlich stärkeren Immunantwort, als sie das deaktivierte Protein hervorrufen kann. Im Gegensatz zur Verwendung von deaktiviertem Tat als Immunogen, wie sie von einigen Wissenschaftlern vorgeschlagen wurde, beabsichtigt die Erfinderin folglich, HIV-1 Tat in seiner biologisch aktiven Form einzusetzen, um eine sehr starke Immunantwort gegen HIV zu induzieren, die eine Infektion oder die Entwicklung der Erkrankung verhindern und wirksame therapeutische Strategien in HIV-1-infizierten Individuen zulassen kann. Laut der Erfinderin kann der Impfstoff auf systemischem (intramuskulärem, d. h. subkutanem usw.) oder lokalem (mukosalem) Wege zugeführt werden. Der letztgenannte Weg ist bevorzugt, wenn Bakterien (siehe unten) als Zuführungssysteme eingesetzt werden.

[0083] Der Impfstoff kann wie folgt produziert werden. Tat kann gemäß Beispiel 1 hergestellt, lyophilisiert und gelagert werden. Zum Zeitpunkt der Verwendung kann es in einem biologisch verträglichen Fluid, wie Serum, Plasma oder Fraktionen davon, resuspendiert werden.

[0084] Transformierte Zellen, umfassend einen Tat-exprimierenden Vektor, oder Teile davon, wie zuvor beschrieben, und Zellen, die kultiviert werden, um Tat-Protein zu exprimieren, und für die Verwendung isoliert werden, sind alle im Umfang des vorliegenden Patentes enthalten.

[0085] Alle Tat-Varianten (einschließlich aller Arten und Unterarten von HIV-Stämmen) mit analoger oder größerer Aktivität als die oben beschriebene sind in dieser Erfindung enthalten.

[0086] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand ihrer veranschaulichenden und nicht einschränkenden, spezifischen Beispiele beschrieben, in denen auf die beigefügten Zeichnungen Bezug genommen wird.

Detaillierte Beschreibung der Figuren

[0087] **Fig. 1A.** Inhibierung der Aufnahme von 10 ng/ml rhodaminiertem Tat-Protein durch Vorinkubation Cytokin-aktivierter Endothelzellen mit Anti-Integrin-Antikörpern. Cytokin-aktivierte Humanumbilikalvenen(HU-VE)-Zellen, die wie in der Erklärung zu Tabelle 2A beschrieben behandelt wurden, wurden in serumfreiem Me-

dium vorinkubiert, enthaltend Puffer oder Antikörper, und dann 15 Minuten bei 37°C mit 10 ng/ml rhodaminier-tem Tat oder rhodaminiertem BSA inkubiert.

[0088] Bild A, Zellen, vorinkubiert mit Puffer, inkubiert mit BSA.

[0089] Bild B, Zellen, vorinkubiert mit Puffer, inkubiert mit Tat.

[0090] Bild C, Zellen, vorinkubiert mit den monoklonalen Antikörpern CDw49e (anti- α 5) und CD29 (anti- β 1), inkubiert mit Tat.

[0091] Bild D, Zellen, vorinkubiert mit den monoklonalen Antikörpern CD51 (anti- α v) und CD61 (anti- β 3), inkubiert mit Tat.

[0092] Bild E, Zellen, vorinkubiert mit Antihuman-Faktor VIII-Antikörpern (Kontroll-Antikörper), inkubiert mit Tat.

[0093] [Fig. 1B](#). Gezeigt ist die Fähigkeit von gereinigtem Tat-cys22 (Tat22)-Protein, mit der Transaktivierungsaktivität von Wildtyp-Tat-Protein zu konkurrieren, die mittels CAT-Assays überwacht wird. H3T1-Zellen, enthaltend das HIV-1 LTR-CAT-Reportergen (Ref. 148), wurden mit Wildtyp-Tat-Protein (100 ng), alleine oder in Gegenwart eines molaren Überschusses von Tat-cys22-Protein (1 μ g) inkubiert. Die HIV-1 LTR-Transaktivierungsaktivität von Tat und die Fähigkeit des Tat-cys22-Proteins mit Wildtyp-Tat zu konkurrieren, wurden 48 h nach Transfektion durch Bestimmen der CAT-Aktivität in Cytoplasmaextrakten (entsprechend 200 μ g Protein) wie beschrieben (Ref. 41) bestimmt. Die Prozentsätze (%) der Acetylierung von 14 C-Chloramphenicol sind angegeben.

[0094] [Fig. 2](#). Anti-Tat-spezifische IgG-Produktion in mit dem Tat-Protein geimpften Affen, bestimmt durch immun-enzymatischen Assay (ELISA). (A) zeigt die Ergebnisse, die in zwei Affen erhalten wurden, welche mit 10 oder 100 μ g rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 250 μ l autologem Serum und 250 μ l RIBI, subkutan inokuliert waren; (B) zeigt die Ergebnisse für den Kontrollaffen (M3). Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 und 37 Wochen inokuliert. Auch die Anti-Tat-Antikörper wurden in Woche 41 im Affen M2, der mit 10 μ g Tat-Protein inokuliert war, und für den Affen M3 bestimmt.

[0095] Das Vorliegen der Anti-Tat-Antikörper im Plasma geimpfter Tiere wurde mittels ELISA ausgewertet, das wie folgt hergestellt und charakterisiert wurde: Das Tat-Protein wurde 12 h bei 4°C in PVC-Platten mit 96 Vertiefungen adsorbiert (100 ng/Vertiefung in 200 μ l Carbonatpuffer, 0,05 M, pH 9,6). Nach 3 Wäschen mit PBS 1 \times ohne Ca^{++} und Mg^{++} (PBS-A), enthaltend Tween 20 (0,05%), wurde Plasma 1:50 verdünnt in 200 μ l Carbonatpuffer zugegeben (zweifach), und die Platten wurden 90' bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen mit PBS-A 1 \times /Tween 0,05% gewaschen, gefolgt von 90-minütiger Zugabe von 100 μ l des sekundären Antikörpers (1:1000 verdünnt in PBS-A 1 \times /Tween 0,1%/BSA 1%), konjugiert mit Meerrettichperoxidase, bei Raumtemperatur. Nach 5 Wäschen der Vertiefungen wurden 100 μ l Substrat (ABTS 1 mM, Amersham) 30-45' bei Raumtemperatur zugegeben. Es wurde eine Ablesung am Spektrophotometer (405 nm) durchgeführt. Jeder ELISA umfasste ein polyklonales Anti-Tat-Kaninchenserum (positive Kontrolle) in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:6400 und das präimmune Plasma (negative Kontrolle) in einer Verdünnung von 1:50. Der Cutoff-Wert wurde als Mittelwert der optischen Dichten (O. D.) von negativem Affenplasma +3 Standardabweichungen (S. D.), erhalten in allen Experimenten mit dem präimmunen Plasma, berechnet. Die gezeigten Ergebnisse sind der Mittelwert aus zwei Vertiefungen. > 2,7 zeigt an, dass die optischen Dichtewerte außerhalb der Skala lagen.

[0096] [Fig. 3](#). Titration von Anti-Tat-Antikörpern im Plasma von Affen, inokuliert mit 100 (M1) und 10 (M2) μ g rekombinantem Tat-Protein, beschrieben in [Fig. 2](#).

[0097] Ein Elisa wurde, wie in [Fig. 2](#) beschrieben, durchgeführt und Plasma wurde (zweifach) in skalaren Verdünnungen von 1:50 bis 1:25.600 getestet.

[0098] Die Werte auf der Ordinate stellen die Umkehrfunktion der höchsten Plasmaverdünnung dar, bei welcher der Test noch positiv war. Der Cutoff-Wert wurde für jede Verdünnung berechnet und entsprach der durchschnittlichen O. D. des präimmunen Plasmas aller Affen in allen Experimenten + 3 S. D.

[0099] [Fig. 4](#). Kartierung der Tat-Epitope, die erkannt werden vom Anti-Tat IgG von Affen, denen 100 (M1) und 10 (M2) μ g rekombinantes Tat-Protein injiziert wurden, wie dies in [Fig. 2](#) beschrieben ist. Für die Epitop-

kartierung wurden Elisa unter Verwendung von 8 synthetischen Peptiden durchgeführt, die den Tat-Aminosäuren (aa) 1-20, 21-40, 36-50, 46-60, 52-72, 56-70, 65-80, 73-86 entsprachen. Einhundert Mikroliter jedes Peptids (10 µg/ml in PBS-A/0,1% BSA) wurden 12 Stunden bei 4°C an eine PVC-Platte mit 96 Vertiefungen adsorbiert. Dann wurden die Platten gewaschen und 2 Stunden bei 37° mit 100 µl PBS-A/3% BSA inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten mit PBS-A/0,05% Tween 20 gewaschen, und dann wurden 50 µl Plasma, verdünnt in PBS-A und 3% BSA, in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurden die Elisa wie in [Fig. 2](#) beschrieben fortgesetzt. Plasma wurde in Woche 37 nach der primären Immunisierung erhalten. Die für jedes Peptid und für jede Plasmaverdünnung berechneten Cutoff-Werte entsprechen der durchschnittlichen O. D. des präimmunisierten Plasmas aller Experimente + 3 S. D. (A) zeigt die durchschnittlichen Ergebnisse von 1:50 verdünntem Plasma für jedes zweifach getestete Peptid; (B) zeigt die Antikörpertiter des in (A) gezeigten Plasmas, ausgedrückt als Kehrwert der höchsten Verdünnung, bei welcher der Test noch positiv war.

[0100] Fig. 5. Analyse der spezifischen Anti-Tat IgM-Antwort in Affen, inokuliert mit Tat, und bestimmt mittels ELISA. Drei Affen (M1-3) wurden subkutan mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein inokuliert, das in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI resuspendiert war; 3 Affen (M4-6) wurden subkutan inokuliert mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun; 2 Kontrollaffen wurden subkutan inokuliert mit RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) oder mit Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M8). Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 2, 6, 11 und 15 Wochen inokuliert. Das Vorliegen von Antikörpern wurde nach 2, 6, 11 und 15 Wochen untersucht. Das ELISA-Verfahren ist in [Fig. 2](#) beschrieben. In diesem Fall wurde das Plasma der Tiere (zweifach) bei einer Verdünnung von 1:100 getestet und ein IgM-Ziege-Anti-Affe-Serum (1:1000 verdünnt), konjugiert mit Meerrettichperoxidase, als sekundärer Antikörper verwendet.

[0101] Der Cutoff-Wert wurde als Durchschnitt (+2 S. D.) der O. D.-Werte des präimmunisierten Plasmas berechnet. Die Ergebnisse sind der Durchschnitt der O. D.-Werte (bei 405 nm) von zwei Vertiefungen, subtrahiert vom Cutoff-Wert (Δ O. D. 405).

[0102] Fig. 6. Analyse der spezifischen Anti-Tat IgG-Produktion in Affen, inokuliert mit Tat, getestet mittels ELISA. Drei Affen (M1-3) wurden mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI, inokuliert; 3 Affen (M4-6) wurden mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun, inokuliert; zwei Kontrollaffen wurden mit RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) oder mit Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) inokuliert (M8). Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 2, 6, 11, 15, 21, 28 und 32 Wochen inokuliert. In Woche 36 wurden die Affen M1 bis M6 mit 16 µg Tat-Protein, resuspendiert in 200 µl ISCOM und 300 µl PBS, inokuliert. Zudem wurden die Antikörper in Woche 40 und 44 evaluiert. Das ELISA-Verfahren und die Bestimmung des Cutoff-Wertes sind in [Fig. 2](#) beschrieben. Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf 1:50 verdünnte Proben. > 2,7 zeigt an, dass der O. D.-Wert außerhalb der Skala lag.

[0103] Fig. 7. Titration von Anti-Tat-Antikörpern in Plasma der Affen, die mit rekombinantem Tat (10 µg) in Gegenwart von RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6), wie in [Fig. 6](#) beschrieben, inokuliert wurden. Die Ergebnisse sind für jedes Plasma als Kehrwert der höchsten Serumverdünnung gezeigt, bei welcher der Test noch positiv war.

[0104] Fig. 8. Epitope von Tat, erkannt von Anti-Tat-IgG aus Affen, die mit rekombinantem Tat-Protein (10 µg) in Gegenwart von RIBI (M1 bis M3) oder Alaun (M4 bis M6), wie in [Fig. 6](#) beschrieben, inokuliert wurden. Plasma wurde in Woche 21 nach der Primärimmunisierung erhalten. Das Elisa-Verfahren und die Cutoff-Bestimmung sind in [Fig. 4](#) beschrieben. Die Ergebnisse in (A) beziehen sich auf Proben in einer Verdünnung von 1:50 und sind der Durchschnitt von zwei Vertiefungen. Die Ergebnisse in (B) beziehen sich auf die Titration von Plasma, gezeigt in (A), und sind als die höchste reziproke Verdünnung von Plasma ausgedrückt, bei welcher der Test noch positiv war.

[0105] Fig. 9. Analyse von Tat-spezifischen CTL. Der Assay wurde wie in Tabelle 5 beschrieben durchgeführt. Gezeigt ist ein Beispiel in der 36. Woche für den Affen M1, dem 10 µg Tat und RIBI subkutan injiziert worden waren, wie dies in [Fig. 6](#) beschrieben ist. Die Quadrate (Kontrolle) entsprechen den mit ungeladenen BLCL-Zielzellen inkubierten Zellen; die Rhomben entsprechen den Zellen, die mit den BLCL-Zielzellen, gepulst mit Tat (1 µg/250.000 Zellen), inkubiert wurden.

[0106] Fig. 10. Analyse der verzögerten Hypersensibilitätsreaktion auf Tat mittels Hauttest. Tat-Protein (5,1 und 0,2 µg), resuspendiert in 150 µl PBS, enthaltend 0,1% BSA, oder Puffer, in dem Tat resuspendiert war, wurde intradermal (i. d.) in einem rasierten Bereich auf dem Rücken des Tieres inokuliert. Der Bereich wurde zum Zeitpunkt 0 und nach 24, 48 und 72 Stunden fotografiert. Die Kontrollaffen wurden nur mit Puffer ino-

kuliert. Gezeigt ist ein Beispiel des Affen M2 (Woche 15), inokuliert mit 10 µg Tat und RIBI, wie in [Fig. 6](#) beschrieben. Die positive Reaktion auf Tat wurde 48 Stunden nach dem Hauttest deutlich.

[0107] Fig. 11. Humorale IgG-Antwort auf Tat in einem Affen (M1), der mit 200 µg des pCV-Tat-Plasmids, resuspendiert in 150 µl PBS-A, an zwei Stellen nahe den axillären Lymphknoten i.d. inokuliert war; einem Affen (M2) wurden 500 µg pCV-Tat, resuspendiert in 250 µl PBS-A, intramuskulär in zwei Stellen am Rücken injiziert; der Kontrollaffe (M3) wurde nicht mit Tat-DNA inokuliert, sondern erhielt als Kontrolle der Spezifität wiederholte Hauttests mit Tat. Den Affen wurde pCV-Tat zum Zeitpunkt 0 und nach 5, 10, 15, 22, 27, 32 und 37 Wochen injiziert. Schließlich wurden die Affen nach 42 Wochen mit rekombinantem Tat-Protein (16 µg), resuspendiert in 200 µl ISCOMs und 300 µl PBS, geboostet. Antikörper wurden in den Wochen 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48 und 58 evaluiert. Die Anti-Tat-Antikörperantwort in Plasma (1:50 verdünnt) wurde mittels Elisa analysiert, wie in [Fig. 2](#) beschrieben. Die Ergebnisse sind die durchschnittlichen O.D. von zweifachen Vertiefungen. (A) zeigt die Ergebnisse, die mit den zwei Affen erhalten wurden, welche mit 200 (M1) und 500 (M2) µg pCV-Tat-Plasmid geimpft waren. (B) zeigt die Ergebnisse des Kontrollaffen (M3).

[0108] Fig. 12. Titration von Anti-Tat-Antikörpern in Plasma des mit 200 µg pCV-Tat i. d. inokulierten Affen M2. Der Elisa ist in [Fig. 2](#) beschrieben. Die Ergebnisse an der Ordinate sind als Kehrwert der höchsten Verdünnung ausgedrückt, bei welcher der Test noch positiv war.

[0109] Fig. 13. Analyse der Anti-Tat IgG-Produktion in drei Affen (M9 bis M11), inokuliert mit 1 mg pCV-Tat, und in einem Kontrollaffen (M12), inokuliert mit 1 mg des Kontrollvektors pCV-0. DNA wurde in 1 ml PBS-A resuspendiert und intramuskulär in zwei Stellen am Rücken injiziert. Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 6, 11, 15, 21, 28 und 32 Wochen inokuliert. In der 36. Woche erhielten die Affen M9 bis M11 einen Boost mit 16 µg rekombinantem Tat-Protein, resuspendiert in 200 µl ISCOMs und 300 µl PBS. Das Vorliegen von Anti-Tat-Antikörpern wurde in den Wochen 2, 6, 11, 15, 21, 28, 32, 36, 40 und 44 evaluiert. Elisa und Cutoff-Bestimmung sind in [Fig. 2](#) beschrieben.

[0110] Fig. 14. Kinetik der proliferativen Antwort von PBMC aus *Macaca fascicularis* auf die Co-Stimulation mit monoklonalen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern auf paramagnetischen Kügelchen (Anti-CD3/28-Kügelchen). Aus den PBMC wurde die CD8-positive Subpopulation mittels immunmagnetischer Verfahren depletiert. Danach wurde die Hälfte der Anti-CD8-depletierten Lymphocyten ab Tag 3 mit PHA und IL-2 (40 U/ml) stimuliert; den übrigen Teil ließ man an den Anti-CD3/28-beschichtete Kügelchen-Antikörpern haften, wodurch eine CD8-depletierte und CD3/28-positive Lymphocytenpopulation erhalten wurde. Dieser Zellfraktion wurde IL-2 (40 U/ml) ab Tag 10 der Kultur zugegeben. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen gezählt und ihre Lebensfähigkeit bestimmt. Das Verhältnis Kügelchen:Zellen wurde konstant gehalten. Es ist die Anzahl der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten angegeben.

[0111] Fig. 15. Antiviraler Effekt der Co-Stimulation mit Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC von *Macaca fascicularis*. Die CD8-depletierten und CD8-depletierten CD3+/CD28+-Lymphocyten, erhalten aus 4 Affen ([Fig. 15A bis 15D](#)) durch die in [Fig. 14](#) beschriebenen Verfahren, wurden stimuliert, wie dies in Beispiel 7 beschrieben ist. Die beiden Fraktionen wurden am Tag 0 mit 0,1 M.O.I. SIVmac251/63M in vitro infiziert.

[0112] Die Stimulation wurde mit PHA und IL-2, zugegeben seit Tag 3, und mit den Anti-CD3/28-Kügelchen ohne Zugabe von exogenem IL-2 durchgeführt. Die virale Produktion wurde durch Bestimmung der p27-Spiegel (ng/ml) in den Zellüberständen an den Tagen 6 und 12 nach der Infektion evaluiert, wie dies in Beispiel 7 beschrieben ist (hellgrau: PHA+IL-2; dunkelgrau: Anti-CD3/28-Kügelchen auf PBMC CD8-/CD3+/CD28+).

[0113] Fig. 16. Funktionale Charakterisierung dendritischer Zellen (DC), erhalten aus dem peripheren Blut von Affen. (A) ³H-Thymidinaufnahme am Tag 4 der allogenen, gemischten Leukozytenkultur (AMLR), zum Vergleich der Antigen-präsentierenden Funktion (APC, bestimmt als Induktion der Proliferation von allogenen T-Zellen) von DC und Makrophagen (M ϕ), erhalten aus PBMC von *Macaca fascicularis* nach Auftrennung auf Percoll-Gradient und Adhäsion an Kunststoff. Nicht-adhärenente Zellen wurden entfernt, und adhärenente Zellen wurden durch Zugabe von GM-CSF (200 ng/ml) und IL-4 (200 Einheiten/ml) alle 3 Tage zur Reifung zu DC induziert. Alle 3 Tage wurde die Hälfte des Kulturmediums (RPMI, 10% FCS) entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 6-7 Tagen wurde eine morphologische Veränderung der Cytokin-induzierten Zellen beobachtet, die einen typischen DC-Phänotypen (Adhäsionsverlust, Clusterbildung, Finger) erwarben, was auch durch Bestimmung typischer Membranmarker verifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Monocyten waren nicht Cytokin-induziert und wurden in dem gleichen Medium kultiviert, das alle 3 Tage ersetzt wurde. Die Zellen behielten die Monocyten-Makrophagen-Merkmale, wie die Adhäsion, bei. Am Tag 7 wurden beide Zellpopulationen mit T-Lymphocyten eines menschlichen Blutspenders angeregt, durch Ficoll- und Percoll-Gradient und durch Ad-

häSION gereinigt und dann eingefroren. Zellproliferationsassays wurden in einer Platte mit 48 Vertiefungen durchgeführt. Fünfhunderttausend T-Lymphocyten wurden mit 5000 DC oder M ϕ stimuliert (Verhältnis T:APC = 100:1). Die Kultur wurde 4 Tage aufrecht erhalten, und festgelegte Aliquots der Zellsuspension wurden dreifach in Platten mit 96 Vertiefungen übertragen. Dann wurde 1 μ Ci ³H-Thymidin über 16 Stunden zugegeben, und die Counts pro Minute (cpm) des integrierten Präkursors wurden mit einem β -Zähler bestimmt.

[0114] (B) APCs, wie DC und M ϕ , erhalten wie in **Fig. 16A** angegeben, wurden mit T-Lymphocyten eines anderen Affen angeregt, die, wie oben für den menschlichen Spender angegeben, erhalten wurden. Die größere Fähigkeit, das Antigen zu präsentieren, ist ein typisches Merkmal der DC im Vergleich zu M ϕ . APCs wurden in skalaren Konzentrationen zu T-Lymphocyten gegeben, um die proliferativen Antworten zu evaluieren, die bei unterschiedlichen Verhältnissen von T:APCs (DC oder M ϕ) erhalten wurden.

[0115] Die folgenden Beispiele sind als veranschaulichend aufzufassen und nicht als den Umfang der Erfindung einschränkend auszulegen.

Beispiel 1. Expression, Reinigung und Charakterisierung von Wildtyp-Tat-Protein (IIIB-Isolat), mutierten Tat-Proteinen und Wildtyp-Tat-Peptiden.

[0116] Früher begegnete man zahlreichen Schwierigkeiten beim Reinigen und Aufrechterhalten der biologischen Aktivität des Tat-Proteins aufgrund der Leichtigkeit, mit der es oxidiert, aggregiert und seine Aktivität verliert. Dies ist bedingt durch die hohen Mengen an Cysteinresten, die intra- und intermolekulare Bindungen bilden können und somit die Struktur des nativen Proteins (Ref. 159, 41) modifizieren. Die cDNA oder das tat-Gen (Seq. 1, Beispiel 2), das in den pL-syn-Vektor kloniert wurde, bereitgestellt von Dr. J. F. DeLamarter und B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S. A., Genf, Schweiz), wurde für die Expression des Proteins in E. Coli verwendet.

[0117] Um eine wirksame Immunisierung mit Tat für Impfstoffzwecke zu erreichen, betrachtet es die Erfinderin als fundamental, ein biologisch aktives Tat-Protein zu erhalten, wie dies im Abschnitt „Detaillierte Beschreibung der Erfindung“ beschrieben ist. Daher beschreiben die Verfahren zur Herstellung und Reinigung von Tat, die in diesem Beispiel und in den nächsten Beispielen 1B, 2 und 3 beschrieben sind, notwendige Prozeduren und Kontrollen, um ein biologisch aktives Tat-Protein zu erhalten, das ein wirksames Immunogen zum Schutz vor HIV-Infektion, AIDS oder vor der Entwicklung von HIV-bedingten Erkrankungen ist.

[0118] Ein erstes Verfahren, das wir einsetzten, um ein aktives Protein zu erhalten, basierte auf aufeinanderfolgenden Schritten einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie Flüssigkeits- und Ionenaustauschchromatographie (Ref: 15, 41). Das mit diesen Verfahren erhaltene Protein hat eine Reinheit von mehr als 95% und ist aktiv (Ref. 41, 42).

[0119] Jedoch wurde aufgrund der Proteinoxidation, die das Hauptproblem der kommerziellen Tat-Präparate ist, keine gute Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge erhalten. Aufgrund unserer Beobachtungen, dass die basische Region des Tat-Proteins eine starke Affinität gegenüber Heparin aufweist und dass Heparin dessen Oxidation verhindert, setzten wir die Heparin-Affinitätschromatographie ein und definierten ein neues Tat-Reinigungsprotokoll, wie von Chang et al. (Ref. 26) beschrieben. Zellen (10 g Gewicht) von E. coli, die Tat exprimieren, wurden in 40 ml Lysepuffer (Dinatriumphosphat 20 mM, pH 7,8; Glycerin bei 2,5%; PMSF 0,2 mM; DTT 5 mM; Mannitol 50 mM; Ascorbinsäure 10 mM; NaCl 500 mM) unter Verwendung eines Ultrasonic Liquid Processor (Model XL2020, Heat System Inc.) mit drei Entladungen von jeweils 20 Sek. beschallt. Das Lysat wurde 30 Min. bei 12.000 g zentrifugiert, und der Überstand wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit 2 ml Heparinsepharoseharz, das mit dem Lysepuffer vorgewaschen war, inkubiert. Das Harz wurde auf eine Glassäule geladen mit dem Lysepuffer gewaschen, bis das Protein in dem Waschmedium undetektierbar war. Das gebundene Material wurde mit Lysepuffer eluiert, der 2 M NaCl enthielt, und das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die Homogenität des eluierten Proteins wurde mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Das gereinigte Protein wurde bei -70°C lyophilisiert gelagert und vor Verwendung in einem entgasten Puffer resuspendiert.

[0120] Die biologische Aktivität von gereinigtem Tat-Protein wurde gemäß dem obigen Protokoll evaluiert durch einen „Rescue“-Assay viraler Infektion in HLM-1-Zellen, die von HeLCD4+-Zellen abgeleitet waren, die Proviren enthielten, denen das tat-Gen fehlte, und die von Sadaie et al. (Ref. 140) erhalten und beschrieben worden waren. Der "Rescue"-Assay viraler Infektion, beschrieben von Ensoli et al. (Ref. 41), bestand darin, die fehlende Tat-Expression in HLM-1 Zellen (2×10^5) durch Zugabe von exogenem Tat-Protein (2 μ g/ml) zu komplementieren und die virale Replikation durch die Bestimmung des p24-Antigens, das im Kulturmedium 48

Stunden nach der Zugabe des exogenen Tat-Proteins freigesetzt wurde, mit handelsüblichen Kits zu evaluieren. Die Ergebnisse der von Chang et al. (Ref. 26) beschriebenen "Rescue"-Experimente zeigen, dass das mit diesem Verfahren gereinigte Tat-Protein aktiv ist und dieses Reinigungsverfahren im Vergleich zu den vorbeschriebenen Verfahren (Ref. 40, 41, 42) sowohl hinsichtlich der Reinheit als auch der biologischen Aktivität von Tat besser, einfacher und kostengünstiger ist.

[0121] Unterschiedliche Präparate von rekombinantem Tat, die wie oben beschrieben gereinigt waren, wurden in Gegenwart von Freund-Adjuvans gemäß üblichen Protokollen in Mäuse und Kaninchen inokuliert (Ref. 4). Die Ergebnisse der durch die Immunisierung induzierten Antikörperantwort sind in Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1.

Analyse der Antwort Anti-Tat-spezifischer Antikörper in Seren von Mäusen und Kaninchen, immunisiert mit dem rekombinanten Tat-Protein.

Anti-Tat-Antikörper	OD-ELISA/Tat			Western Blot
	1:500	1:1000	1:2000	
Kaninchen	0,651	0,400	0,175	+
Maus	0,502	0,240	0,150	+

[0122] Das in *E. coli* produzierte, rekombinante Tat-Protein wurde eingesetzt, um Mäuse und Kaninchen gemäß üblichen Immunisierungsprotokollen zu immunisieren (Ref. 4). Die Seren der immunisierten Tiere wurden mittels ELISA auf das Vorliegen von Anti-Tat-Antikörpern unter Verwendung von drei Serumverdünnungen (1:500 bis 1:2000) analysiert. Die Ergebnisse sind der Mittelwert der Messwerte von zwei Kaninchen und drei Mäusen bei 405 nm. Darüber hinaus wurden die Seren mittels Western Blot mit dem rekombinanten Tat-Protein (100 ng) getestet.

[0123] Die Ergebnisse von Tabelle 1 zeigen, dass das von uns hergestellte, rekombinante Tat in der Lage war, in beiden Tierspezies eine Antikörperantwort zu induzieren, wie dies mit ELISA und Western Blot unter Verwendung des rekombinanten Tat-Proteins getestet wurde. Diese Antikörper waren in der Lage, die Internalisierung und die biologischen Aktivitäten von Tat zu inhibieren (Ref. 40, 41, 42). Der pL-syn-Vektor und das Reinigungsprotokoll des Tat-Proteins werden eingesetzt, um die in Beispiel 2 beschriebenen Mutanten von Tat zu exprimieren und zu reinigen. Die biologische Aktivität der mutierten und gereinigten Tat-Proteine wird mittels „Rescue“-Assays der viralen Infektion in HLM-1 Zellen, Assays der Proliferation von KS-Zellen und in vivo in Mäusen bestimmt, wie dies oben für das Wildtyp-Tat-Protein beschrieben wurde. Darüber hinaus werden die mutierten Tat-Proteine in Gegenwart von Wildtyp-Tat (in Reihenkonzentrationen) getestet, um den negativen, transdominanten Effekt auf die nicht-virale Replikation zu verifizieren. Der pL-syn-Vektor und das Reinigungsprotokoll werden verwendet, um Fusionsproteine dieses Typs zu exprimieren und zu reinigen: Tat (Wildtyp oder Mutanten davon)/IL-12 oder Tat (Wildtyp oder Mutanten davon)/IL-15 oder Teile desselben oder Tat (Wildtyp oder Mutanten davon)/andere Moleküle (oder Teile davon), die in der Lage sind, die Immunantwort auf Tat alleine oder in Verbindung mit anderen viralen Produkten zu verstärken. Rekombinante Fusionsmoleküle werden unter Verwendung der in den Beispielen 2 und 3 beschriebenen Sequenzen und Primer hergestellt. Als Alternative werden synthetische Peptide, die Regionen von Tat oder von anderen viralen Produkten oder von Cytokinen entsprechen, welche in Kombination mit Tat zu verwenden sind, als Immunogene eingesetzt. Die Peptidsequenzen von Tat sind:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT (Sequenz ID Nr. 11)

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT (Sequenz ID Nr. 12)

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK (Sequenz ID Nr. 13)

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ (Sequenz ID Nr. 14)

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ (Sequenz ID Nr. 15)

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD (Sequenz ID Nr. 16)

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE (Sequenz ID Nr. 17)

[0124] Die Tat-Mutantenpeptide enthalten die gleichen Aminosäuresubstitutionen der mutierten Tat-Proteine,

die in Beispiel 2 beschrieben sind. Die Peptide werden in Kombination mit dem Peptid, welches das universelle T-Hilfspeptid des Tetanoustoxoids darstellt, oder mit anderen Peptiden, die T-Hilfspeptide darstellen, verwendet (Ref. 77).

Beispiel 1A. Aufnahme pikomolarer Konzentrationen (10 bis 100 ng/ml) von biologisch aktivem Tat durch aktivierte Endothelzellen wird von Integrin-Rezeptoren vermittelt.

[0125] Wenn normale Endothelzellen in vitro mit inflammatorischen Cytokinen aktiviert werden, sprechen sie auf die Effekte von extrazellulärem Tat an, was durch die Induktion der $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine bedingt ist (Ref. 9, 10). Gleichermäßen erhöhen inflammatorische Cytokine (IC) oder bFGF die Integrinexpression auf Endothelzellen in vivo, was zu einem synergistischen KS-fördernden Effekt führt, wenn ein biologisch aktives Tat in Mäuse gleichzeitig mit oder nach bFGF inokuliert wird (Ref. 42). Zudem erwerben IC-aktivierte Endothelzellen eine APC-Funktion.

[0126] In diesem Beispiel ist gezeigt, dass mit IC aktivierte Endothelzellen rhodaminierte, biologisch aktives Tat-Protein effizienter aufnehmen, und dass dies durch die Integrinrezeptoren vermittelt wird.

[0127] Wegen der Schwierigkeit, die Internalisierung sehr niedriger Konzentrationen von kaltem Tat zu beobachten, wurde das Protein mit Rhodamin markiert (Ref. 98). Das rhodaminierte Tat zeigte noch immer eine Aktivierung der KS-Zellproliferation im gleichen Konzentrationsbereich wie unmarkiertes Tat, was darauf hindeutet, dass der Markierungsvorgang dessen biologische Funktion nicht beeinträchtigte. Tat-Aufnahmeexperimente wurden wie folgt durchgeführt: humane Umbilikalvenen (HUVE)-Zellen wurden 5 Tage mit IC gezüchtet und behandelt, wie beschrieben (Ref. 9, 46). Dann wurden die Zellen trypsinisiert, auf Objektträgern mit 8 Vertiefungen (Nunc Inc., Naperville, IL) bei $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung plattiert und 18 Stunden in Medium, das 15% fötales Rinderserum (FBS) enthält, in Gegenwart von IC inkubiert. Serumfreie (SF, RPMI, 1% BSA, 0,1% Antibiotika, Fungizon) Medien wurden zugegeben und die Träger 2 h bei 4°C vorinkubiert. Frisches Medium, enthaltend rhodaminiertes Tat in Reihenverdünnung, wurde den Zellen zugegeben, die Zellen über den angegebenen Zeitraum bei 37°C inkubiert wurden. Negative Kontrollen waren rhodaminiertes BSA in dem gleichen Puffer wie Tat. Die Zellen wurden in eiskaltem Aceton-Methanol (1:1) fixiert und die Aufnahme und Lokalisierung von Tat mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und fotografiert. Die Ergebnisse wurden durch Vergleichen der Fluoreszenz von Proben mit der negativen Kontrolle evaluiert und bezüglich der Aufnahmemenge ohne vorherige Kenntnis des Proben-codes von 0 bis ++++ bewertet.

[0128] Um die Wege zu untersuchen, über die Tat von aktivierten Endothelzellen aufgenommen wird, wurden Experimente unter Verwendung von aktivierten HUVE-Zellen mit einem großen Bereich von Konzentrationen an exogenem Tat durchgeführt, wie sie zuvor zum Induzieren des HUVE- oder KS-Zellwachstums (10-50 ng/ml) oder zur HIV-1-Transaktivierung durch Zugabe des Proteins zu Zellen, die den HIV-1-Promoter oder das Provirus tragen (0,5 bis 1 µg/ml), verwendet worden waren.

[0129] In diesen Experimenten wurden zur Übereinstimmung mit Aufnahmeinhibierungsexperimenten (siehe unten) Zellen 2 Stunden bei 4°C mit Medium vorinkubiert, dem fötales Kälberserum fehlte. Diese Vorinkubation hat keinen Einfluss auf die nachfolgende Aufnahme von rhodaminiertem Tat.

[0130] Mit rhodaminiertem Tat begann die Aufnahme und Translokation des Proteins am Kern oder an den Nucleoli aktivierter HUVE-Zellen innerhalb von 15 Minuten der Inkubation mit nur 10 ng/ml rhodaminiertem Tat sichtbar zu werden. Die Dichte des aufgenommenen Tat in den Zellen nahm dosis- und zeitabhängig zu. Rhodaminiertes BSA oder rhodaminiertes Puffer zeigten keine Signale und wurden routinemäßig als negative Kontrollen verwendet.

[0131] Um zu bestimmen, ob die Aufnahme von Tat in aktivierten HUVE-Zellen durch die gleichen Integrine vermittelt wurde, wie sie auf KS-Zellen exprimiert zu finden sind, wurden Inhibierungsexperimente durch Vorinkubieren IC-aktivierter Endothelzellen mit kaltem Tat (Kompetitor), den physiologischen Liganden für diese Rezeptoren, wie Fibronectin (FN) oder Vitronectin (VN), oder durch Vorinkubieren der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen die RGD-Bindungsregionen der $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren gerichtet sind, durchgeführt. Über das experimentelle Vorgehen wird kurz berichtet. Nach dem Plattieren auf Trägern mit 8 Vertiefungen wurden HUVE-Zellen 18 h mit Medium, das 15% FBS enthält, und dann mit SF-Medium, enthaltend unmarkiertes Tat (kalter Kompetitor) (Tabelle 1A), FN, VN (Tabelle 1B) oder monoklonale Antikörper, die gegen die RGD-Bindungssequenz der FN- oder VN-Rezeptoren ($\alpha_5\beta_1$ bzw. $\alpha_v\beta_3$) gerichtet sind, oder monoklonale Antikörper, die gegen den menschlichen Faktor VIII gerichtet sind (Kontroll-Antikörper) ([Fig. 1A](#)), 2 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen über die angegebenen Zeiträume mit rhodaminiertem Tat inkubiert. Die Kontrolle

bestand aus Zellen, die 2h bei 4°C nur mit SF-Medium behandelt und mit rhodaminiertem BSA inkubiert wurden. Die Zellen wurden fixiert, visualisiert und photographiert, und die Ergebnisse wurden wie oben angegeben bewertet.

TABELLE 1A

Inhibierung der Aufnahme von 100 ng/ml und 1 µg/ml rhodaminiertem Tat durch Cytokin-aktivierte HUVE mittels Vorinkubation der Zellen mit 1 µg/ml unmarkiertem Tat.^a

Vorinkubation	Rhodaminiertes Tat	Aufnahme von Tat
Serumfreies Medium	100 ng/ml	+++
1 µg/ml unmarkiertes Tat	100 ng/ml	+/-
Serumfreies Medium	1 µg/ml	++++
1 µg/ml unmarkiertes Tat	1 µg/ml	+/-

^aHUVE-Zellen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert (Ref. 40). IC wurden aus mit humanem T-lymphotropem Virus Typ II (HTLV-II) transformierten CD4⁺ T-Zellen oder Phytohämagglutinin-stimulierten T-Zellen erhalten und die Überstände verwendet (1:8), um die HUVE-Zellen (Passage 8-14) 5 Tage zu aktivieren, wie dies zuvor beschrieben wurde (Ref. 9, 46). Dieser Überstand enthält Interleukin-1α (IL-1α) und -β (IL-1β), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und -β (TNF-β) sowie Interferon-γ (IFN-γ) (Ref. 9).

[0132] Das Tat-Protein wurde an Lysinresten im Wesentlichen wie beschrieben rhodaminiert (Ref. 98). Kurz gesagt, wurden 50 µg rekombinantes Tat (2 mg/ml) durch Zugabe von 2,5 µl 1M Na₂CO₃ auf pH 9,0 gebracht. 2,5 µl von 1 mg/ml TRITC in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden zugegeben, und man ließ die Reaktion 8 h bei 4°C ablaufen. Nicht umgesetztes TRITC wurde durch Zugabe von 2,5 µl 0,5M NH₄Cl gequenchet, der pH wurde unter Verwendung von 1 M HCl auf 7,0 gesenkt, und das rhodaminierte Tat wurde mit zwei Wechseln von 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM Dithiothreitol (DTT), dialysiert, um das abgeschreckte TRITC abzuziehen. In gleicher Weise rhodaminierte(s) BSA oder PBS wurde als negative Kontrolle verwendet. Rhodaminiertes Tat wurde auf die AIDS-KS-Zellwachstumsaktivität getestet, wie beschrieben, um sicher zu stellen, dass die biologische Aktivität erhalten blieb (Ref. 40).

[0133] HUVE-Zellen wurden 2 Stunden mit serumfreiem Medium oder 1 µg/ml unmarkiertem Tat in serumfreiem Medium vorinkubiert, dann 60 Minuten mit 100 ng/ml oder 1 µg/ml rhodaminiertem Tat inkubiert, und die Tat-Aufnahme wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die negativen Kontrollen (+/- Aufnahme) waren Vorinkubation mit serumfreiem Medium, gefolgt von Inkubation mit rhodaminiertem BSA.

TABELLE 1B

Inhibierung der Aufnahme von 10 ng/ml rhodaminiertem Tat durch Cytokin-aktivierte HUVE mittels Vorinkubation der Zellen mit einem Überschuss von FN oder VN.^a

Vorinkubation	Aufnahme von rhodaminiertem Tat
Serumfreies Medium	++++
100 ng/ml FN	+/-
100 ng/ml VN	+/-

^aHUVE-Zellen wurden 2 Stunden mit serumfreiem Medium oder FN oder VN in serumfreiem Medium vorinkubiert, dann 60 Minuten mit 10 ng/ml rhodaminiertem Tat inkubiert, und die Tat-Aufnahme wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die negativen Kontrollen (+/- Aufnahme) waren die Vorinkubation mit serumfreiem Medium, gefolgt von Inkubation mit rhodaminiertem BSA.

[0134] Die Aufnahme von Tat wurde mit kaltem Tat (Tabelle 1A), mit FN oder VN (Tabelle 1B) oder durch vorherige Behandlung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen die RGD-Bindungsregionen sowohl des FN-Rezeptors α₅β₁ als auch des VN-Rezeptors α_vβ₃ gerichtet waren, inhibiert (Fig. 1A). Die Intensität der Fluoreszenz in den Zellen wurde auf Werte verringert, die bei der negativen Kontrolle zu sehen sind, und vor

der Inkubation der Zellen mit gegen den Humanfaktor VIII gerichteten monoklonalen Antikörpern, verwendet als negative Kontrolle, wurde keine Inhibierung beobachtet, was darauf hinweist, dass die Inhibierung spezifisch war ([Fig. 1A](#)).

[0135] Die Aufnahme und Kernlokalisierung von 100 ng/ml Tat wurde inhibiert durch Vorinkubation der Zellen mit den monoklonalen Antikörpern, die gegen die RGD-Bindungsregion des $\alpha_5\beta_1$ -Rezeptors und des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors gerichtet waren. In beiden Fällen war die Inhibierung jedoch nicht vollständig. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme pikomolarer Konzentrationen von Tat durch die gleichen Integrine vermittelt wird, die an der Zelladhäsion an Tat beteiligt sind (Ref. 10). Bei einer höheren Konzentration von extrazellulärem Tat (wie z. B. ≥ 100 ng/ml) ist ein nicht von Integrinen vermittelter Weg für die Aufnahme eines Teils des Proteins verantwortlich.

[0136] Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Aufnahme von iodiertem Tat mit Lymphocyten- und Epithelzelllinien linear und abhängig von der Tat-Konzentration im Medium erfolgte und keine oder nur geringe Konkurrenz von einem Überschuss an kaltem Tat bekam, was auf eine fehlende Rezeptorbeeiligung hinweist (Ref. 98). Allerdings betrug der Konzentrationsbereich von Tat in dem Medium bei dieser Studie etwa 1-100 $\mu\text{g/ml}$ (Ref. 98), was deutlich höher ist als die Konzentrationen, die benötigt werden, um die Aufnahme von Tat durch Zellen, die auf seine biologische Aktivität ansprechen, wie aktivierte primäre Endothelzellen, zu beobachten. Zudem kann die Iodierung von Tat dessen Struktur und dessen Aufnahme durch die Zellen erschweren, und von diesen Autoren wurden keine Ergebnisse für die biologische Aktivität von iodiertem Tat gezeigt.

[0137] Diese Ergebnisse, die noch unveröffentlicht sind, zeigen, dass die Aufnahme von Tat auf mindestens zwei Wegen erfolgt, die von der Konzentration des Proteins abhängen. Bei niedrigen Tat-Konzentrationen (10-100 ng/ml) wird die Tat-Aufnahme von den $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren durch die Wechselwirkung mit der RGD-Sequenz des Proteins vermittelt, während bei einer höheren Konzentration an extrazellulärem Tat ein Integrin-unabhängiger Weg wichtiger ist. Die Integrin-vermittelte Aufnahme pikomolarer Konzentrationen von Tat durch IC-aktivierte Endothelzellen weist auf ein vollständig aktives Protein hin, das in Antigene präsentierende Zellen, wie aktivierte Endothelzellen und dendritische Zellen, welche die Immunantwort initiieren, eindringen kann.

Beispiel 2. Konstruktion und Charakterisierung von mutierten tat-Genen (nicht beansprucht)

[0138] Wir produzierten 19 Mutanten in unterschiedlichen Tat-Regionen mittels ortsspezifischer Mutagenese oder mittels Deletion. Die Sequenz jeder mutierten DNA wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Die cDNAs der mutierten tat-Gene wurden in die Pst1-Stelle des pCV0-Vektors kloniert, wie dies in Beispiel 3 beschrieben ist. Jede Mutante wurde, wie von Ensoli et al. beschrieben (Ref. 41), in COS-1-Zellen oder in die Jurkat T-Zelllinie mit dem HIV-1 LTR-CAT-Plasmid cotransfiziert, in dem das CAT-Reportergen von den HIV-1-LTR gesteuert wird. Die unveröffentlichten Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2

Effekt von Tat-Mutanten auf die HIV-1 LTR-CAT-Transaktivierung und blockierender Effekt (negative Transdominante) gegenüber der Tat-Wildtyp-Aktivität

MUTANTEN	Transaktivierende Aktivität ^a		Transdominante Aktivität ^b (% Inhibierung) Mittelwert
	Mittelwert (Faktor)	(Min-Max-Werte)	
CYS 22	0,09	(0,021-0,22)	21
THR 23	0,36	(0,16-1)	
THR 23A	0,30	(0,16-0,78)	
ASN 24	0,34	(0,34-0,82)	
ASN 24A	0,42	(0,45-0,95)	
TYR 26	0,14	(0,08-0,19)	
LYS 28/29	0,52	(0,19-1,04)	
CYS 30	0,30	(0,045-0,65)	
CYS 31	0,60	(0,27-1,09)	
PHE 32	0,31	(0,077-0,097)	
LYS 33	0,04	(0,0027-0,068)	46
GLU 35	0,31	(0,19-0,43)	
PHE 38	0,05	(0,043-0,057)	98
LYS 41	0,04	(0,025-0,061)	97
TYR 47	0,58	(0,31-0,8)	
57 A	0,35	(0,26-0,44)	
TAT-RGD	0,94	(0,73-1,15)	
TAT-KGE	1,11	(0,67-1,49)	
TAT-Wildtyp	1	1	

^aDie Ergebnisse sind als Inkrement der Aktivierung der CAT-Aktivitätswerte angegeben, die durch Wildtyp Tat (Faktor = 1) induziert werden. ^bDie Ergebnisse sind als prozentuale (%) Inhibierung der Wildtyp-Tat-Aktivität ausgedrückt.

[0139] Aus den in Tabelle 2 angegebenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass bei der Mehrheit der Mutanten der transaktivierende Effekt der HIV-1 LTR verringert war oder fehlte, mit Ausnahme der RGD-Mutante, die eine ähnliche Aktivität wie Wildtyp Tat aufwies. Wir wählten die 4 Mutanten (cys22, lys33, phe38, lys41) mit der niedrigsten (nahezu Null) transaktivierenden Aktivität und bestimmten den negativen, transdominanten Effekt auf die transaktivierende Aktivität von Wildtyp-Tat. Zu diesem Zweck wurden COS-1 Zellen mit jedem Vektor, der eine Tat-Mutante enthielt, und dem pCV-Tat-Vektor (in einem Molverhältnis von 10:1) in Gegenwart des HIV-1 LTR-CAT-Vektors cotransfiziert. Wie in Tabelle 2 gezeigt, inhibierten die lys41- und phe38-Mutanten die Tat-Aktivität nahezu vollständig, während die lys33- und cys22-Mutanten die Tat-Aktivität nur teilweise inhibierten. Allerdings konkurrierte das cys22-rekombinante Protein (beschrieben im folgenden Beispiel 3) mit dem Wildtyp-Tat-Protein um die Transaktivierung von HIV-1 LTR-CAT ([Fig. 1B](#)). Gewählt wurden eine Mutante in der Cysteinregion (cys22), eine in der Kernregion (lys41), eine mit deletierter RGD-Sequenz (RGDΔ) und eine Doppelmutante, welche die Mutation bei lys41 und die Deletion der RGD-Sequenz (lys41-RGDΔ) enthielt.

[0140] Nachfolgend sind die Sequenz des tat-Inserts und die für die Impfung ausgewählten Mutanten angegeben. Dabei wird eine Reihe von tat-Mutanten beschrieben, hergestellt durch 1) Substitution einer Base, um eine Aminosäuresubstitution zu erhalten, und 2) Deletion einer Base, um eine Deletion der entsprechenden Aminosäuren zu erhalten. Die Substitutionen und Deletionen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese erhalten. Die Sequenzen des Wildtyp-tat-Gens und der tat-Gen-Mutanten, die nachfolgend angegeben sind, wurden in den pCV0-Plasmidvektor wie oben beschrieben eingesetzt.

[0141] Mit Seq. 1 ist die HIV-1 tat-Gensequenz des BH-10-Klons und seines abgeleiteten Proteins gemeint. Mit Seq. 2 ist die cys22-Mutantensequenz (und ihr abgeleitetes Protein) gemeint, dargestellt durch eine Substitution des Thymin(T)-Nukleotids in Position 64, beginnend vom 5'-Ende mit dem Guanin(G)-Nukleotid. Diese Substitution erzeugt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz eine Substitution eines Cysteins (C im Einbuchstabencode) in Position 22 am aminoterminalen Ende, mit einem Glycin (G im Einbuchstabencode). Mit Seq. 3 ist die lys41-Mutantensequenz (und ihr abgeleitetes Protein) gemeint, dargestellt durch eine Substitution des Adenin(A)-Nukleotids in Position 122 vom 5'-Ende mit dem Cytosin(C)-Nukleotid. Diese Substitution erzeugt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz eine Substitution eines Lysins (K im Einbuchstabencode) in Position 41 vom aminoterminalen Ende mit einem Threonin (T im Einbuchstabencode). Mit Seq. 4 ist eine Sequenz der RGD-Mutante (und ihres abgeleiteten Proteins) gemeint, dargestellt durch die Deletion der Nukleotidsequenz CGAGGGGAC von Nukleotid 232 bis Nukleotid 240, beginnend vom 5'-Ende des Wildtyp-tat-Gens. Dies ergibt eine Deletion der Aminosäuren Arginin-Glycidin-Asparaginsäure (RGD im Einbuchstabencode) in den Positionen 78-80 vom aminoterminalen Ende. Mit Seq. 5 ist eine Sequenz der lys41-RGDΔ-Doppelmutante (und ihres abgeleiteten Proteins) gemeint, hervorgegangen aus einer Kombination der oben beschriebenen Mutanten.

Wildtyp-tat-Nukleotidsequenz (Seq. 1) (Sequenz ID Nr. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 2)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Cys22-Mutanten-Nukleotidsequenz (Seq. 2) (Sequenz ID Nr. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAAGTCTTGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 4)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Lys41-Nukleotidsequenz (Seq. 3) (Sequenz ID Nr. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAACAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 6)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

RGDΔ-Mutanten-Nukleotidsequenz (Seq. 4) (Sequenz ID Nr. 7)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 8)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Lys41-RGDΔ-Mutanten-Nukleotidsequenz (Seq. 5) (Sequenz ID Nr. 9)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAACAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 10)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Beispiel 3. Konstruktion und Charakterisierung der DNA-Immungene.

[0142] Die DNA-Moleküle für die Inokulierung von Tieren werden in den 6,4 kb pCV0-Plasmidvektor eingesetzt (Ref. 5). Dieses Plasmid umfasst zwei SV40-Replikationsursprünge, den späten Hauptpromoter des Adenovirus (AdMLP) und die Spleiss-Sequenzen des Adenovirus und der Mäuse-Immunglobulingene, die cDNA des Mäuse-Dihydrofolatreduktasegens (dhfr) und das SV40-Polyadenilierungssignal. Die Stelle für das Pst1-Restriktionsenzym liegt an der 3'-Position des AdMLP und stellt die Stelle dar, in die das interessierende exogene Gen kloniert wird. Die tat-Gen-cDNA (261 Basenpaare) (Seq. 1, Beispiel 2) von HIV-1 wurde vom HIV-1 BH10-Klon abgeleitet (Ref. 126) und kodierte ein 86 Aminosäuren langes Protein. Der pCV-Tat-Vektor

(Ref. 5) wurde erhalten durch Klonieren der tat-cDNA in die pCV0 Pst1-Stelle, gesteuert durch den AdMLP. Die Wahl dieses Vektors basiert darauf, dass der AdMLP eine höhere Expression und Freisetzung von Tat gegenüber anderen eukaryontischen Promotern, wie z. B. dem Promoter der Immediate Early-Region des Cytomegalovirus (CMV), induzierte, wie von Ensoli et al. (Ref. 41) gezeigt und in Tabelle 3 angegeben.

TABELLE 3. Expression, subzelluläre Lokalisierung, Freisetzung und Aktivität von Tat in COS-1-Zellen, transfiziert mit pCV-Tat und CMV-Tat^a.

Vektoren	Tat-Expression			Tat ^b -Gehalt			Tat-Aktivität	
	Kern ^c	(%)	Cytoplasma	Gesamt	Intrazell. (%)	Extrazell. (%)	Intrazell. ^d (Faktor)	Extrazell. ^c (cpm)
PCV-Tat	5-10	++	++	25	63,5	36,5	50	2.478
CMV-Tat	3-5	++	+	14,6	92,2	7,8	72	2.254
Kontrolle	0	-	-	0	0	0	1	1.400

^aCOS-1-Zellen (5×10^6) wurden mittels Elektroporation mit 30 µg pCV-Tat, CMV-Tat oder einer Kontroll-DNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Tat-Expression mittels Immunhistochemie mit monoklonalen Anti-Tat-Antikörpern (die angegebenen Werte sind Mittelwerte der Prozentwerte positiver Zellen) und durch Lokalisierung von Kern- und Cytoplasma-Tat evaluiert. Das Vorliegen von intra- und extrazellulärem Tat wurde mittels Radioimmunpräzipitation auf den Zellextrakten (500 µl) und in den Kulturmedien (4 ml) und anschließende densitometrische Ablesung (Gelscan XL; Pharmacia) der präzipitierten Tat-Banden analysiert. Die Aktivität von intrazellulärem Tat wurde auf Zellextrakten von COS-1-Zellen gemessen, cotransfiziert mit Tat-Expressionsvektoren oder dem Kontrollvektor und mit dem LTR-CAT-HIV-1-Plasmid; die extrazelluläre Tat-Aktivität hinsichtlich der AIDS-KS-Zellenproliferation (bestimmt mittels ³H-Thymidinaufnahme-Assay) wurde im Kulturmedium (1:2 und 1:4 verdünnt) der Zellen bestimmt, die mit Tat exprimierenden Plasmiden oder mit dem Kontrollplasmid transfiziert waren. Die Ergebnisse stellen den Durchschnitt aus fünf unabhängigen Experimenten dar.

^bDensitometrische Analyse der immunpräzipitierten Tat-Proteinbande. Die Werte sind in einem willkürlichen Maßstab ausgedrückt, wobei der gesamte detektierte Mindestwert (intra- und extrazelluläres Tat) bei 10 liegt.

^c-: negativ; +: 50% Tat-positive Zellen; ++: 50-100% Tat-positive Zellen.

^dCAT-Aktivität nach 20 Minuten Inkubation gegenüber dem Kontrollvektor, dessen Aktivierungswert als 1 betrachtet wird.

^eDas AIDS-KS-Zellwachstum wurde mit einem ³[H]-Thymidinaufnahme-Assay (Standardabweichung SD: 12%) bestimmt. Die Überstände der mit der Kontroll-DNA transfizierten Zellen wiesen eine ³[H]-Thymidinaufnahme von 1.400 cpm (SD: 11,5%) auf.

[0143] Das Kulturmedium, das von aktivierten T-Lymphocyten (positive Kontrolle) stammte, wies eine ³[H]-Thymidinaufnahme von 2.400 cpm (SD: 10%) auf.

[0144] Tabelle 3 zeigt, dass in den pCV-Tat-transfizierten Zellen im Vergleich zu den CMV-Tat-transfizierten Zellen der Prozentsatz Tat-positiver Zellen und der Gesamtgehalt an Tat höher sind, die Menge an freigesetztem Tat deutlich höher ist und mit dem Gesamtgehalt und dem Cytoplasmagehalt von Tat zusammenhängt, und die biologische Aktivität von extrazellulärem Tat hinsichtlich des AIDS-KS-Zellwachstums daher stärker ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass der pCV-Tat-Vektor für ein biologisch aktives Protein kodiert, hohe Expressionsniveaus des tat-Gens induziert und aus den Zellen deutlich höhere Tat-Mengen freisetzen kann als der CMV-Tat-Vektor.

[0145] Der pCV0-Vektor wird auch zur Expression der HIV-1-nef-, -rev- und -gag-Gene und der Gene, die für IL-12- und IL-15-Cytokine kodieren, eingesetzt. Die cDNAs der nef- (618 Basenpaare, Stamm NL43) (Ref. 112) rev- (348 Basenpaare, Stamm NL43) (Ref. 95) und der gag-Gene (1500 Basenpaare, Stamm NL43) (Ref. 95), oder die cDNAs der IL-12- (Ref. 165) oder IL-15-Gene (Ref. 56) werden durch die Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, wobei spezifische Primer verwendet werden, die komplementär zu den ersten 15 Nukleotiden der 5'-Region (Vorwärtsprimer) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) oder zu den letzten 15 Nukleotiden der 3'-Region des Gens (Rückwärtsprimer) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10) sind. Darüber hinaus umfasst jeder Primer, ob vorwärts oder rückwärts gerichtet, die Sequenz für das Restriktions-Pst1-Enzym, um das Klonieren des amplifizierten Produktes in den pCV0-Vektor zu gestatten. Nach dem Klonieren wird die Sequenz der insertierten Gene durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Der pCV0-Vektor wird auch zur Tat-Coexpression mit anderen viralen Genen von fHIV-1 (rev, nef oder gag) oder mit den IL-12- oder IL-15-Cytokinkodierenden Ge-

nen verwendet. Zu diesem Zweck wird die cDNA des HIV-1-tat-Gens mit 261 Basenpaaren (Seq. 1, Beispiel 2) mittels PCR mit einem Vorwärtsprimer, der die Sequenz für das Pst1-Restriktionsenzym (Seq. P11) umfasst, und mit einem Rückwärtsprimer, der komplementär zu den letzten 15 Nukleotiden des tat-Gens (Seq. P12) ist, amplifiziert. Die viralen Gene (nef, rev oder gag) oder die Gene, welche für die IL-12- oder IL-15-Cytokine kodieren, werden durch einen Vorwärtsprimer, der auch eine Sequenz von 15 Basen umfasst, die komplementär zur tat-3'-Region ist, wodurch das Gen in einem Rahmen mit dem tat-Gen (Seq. P13, P14, P15, P16, P17) liegt, und durch einen Rückwärtsprimer, der die Sequenz für das Pst1-Restriktionsenzym (Seq. P2, P4, P6, P8, P10) umfasst, amplifiziert. Anschließend wird eine dritte PCR-Reaktion durchgeführt, bei der die DNA-Matrize durch die amplifizierten Produkte des tat-Gens und des Gens von Interesse dargestellt wird. Der Vorwärtsprimer ist durch den Primer dargestellt, der eingesetzt wird, um tat (Seq. P11) zu amplifizieren, und der Rückwärtsprimer durch den, der eingesetzt wird, um das interessierende Gen zu amplifizieren (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Das amplifizierte tat/interessierende Gen wird mit Agarosegel gereinigt, mit Pst1 verdaut und in pCV0 kloniert.

[0146] Nach dem Klonieren wird die Sequenz der insertierten Gene durch DNA-Sequenzierung kontrolliert, während die Proteinexpression anhand der Transfektion bestimmt wird, wie dies oben beschrieben ist (Ref. 41).

[0147] Die Sequenzen der oben erwähnten Primer lauten:

Seq. P1. Vorwärtsprimer Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3' (Sequenz ID Nr. 18)

Seq. P2. Rückwärtsprimer Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3' (Sequenz ID Nr. 19)

Seq. P3. Vorwärtsprimer Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3' (Sequenz ID Nr. 20)

Seq. P4. Rückwärtsprimer Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3' (Sequenz ID Nr. 21)

Seq. P5. Vorwärtsprimer Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3' (Sequenz ID Nr. 22)

Seq. P6. Rückwärtsprimer Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3' (Sequenz ID Nr. 23)

Seq. P7. Vorwärtsprimer IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3' (Sequenz ID Nr. 24)

Seq. P8. Rückwärtsprimer IL-12: 5'TTAGGAAGCATTTCAG3' (Sequenz ID Nr. 25)

Seq. P9. Vorwärtsprimer IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3' (Sequenz ID Nr. 26)

Seq. P10 Rückwärtsprimer IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3' (Sequenz ID Nr. 27)

Seq. P11. Vorwärtsprimer Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3' (Sequenz ID Nr. 28)

Seq. P12. Rückwärtsprimer Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3' (Sequenz ID Nr. 29)

Seq. P13. Vorwärtsprimer Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3' (Sequenz ID Nr. 30)

Seq. P14. Vorwärtsprimer Tat/Nef: 5'GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3' (Sequenz ID Nr. 31)

Seq. P15. Vorwärtsprimer Tat/Gag: 5'
GGCCCTGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3' (Sequenz ID Nr. 32)

Seq. P16. Vorwärtsprimer Tat/IL-12: 5'GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3' (Sequenz ID Nr. 33)

Seq. P17. Vorwärtsprimer Tat/IL-15: 5'GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3' (Sequenz ID Nr. 34)

Beispiel 4. Inokulierung eines Anti-Tat-Proteinimpfstoffs in gesunde *Macaca fascicularis*: Evaluation von Sicherheit, Verträglichkeit, spezifischer Immunantwort und Wirksamkeit des Schutzes gegen Virusanregung

[0148] Die Verträglichkeit, die Sicherheit und die Fähigkeit, eine spezifische Immunantwort (humoral und zellulär) hervorzurufen, und die Schutzwirkung gegen eine Virenanregung eines rekombinanten Tat-Proteinimpfstoffs, hergestellt durch das beschriebene Verfahren und gereinigt durch Heparinaffinitätssäulen, wurde im Versuchsmodell mit *Cynomolgus*-Affen (*Macaca fascicularis*) beurteilt. Um eine breite Immunantwort zu induzieren, verwendeten wir Aluminiumphosphat (Alaun), das in zahlreichen Modellen getestet wurde, als einziges zur Verwendung beim Menschen zugelassen ist. Als teilchenförmige Adjuvanzien verwendeten wir RIBI (zur Gruppe der Emulgatoren gehörig oder aus Monophosphoryl-Lipid A, dimycolischem Trehalosol und dem Skelett der Bakterienwand des Calmette-Guerin-Bazillus zusammengesetzt) (Ref. 7,109).

[0149] Im ersten Pilotversuch evaluierten wir die Verträglichkeit, die Sicherheit und die Fähigkeit zum Hervorrufen einer spezifischen Immunantwort (humoral und zellulär). Dabei wurden 3 Affen gemäß folgendem Schema inokuliert: Affe 1 (M1) wurde mit dem rekombinanten Tat-Protein (100 µg), resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI, auf subkutanem Wege an einer Stelle inokuliert; Affe 2 (M2) wurde mit dem rekombinanten Tat-Protein (10 µg), resuspendiert in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI, auf subkutanem Wege an einer Stelle inokuliert; und Affe 3 (M3) war der nicht-inokulierte Kontrollaffe. Allen Affen wurden an den Tagen -42 und -35 vor der ersten Impfstoffinokulation zehn ml Blut entnommen, um die Grundparameter zu bestimmen. Serum- und Plasmaproben wurden bei -20°C oder -80°C eingefroren und später dazu verwendet, das Protein-Inokulum zu resuspendieren. Die Affen 1 und 2 wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 und 37 Wochen inokuliert. Der Immunisierungsplan wurde in Woche 37 für den Affen M1 und in Woche 41 für den Affen M2 unterbrochen. Die Tiere wurden sakrifiziert, um die immunologischen Parameter in mehreren Organen und Geweben (Milz und Lymphknoten) zu untersuchen, wie die Evaluation des Vorliegens einer proliferativen Antwort auf Tat, und der CAF- und CTL-Aktivität gegen Tat. Die CAF-Aktivität ist die antivirale Aktivität, die durch CD8+-Lymphocyten weder MHC-restriktiv noch cytolytisch vermittelt wird. An den selben Tagen der Inokulierung des Immunogens wurden jedem Tier 10 ml Blut entnommen, um Labortests (chemisch-physikalische Analysen, Elektrolyte, Leukozyten, Plättchenzählungen und Hämoglobinquantifizierung), die Evaluierung der immunologischen Parameter, wie des Vorliegens spezifischer Immunglobuline (IgM, IgG, IgA), der Spiegel der Cytokine vom Th1-Typ (IL-2, IFN γ) und vom Th2-Typ (IL-4, IL-10), der Produktion von Chemokinen (RANTES, M1P-1 α und M1P-1 β), des lymphocytischen Phänotyps (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56, HLA-DR, CD45RA), der proliferativen Antwort auf Tat, des Vorliegens spezifischer zytotoxischer Aktivität (CTL), des Vorliegens antiviraler Aktivität (CAF), und des Vorliegens antiviraler Gesamtaktivität (TAA), vermittelt durch PBMC und durch autologes Serum, durchzuführen. Zudem wurden, um das Vorliegen einer zellvermittelten Immunantwort in vivo zu evaluieren, alle geimpften Affen und der Kontrollaffe einem Tat-Hauttest unterzogen.

[0150] Die Ergebnisse dieses Experimentes sind wie folgt: Es waren keine Änderungen der chemisch-physikalischen, hämatologischen und verhaltensbezogenen Parameter zu beobachten. Bei den geimpften Affen und dem Kontrollaffen wurden keine Anzeichen von Entzündung und Gefäßneubildung an den Inokulationsstellen detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Tat-Protein von den Tieren gut toleriert wurde und in den verabreichten Dosen sowie auf dem gegebenen Inokulationsweg nicht toxisch war. Bei den Affen M1 und M2 wurde das Vorliegen von Antikörpern des IgG-Typs, der für Tat spezifisch ist, in Woche 5 nach der ersten Inokulierung detektiert. In Woche 37 waren Anti-Tat-IgG bis zu einer Plasmaverdünnung von 1:6400 in beiden Affen und in Woche 41 bis zu einer Plasmaverdünnung von 1:12.800 im Affen M2 detektierbar. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt. Im Kontrollaffen M3 wurden Anti-Tat-Antikörper mit niedrigen Titern detektiert, die wahrscheinlich durch die wiederholten Inokulierungen einer geringen Menge Tat hervorgerufen wurden, die diesem Affen injiziert wurde, um die Spezifität der Hauttestreaktionen zu kontrollieren. In den Affen M1 und M2 waren die Anti-Tat-Antikörper mit einem Titer von 1:3200 hauptsächlich gegen die aminoterminalen Region (aa 1-20) von Tat gerichtet ([Fig. 4](#)). Im mit 10 µg Tat geimpften Affen M2 wurden auch gegen aa 36-50 und 46-60 von Tat gerichtete Antikörper mit Titern von 1:50 bzw. 1:100 detektiert ([Fig. 4](#)). Die Fähigkeit des Serums der Affen, Tat zu neutralisieren, wurde mittels in vitro-Assays bestimmt, welche die Inhibierung der Replikation der HIV-1-Replikation in HLM-1 Zellen nach Zugabe von exogenem Tat-Protein maßen, wie zuvor beschrieben (Ref. 41). Diese Assays zeigten, dass Plasma von den Affen M1 und M2 in Woche 27 nach der ersten Inokulierung die von exogenem Tat induzierte Virusreplikation blockierten, wie dies durch Quantifizierung des p24-Antigens in den Kulturüberständen bestimmt wurde. Dagegen blockierte präimmunes Plasma derselben Affen die Tat-Aktivität nicht (Tabelle 4).

TABELLE 4

Neutralisierende Aktivität von Affenplasma hinsichtlich der Rettung der durch extrazelluläres Tat induzierten Virusreplikation^a

Proben	Inhibierung (%)
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M1	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M2	0
Tat (39 ng/ml) + Immun M1	79,12
Tat (30 ng/ml) + Immun M2	100

^aDie neutralisierende Aktivität des Plasmas wurde in HLM-1-Zellen (HeLa-CD4⁺-Zellen, enthaltend eine integrierte Kopie eines HIV-1-Provirus, dem das tat-Gen fehlt) bestimmt. Die HLM-1 Zellen wurden bei 6×10^5 Zellen/Vertiefungen in Platten mit 24 Vertiefungen angeimpft und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS, enthaltend 0,1% Rinderserumalbumin (BSA), gewaschen und mit frischem Medium (0,3 ml) in Gegenwart von rekombinantem Tat-Protein und einem gleichen Volumen des Tierplasmas, entnommen zum Zeitpunkt 0 (präimmunes Plasma) oder in Woche 27 (immunes Plasma), 48 Stunden kultiviert. Die negativen Kontrollen wurden durch Zellen dargestellt, die nur mit dem gepoolten präimmunen Plasma, mit dem gepoolten immunen Plasma oder mit PBS, enthaltend 0,1% BSA (PBS + 0,1% BSA), ohne Tat, behandelt wurden. Bei allen Kontrollproben wurden keine Auswirkungen auf die Rettung der Virusreplikation beobachtet. Jedes Plasma wurde zweifach getestet. Das Vorliegen eines von den Zellen freigesetzten Virus wurde durch Quantifizierung des p24 Gag-Antigens unter Verwendung eines handelsüblichen p24-Antigen-Einfang-ELISA-Kits (NEN-Dupont) getestet. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der Inhibierung der Virus-Rettung [für jedes Plasma als Durchschnittswert von p24 (pg/ml) in zwei Vertiefungen bestimmt] durch das immune Plasma im Vergleich zum präimmunen Plasma (0% Inhibierung) ausgedrückt. Die Affen M1 und M2 wurden mit dem rekombinanten Tat-Protein (100 µg bzw. 10 µg) geimpft, das in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI resuspendiert war und auf subkutanem Wege in eine einzige Stelle injiziert wurde.

[0151] Die Ergebnisse zeigen das Vorliegen einer proliferativen Antwort auf Tat in Woche 22 (Tabelle 5), die bei mit dem rekombinanten Tat-Protein geimpften Affen höher war als beim Affen M2, der bei jedem Boost (Auffrischungsimpfung) 10 µg rekombinantes Tat-Protein erhielt.

Tabelle 5

Proliferative Antwort auf Tat^a

Affe	Stimulus	Wochen ab Primärimmunisierung				
		15	22	27	32	37
M1	PHA	15,3	13,9	19,9	40,6	3,2
	TT	1,2	4,7	2,1	3,8	2
	Tat	0,8	2,4	1,1	1,3	0,6
M2	PHA	8,1	11,6	17,1	16,8	1,7
	TT	2	3,8	1,7	1	0,6
	Tat	0,9	3	1,4	1,2	0,6
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6
	Tat	2,1	1,4	1,3	0,7	0,9

^aPBMCs, isoliert durch den Ficoll-Dichtegradienten, wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Vertiefung dreifach in eine flachbödige Platte mit 96 Vertiefungen plattiert, in mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) ergänztem RPMI-1640 kultiviert, und mit Tat (1 oder 5 µg/ml), PHA (4 µg/ml) oder Tetanustoxoid (TT), gegen das die Affen geimpft waren, stimuliert.

[0152] Unstimulierte Kontrollen wurden in RPMI, 10% FCS-Medium, inkubiert. Der Anstieg der Zellprolifera-

tion wurde am Tag 5 mittels $^3\text{[H]}$ -Thymidinaufnahme bestimmt, wie zuvor beschrieben (Ref. 39, 22). Die Ergebnisse sind als Stimulationsindex ausgedrückt und wurden wie folgt berechnet: Durchschnitt der Testprobe (cpm)/Durchschnitt der Kontrolle (cpm). Werte größer 2,5 galten als positiv. Die Affen M1 und M2 wurden mit 100 μg oder 10 μg rekombinantem Tat, resuspendiert in 250 μl autologem Serum und 250 μl RIBI, subkutan immunisiert. M3 stellt einen Kontrollaffen dar.

[0153] Wie in Tabelle 6 gezeigt, wurde in den Affen M1 und M2, die mit rekombinantem Tat immunisiert waren, keine cytotoxische Aktivität gegen Tat detektiert.

TABELLE 6

Analyse der cytotoxischen Aktivität gegen Tat (CTL)^a

Affe	Woche	Verhältnis Ziel:Effektor						CTL-Aktivität
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Medien	
M1	41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2	41*	0	0	0	0	0	0	–
M3	41	0	0	0	0	0	0	–

^aPBMCs, isoliert mittels Ficoll-Dichtezentrifugation, wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in RPMI 1640, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, resuspendiert und in einer Platte mit 24 Vertiefungen (500 μl pro Vertiefung) 12 Stunden bei 37°C in Gegenwart von 1 μg Tat angeimpft. Einen Tag später wurden die ohne Tat inkubierten Zellen bei 1500 UpM zentrifugiert und in 50 μl RPMI 1640, ergänzt mit 10% FCS, resuspendiert, 3 Stunden bei 37°C mit 1 μg Tat inkubiert, gewaschen, in 500 μl frischem Medium resuspendiert und in die Vertiefung gegeben, welche die zuvor stimulierten PBMCs enthielt. Am Tag 2 wurden die Zellen mit 1 ml Medium, enthaltend IL-2 (2 IU/ml), verdünnt und 14 Tage kultiviert. Autologe B-Lymphocyten, die aus jedem Affen vor dem Impfungsprotokoll isoliert worden waren, wurden als Zielzellen (BLCL) verwendet. Zu diesem Zweck wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isolierte PBMCs am Tag 35 in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/Vertiefung in einer Platte mit 96 Vertiefungen angeimpft und 2 oder 3 Wochen in Gegenwart von 50% eines Mediums kultiviert, das aus einer Zelllinie gesammelt wurde, die Papioviren produziert, wie zuvor beschrieben (Ref. 28). Zehn B-Zelllinien, die für jedes Tier erhalten worden waren, wurden erweitert und eingefroren. Zum Testen der Toxizität wurde der Delta Cytotoxic Test (Wallac, Turku, Finnland), basierend auf der zeitaufgelösten Fluoreszenz, verwendet (Ref. 12, 13, 14). Zu diesem Zweck wurden BLCL in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/200 μl RPMI1640, ergänzt mit 10% FCS, das 4 μg Tat enthielt, 12 Stunden bei 37°C kultiviert. Als Kontrolle wurde ein anderer Aliquot von autologen BLCL mit dem gleichen Medium, ohne Tat, inkubiert. Die BLCL wurden in 1 ml RPMI 1640, ergänzt mit 10% FCS, das 5 μl eines fluoreszenzverstärkenden Liganden enthielt, gewaschen und resuspendiert sowie 15 Min. bei 37°C gemäß den Anweisungen des Herstellers inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurden die BLCL in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml resuspendiert und umgehend zentrifugiert, um den Überstand zu ernten, der zum Messen des Hintergrundpegels verwendet wurde. PBMCs (Effektoren) wurden zweifach in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/100 μl in Medium, das IL-2 enthielt und entsprechend verdünnt war, in einer Platte mit 96 Vertiefungen angeimpft. In jede Vertiefung wurden 5×10^3 Zielzellen/100 μl (mit oder ohne Tat kultiviert) gegeben. Die Ziel:Effektor-Verhältnisse betragen 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25, 1:3,125. PBMCs und Zielzellen (Tat-gepulst oder ungepulst) wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert mit i) 20 μl 5% Triton, um die maximale Freisetzung zu bestimmen, ii) 100 μl Wachstumsmedium, um die spontane Freisetzung zu detektieren, iii) 200 μl Überstand der Zielzellen, um den Hintergrundpegel zu detektieren. Am Ende des Inkubationszeitraums wurden die Platten zentrifugiert, 20 μl jedes Überstandes auf eine neue Platte übertragen und in Gegenwart von 200 μl einer in dem Kit enthaltenen Europiumlösung inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach 20-minütiger Inkubation mit einem zeitaufgelösten Fluoreszenzmessgerät (Victor, Wallac, Turku, Finnland) bestimmt. Die spezifische CTL-Aktivität wurde wie folgt bestimmt: % spezifische Freisetzung = $[(\text{Durchschnitt von Probedetektion} - \text{Hintergrund}) - (\text{spontane Freisetzung} - \text{Hintergrund})] / [(\text{maximale Freisetzung} - \text{Hintergrund}) - (\text{spontane Freisetzung} - \text{Hintergrund})] \times 100$. Der Test galt als positiv, wenn die Tat-spezifische Freisetzung bei den meisten getesteten Effektor:Ziel-Verhältnissen größer als 4% war. 4% ist ein willkürlicher Wert, der aufgrund früherer Kontrollexperimente bestimmt wurde. ND: nicht bestimmt. Der Affe M2 wurde mit 10 μg rekombinantem Tat, resuspendiert in 250 μl autologem Serum und 250 μl RIBI, subkutan immunisiert. M3 stellt einen Kontrollaffen dar. ND: nicht durchgeführt.

*PBMCs wurden aus peripheren Lymphknoten isoliert, nachdem M2 sakrifiziert worden war. Zudem zeigen die Ergebnisse in den Wochen 22, 27 und 37 das Vorliegen einer löslichen antiviralen Aktivität, vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten, gemessen als die Fähigkeit von Zellüberständen der CD8+ T-Lymphocyten von Affen, eine akute Infektion des chimären Virus SHIV 89.6P in CEMx174-Zellen zu inhibieren, oder die Reaktivierung einer chronischen HIV-1-Infektion in OM-10-1-Zellen zu steuern (Tabelle 7). Die CAF-Aktivität war meist eher in den geimpften Affen als in den Kontroll-Tieren zu beobachten.

TABELLE 7

Analyse des Vorliegen einer löslichen, antiviralen Aktivität, vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten (CAF)^a

Affen-ID	Woche nach Primärimmunisierung	% Inhibierung der viralen Replikation	
		Akute Infektion	Chronische Infektion
M1	22	89,5	ND
	27	62	61,7
	37	ND	ND
M2	22	44	ND
	27	54	27
	37	48	53
M3	22	24	ND

	27	37	22
	37	75	23

^aPBMC von Affen, die mit 100 µg (M1) und mit 10 µg (M2) rekombinantem Tat-Protein geimpft waren, und eines Kontrollaffen (M3), der nicht geimpft war, aber wiederholte Hauttests mit Tat durchlief, wurden mittels Ficoll-Dichtegradient isoliert. Mit CD8+ T-Lymphocyten angereicherte Kulturen wurden aus PBMC mittels Anti-CD8-Magnetkügelchen (Dynabeads, Dynal, Norwegen) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Reinheit der Kulturen wurde mittels FACS-Analyse unter Verwendung einer Reihe von Antikörpern kontrolliert, die gegen spezifische Zellmarker (CD3, CD4, CD8) gerichtet waren. Mit CD8+ angereicherte Kulturen wurden (zweifach) bei 5×10^5 Zellen/500 µl pro Vertiefung in Platten mit 48 Vertiefungen angeimpft, die zuvor 12 Stunden bei 4°C mit einem monoklonalen Anti-CD3-Antikörper beschichtet worden waren (2,5 µg/ml, BioSource International, Camarillo, CA), und in RPMI 1640, enthaltend 10% fötales Rinderserum und IL-2 (20 U/ml), kultiviert. Zwei Wochen lang wurden alle drei Tage 250 µl Medium gesammelt und durch ein gleiches Volumen an frischem Medium ersetzt. Die Zellüberstände wurden zentrifugiert, filtriert (0,45 µm) und bei -80°C gelagert. Von allen Zeitpunkten stammende Zellüberstände, mit Ausnahme des ersten, wurden gepoolt, und das Vorliegen antiviraler Aktivität wurde als ihre Fähigkeit getestet, die virale Replikation in zwei Systemen zu inhibieren, repräsentiert durch eine akute bzw. eine chronische Infektion. Für das akute Infektionssystem wurde die CEM x 174-Zelllinie verwendet, die von der menschlichen B-Zelllinie 721.174 stammt, fusioniert mit der menschlichen T-Zelllinie CEM (Ref. 143). Die Zellen (2×10^5) wurden 2 Stunden bei 37°C in Polypropylenröhrchen mit oder ohne 200 µl von CD8+-Überständen inkubiert, die wie oben beschrieben hergestellt waren. Die Zellen wurden 3-mal mit frischem Medium gewaschen, bei 2×10^4 Zellen pro Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen angeimpft und in 200 µl mit (behandelte Zellen) oder ohne (unbehandelte Zellen) unterschiedliche(n) Volumina (50 µl, 5 µl und 0,5 µl) von Kulturüberständen, die von CD8+ T-Lymphocyten des mit dem Impfstoff geimpften Affen oder des Kontrollaffen stammten, inkubiert. Nach der Infektion wurden Aliquots der Kulturüberstände alle drei Tage gesammelt und durch ein gleiches Volumen Komplettmedium ersetzt, das zuvor mit dem CD8+-Kulturüberstand von geimpften Affen und vom Kontrollaffen versetzt worden war. Die in der Tabelle gezeigten Ergebnisse entsprechen Tag 7 nach der Infektion und sind als Prozentsatz (%) der Inhibierung der viralen Replikation von Zellen, die mit CD8+-Kulturüberständen behandelt wurden, welche aus geimpften Affen stammen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen ausgedrückt. Die virale Replikation wurde durch Messen der RT-Werte in der beschriebenen Weise (Ref. 54) oder der p27 Gag-Werte mittels ELISA in den Zellüberständen

bestimmt, die zu jedem Zeitpunkt gesammelt wurden. Für das chronische Infektionssystem wurde die OM-10-1-Zelllinie verwendet (Ref. 20, 21), die eine menschliche T-Lymphocytenlinie darstellt, welche chronisch mit HIV-1 infiziert ist. Die Zellen wurden (zweifach) bei 5×10^4 Zellen/200 μ l pro Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen in Gegenwart von Anti-TNF β -Antikörpern (40 μ g/ml), mit oder ohne unterschiedliche(n) Volumina (50 μ l, 5 μ l, 0,5 μ l) von Zellüberständen aus CD8+ T-Lymphocyten, die von geimpften Affen oder vom Kontrollaffen stammten, angeimpft. Die Zellen wurden zur Proliferation durch PMA (10^{-7} M) aktiviert. Nach 24 Stunden wurden Aliquots des Kulturmediums gesammelt, um die virale Replikation durch Messen der RT- oder p24 Gag-Spiegel mittels ELISA zu bestimmen. Die Ergebnisse sind als % der Inhibierung der Reaktivierung der Infektion in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die Ergebnisse akuter und chronischer Infektion, die in der Tabelle gezeigt sind, beziehen sich auf Zellen, die mit 5 μ l Überstand, der aus CD8+-Zellkulturen stammte, behandelt wurden. ND: nicht durchgeführt.

[0154] Eine Analyse der verzögerten Hypersensibilität (DTH) durch einen Hauttest zeigte, dass sowohl die geimpften Affen (M1 und M2) als auch der Kontrollaffe (M3) negativ waren (Tabelle 8).

TABELLE 8

Tat-Hauttest^a

Wochen nach Primärimmunisierung	Affen		
	M1	M2	M3
10	–	–	–
15	–	–	–
22	–	–	–
27	–	–	–
32	–	–	–
37	–	–	–

^aTat (1 und 5 μ g) in 150 μ l PBS-0,1% BSA oder Puffer alleine wurden auf intradermale Weise in einem zuvor rasierten dorsalen Bereich der geimpften Affen und des Kontrollaffen (Kontrolle der Spezifität der Antwort) in den Wochen 10, 15, 22, 27, 32 und 37 nach der Erstimmunisierung inokuliert. Die Affen M1 und M2 wurden mit rekombinantem Tat-Protein (100 μ g bzw. 10 μ g) in 250 μ l autologem Serum und 250 μ l RIBI geimpft, das auf subkutanem Wege in eine einzige Stelle injiziert wurde.

[0155] Affe M3 ist ein Kontrollaffe, der nicht geimpft wurde. Das Auftreten eines knotigen Erythems nach 48-72 Stunden legte eine verzögerte Hypersensibilitätsreaktion (DTH) nahe: ++, $\varnothing \geq 5$ mm; +, $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, Erythem ohne Verhärtung; –, $\varnothing < 1$ mm.

[0156] Die Ergebnisse dieses Pilotexperimentes deuten darauf hin, dass rekombinantes Tat-Protein, hergestellt und gereinigt gemäß einem von uns beschriebenen Protokoll, in den Dosen von 100 und 10 μ g, verabreicht auf subkutanem Wege, nicht toxisch war. Zudem rief das Tat-Protein eine spezifische und breite Immunantwort mit antiviralen Aktivitäten, sowohl humoral als auch zellvermittelt, hervor. Eine stärkere und spezifische Anti-Tat-Immunantwort wurde im Affen M2 beobachtet, der mit 10 μ g rekombinantem Protein geimpft war. Darüber hinaus zeigte das RIBI-Adjuvans keinerlei auffälliges Anzeichen von Toxizität in den geimpften Affen.

[0157] Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurde ein zweites Pilotexperiment entworfen, um die Effekte einer Immunisierung mit 10 μ g Tat, kombiniert mit RIBI oder Alaun-Adjuvanzien, zu bestimmen. Die Affen erhielten gemäß folgendem Schema Injektionen auf subkutanem Wege in eine einzige Stelle: Affen M1-3: 10 μ g rekombinantes Tat-Protein in 250 μ l autologem Serum und 250 μ l RIBI. Affen M4-6: 10 μ g rekombinantes Tat-Protein in 250 μ l autologem Serum und 250 μ l Alaun. Affe M7: 250 μ l RIBI und 250 μ l autologes Serum (Kontrollaffe). Affe M8: 250 μ l Alaun und 250 μ l autologes Serum (Kontrollaffe). Am Tag –9 vor der Erstimmunisierung wurden jedem Affen zehn ml Blut entnommen, um die im vorhergehenden Pilotexperiment beschriebenen Untersuchungen durchzuführen und die Grundparameter jedes Tiers zu bestimmen. Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 2, 6, 11, 15, 21, 28 und 32 Wochen inokuliert. In Woche 36 erhielten die Affen M1-6 den letzten Boost mit rekombinantem Tat-Protein (16 μ g) in 200 μ l ISCOM (immunstimulierender Komplex) und

300 µl PBS. ISCOM ist ein Adjuvans, bestehend aus Quil-A-Saponin, Cholesterin und Phospholipiden, das die humorale und zellvermittelte Immunantwort verstärkt (Ref. 109, 90). Den Affen M7 und M8 wurden zu den gleichen Zeitpunkten nur Adjuvanzen injiziert. Zu jedem Impfungszeitpunkt und in den Wochen 40, 44 und 50 wurden den Tieren 10 ml Blut entnommen, um die im vorhergehenden Pilotexperiment beschriebenen klinischen und immunologischen Parameter zu analysieren. Zudem wurden Urinproben und Vaginalabstriche gesammelt, um das Vorliegen von Tat-spezifischem, sekretorischem IgA zu analysieren. Zum Evaluieren der Schutzwirkung der Tat-Immunsierung gegen die Infektion wurden die geimpften Affen und der Kontrollaffe mit dem chimären „Simian/Human-Immunschwächevirus“ (SHIV), Stamm 89.6P, enthaltend des HIV-1-tat-Gen, das zuvor in *Macaca fascicularis* gezüchtet und titriert worden war (Ref. 128, 129, 69). Nach der Anregung wurden die Tiere auf virologische Parameter, wie Plasma p27-Antigenämie und Plasma- und Zellen-Virenlast überwacht (im ersten Monat alle zwei Wochen, über die nächsten drei Monate alle vier Wochen und über bis zu 6-12 Monate alle 8 Wochen). Um zu bestätigen, dass eine Infektion erfolgt war, wurden auch Anti-SIV-Antikörper mit einem handelsüblichen Kit gesucht, der zur Detektion von Anti-HIV-2-Antikörpern dient und auch Anti-SIV-Antikörper erkennt (Elavia Ac-Ab-Ak II-Kit, Diagnostic Pasteur, Paris, Frankreich).

[0158] Die Ergebnisse der zweiten Pilotexperimente sind derzeit folgende: Es waren keine Veränderungen der chemisch-physikalischen, hämatologischen und verhaltensbezogenen Parameter zu beobachten. Die Affen zeigten keinerlei Anzeichen von Entzündung oder Gefäßneubildung an der Inokulationsstelle. Zu beobachten war eine spezifische Antikörperantwort (IgM, IgG). In Woche 15 erreichten die Anti-Tat-Antikörper(IgG)-Titer hohe Spiegel im Bereich von 1:6400 bis 1:25600 (Fig. 5-Fig. 7). Die Antikörper reagierten im Wesentlichen mit der aminoterminalen Region (aa 1-20) von Tat, mit Titern im Bereich von 1:1600 to 1:3200 (Fig. 8), wie dies in Woche 22 gezeigt wurde. Darüber hinaus wurden auch gegen aa 46-60 von Tat gerichtete Antikörper mit Titern im Bereich von 1:100 bis 1:200 detektiert (Fig. 8). Die Fähigkeit des Plasmas der Affen, die Tat-Aktivität zu neutralisieren, wurde getestet durch einen Assay der Inhibierung der viralen Rettung in HLM-1 Zellen, inkubiert mit seriellen Mengen von exogenem Tat, wie dies zuvor im ersten Pilotexperiment beschrieben wurde. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass immunes Plasma (1:2 verdünnt) der Affen M1-6 in Woche 15 die virale Replikation, induziert durch 30 ng/ml exogenes Tat, blockierte, wie dies durch die Messung von in das Kulturmedium freigesetztem p24-Antigen bestimmt wurde. Dagegen blockierte präimmunes Plasma der Affen M1-6 oder Plasma der Kontrollaffen (M7, M8) die Tat-Aktivität nicht (Tabelle 9). Darüber hinaus blockierte immunes Plasma (1:2 verdünnt) der Affen M1-6, das in Woche 21 entnommen worden war, die Virusreplikation, die durch 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml und 500 ng/ml exogenes Tat induziert worden war. Insbesondere bestimmte dieses Plasma eine 10-fache Verringerung der Virusreplikation, die durch sehr hohe Dosen von extrazellulärem Tat (240 ng/ml und 500 ng/ml) induziert war (Tabelle 9).

TABELLE 9

Neutralisierende Aktivität von immunem Plasma gegenüber der Rettung der Virusreplikation, induziert durch extrazelluläres Tat^a

Proben	Inhibierung (%)
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M1	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M2	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M3	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M4	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M5	0
Tat (30 ng/ml) + Präimmun M6	0
Tat (30 ng/ml) + Immun M1 (Woche 15)	89,8
Tat (30 ng/ml) + Immun M2 (Woche 15)	78,7
Tat (30 ng/ml) + Immun M3 (Woche 15)	100
Tat (30 ng/ml) + Immun M4 (Woche 15)	100
Tat (30 ng/ml) + Immun M5 (Woche 15)	70,8
Tat (30 ng/ml) + Immun M6 (Woche 15)	94,2
Tat (60 ng/ml) + Präimmun M1	0
Tat (60 ng/ml) + Präimmun M2	0

Tat (60 ng/ml) + Präimmun M3	0
Tat (60 ng/ml) + Präimmun M4	0
Tat (60 ng/ml) + Präimmun M5	0
Tat (60 ng/ml) + Präimmun M6	0
Tat (60 ng/ml) + Immun M1 (Woche 21)	96,3
Tat (60 ng/ml) + Immun M2 (Woche 21)	100
Tat (60 ng/ml) + Immun M3 (Woche 21)	100
Tat (60 ng/ml) + Immun M4 (Woche 21)	98,7
Tat (60 ng/ml) + Immun M5 (Woche 21)	99
Tat (60 ng/ml) + Immun M6 (Woche 21)	98,8
Tat (120 ng/ml) + Präimmun M1-6, gepoolt	0
Tat (120 ng/ml) + Immun M1 (Woche 21)	59,2
Tat (120 ng/ml) + Immun M2 (Woche 21)	90,4
Tat (120 ng/ml) + Immun M3 (Woche 21)	96,8
Tat (120 ng/ml) + Immun M4 (Woche 21)	98,3
Tat (120 ng/ml) + Immun M5 (Woche 21)	100
Tat (120 ng/ml) + Immun M6 (Woche 21)	97,8
Tat (240 ng/ml) + Präimmun M1-6, gepoolt	0
Tat (240 ng/ml) + Immun M1 (Woche 21)	26,1
Tat (240 ng/ml) + Immun M2 (Woche 21)	49,4
Tat (240 ng/ml) + Immun M3 (Woche 21)	70,3
Tat (240 ng/ml) + Immun M4 (Woche 21)	91,2
Tat (240 ng/ml) + Immun M5 (Woche 21)	94,5
Tat (240 ng/ml) + Immun M6 (Woche 21)	86
Tat (500 ng/ml) + Präimmun M1-6, gepoolt	0
Tat (500 ng/ml) + Immun M1 (Woche 21)	32,7
Tat (500 ng/ml) + Immun M2 (Woche 21)	38,9
Tat (500 ng/ml) + Immun M3 (Woche 21)	57,5
Tat (500 ng/ml) + Immun M4 (Woche 21)	89,4
Tat (500 ng/ml) + Immun M5 (Woche 21)	72
Tat (500 ng/ml) + Immun M6 (Woche 21)	71,8

^aDie Fähigkeit von Anti-Tat-Plasma, die Tat-Aktivität zu neutralisieren, wurde in HLM-1-Zellen bestimmt, wie dies in der Erklärung zu Tabelle 4 beschrieben ist. Rekombinantes Tat-Protein (30 ng/ml, 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml und 500 ng/ml) wurde alleine oder zusammen mit einem gleichen Volumen an präimmunem Affen-Plasma oder in Woche 15 oder 21 (immunes Plasma) zugegeben. Die Affen M1-3 wurden mit 10 µg Tat in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI geimpft; die Affen M4-6 wurden mit 10 µg Tat in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun geimpft; zwei Kontrollaffen wurde RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) oder Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M8) injiziert. Die Ergebnisse sind wie in der Erklärung zu Tabelle 4 beschrieben dargestellt.

[0159] Die Fähigkeit von Affenplasma, die Aktivität von extrazellulärem Tat, das von den Zellen während einer akuten Infektion freigesetzt wird, zu neutralisieren, wurde in CEM x 174 Zellen getestet, die mit dem chimären Virus SHIV 89.6P infiziert waren. Am Tag 7 nach der Infektion war eine Virusreplikation in 50% der mit SHIV infizierten und mit dem präimmunem Plasma der Affen M1-6 kultivierten Kontrollzellen zu beobachten. Umgekehrt wurde keine Virusreplikation in infizierten Zellen detektiert, die in Gegenwart des immunen Plasmas der Affen M1-6 gezüchtet wurden, das in Woche 44 entnommen worden war (Tabelle 10).

TABELLE 10

Neutralisierende Aktivität von immunem Plasma gegenüber der Übertragung einer Virusinfektion^a

Probe	p27 (pg/ml)
SHIV + Präimmun M1	Neg
SHIV + Präimmun M2	Neg
SHIV + Präimmun M3	1,080
SHIV + Präimmun M4	0,602
SHIV + Präimmun M5	1,169
SHIV + Präimmun M6	Neg
SHIV + Immun M1	Neg
SHIV + Immun M2	Neg
SHIV + Immun M3	Neg
SHIV + Immun M4	Neg
SHIV + Immun M5	Neg
SHIV + Immun M6	Neg

^aCEM x 174 Zellen (3×10^4 Zellen/150 μ l) in Platten mit 96 Vertiefungen wurden 2 Stunden bei 37°C in RPMI 1640, enthaltend 10% FCS, mit dem chimären SHIV 89.6P-Virus (5×10^{-5} TCID₅₀/Zelle) infiziert. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und in 150 μ l Kompletmedium resuspendiert, das mit 5% des prä-immunen oder immunen Affenplasmas (Woche 44) von mit rekombinantem Tat (10 μ g) und RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6) geimpften Tieren versetzt war. Das Tierplasma wurde zuvor 30 Min. bei 56° erwärmt und mittels ELISA analysiert, um die Anti-Tat-Antikörpertiter zu kontrollieren. Jedes Serum wurde zweifach getestet. An den Tagen 3, 5 und 7 nach der Infektion wurden 120 μ l Kulturmedium gesammelt und durch ein gleiches Volumen an frischem Medium ersetzt, das 5% präimmunes oder immunes Plasma der Affen M1-6 enthielt. Die Fähigkeit des Plasmas, extrazelluläres Tat zu neutralisieren, das während einer akuten Infektion freigesetzt wird, und die Übertragung der Infektion in vitro zu kontrollieren, wurde durch Detektieren von viralem Gag p27 im Kulturmedium mittels ELISA (Coulter International, Miami, FL) bestimmt. Die Ergebnisse, die als p27-Werte (pg/ml) dargestellt sind, entsprechen dem Mittelwert von zwei Vertiefungen für jedes Serum am Tag 7 nach der Infektion.

[0160] Zudem wurde ab Woche 11 eine proliferative Antwort auf Tat beobachtet (Tabelle 11).

TABELLE 11

Proliferative Antwort auf Tat^a

Affe	Sti- mulus	Wochen ab Primärimmunisierung									
		0	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M1	PHA	16,96	10,50	15,27	33,8	7,2	51,5	64,3	36,05	24	65,7
	TT	11,69	1,96	3,01	1,2	1,2	1,3	0,93	1,4	10,05	7,2
	Tat	1,12	1,55	0,52	1,7	0,8	0,8	0,6	0,7	9,27	4,7
M2	PHA	31,27	25,75	21,28	87,1	25,7	56	38,2	40,3	29,03	26
	TT	1,12	1,8	0,57	1,7	1,15	1,6	4,95	1,2	1,51	2,9
	Tat	1,08	3,65	6,22	14,14	3,5	1,8	4,1	1,9	7,67	13,2
M3	PHA	22,42	7,89	16,88	36,3	148,5	42	78,9	27	53,71	ND
	TT	11,43	0,95	1,71	1,25	1,2	1,1	1	1	1,81	ND
	Tat	1,65	2,69	18,82	23,51	12,03	0,9	1,3	0,5	23,85	ND
M4	PHA	3,88	20,77	15,22	83,7	18,6	35	38,2	45,2	57,47	15,8
	TT	2,85	4,49	9,07	6,9	15,8	3,7	3,8	5	19,77	6,6
	Tat	1,29	3,01	3,24	7,9	10,1	2,6	1,5	3,9	33,61	4,7
M5	PHA	6,25	5,74	16,74	72,2	7,45	41	56,5	32,9	33,85	12
	TT	2,31	1,07	4,84	3,9	0,9	0,83	1,4	1,24	10,22	1,95
	Tat	1,80	0,66	1,76	3,6	2,22	0,8	1,14	1,3	1,33	1,4
M6	PHA	11,96	17,94	2,77	29,4	7,3	25	8,3	6,85	18,01	5,2
	TT	4,14	1,71	0,13	1,7	10,34	1,3	1,8	1,1	2,49	0,9
	Tat	1,37	1,06	0,11	2,95	9,3	1,13	1,3	1	5,8	0,3
M7	PHA	21,65	20,30	37,93	17,6	17,9	75	12,9	34,8	41,81	27,5
	TT	0,97	0,80	0,88	1	0,6	1,04	0,6	0,4	1,11	1,1
	Tat	1,78	0,68	0,73	1	0,42	0,9	0,5	0,8	1,07	0,4
M8	PHA	26,51	67,09	16,38	14,9	17,2	28,2	18,95	20,6	28,61	13,6
	TT	1,20	10,78	0,20	1,6	0,62	0,8	1,2	0,9	1,11	2,1
	Tat	1,12	0,00	0,21	1,03	0,57	0,6	0,5	0,9	1,04	1

^aPeripherblut-Lymphocyten wurden isoliert, mit PHA (4 µg/ml), mit dem Tetanustoxoid (TT) (10 µg/ml) und mit Tat (5 µg/ml) aktiviert und einem Assay unterzogen, wie dies in der Erklärung zu Tabelle 5 beschrieben ist. Die Affen M1-3 wurden mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI inokuliert; die Affen M4-6 wurden mit 10 µg rekombinantem Tat in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun inokuliert; zwei Kontrollaffen wurden mit RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) und mit Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M8) inokuliert. ND: nicht durchgeführt.

[0161] Eine starke cytotoxische T-Zellantwort (CTL) wurde in einem Affen, der mit dem Tat-Protein und RIBI geimpft war (M1), und in zwei Affen, die mit dem Tat-Protein und Alaun geimpft waren (M4 und M5), detektiert, während eine schwächere CTL-Antwort im Affen M6, der mit Tat und Alaun immunisiert war ([Fig. 9](#) und Tabelle 12), beobachtet wurde.

TABELLE 12

Analyse der CTL-Antwort

Affe	Woche	Ziel:Effektor-Verhältnis						CTL-Aktivität
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Durchschnitt	
M1	28	5,9	4,7	4,1	7,9	5,3	5,5	+
	36	ND	14,4	8,8	4,9	6,7	8,7	+
M2	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M3	28	0	0	0	0	0	0	-
	36	ND	0	0,6	0,5	2,0	0,7	-
M4	28	0	0	1,1	1,1	2,6	0,9	-
	36	ND	2,7	8,3	15	1,9	6,9	+
M5	28	4,9	3,9	4,7	5,5	1,7	4,1	+
	36	0	1	0	0	0	0,2	-
M6	28	0	2,6	1,1	7,2	7,2	3,6	±
	36	ND	0	0	0	0	0	-
M7	36	0	0	0	0	0	0	-
M8	36	0	0	0	0	0	0	-

^aDer Assay wurde durchgeführt, wie in Tabelle 6 beschrieben. Die Affen M1-3 wurden mit 10 µg rekombinatem Tat in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI immunisiert; die Affen M4-6 wurden mit 10 µg rekombinatem Tat in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun inokuliert; zwei Kontrollaffen wurden mit RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) und Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M8) inokuliert. ND: nicht durchgeführt.

[0162] In Woche 44 wurde das Vorliegen der antiviralen Gesamtaktivität (TAA) bestimmt. Die TAA wurde als Fähigkeit der PBMC von Affen, die mit in Gegenwart von autologem Serum kultiviertem, rekombinatem Tat-Protein geimpft waren, zur Resistenz gegen eine SHIV 89.6P-Infektion gemessen (Tabelle 13).

TABELLE 13

Analyse des Vorliegen der antiviralen Gesamtaktivität (TAA)^a

Affen-ID	Tage nach Infektion	
	7	17
	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)
M1	10 ⁻²	10 ⁻²
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³
M4	10 ⁻²	10 ⁻²
M5	10 ⁻²	10 ⁻²
M6	10 ⁻³	10 ⁻³
M7	10 ⁻³	10 ⁻³
M8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

^aPBMC wurden in Woche 44 von mit dem rekombinanten Tat-Protein (10 µg) und RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6) geimpften Affen und von mit RIBI (M7) oder Alaun (M8) inokulierten Kontrollaffen gesammelt. Die PBMC, gereinigt mittels Ficoll-Gradient und dreifach bei $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ pro Vertiefung in Platten mit 48 Vertiefungen angeimpft, wurden in RPMI 1640, enthaltend 10% FCS und 5% autologes Plasma, das zuvor 30 Min. bei 56°C erwärmt worden war, in Gegenwart eines monoklonalen Anti-CD3-Antikörpers (5 ng/ml) und von IL-2 (2 U/ml) 48-72 Stunden bei 37°C gezüchtet. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 37°C mit Reihenverdünnungen des chimären Virus SHIV 89.6P (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} TCID50/Zelle) infiziert, 3-mal mit PBS-A gewaschen und in 50% konditioniertem Medium sowie 50% frischem Medium bei 5×10^5 Zellen/ml/Vertiefung resuspendiert. An den Tagen 3, 7, 10, 14 und 17 nach der Infektion wurden Aliquots des Kulturmediums gesammelt und durch gleiche Volumina an frischem Medium ersetzt. Die Virusreplikation wurde in Zellüberständen mittels p27 Gag ELISA (Coulter International, Miami, FL) bestimmt. Die Ergebnisse sind als minimale infektiöse Dosis von SHIV (TCID50/Zelle) an den Tagen 7 und 17 nach der Infektion angegeben, die in der Lage war, Affen-Lymphocyten zu infizieren.

[0163] Die Ergebnisse zeigen das Vorliegen löslicher viraler Aktivität, vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten (CAF) (Tabelle 14). In den geimpften Affen war im Vergleich zu den Kontrolltieren ein Gesamtanstieg der CAF-Aktivität zu beobachten.

TABELLE 14

Analyse des Vorliegen löslicher antiviraler Aktivität, vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten CAF^a

Affen-ID	Wochen nach Primärimmunisierung	% Inhibierung der viralen Replikation	
		Akute Infektion	Chronische Infektion
M1	0	8	30
	32	53	53
M2	0	36	0
	32	60	27
M3	0	0	37
	32	55	29
M4	0	45	0
	32	85	66
M5	0	41	0
	32	ND	ND
M6	0	49	18
	32	34	41,4
M7	0	39	39
	32	71	44
M8	0	37	0
	32	76	26,8

^aAnalyse des Vorliegens löslicher antiviraler Aktivität, vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten (CAF) von mit rekombinantem Tat-Protein (10 µg) und RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6) geimpften Affen und von mit RIBI (M7) oder Alaun (M8) inokulierten Kontrollaffen. Eine akute Infektion wurde bei CEM x 174 Zellen getestet, die mit SHIV 89.6P infiziert waren. Der Assay wurde wie in Tabelle 7 beschrieben durchgeführt, und die Ergebnisse beziehen sich auf Tag 7 nach der Infektion. Das Vorliegen von CAF beim chronischen Infektionssystem wurde in der U1-Zelllinie getestet (Ref. 47), bei der es sich um eine promonocytische, menschliche Zelllinie handelt, die chronisch mit HIV-1 infiziert ist. U1-Zellen, die bei 1×10^4 Zellen/200 µl pro Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen angeimpft worden waren, wurden, um eine Reaktivierung der HIV-1-Infektion zu induzieren, mit PMA (10^{-8} M) und mit oder ohne unterschiedliche(n) Volumina (50 µl, 5 µl, 0,5 µl) von Kulturüberständen aus CD8+ T-Lymphocyten, die von geimpften Affen und von Kontrollaffen stammten, inkubiert. Drei Tage nach der PMA-Behandlung wurde das Vorliegen von HIV-1 im Kulturmedium mittels RT-Assay oder p24 Gag ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als % Inhibierung der HIV-1-Replikation in CD8+ T-Zellüberständen gegenüber unbehandelten Zellen gezeigt. Die Ergebnisse der Inhibierung akuter und chronischer Infektion beziehen sich auf Zellen, die mit 5 µl CD8+-Überständen behandelt wurden.

[0164] Die Produktion von Cytokinen (γIFN, IL-4, TNFα) und des RANTES-Chemokins aus PBMC von Affen, die mit Tat und RIBI (M1-3) oder Tat und Alaun (M46) geimpft waren, und der Kontrollaffen M7 und M8 wurde ebenfalls bestimmt (Tabelle 15).

TABELLE 15

Analyse der Cytokin- und Chemokin-Produktion

Affe	Kontrolle				PHA				TT			
	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	988/1096	-/-	948/-	1788/2564	-/-	-/3,8	-/-	Nd/Nd
M2	-/-	-/-	126/-	-/-	325/280	-/-	244/172	292/284	86/66	-/-	-/-	Nd/Nd
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	-/-	-/-	426/66	-/-	98/-	-/284	-/-	-/-	-/224	Nd/Nd
M5	-/-	-/-	48/-	-/-	279/303	-/-	416/-	536/608	-/-	-/-	-/-	Nd/Nd
M6	-/-	-/-	-/-	246/-	255/137	-/-	-/-	1124/268	-/-	-/-	-/266	Nd/Nd
M7	-/-	-/-	-/-	-/-	150/169	-/-	40/-	1228/976	-/-	-/4	-/nd	Nd/Nd
M8	-/-	-/-	-/-	-/-	0/0	20/32	60/-	2160/1588	-/-	-/-	-/nd	Nd/Nd

Affe	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/-	-/-
M2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	378/430	-/-	-/-	-/-	344/352	-/-
M5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M6	-/-	-/5	-/-	-/-	-/78	-/-	150/-	-/-
M7	-/40	-/3,3	84/-	-/-	-/-	-/3,2	-/-	-/-
M8	-/-	-/4,8	-/-	-/-	-/-	-/10	-/-	726/528

^aAnalyse der Produktion von Cytokinen und Chemokinen nach 48 und 96 Stunden Kultur (48/96) von PBMC aus mit 10 µg Tat und RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6) geimpften Affen. Die Kontrollaffen (M7 und M8) wurden mit RIBI bzw. Alaun-Adjuvanzen inokuliert. In Woche 44 entnommene und mittels Ficoll-Gradient gereinigte PBMC wurden bei 1×10^6 Zellen/ml pro Vertiefung in Platten mit 24 Vertiefungen angeimpft und in RPMI 1640, enthaltend 10% FCS, gezüchtet. Die PBMC waren unstimuliert (Kontrolle), um die spontane Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen zu evaluieren, oder wurden mit PHA (2 µg/ml), mit dem Tetanustoxoid (TT, 5 µg/ml) oder mit Tat (1 oder 5 µg/ml) stimuliert. Aliquots von Kulturüberständen wurden 48 und 96 Stunden nach der Stimulation gesammelt, um das Vorliegen von Cytokinen und Chemokinen mittels handelsüblicher ELISA-Kits von BioSource International (Camarillo, CA, USA) für den Assay der Cytokinproduktion und von R & D Systems (Abdugdon, Oxon, UK) zum Evaluieren der RANTES-Produktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind als pg/ml nach 48 bzw. 96 Stunden Kultur (48/96) gezeigt. Die Cutoff-Werte waren (pg/ml): γ 1FN: 31,2; IL-4: 3,12; TNF α : 15,6; RANTES: 6,25. (-): Die Werte waren niedriger als entsprechende Cutoff-Werte. Nd: nicht durchgeführt.

[0165] Darüber hinaus zeigten fünf mit dem rekombinanten Protein geimpfte Affen (M2-6) in Woche 15 eine positive Reaktion auf den Tat-Hauttest mit einer starken, verzögerten Hypersensibilitätsreaktion (Tabelle 16 und Fig. 19). Bei den Affen 4 und 5 war die Hauttestreaktion in den folgenden Wochen sogar noch stärker (Tabelle 16).

TABELLE 16

Tat-Hauttest^a

Affe	Wochen nach Primärimmunisierung						
	11	15	21	28	32	36	44
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
M3	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
M4	-	+	++	++	++	++	++
M5	+/-	+	++	+	++	++	+
M6	-	+	+/-	+/-	-	-	-
M7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 und 5 µg) in 150 µl PBS-0,1% BSA oder der Puffer alleine wurden auf intradermale Weise in einem rasierten Bereich des Rückens von geimpften Affen inokuliert. Die Kontrolltiere wurden in den Wochen 11, 15, 21, 28, 32, 36 und 44 nach der Erstimmunisierung nicht inokuliert (ND, nicht durchgeführt). Die Affen M1-3 wurden mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein in 250 µl autologem Serum und 250 µl RIBI geimpft; die Affen M4-6 wurden mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein in 250 µl autologem Serum und 250 µl Alaun geimpft; zwei Kontrollaffen wurden mit RIBI (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M7) oder Alaun (250 µl und 250 µl autologes Serum) (M8) inokuliert. Das Vorliegen eines erythematösen Knötchens nach 48-72 Stunden legte eine verzögerte Hypersensibilitätsreaktion (DTH) nahe: ++, $\varnothing \geq 5$ mm; +, $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, Erythem ohne Verhärtung; -, $\varnothing < 1$ mm.

[0166] Die Ergebnisse nach der Anregung zeigen, dass 4/6 (67%) der geimpften Affen vor einer Infektion mit 10 MID₅₀ von SHIV 89.6P geschützt waren, wie durch die Ergebnisse der virologischen Assays gezeigt (Tabelle 17). Insbesondere wurde kein p27 Gag-Antigen im Plasma der Affen M1, M2, M4 und M6 detektiert und keine provirale DNA mittels PCR in Lymphocyten dieser Affen gefunden, und die Cyto-Virämie war negativ. Die Affen M3 und M5 waren infiziert, wie sich durch das Vorliegen des p27 Gag-Antigens im Plasma durch Detektion von proviraler DNA in den Zellen und durch eine positive Cytomegalie-Virämie zeigte (Tabelle 17). Beide Kontrollen (M7 und M8) stellten sich anhand der gleichen virologischen Assays als infiziert heraus. Um die Infektiosität der viralen Dosis, die zur Anregung verwendet wurde, weiter zu kontrollieren, wurde ein weiterer naiver Affe (M13) zu den Kontrolltieren hinzugenommen und mit 2,85 MID₅₀ von SHIV 89.6P (was einer Virusdosis entspricht, die 3,5-mal niedriger als die zur Anregung der Tiere im Protokoll verwendete Dosis ist) infiziert. Der Affe M13 stellte sich anhand aller virologischen Assays als infiziert heraus. Um zu bestätigen, dass die Tiere dem Virus ausgesetzt waren, wurde das Vorliegen von Antikörpern gegen SIV-Antigene, kodiert durch das chimäre SHIV 89.6P-Virus (Gag, Pol, RT, Nef), analysiert, wie in diesem Beispiel bereits beschrieben. Das Vor-

liegen von Anti-SIV-Antikörpern in den Affen, die bezüglich der virologischen Parameter negativ waren (M1, M2, M4 und M6), bestätigt, dass diese Tiere dem Virus ausgesetzt waren, und zeigt, dass in diesen Affen eine abortive SHIV-Infektion stattgefunden hatte. Die Affen, die niedrige Anti-SIV-Antikörper-Titer zeigten, wurden gemäß folgendem Verfahren auf die in vitro-Produktion von spezifischen antiviralen IgG (IVAP) (Ref. 177,178) untersucht: PBMC (2×10^6 /Vertiefung) wurden in Platten mit 24 Vertiefungen angeimpft und mit PWM (2 µg/ml, Sigma, St. Louis, USA) stimuliert. Nach 7-tägiger Inkubation (bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ und 95% Feuchtigkeit) wurden die Kulturüberstände gesammelt, um sie mit einem handelsüblichen Elisa-Kit zur Detektion von HIV-1- und HIV-2-Antikörpern (Abbott, HIV-1/HIV-2 EIA Third Generation Plus) auf Anti-HIV-Antikörperproduktion zu testen. Alle angeregten Affen stellten sich bezüglich der Produktion von Anti-HIV Env-Antikörpern als positiv heraus, da HIV-1 Env in SHIV 89.6P vorliegt.

TABELLE 17

Analyse virologischer Parameter

Affe	Tage nach Anregung mit SHIV89.6P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ µg) ^b	Cytomegalie- Virämie ^c	Anti- SIV- IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ µg)	Cytomegalie- Virämie	Anti- SIV- IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ µg)	Cytomegalie- Virämie	Anti- SIV- IgG
M1	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M3	73,3	855	707,3	Neg	26,22	959	74,95	Neg	<20	71	<1	1:10
M4	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M5	964	1147	>2818,3	Neg	20,8	>10 ⁶	78	1:2	>20	65	44,6	1:10
M6	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:6
M7	287,8	838	707,9	>1:50	65,2	858	354,8	>1:50	<20	439	11,2	1:6400
M8	106,7	376	707,9	1:2	<20	311	44,6	1:5	<20	56	2,8	1:6400
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

[0167] Analyse der virologischen Parameter nach Anregung von Affen, die mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein und RIBI (MI-3) oder Alaun (M4-6) geimpft waren. Die Kontrollaffen (M7 und M8) wurden mit RIBI bzw. Alaun inokuliert. Affe M13 war ein naives Tier, das mit 2,85 MID₅₀ von SHIV 89.6P infiziert war.

^aDie Plasmaantigenämie wurde mittels p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgien) evaluiert und ist in p27-Werten (pg/ml) ausgedrückt. Neg: der Wert war niedriger als der entsprechende Cutoff-Wert (18 pg/ml).

^bDNA wurde mit Vollblut unter Verwendung des Q1Aamp-Blutkits (Angingen GmbH und Qiagen Inc., Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Qualität der DNA wurde mittels PCR-Amplifikation des β-Globingens kontrolliert, wie zuvor beschrieben (Ref. 141). Das Vorliegen von proviraler DNA wurde mittels semiquantitativer PCR-Amplifikation von SIV gag analysiert. Eine PCR wurde mit 1 µg Zell-DNA unter Verwendung der Primer SG1096Ngag (entsprechend den Nukleotiden 1096-1119 des S1Vmac251-Genoms: 5'TTAGGCTACGACCCGGCGGAAAGA3') (Sequenz ID Nr. 35) und SG1592CgagD (Kartierung an den Nukleotiden 1569-1592 des S1Vmac251-Genoms: 5'ATAGGGGGTGCAGCCTTCTGACAG3') (Sequenz ID Nr. 36), die ein 496 Basenpaare umfassendes Fragment des SHIV gag-Gens amplifizieren, wie beschrieben durchgeführt (Ref. 153). Um die Kopienzahl proviraler DNA zu quantifizieren, wurde in jedem Experiment eine Standardkurve unter Verwendung des Plasmids pCMRII-Δgag (das eine 100 Basenpaare umfassende Deletion im gag-Gen von S1Vmac251 enthielt) als Matrizen-DNA und der oben beschriebenen Primer, die ein 396 Basenpaare umfassendes DNA-Fragment amplifizieren, hergestellt. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese analysiert und durch densitometrische Analyse (Ultrascan LX Enhancer Laser, LKB, Bromma, Schweden) quantifiziert. Die Beziehung zwischen den OD-Werten und der Zahl der Moleküle des Δgag-Plasmids wurde mittels linearer Regressionsanalyse (Statgraphics, Manugistics, Inc., Cambridge, MA) korreliert. Die OD-Werte waren bei bis zu 1000 Molekülen linear (Korrelationskoeffizient = 0,954 ± 0,026). Die Kopienzahl von SHIV-proviraler DNA/µg Zell-DNA wurde durch Interpolation der OD-Werte jeder Probe mit der Standardkurve bestimmt. Die Empfindlichkeit des Assays betrug 1 Provirus-Kopie/µg DNA.

^cDie Cytomegalie-Virämie wurde in Co-Kultivierungsassays bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 1 × 10⁴ CEM x 174 Zellen in Gegenwart von Reihenverdünnungen von zu untersuchenden, CD-8-depletierten PBMC (insgesamt 12 Verdünnungen, von 1 × 10⁶ bis 3,9 × 10³ Zellen pro Vertiefung) in Platten mit 96 Vertiefungen kultiviert. An den Tagen 3, 7 und 10 nach der Infektion wurden 150 µl entnommen, um das Vorliegen von p27 Gag mittels ELISA (Innogenetics, Belgien) zu testen, und durch ein gleiches Volumen frisches Medium ersetzt. Die Ergebnisse wurden anhand der Formel von Reed und Muench analysiert, um die Anzahl produktiv infizierter PBMC pro Million der gesamten Zellen zu bestimmen.

^dDas Vorliegen von Antikörpern gegen SHIV wurde mit Reihenverdünnungen von Tierplasma bestimmt, die mit dem Elavia Ac-Ab Ak II-Kit (Diagnostic Pasteur, Paris, Frankreich) gemäß den Anweisungen des Herstellers zweifach getestet wurden. Gezeigt ist die höchste Verdünnung, bei der die Plasmapwerte höher als der Cutoff-Wert waren.

^eBeim Affen M13 wurde statt einer Cytomegalie-Virämie eine Virusisolierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PBMC (3 × 10⁶) von Affen, die mit unterschiedlichen Dosen von SHIV 89.6P, gereinigt mittels Ficoll, infiziert waren, mit CEM x 174 Zellen (1 × 10⁶) in 1 ml Medium kultiviert, das 10% FCS enthielt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf 1 × 10⁶/ml verdünnt und drei Tage kultiviert. Dann wurden zwei ml Medium gesammelt und die Zellen bei 3 × 10⁵/ml in 7 ml wieder angeimpft. Der Überschuss der Zellen wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde zweimal pro Woche über 4 Wochen wiederholt. Das Vorliegen von Viren wurde mittels p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgien) und anschließend mittels RT-Assay bestimmt. Die Virusisolierung galt als positiv (+), wenn beide Assays (p27 und RT) in 3 aufeinanderfolgenden Proben positiv waren. Andernfalls wurde die Virusisolierung als negativ (-) betrachtet.

^fEine qualitative DNA-PCR wurde für den Affen M13 durchgeführt. Die virologischen Daten überschneiden sich mit der absoluten Anzahl CD4-Lymphocyten, die sich bei den infizierten Affen (M3, M5, M7, M8) als drastisch verringert und bei den Virus-negativen Tieren (M1, M2, M4, M6) als hoch und stabil herausstellte, wie dies in Tabelle 18 gezeigt ist.

TABELLE 18

FACS-Analyse von CD4+- und CD8+-Lymphocyten^a

Affe	Tage nach Anregung mit SHIV89.6P											
	0			15			30			60		
	% (Zellen/ μ l)			% (Zellen/ μ l)			% (Zellen/ μ l)			% (Zellen/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+
M1	32,1 (1490)	53 (2460)	0,6	ND	ND	ND	30,8 (2420)	57,3 (4500)	0,54	30,6 (2460)	57,9 (4670)	0,53
M2	27,7 (1550)	45,3 (2530)	0,6	ND	ND	ND	35,5 (2120)	43,7 (2610)	0,81	29,6 (2000)	42,4 (2870)	0,7
M3	33 (1120)	39,3 (1340)	0,84	ND	ND	ND	3,1 (190)	75,6 (4660)	0,04	6,2 (240)	70 (2750)	0,09
M4	16,6 (670)	68,3 (2740)	0,24	ND	ND	ND	17,25 (2050)	68,7 (8180)	0,25	15,5 (1520)	75 (7350)	0,21
M5	36,3 (2770)	43,9 (3350)	0,83	ND	ND	ND	1,1 (90)	82,3 (1300)	0,01	4,1 (480)	75,5 (8730)	0,05
M6	35,3 (1210)	43,4 (1490)	0,81	ND	ND	ND	35,9 (1240)	45,5 (1570)	0,79	37,8 (3700)	43,7 (4280)	0,86
M7	36,1 (1610)	31,3 (1400)	1,15	ND	ND	ND	7,4 (480)	66,1 (4260)	0,11	13,7 (860)	56,7 (3550)	0,24
M8	25,7 (850)	51,3 (1710)	0,5	ND	ND	ND	3,3 (210)	76,2 (4840)	0,04	8,1 (590)	64,9 (4670)	0,13
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

^aFACS-Analyse von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphocyten von Affen, die mit 10 µg rekombinantem Tat-Protein und RIBI (M1-3) oder Alaun (M4-6) geimpft waren. Die Kontrollaffen (M7 und M8) wurden nur mit RIBI- bzw. Alaun-Adjuvanzen inokuliert. Der Affe M13 war ein naives Tier, das mit 2,85 MID₅₀ SHIV 89.6P infiziert war. Eine Analyse wurde mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS), wie beschrieben (Ref. 137), unter Verwendung markierter monoklonaler Antikörper (Anti-CD4-FITC, BioSource; Anti-CD8-PerCp, Becton-Dickinson) durchgeführt. ND: nicht durchgeführt.

[0168] Die Ergebnisse vor der Anregung zeigen, dass Tat als Immunogen sowie RIBI und Alaun als Adjuvanzen (oder ISCOM, das im letzten Boost als Adjuvans verwendet wurde) von den Tieren gut toleriert wurden und nicht-toxisch waren, was die Ergebnisse der Sicherheit und Verträglichkeit der Immunisierung mit Tat bestätigt, die im ersten Pilotexperiment erhalten wurden. Zudem bestätigen diese Daten die Beobachtungen des ersten Pilotexperimentes und liefern zusätzliche Beweise für die Tatsache, dass das rekombinante Tat-Protein eine starke humorale und zelluläre, Tat-spezifische Antwort mit antiviralen Effekten in vitro und in vivo hervorruft. Die Ergebnisse nach der Anregung (4/6 geschützte Affen) bestätigen die Erwartung der in vitro-Ergebnisse und deuten darauf hin, dass ein Anti-Tat-Impfstoff einen Schutz gegen die Infektion und damit gegen die Erkrankung induziert. Die Nachfolgeuntersuchung der beiden geimpften und infizierten Affen wird die Effekte der Impfung auf die Progression der Erkrankung klären.

Beispiel 5. Inokulierung eines Anti-Tat-DNA-Impfstoffes in *Macaca fascicularis*: Analyse von Sicherheit, Verträglichkeit, spezifischer Immunantwort und Wirksamkeit des Schutzes gegen virale Anregung (nicht beansprucht).

[0169] Vorgeschlagen wird die direkte Inokulierung von DNA des Plasmids pCV-Tat, enthaltend die cDNA des tat-Gens, und des Plasmids pCV0 als Kontroll-DNA. Die den Tieren zu verabreichenden Plasmid-DNAs werden in *E. Coli* (Stamm DH5) gemäß üblichen Verfahren (Ref. 110) und gemäß von der „European Agency for the evaluation of medical products; Human Medicine Evaluation Unit“ (Technical Report Series Nr. 17 Januar 1997) etablierten Protokollen amplifiziert, mit zwei CsCl-Gradienten gereinigt und 48-72 Stunden mit 100 Volumina PBS dialysiert. Dann werden die DNAs mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Die Funktionalität der Plasmid-DNA wird mittels Transfektion von 5-10 µg DNA unter Anwendung von Calciumphosphat-Techniken (Ref. 110) in H3T1-Zellen (1×10^6), die eine integrierte Kopie des Reporter-Plasmids HIV-1 LTR-CAT enthalten, und 48 Stunden später mittels Analyse der CAT-Aktivität (Ref. 55) kontrolliert. Die Verträglichkeit, die Sicherheit, die Fähigkeit zum Hervorrufen einer spezifischen Immunantwort (sowohl humoral als auch zellulär), und die Wirksamkeit des Schutzes gegen die Virusanregung nach der Immunisierung mit pCV-Tat-Plasmid-DNA wurden in *Cynomolgus*-Affen (*Macaca fascicularis*) evaluiert. In einem ersten Pilotexperiment wurden drei Affen gemäß folgendem Schema immunisiert: Affe M1 wurde mit 200 µg pCV-Tat in 300 µl PBS auf i.d. Wege in 2 Stellen am Rücken nahe den axillären Lymphknoten inokuliert (150 µl/Stelle); Affe M2 wurde mit 500 µg pCV-Tat in 500 µl PBS auf i.m. Wege in 2 Stellen am Rücken inokuliert (250 µl/Stelle). An den Tagen 1 oder 5 vor der i.m. Inokulation wurden 250 µl physiologische Lösung, enthaltend 0,5% Bupivacain und 0,1% Methylparaben, in die zwei zuvor markierten Stellen injiziert, wo Plasmid-DNA inokuliert werden musste. Dies wurde durchgeführt, um die Aufnahme und Expression von DNA im Muskel zu erhöhen (Ref. 37, 45). Der Affe M3 wurde nicht inokuliert, sondern als Kontrolltier verwendet. Ab Woche 10 wurde dieser Affe jedoch mit 6 µg (5 + 1 µg) Tat i. d. als Kontrolle für Hauttests inokuliert. Allen Affen wurden 42 und 35 Tage vor der ersten Inokulation zehn ml Blut zur Analyse von Grundparametern entnommen. Die Affen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 5, 10, 15, 22, 27, 32 und 37 Wochen inokuliert. Schließlich erhielten die Tiere in Woche 42 den letzten Boost mit rekombinantem Tat-Protein (16 µg) in 200 µl ISCOM und 300 µl PBS. Die Tiere wurden täglich hinsichtlich klinischer Parameter beobachtet, wie dies in Beispiel 4 beschrieben ist. Darüber hinaus wurden am selben Tag 10 ml Blut entnommen, wie dies in Beispiel 4 beschrieben ist. Die Schutzwirkung der Impfung wurde nach Anregung der Affen mit 10 MID₅₀ SHIV89.6P bestimmt, das in Woche 65 auf intravenösem Wege injiziert wurde. Die noch andauernde Nachuntersuchung nach der Anregung wurde wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experimentes lauten wie folgt: Bei zwei geimpften Affen und beim Kontrollaffen wurden keine Veränderungen klinischer, hämatologischer und verhaltensbezogener Parameter beobachtet. Auch wurden weder Anzeichen einer Entzündung noch eine Gefäßneubildung an der Injektionsstelle beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die pCV-Tat-DNA von den Tieren gut toleriert wurde und bei den Dosierungen und Inokulationswegen, die bei diesem Experiment verwendet wurden, nicht-toxisch war. Der Affe M1, der auf i. d. Wege mit 200 µg DNA geimpft wurde, entwickelte ab Woche 32 Tat-spezifische IgG-Antikörper (Fig. 11). Die Antikörper-Titer (von Woche 32 bis Woche 58) lagen in einem Bereich von 1:100 bis 1:800 (Fig. 12). In Woche 37 zeigte eine Epitopkartierungsanalyse (durchgeführt, wie in der Erklärung zu Fig. 4 beschrieben), dass diese Antikörper gegen spezifische Regionen von Tat gerichtet waren, mit einer Kartierungsposition bei aa 1-20, aa 46-60 und aa 65-80 und Titern von 1:200, 1:100 bzw. 1:50 (Daten nicht gezeigt). Im Affen M2, der auf i. m. Wege mit 500 µg DNA geimpft war, wurden über den gesamten Zeitraum der

Studie kaum Anti-Tat-Antikörper detektiert (mit einem Titer von 1:50, nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) gezeigt. Die Fähigkeit von Plasma des Affen M1, der auf i. d. Wege mit 200 µg DNA geimpft war, die Tat-Aktivität zu neutralisieren, wurde getestet, indem ein Assay der Inhibierung der Rettung der viralen Replikation in HLM1-Zellen, inkubiert mit exogenem Tat-Protein, durchgeführt wurde, wie dies in Beispiel 4 beschrieben ist. Dieser Assay zeigte, dass das Plasma des Affen M1, 1:2 verdünnt und in Woche 37 erhalten, die mit 30 ng/ml exogenem Tat induzierte virale Replikation verringerte. Dagegen wurde extrazelluläres Tat durch das Plasma desselben Affen, das zum Zeitpunkt 0 (präimmun) erhalten wurde, nicht blockiert (Tabelle 19).

TABELLE 19

Neutralisierende Aktivität von Plasma gegenüber der Rettung einer mit extrazellulärem Tat induzierten, viralen Infektion^a

Proben	Inhibierung
Tat + M1 präimmun	0
Tat + M1 immun	51

^aDie Fähigkeit von Anti-Tat-Antikörpern, die Tat-Aktivität zu neutralisieren, wurde in HLM1-Zellen durch Zugabe von 30 ng/ml rekombinantem Tat-Protein bestimmt, das zuvor mit einem gleichen Volumen an Plasma inkubiert wurde, welches zum Zeitpunkt 0 (präimmun) oder in Woche 37 (immun) vom Affen M1 erhalten wurde, der auf i. d. Wege mit 200 µg pCV-Tat-Plasmid-DNA geimpft war. Der Assay wurde durchgeführt und die Ergebnisse sind ausgedrückt, wie dies in Tabelle 4 beschrieben ist.

[0170] Die in Tabelle 20 angegebenen Ergebnisse zeigen das Vorliegen einer proliferativen Antwort auf Tat in Woche 42 im Affen M1, der i. d. mit 200 µg DNA immunisiert war, während diese Art einer zellulären Antwort im Affen M2 nicht detektiert wurde.

TABELLE 20

Proliferative Antwort auf Tat^a

Affe	Stimulus	Wochen nach Erstimmunisierung							
		15	22	27	32	37	42	48	58
M1	PHA	32,9	45	89,3	40,5	3,1	13,3	ND	13,1
	TT	0,8	2,7	1,5	1,3	0,6	9	1,2	1,6
	Tat	0,9	1,7	1,2	1,1	1,1	5,9	1	1
M2	PHA	11,7	18,5	21,8	32,2	1,1	6,2	7	18,9
	TT	0,9	1,8	0,8	1,1	1	1,5	1,1	1
	Tat	0,8	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	1,1	1
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1	77,8	ND	2,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6	36,8	1	2,1
	Tat	2,1	1,4	2,2	0,7	1,5	2,8	0,8	0,9

^aPBMC wurden isoliert, mit PHA (4 µg/ml), Tetanustoxoid (TT) und Tat (1 oder 5 µg/ml) stimuliert und getestet, wie in Tabelle 5 beschrieben. Die Affen wurden auf i. d. Wege mit 200 µg (M1) pCV-Tat oder auf i. m. Wege mit 500 µg (M2) pCV-Tat geimpft. Der Affe (M3) wurde nicht geimpft, sondern ab Woche 10 mit 6 µg (5 + 1 µg) Tat als Kontrolle für Hauttests i. d. inokuliert. ND: nicht durchgeführt.

[0171] Die cytotoxische Anti-Tat-Aktivität (CTL) wurde im Affen M1 in den Wochen 42 und 48 sowie im Affen M2 in Woche 48 detektiert. Ferner wurde in Woche 48 eine positive CTL-Antwort im Affen M3 detektiert, der seit Woche 10 mit 6 µg Tat als Kontrolle für Hauttests inokuliert wurde (Tabelle 21).

TABELLE 21

Analyse der Tat-spezifischen cytotoxischen Aktivität (CTL)^a

Affe	Woche	Ziel:Effektor-Verhältnis						CTL-Aktivität
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Medien	
M1	42	27,4	27,8	17,1	9,8	3,9	17,2	+
	48	ND	ND	21,3	0	11,7	11	+
M2	42	1,2	5,9	2,4	1	0	2,1	-
	48	ND	ND	ND	57	25,1	41	+
M3	42	0	0	0	1,2	0	0,6	-
	48	ND	12,4	4,2	0	0	0	+

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 6 beschrieben durchgeführt. Die Affen wurden mit 200 µg (M1) pCV-Tat auf i.d. Wege oder mit 500 µg (M2) pCV-Tat auf i.m. Wege geimpft. Der Affe (M3) wurde nicht geimpft, sondern ab Woche 10 mit 6 µg (5 + 1 µg) Tat als Kontrolle für Hauttests i.d. inokuliert. ND: nicht durchgeführt.

[0172] Die in Tabelle 22 angegebenen Ergebnisse zeigen in Woche 52 das Vorliegen der antiviralen Gesamtaktivität (TAA) in den beiden mit 200 bzw. 500 µg DNA geimpften Affen.

TABELLE 22

Analyse der antiviralen Gesamtaktivität (TAA)^a

Affe	Tage nach Infektion	
	7	17
	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)
M1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 13 beschrieben durchgeführt. Die Affen wurden mit 200 µg (M1) pCV-Tat auf i. d. Wege oder mit 500 µg pCV-Tat auf i. m. Wege inokuliert. Der Affe (M3) wurde nicht inokuliert, erhielt aber ab Woche 10 i. d. 6 µg (5 + 1 µg) Tat als Kontrolle für Hauttests. PBMC wurden in Woche 52 nach der Erstimmunisierung gesammelt und mit SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ TCID₅₀/Zelle) infiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt als minimale infektiöse Dosis von SHIV (TCID₅₀/Zelle), die noch in der Lage war, die Zellen zu infizieren.

[0173] Die in Tabelle 23 gezeigten Ergebnisse deuten auf das Vorliegen von löslicher antiviraler Aktivität (CAF), vermittelt durch CD8+ T-Lymphocyten, in den Wochen 22 und 27 bei beiden geimpften Affen hin. Die Aktivität war im Kontrollaffen niedriger.

TABELLE 23

Analyse der CD8+-Zellen-vermittelten, löslichen antiviralen Aktivität (CAF)^a

Affe	Wochen nach Erstimmunisierung	% Inhibierung der viralen Replikation	
		Akute Infektion	Chronische Infektion
M1	22	62	27
	27	56	25
M2	22	74	ND
	27	28	ND
M3	22	24	ND
	27	37	22

^aAnalyse des Vorliegens von löslicher antiviraler Aktivität, erzeugt durch CD8+ T-Lymphocyten (CAF), die von mit 200 µg (M1) und 500 µg (M2) pCV-Tat inokulierten Affen und vom Affen M3 stammten. Die antivirale Aktivität wurde bei einer akuten und einer chronischen Infektion in CEM x 174 Zellen, die mit SHIV 89.6P infiziert waren, und in OM-10-1-Zellen, die chronisch mit HIV-1 infiziert waren, wie in Tabelle 7 beschrieben, getestet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz (%) der Inhibierung viraler Replikation in Zellen, die mit Überständen von CD8+ T-Lymphocyten behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die in der Tabelle gezeigten Ergebnisse der akuten und der chronischen Infektion beziehen sich auf Proben, die mit 5 µl der CD8+-Kulturüberstände behandelt wurden. ND: nicht durchgeführt.

[0174] Die in Tabelle 24 angegebenen Ergebnisse zeigen, dass der Affe M1, inokuliert mit 200 µg DNA auf i. d. Wege, in Woche 22 einen positiven Tat-Hauttest hatte.

TABELLE 24

Tat-Hauttest^a

Wochen nach Immunisierung	Affe		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	+	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-
42	-	-	-
48	-	-	-
52	-	-	-
58	-	-	-

^aTat (1 und 5 µg) in 150 µl PBS-0,1% BSA oder der Puffer alleine (Kontrolle) wurden in den Wochen 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48, 52 und 58 nach der Erstimmunisierung i. d. in einen zuvor trichotomisierten Bereich am oberen Rücken der geimpften Tiere und in den Kontrollaffen (Kontrolle für die Spezifität der Antwort) inokuliert. Der Affe M1 wurde i. d. mit 200 µg DNA des Plasmids pCV-Tat inokuliert, während der Makake M2 500 µg des gleichen Plasmids i. m. erhielt. Der Affe M3 (Kontrolle) wurde nicht geimpft, erhielt aber ab Woche 10 i. d. 6 µg (5 + 1 µg) Tat als Kontrolle für Hauttests. Das Auftreten eines erythematösen Knötchens 48 bis 72 Stunden später deutete auf das Vorliegen einer verzögerten Hypersensibilität (DTH) hin: ++, Ø ≥ 5 mm; + ≥ 1-4 mm; ±, Erythem

ohne Verhärtung; -, $\emptyset < 1$ mm.

[0175] Diese Ergebnisse zeigen, dass das Plasmid pCVTat (pCVTat-DNA) in den gegebenen Dosierungen sowohl intradermal als auch intramuskulär gut toleriert wurde und sicher war. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass die Immunisierung mit der pCVTat-DNA sowohl eine humorale (wenn auch eine geringere, als die durch die Immunisierung mit dem rekombinanten Tat-Protein induzierte) als auch eine zelluläre Anti-Tat-Immunantwort mit antiviralen Effekten induziert. Bezüglich der Schutzwirksamkeit nach Anregung (durchgeführt in Woche 65 nach der Erstimmunisierung) deuten die virologischen Daten, einschließlich Antigenämie- und Cytomegalie-Virämie-messungen, und die Bestimmung der Anzahl proviraler DNA-Kopien (DNA-PCR) in PBMCs darauf hin, dass der Affe M2, der i. m. mit Tat-DNA immunisiert wurde, sich bei Anregung mit 10 MID_{50} von SHIV-89.6P als geschützt herausstellte, während der Makake M1, der i. d. mit einer niedrigeren Dosis Tat-DNA ($200 \mu\text{g}$) immunisiert wurde, sich als infiziert herausstellte, was nahelegt, dass hinsichtlich der Immunisierung mit DNA der i. m. Weg wirksamer als die i. d. Inokulierung ist. Der Kontrollaffe M3 erwies sich ebenfalls als resistent gegen die Infektion. Wie zuvor beschrieben, erhielt dieser Affe jedoch im Gegensatz zu den Kontrollen der anderen experimentellen Protokolle wiederholte Hauttests für Tat, um die Testspezifität zu kontrollieren (Tabelle 24), und Anti-Tat-Antikörper wurden, wenn auch mit niedrigeren Titern (1:100), ab Woche 32 seit Beginn der Immunisierung detektiert (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte die proliferative Antwort auf Tat in diesem Affen eine schwache und sporadische Reaktivität gegenüber dem Antigen (Tabelle 20). Schließlich zeigte der Affe M3 das Vorliegen spezifischer Anti-Tat-CTLs (Tabelle 21). Obwohl sie nur vorläufig sind, deuten diese Daten darauf hin, dass die wiederholte i. d. Injektion von $6 \mu\text{g}$ Tat zur Immunisierung des Tiers und zum Schutz gegen Anregung hätte führen können. Daher soll der Affe M3 als i. d. mit dem Tat-Protein geimpft betrachtet und als solcher untersucht werden.

TABELLE 25

Analyse der virologischen Parameter

Affe	Tage nach Herausforderung mit SHIV89.6P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g) ^b	Cytomegalie- Virämie ^c	Anti- SIV IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g) ^b	Cytomegalie- Virämie ^c	Anti- SIV IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g) ^b	Cytomegalie- Virämie ^c	Anti- SIV IgG
M1	1796	1278	>2818,3	1:10	68,6	1048	353,9	1:50	<20	8	21,3	1:800
M2	<20	<1	Neg	1:10	<20	<1	Neg	1:50	<20	<1	Neg	1:10
M3	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	1:100

Der Affe M1 war i.d. mit 200 μ g pCVTat immunisiert worden, der Affe M2 i. m. mit 500 μ g pCVTat. Dem Makaken M3 wurden mehrmals 6 μ g Tat-Protein intradermal injiziert, um die Hauttestspezifität zu kontrollieren. Daher wird der Affe M3 ab dem Zeitpunkt der Anregung als geimpfter Affe betrachtet. Die virologischen Parameter wurden wie in der Erklärung zu Tabelle 17 beschrieben evaluiert.

[0176] Die FACS-Evaluation des Prozentsatzes und der absoluten Anzahl der CD4- und CD8-Lymphocyten bestätigten die virologischen Daten mit einer klaren Verringerung (etwa 4-fach) der CD4-Lymphocyten im infizierten Affen bereits bei der ersten Analyse nach Anregung (Tag 30), was später (Tag 60) bestätigt wurde (Tabelle 26).

TABELLE 26
FACS-Analyse von CD4- und CD8-Subsets

Affe	Tage nach Anregung mit dem SHIV89.6P-Virus											
	0			15			30			60		
	(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
M1	27,5 (940)	40,7 (1390)	0,68	ND	ND	ND	8,1 (250)	56,5 (1780)	0,14	9,5 (360)	69,7 (2650)	0,14
M2	22,2 (490)	36,8 (810)	0,6	ND	ND	ND	16,4 (580)	42,4 (1500)	0,39	10,9 (940)	52,7 (4560)	0,21
M3	28,7 (1170)	41,1 (1680)	0,7	ND	ND	ND	19,5 (970)	48,7 (2430)	0,4	17,9 (900)	52,2 (2620)	0,34

Die Analyse wurde wie in der Erklärung zu Tabelle 18 angegeben durchgeführt. Der Affe M1 war i. d. mit pCVTat-Plasmid-DNA immunisiert worden, der Affe M2 i. m. mit 500 μ g pCVTat-DNA. Der Makake M3 wurde intradermal mit 6 μ g Tat-Protein geimpft.

[0177] Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurde ein zweites Experiment entwickelt, in dem die Effekte der Immunisierung mit der pCVTat-DNA in 3 Affen (M9-M11) im Vergleich zum Kontrollaffen (M12), der die pCV0-DNA erhielt, evaluiert wurden. Alle Tiere wurden i. m. in 2 Stellen am Rücken mit insgesamt 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12) inokuliert. Entweder 1 oder 5 Tage vor der Impfung wurden 250 µl Kochsalzlösung, enthaltend 0,5% Bupivacain und 0,1% Methylparaben, in die beiden markierten Stellen inokuliert, in die anschließend das Plasmid injiziert worden wäre. Die Makaken wurden zum Zeitpunkt 0 und in den Wochen 6, 11, 15, 21, 28 und 32 geimpft. Ein abschließender Booster wurde in Woche 36 mit dem rekombinanten Tat-Protein (16 µg), resuspendiert in 200 µl ISCOM und 300 µl PBS, durchgeführt. Die Tiere wurden jeden Tag hinsichtlich klinischer Parameter kontrolliert, wie dies in Beispiel 4 beschrieben ist. Darüber hinaus wurden 9 Tage vor der Erstimmunisierung und bei jeder Immunisierung 10 ml Blut entnommen, wie dies in Beispiel 4 beschrieben ist. Um die Schutzwirkungen der Impfung zu evaluieren, wurden die Affen in Woche 50 nach Beginn der Immunisierung mittels intravenöser (i. v.) Injektion von 10 MID₅₀ SHIV89.6P angeregt. Die Nachfolgeuntersuchung nach der Anregung dauert noch an und wird wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

[0178] Die Ergebnisse dieses Experimentes sind die folgenden: Sowohl in den geimpften Tieren als auch in den Kontrolltieren waren keine Veränderungen hinsichtlich Verhalten, klinischer Parameter und Blutchemie festzustellen. An den Injektionsstellen wurden weder Anzeichen für eine Entzündung noch Gefäßneubildungen detektiert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass 1 mg der Plasmid pCVTat-DNA, i. m. injiziert, gut toleriert wurde und nicht-toxisch war. Anti-Tat IgG wurden ab Woche 15 (Fig. 13) mit Titern in einem Bereich von 1:50 bis 1:100 detektiert (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde eine proliferative Antwort auf Tat bei einem Affen (M11) bereits in Woche 2 detektiert (Tabelle 27).

TABELLE 27

Proliferative Antwort auf Tat^a

Affe	Stimulus	Wochen ab Primärimmunisierung										
		2	6	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M9	PHA	8,9	9,2	17,1	58,2	18	47,1	43,4	3,1	72,6	64,6	7
	TT	2,9	1,7	0,9	1	1,8	0,7	1,1	0,8	1	7	2,7
	Tat	0,4	0,5	0,6	1,5	1,6	0,9	1	0,7	1,1	7	1,9
M10	PHA	8,5	18	19,8	ND	10,1	2,2	14,7	15,2	4,4	8,4	ND
	TT	2,4	0,3	0,8	ND	1,1	0,6	1	0,9	0,6	6,4	ND
	Tat	1	0,3	0,7	ND	1,1	0,5	1	0,9	0,7	4,2	ND

M11	PHA	25,7	43,3	1,3	12,1	27,8	3,4	21,3	14,1	15,9	25,8	ND
	TT	4,2	1,9	1,6	0,9	1,1	3,6	1,2	0,8	0,3	1,8	ND
	Tat	5,1	0,8		0,7	1,1	1,1	1,2	0,7	0,7	3	ND
M12	PHA	28,7	30,9	41	50,7	30,8	7,6	43	22,6	34,6	19,9	55,1
	TT	3,2	1,6	0,9	5,2	1,6	1,6	1,3	1,1	1	0,7	3,1
	Tat	3,2	1,4	0,8	1,3	1	1,6	1	0,8	1	1,6	1,3

^aPBMC wurden isoliert, mit PHA (4 µg/ml) oder Tetanustoxoid (TT, 10 µg/ml oder Tat (1 und 5 µg/ml) stimuliert und einem Assay unterzogen, wie in Tabelle 5 beschrieben. Den Affen wurden 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i. m. injiziert. ND: nicht bestimmt.

[0179] Anti-Tat-CTLs wurden in Woche 32 nach der Immunisierung detektiert (Tabelle 28).

TABELLE 28

Analyse der cytotoxischen Anti-Tat-Aktivität (CTLs)^a

Affe	Woche	Ziel:Effektor-Verhältnis						CTL-Aktivität
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Medien	
M9	32	0	0	0	0	0	0	–
	50	4,2	0	0	0	0,9	1	–
M10	32	0	0	9,9	2,7	0	2,5	–
	50	3,5	0	2,3	0	0	1,1	–
M11	32	0	10,5	8,9	3,5	0,9	4,7	+
	50	0	0	0	3,8	0,3	0,8	–
M12	32	0	0	0	0	0	0	–
	50	0	0	0	0	0	0	–

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 6 beschrieben durchgeführt. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i.m. injiziert.

[0180] PBMCs, die vom Affen M11 in Woche 44 erhalten wurden, erwiesen sich als resistent gegen in vitro-Infektion mit Reihenverdünnungen des chimären SHIV-89.6P-Virus in einem zuvor beschriebenen Assay, der das Vorliegen der antiviralen Gesamtaktivität (TAA) detektiert. Tatsächlich wird die TAA evaluiert als die Fähigkeit von PBMCs aus Affen, die mit pCVTat-DNA geimpft sind, die in Gegenwart von autologem Serum gezüchtet wurden, der Infektion mit Virus-Reihenverdünnungen zu widerstehen. (Tabelle 29)

TABELLE 29

Analyse der antiviralen Gesamtaktivität (TAA)

Affe	Tage nach Infektion	
	7	17
	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)	Minimale infektiöse Dosis (TCID ₅₀ /Zelle)
M9	10 ⁻²	> 10 ^{-2**}
M10	10 ⁻³	10 ⁻²
M11	> 10 ^{-2*}	> 10 ^{-2*}
M12	10 ⁻²	> 10 ^{-2**}

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 13 beschrieben durchgeführt. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i.m. injiziert. PBMCs wurden in Woche 44 nach der Erstimmunisierung entnommen und in vitro mit 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID₅₀ von SHIV-89.6P infiziert. Die Ergebnisse sind als die minimale infektiöse Dosis des SHIV (TCID₅₀/Zelle) angegeben, die noch in der Lage ist, die Zellen zu infizieren.

*Keine Kultur stellte sich bei der höchsten SHIV-Konzentration, die im Assay verwendet wurde (10⁻² TCID₅₀/Zelle), als infiziert heraus. **Die Kulturen wurden am Tag 17 nach der Infektion negativ.

[0181] Die in Tabelle 30 angegebenen Ergebnisse zeigen das Vorliegen der durch die CD8+ T-Lymphocyten vermittelten, löslichen antiviralen Aktivität (CAF) in den geimpften Affen und in dem Kontrollaffen (M12), dem der leere Vektor (pCV0) injiziert worden war.

TABELLE 30

Analyse der durch die CD8+ T-Lymphocyten vermittelten, löslichen antiviralen Aktivität (CAF)^a

Affe	Wochen nach Primärimmunisierung	% Inhibierung der viralen Replikation	
		Akute Infektion	Chronische Infektion
M9	0	21	14,6
	36	77	2,6
M10	0	40	13,8
	36	67	25
M11	0	49	19
	36	42	14
M12	0	65	23
	36	62	14

^aAnalyse des Vorliegens der durch die CD8+ T-Lymphocyten vermittelten, löslichen antiviralen Aktivität (CAF). PBMCs wurden von den drei Affen (M9-M11), denen 1 mg pCVTat injiziert worden war, und von dem Kontrollaffen (M12) erhalten, der mit 1 mg pCV0 inokuliert war. Der Assay für die akute Infektion wurde in CEM x 174 Zellen, infiziert mit SHIV-89.6P, wie in Tabelle 14 beschrieben durchgeführt. Der Assay für die chronische Infektion wurde in U1-Zellen, die chronisch mit HIV-1 infiziert waren, wie in Tabelle 14 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz (%) der Inhibierung der viralen Replikation in Zellen, die in Gegenwart oder in Abwesenheit (Kontrolle) von 5 µl der Überstände von CD8+ T-Zellen kultiviert wurden, ausgedrückt.

[0182] Die Produktion von Cytokinen (γIFN, IL-4, TNFα) und des Chemokins RANTES wurde in Woche 44 in PBMCs sowohl der geimpften Affen als auch des Kontrollaffen evaluiert (Tabelle 31).

TABELLE 31

Analyse der Produktion von Cytokinen und von RANTES^a

Affe	Kontrolle						PHA						TT					
	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES		
M9	-/-	-/3,5	-/-	-/-	321/204	-/-	250/-	536/2288	-/-	-/-	-/-	nd/nd	-/-	-/-	-/-	nd/nd		
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd		
M11	-/-	-/-	-/-	-/-	420/183	-/-	388/-	4336/3124	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/nd	nd/nd		
M12	-/-	-/3,2	-/-	-/-	430/932	-/-	-/-	1936/2576	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	218/nd	nd/nd		

Affe	Tat (1 µg)						Tat (5 µg)					
	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES
M9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/4	-/-	544/368	-/-	-/3,5	-/-	-/-	-/3,5	-/-	-/-	2124/-
M12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 15 beschrieben durchgeführt. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i.m. injiziert. PBMCs wurden in Woche 44 nach der Erstimmunisierung entnommen. Die Ergebnisse sind gezeigt als pg/ml von Cytokinen und RANTES, detektiert nach 48 bzw. 96 Stunden (48/96).

(-): Die Werte lagen unter dem Cutoff-Wert. Die Cutoff-Werte (pg/ml) betragen: γ IFN: 31,2; IL-4: 3,12; TNF- α : 15,6; RANTES: 62,5. ND: nicht durchgeführt.

TABELLE 32

Die Ergebnisse zeigen das Vorliegen einer schwachen Reaktivität auf die Hauttests mit Tat bei einem Affen (M9) in Woche 11 (Tabelle 32) Tat-Hauttest^a

Wochen nach Primärimmunisierung							
Affe	11	15	21	28	32	36	44
M9	+/-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
M12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 und 5 μ g) in 150 μ l PBS-A, 0,1% BSA oder der Puffer alleine (Kontrolle) wurden i. d. in einen zuvor trichotomisierten Bereich am oberen Rücken der geimpften Affen, aber nicht in die Kontrollaffen, in den Wochen 11, 15, 21, 28, 32, 36, und 44 nach der Erstimmunisierung inokuliert. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i.m. injiziert. Das Auftreten eines erythematösen Knötchens 48 bis 72 Stunden später deutete auf das Vorliegen einer verzögerten Hypersensibilität (DTH) hin: ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + \varnothing 1-4 mm; \pm , Erythem ohne Verhärtung; -, $\varnothing < 1$ mm.

[0183] Die Ergebnisse nach Anregung deuten darauf hin, dass alle geimpften Tiere gegen die Infektion mit 10 MID₅₀ von SHIV-89.6P geschützt waren, wie sich durch die virologischen Tests (Plasmaantigenämie, Bestimmung der Kopienzahl proviraler DNA, Cytomegalie-Virämie) zeigte, die alle negativ waren (Tabelle 33). Darüber hinaus deutete das Vorliegen von Anti-SIV-Antikörpern im Affen M11 auf die Exposition mit dem Virus oder eine abortive Infektion hin. Im Gegensatz dazu wurden sie in den übrigen Affen nicht detektiert, weshalb wir beschlossen, den in vitro-Antikörperproduktionsassay (IVAP) sowie die lymphoproliferative Antwort auf SIV-Antigene durchzuführen. Diese Assays dauern noch an, und vorläufige Daten zeigen das Vorliegen von Anti-HIV Env-Antikörpern in allen DNA-inokulierten Affen. Die Makaken werden mit einer höheren Dosis des Virus inokuliert werden, da sich auch das Kontrolltier M12 als gegen die Infektion resistent erwies.

[0184] Dieser Affe war mit dem leeren Vektor pCV0 geimpft worden. Jüngste Daten aus der Literatur zeigten die Adjuvansrolle, die von bestimmten DNA-Sequenzen gespielt wird, welche in Bakterien deutlich häufiger als in eukaryontischen Zellen sind, und die ähnlich wie bei LPS und Mannose einen starken Stimulus für die natürliche Immunität darstellen (Ref. 179). Somit ist denkbar, dass der beim Affen M12 beobachtete Schutz möglicherweise durch die Induktion einer nicht-spezifischen antiviralen Immunität durch diese bakteriellen Sequenzen bedingt ist, wie die Produktion von IFN α , IFN β , IL-12 und IL18, die bekanntlich immun-modulierende und antivirale Funktionen induziert. Dies wird durch das Vorliegen von TAA- (Tabelle 29) und CAF- (Tabelle 30) antiviralen Aktivitäten bei fehlender Anti-Tat-spezifischer, humoraler und zellulärer Immunität in diesem Makaken deutlich nahegelegt. Tatsächlich messen diese Assays auch nicht-antigenspezifische antivirale Aktivitäten. Der naive Affe M13, inokuliert mit einer 3,5-mal niedrigeren Virusdosis als sie dem Makaken M12 injiziert wurde, erwies sich als infiziert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die 10 MID₅₀-Anregungsdosis, mit welcher der Affe M12 inokuliert wurde, infektiös war (Tabelle 33). Auf Grundlage dieses Ergebnisses plant die Erfinderin die Verwendung des pCV0-Vektors oder von Teilen davon als Adjuvans.

TABELLE 33

Analyse der virologischen Parameter

Affe	Tage nach Anregung mit SHIV89.6P-Virus											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g) ^b	Cytomegalie- Virämie ^c	Anti- SIV IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g)	Cytomegalie- Virämie	Anti- SIV IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (Kopien/ μ g)	Cytomegalie- Virämie	Anti- SIV IgG
M9	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M10	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M11	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	Neg
M12	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

^{a,b,c,d}Die Assays wurden wie in Tabelle 17 beschrieben durchgeführt. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i. m. injiziert. Der Affe M13 war ein naives Tier, das mit 2,85 MID₅₀ SHIV89.6P infiziert war. ^eStatt einer Cytomegalie-Virämie wurde eine virale Isolierung durchgeführt, deren Ergebnis positiv war.

^fDie DNA PCR war nicht quantitativ und hatte ein positives Ergebnis.

[0185] Eine FACS-Analyse der CD4- und CD8-Subsets (Tabelle 34) bestätigte die virologischen Daten.

[0186] Tatsächlich wurde ein signifikanter Rückgang des Prozentsatzes und der absoluten Anzahl der CD4-Lymphocyten an den Tagen 15 und 60 nach Anregung lediglich beim naiven Affen M13 beobachtet, der sich als infiziert erwies, wie das positive Ergebnis der Plasmaantigenämie, der proviralen DNA und der Virusisolierung zeigt (Tabelle 33).

TABELLE 34
FACS-Analyse der CD4- und CD8-Lymphocyten

Affe	Tage nach Anregung mit SHIV89.6P											
	0			15			30			60		
	(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)			(Zellen/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
M9	21,5 (1500)	37,6 (2630)	0,57	ND	ND	ND	26,4 (1340)	51,6 (2610)	0,51	30,6 (2000)	45,5 (2980)	0,67
M10	39,5 (1050)	36,3 (960)	1,1	ND	ND	ND	34,8 (1730)	41,8 (2080)	0,83	31,6 (3760)	52,2 (6200)	0,61
M11	35,8 (1080)	37,7 (1140)	0,95	ND	ND	ND	28,7 (1330)	36,7 (1710)	0,78	24,5 (890)	48,7 (1770)	0,5
M12	30,9 (1860)	46 (2760)	0,67	ND	ND	ND	26,7 (1300)	49,6 (2420)	0,54	23,7 (2620)	52,1 (5760)	0,45
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

^aDer Assay wurde wie in Tabelle 18 beschrieben durchgeführt. Den Makaken wurde 1 mg pCVTat (M9-M11) oder pCV0 (M12, Kontrolle) i.m. injiziert. Der Affe M13 war ein naives Tier, das mit 2,85 MID₅₀ SHIV89.6P infiziert war.

[0187] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Impfung mit dem pCVTat-Plasmid gut toleriert wurde und nicht-toxisch war, und bestätigen die Ergebnisse bezüglich Sicherheit und Verträglichkeit der DNA-Impfung, die in der ersten Pilotstudie erhalten wurden. Zudem liefern diese Daten den Nachweis, dass das pCVTat-DNA-Plasmid eine spezifische humorale (wenn auch schwächere, als die durch das Tat-Protein induzierte) und zelluläre Immunantwort mit antiviralen Effekten induziert, die zum Teil durch bestimmte, im pCV0-Vektor vorhandene DNA-Sequenzen bedingt sein kann, die als Adjuvanzen fungieren könnten.

[0188] Es werden Immunisierungsprotokolle evaluiert, die Kombinationen der für andere HIV-1- und Cytokine kodierenden DNA enthalten, wie in Beispiel 3 beschrieben. In diesen Experimenten soll SHIV, enthaltend die tat-, rev- und nef-Gene von HIV, verwendet werden (Ref. 146, 85, 142, 65, 94, 129).

[0189] Die pCV0- und pCVTat-Plasmide werden in die Tiere unter Verwendung anderer Zuführungssysteme inokuliert, welche die Immunisierungswirksamkeit verbessern können, wie Liposome, Nanopartikel, Erythrozyten, Zuführung mittels Genpistole, oder Tat-DNA wird unter Verwendung von Herpesvektoren zugeführt, wie in den vorausschauenden Beispielen 9 und 10 beschrieben.

Beispiel 6: Therapeutischer Impfstoff

[0190] Ein Impfprotokoll, das sowohl auf Tat-Protein als auch auf Tat-DNA beruht, wurde erstellt, um die Sicherheit und Toxizität eines Anti-Tat-Impfstoffs bei bereits infizierten Individuen zu evaluieren.

[0191] Das Experiment wurde an Affen durchgeführt, die mit niedriger werdenden Dosen von SHIV89.6P und mit der Immunschwächeerkrankung (AIDS) infiziert wurden. Das zur Infektion verwendete virale Ausgangsmaterial wurde aus Milz und Lymphknoten eines 14 Tage zuvor infizierten Cynomolgusaffen erhalten. Lymphocyten, gereinigt durch mechanische Auftrennung, wurden in zwei Aliquots (jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) aufgeteilt. Aus einem Aliquot wurden mittels immunmagnetischer Kügelchen (Dyna, Norwegen) CD8+ T-Zellen depletiert. Beide Kulturen wurden drei Tage mit PHA ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und in der Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Gegenwart von 50 U/ml IL-2 angeimpft. Die virale Replikation wurde durch das Vorliegen reverser Transkriptase (RT) im nach drei Tagen geernteten Kulturmedium detektiert. Vor dem Testen wurde der Überstand geklärt und bei 100.000 UpM 11 Minuten bei $+4^\circ\text{C}$ ultrazentrifugiert (Beckman TL-100-Ultrazentrifuge) und das Pellet lysiert. Dreißig μl der Suspension wurden zu dem Reaktionsgemisch (IRIS HCl 1M, pH 8; MgCl_2 , 0,5 M; KCl, 1M; Poly A 1 mg/ml; Oligo-dT 12-18 100 $\mu\text{g/ml}$; DTT 0,02 M; 1,2 $^3\text{[H]}$ -Methylthymidintriphosphat 1 mCi/ml) gegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μl 0,1 M Na-Pyrophosphat, pH5, und 600 μl 20%iger Trichloressigsäure (TCA) beendet, und die Probe wurde auf einen 0,45 μm -Filter (Millipore) getupft und dann mit einem β -Zähler nach Zugabe von 5 ml eines Szintillationscocktails (Filter Count, Packard) gelesen.

[0192] Kulturmedien mit mehr als 20.000 cpm wurden zentrifugiert und mit 10% menschlichem Serum AB ergänzt. Das Virus wurde durch Ultrazentrifugation bei 30.000 UpM (90 Minuten bei 4°C) konzentriert, in RPMI 1640, enthaltend 10% menschliches Serum (AB-Gruppe), resuspendiert und dann in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Das virale Ausgangsmaterial wurde in vitro auf den menschlichen Zelllinien CEMx174 und C8166 (3×10^3 TCID₅₀/Zelle) und in vivo auf Cynomolgus-Affen ($3,17 \geq 10^{5,69}$ MID₅₀/ml) titriert.

[0193] Ein erstes Pilotexperiment wurde an 7 Affen durchgeführt, die mit wie oben hergestelltem SHIV89.6P i. v. infiziert wurden. Jeder Affe erhielt 1 ml SHIV, verdünnt in Kochsalzpuffer, ergänzt mit 2% menschlichem Serum (AB, Rh-), gemäß folgendem Protokoll: Ein Affe (IM1) wurde mit 1:500 viraler Verdünnung inokuliert; zwei Affen (IM2, IM3) erhielten die Verdünnung 1:5.000; zwei Affen (IM4, IM5) wurden mit 1:50.000 inokuliert; der Affe IM6 erhielt die Verdünnung 1:500.000; der letzte Affe (IM7) erhielt die Verdünnung 1:5.000.000. Jedem Affen wurde am Tag 7 vor der Infektion mit SHIV zur Bestimmung der Grundparameter Blut entnommen. Serum und Plasmaproben wurden bei -20°C oder -80°C eingefroren und dann dazu verwendet, das Proteininokulum zu resuspendieren. Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Affen mit SHIV89.6P inokuliert. Die Affen wurden täglich überprüft. Zudem wurde ihnen am Tag 0 und nach 2 und 4 Wochen Blut entnommen und wurden 10 ml Blut für hämatochemische Bestimmungen (chemisch-klinische Analyse, Elektrolyten, weiße Zellen und Plättchenzählungen, Hämoglobin) und virologische und immunologische Analyse (d. h. Plasma p27 Ag-Bestimmung und virale Last in Plasma und Zellen) verwendet. In Woche 4 nach der Infektion waren 6 Affen (IM1-6) infiziert. Der Affe IM7, der die geringste virale Verdünnung erhielt (1:5.000.000) war SHIV-negativ (Tabelle 35).

TABELLE 35

Detektion des Vorliegens von SHIV89.6P in Affen, infiziert mit viralen Reihenverdünnungen

Affe	SHIV 89.6P-Verdünnung	Wochen nach Infektion					
		0		2		4	
		Virusisolierung ^a	p27 (pg/ml) ^b	Virusisolierung ^a	p27 (pg/ml) ^b	Virusisolierung ^a	p27 (pg/ml) ^b
IM1	1:500	ND	ND	+	> 450	+	47
IM2	1:5.000	ND	ND	+	> 450	+	161,8
IM3	1:5.000	ND	ND	+	> 450	+	6,67
IM4	1:50.000	ND	ND	-	< 20	+	> 450
IM5	1:50.000	ND	ND	-	> 450	+	166,7
IM6	1:500.000	ND	ND	-	> 450	+	0
IM7	1:5.000.000	ND	ND	-	0	-	0

^aVirusisolierung und ^bPlasma p27 Ag (pg/ml) wurden wie in der Erklärung zu Tabelle 17 beschrieben durchgeführt. Die Affen wurden i. v. mit Reihenverdünnungen des Virusausgangsmaterials inokuliert, wie im Text beschrieben.

[0194] 7 Wochen nach der Infektion wurden alle Tiere, die ernste Immunschwächesymptome zeigten, sowohl mit dem Tat-Protein als auch mit der DNA des Plasmids pCVTat gemäß folgendem Protokoll geimpft. Die Affen IM1, IM3, IM5 und IM6 erhielten das Tat-Protein (20 g), gelöst in 250 µl PBS-A, ergänzt mit 0,1% BSA und 20% autologem Plasma und dann zu 250 µl Alaun-Adjuvans gegeben. Das Proteininokulum wurde subkutan an einer einzigen Stelle am oberen Rücken des Affen durchgeführt, wobei das Plasmid pCVTat (1 mg), resuspendiert in 1 ml PBS-A, an einer anderen Stelle i.m. in den Rücken injiziert wurde. Den Affen IM2 und IM4 (Kontrollen) wurden 250 µl Alaun und 250 µl PBS-A, 0,1% BSA 20% autologes Plasma, s.c. in eine einzige Stelle am oberen Rücken injiziert, und pCV-0 (1 mg), resuspendiert in 1 ml PBS-A, i. m. in eine einzige Stelle im oberen Rücken injiziert, die sich von der vorhergehenden unterschied. Der uninfizierte Affe IM7 wurde nicht geimpft. Das Impfschema bestand aus einem Zeitpunkt 0, entsprechend 7 Wochen nach der SHIV-Infektion, und 1, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 17, 18 Wochen danach. Um die Wirkungen dieser Impfung auf die Progression der Erkrankung zu evaluieren, wurde jeder Makake täglich auf das Vorliegen oder auf Anzeichen der Erkrankung untersucht, und zum Zeitpunkt 0 sowie nach 3, 8, 12, 16 und 21 Wochen wurden 10 ml Blut für Labortests (chemisch-klinische Analyse, Elektrolyte, weiße Zellen und Plättchenzählungen, Hämoglobin), zur Evaluation des immunologischen Status (Vorliegen von spezifischen Immunglobulinen, Bestimmung von Th1- und Th2-Cytokinen, Chemokinproduktion), zur Charakterisierung von Lymphocyten mittels FACS-Analyse (CD4, CD8, CD28, CD40, CD86, CD20, CD2, CD26 und CD20), und schließlich zur Evaluation virologischer Parameter (provirale DNA-Detektion durch semi-quantitative PCR, Plasmaviruslast durch kompetitive RT-PCR, Plasma p27 Gag-Antigen mittels ELISA und Vorliegen von Anti-SHIV Ab, wie zuvor beschrieben) entnommen. Andere Boosts sollen auf Basis der immunologischen, virologischen und klinischen Ergebnisse durchgeführt werden.

[0195] Nach dem letzten Inokulum soll eine Überprüfung monatlich und bei Auftreten klinischer Modifikationen durchgeführt werden. PBMC, Seren, Plasma und Urinproben sollen zu jedem Zeitpunkt für zukünftige Tests eingefroren werden, wie zuvor beschrieben.

[0196] Nun werden die bereits verfügbaren Ergebnisse dieses Experimentes beschrieben, die in Woche 8 nach Immunisierung erhalten wurden. Sowohl in den geimpften, asymptomatischen Affen als auch in den Kontrollaffen wurden keinerlei Anzeichen einer Entzündung und Neoangiogenese an den Inokulationsstellen oder allgemeine Erkrankungssymptome beobachtet. In den bereits symptomatischen Affen waren keine Modifikationen des klinischen Status sichtbar. Zudem wurde keine Aktivierung der viralen Replikation detektiert. Zusammen genommen, deuten diese Ergebnisse auf das Fehlen von Toxizität oder erhöhter viraler Replikation in den mit einem (einer) biologisch aktiven Tat-Protein oder -DNA geimpften Affen hin (Tabelle 36).

TABELLE 36

Analyse virologischer Parameter

Affe	Wochen ab Beginn der Impfung					
	0		3		8	
	p27 (pg/ml)	DNA PCR Kopien/ μ g	p27 (pg/ml)	DNA PCR Kopien/ μ g	p27 (pg/ml)	DNA PCR Kopien/ μ g
IM1	12,3	68	17,3	52	141	41
IM3	0	61	0	48	0	71
IM5	97,1	20	21,7	15	23,6	95
IM6	0	43	0	55	0	24
IM2	21,2	ND	36,6	53	27,4	78
IM4	81	195	22	288	15,4	135
IM7	ND	ND	ND	ND	0	> 1

[0197] Die Tests wurden wie in Tabelle 17 beschrieben durchgeführt. Den Affen IM1, IM3, IM5 und IM6 wurden Tat-Protein (20 μ g) und Alaun-Adjuvans s. c. und pCVTat (1 mg) i. m. injiziert. Den Affen IM2 und IM4 (infizierte Kontrollen) wurden Alaun-Adjuvans s. c. und pCV0 (1 mg) i. m. injiziert. IM7 war ein nicht-infizierter, naiver Affe.

[0198] FACS-Analysen zeigen, dass keine Modifikationen der CD4+- und CD8+-T-Lymphocyten nach Impfung zu beobachten waren (Tabelle 37).

TABELLE 37
FACS-Analyse der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphocyten

Affe	Zeitpunkt 0		Wochen ab Beginn der Impfung												
	%		0				3				8				
	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8
IM1	25,39 (1264)	36,8 (1831)	0,69	3,3 (101)	64,16 (1963)	0,05	2,32 (52)	63,34 (1431)	0,04	3,41 (96)	55,41 (1559)	0,06			
IM3	19,26 (869)	26,45 (1193)	0,73	2,84 (74)	58,22 (1526)	0,05	3,21 (92)	58,16 (1663)	0,05	3,18 (91)	50,12 (1434)	0,06			
IM5	24,75 (580)	58,04 (1361)	0,42	2,28 (38)	57,3 (946)	0,04	2,89 (48)	55,6 (917)	0,05	2,15 (60)	54,3 (1527)	0,04			
IM6	40,46 (2590)	39,74 (2544)	1,01	3,12 (111)	62,3 (2225)	0,05	2,75 (138)	65,40 (3290)	0,04	2,3 (73)	52,18 (1659)	0,04			
IM2	42 (1787)	34,7 (1476)	1,21	2,41 (68)	58,12 (1632)	0,03	2,7 (121)	57,6 (2580)	0,05	1,89 (66)	50,6 (1763)	0,04			
IM4	30,72 (1589)	27,76 (1680)	1,10	2,12 (113)	61,13 (3248)	0,03	1,92 (90)	60,3 (2828)	0,03	3,12 (164)	53,12 (2790)	0,06			
IM7	17,02 (871)	55,8 (2857)	0,30	ND	ND	ND	20,26 (770)	51,40 (1957)	0,39	24,1 (868)	50,43 (1842)	0,48			

Die FACS-Analyse wurde wie in der Erklärung zu Tabelle 18 beschrieben durchgeführt. Den Affen IM1, IM3, IM5 und IM6 wurden Tat-Protein (20 µg) und Alaun-Adjuvans s.c. und pCVTat (1 mg) i.m. injiziert. Den Affen IM2 und IM4 (infizierte Kontrollen) wurden Alaun-Adjuvans s.c. und pCV0 (1 mg) i.m. injiziert. IM7 war ein nicht-infizierter, naiver Affe.

[0199] Diese Daten bestätigen, dass sowohl das Tat-Protein als auch das pCVTat-Plasmid bei den verwendeten Dosierungen und Inokulationswegen gut toleriert wurden und keinen toxischen Effekt in den geimpften Affen hatten, und zudem erhöhten sie weder die virale Replikation noch die CD4 T-Zellenverringering in infizierten Tieren.

Beispiel 7. Co-Stimulation von gereinigten CD4+-Lymphocyten aus SIV-infizierten Affen mit Anti-CD3/28-beschichteten Kügelchen führt zu einer logarithmischen Expansion der Zellzahl ohne signifikante virale Replikation und Transmission

[0200] Aus mononukleären Peripherblutzellen wurde die CD8+-Zellpopulation unter Verwendung von immunmagnetischen Anti-CD8-Kügelchen (Dyna, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) depletiert. Der Reinigungsgrad wurde mittels FACS-Analyse evaluiert und als akzeptabel betrachtet, wenn er höher als 95% war. Die CD8-depletierten Zellen (als CD8-PBMC bezeichnet) wurden gezüchtet in Gegenwart von PHA (2 µg/ml) und IL-2 (40 U/ml) oder immunmagnetischen Kügelchen, die zuvor mit zwei monoklonalen Antikörpern gegen die Antigene CD3 (Klon FN18, BioSource) und CD28 (Klon 9.3) beschichtet worden waren (Anti-CD3/28-Kügelchen). Um die Bindung der Anti-CD3/28-Kügelchen mit Zielzellen zu verbessern, wurde die Inkubation auf einer Drehscheibenanordnung durchgeführt. Dann wurden die gebundenen Zellen (als CD8-CD3+CD28+ bezeichnet) mit einem Magneten selektiert und in Kultur angeimpft. Dreimal pro Woche wurden die Zellkonzentrationen auf den Anfangsspiegel eingestellt und IL-2 zugegeben, wo dies indiziert war; zudem legen Ergebnisse hinsichtlich der mit Anti-CD3/28-Kügelchen stimulierten Zellen nahe, dass das Dauerstimulationsregime, gekoppelt mit einer ständigen Kontrolle des Verhältnisses Kügelchen:Zelle, welches zu jedem Zeitpunkt eingestellt wird, hochwirksam bei der Induktion der proliferativen Antwort ist. Unsere früheren Studien haben gezeigt, dass in Abwesenheit von exogenem IL-2 die CD8-CD3+CD28+-Zellpopulation besser proliferiert als mit Anti-CD3/28-Kügelchen stimulierte CD8-PBMC. Darüber hinaus erhöht die Zugabe von exogenem IL-2 (40 U/ml, dreimal pro Woche) die Proliferationskinetik signifikant, sowohl bezüglich der Zellenzahl als auch der Wirkungsdauer ([Fig. 14](#)).

[0201] Um die antivirale Aktivität dieser Stimulation zu evaluieren, wurden gereinigte CD8-CD3+CD28+-Zellen von 4 nicht-infizierten Affen am Tag 0 mit 0,1 M.O.I. von SIV infiziert und dann unter kontinuierlicher Stimulation kultiviert. CD8-PBMC, stimuliert mit PHA und IL-2, waren die Kontrolle des Experimentes. Die virale Infektion wurde durch Detektion von p27 Gag-Antigen im Kulturüberstand mittels eines handelsüblichen ELISA (Coulter, Hialeah, FL) verfolgt. Die p27 Gag-Antigenspiegel (ng/ml) wurden an den Tagen 6 und 12 nach der Infektion gemessen. Wie in [Fig. 15](#) gezeigt, gibt es zwischen den beiden Stimulationsregimes einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Infektion. Tatsächlich war am Tag 6 nach der Infektion das p27-Antigen in den CD3/28 Kügelchen-stimulierten Kulturen 40% bis 87% geringer als in mit PHA plus IL-2 stimulierten Kulturen, und am Tag 12 war dieser Unterschied in 2 von 4 Affen noch stärker. Dies legt eine Verminderung der Anfälligkeit für eine virale Infektion nahe. In nur einem Fall (MK 9401) beobachteten wir eine Virusausbreitung bei beiden Stimulationsregimes. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass *Macaca fascicularis* ein gutes Modell für die ex vivo-Expansion von Lymphocyten-Subpopulationen durch Anti-CD3/28 Kügelchen-Co-Stimulation ohne virale Replikation ist. Dies stellt das Grundprinzip für den therapeutischen Impfstoff dar, den wir vorschlagen, ausgehend von der Expansion und Reinfusion autologer, antiviraler spezifischer Lymphocyten in HIV-infizierten Individuen.

Beispiel 8. Verwendung dendritischer Zellen zur Impfung (nicht beansprucht)

[0202] Die dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen sind in geringerem Maße in der Lage, wirksam Antigene gegen die T-Lymphocyten zu präsentieren, und induzieren in diesem Zell-Subset eine Proliferation oder einen Erwerb spezifischer cytotoxischer Aktivitäten. Diese Zellen werden als „Antigen-präsentierende Zellen“ (APCs) bezeichnet und können die Immunantwort starten. Somit können DC bei ex vivo-Immunisierungsprotokollen eingesetzt werden. Daher wurden DC-Vorläufer aus dem peripheren Blut von *Macaca fascicularis* durch in vitro-Kultivierung adhärenter Zellen nach sieben Tagen GM-CSF- und IL-2-Stimulation isoliert. Alternativ wurden CD34+-Zellen mit immunmagnetischen Kügelchen gereinigt und dann 14 Tage in vitro mit GM-CSF und TNF-α kultiviert. Um zu bestätigen, dass DC isoliert wurden, führte man eine morphologische Analyse und Phänotyp-Charakterisierung (FACS-Analyse und Immunhistochemie) durch. Die Funktionsanalyse beruhte auf der einzigartigen Fähigkeit von DC, die Proliferation allogener Lymphocyten zu induzieren.

[0203] Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen voll und ganz die Wirksamkeit der Reinigung und der funktionalen Charakterisierung von DC. Im Einzelnen wurden, um DC-Vorläufer zu isolieren, PBMCs, erhalten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, erneut auf einem diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (50% und 42,5%) stratifiziert. Die Zellfraktion, die nach 30-minütiger Zentrifugation bei 500 g zwischen zwei Gradienten vorlag,

bestand hauptsächlich aus Monocyten (wie durch FACS-Analyse bestätigt, Daten nicht gezeigt). Diese Zellen wurden bei 4°C gehalten, um eine Zelladhäsion an die Kunststoffröhrchen zu vermeiden, wurden dann gesammelt, gewaschen, gezählt und bei 37°C in Kultur angeimpft. Am Tag danach wurden nicht-adhärenente Zellen mit 4 sanften Waschungen gewaschen. Um eine Differenzierung zu DC zu induzieren, wurde zu den adhärenenten Zellen Kompletmedium gegeben, das mit GM-CSF (200 ng/ml, Leucomax, Sandoz, Mailand, Italien) und IL-4 (200 U/ml, Pepro tech, London, England) ergänzt war. Als Kontrolle wurde ein Kompletmedium ohne Cytokine zugegeben, um die normale Differenzierung von Monocyten in der Makrophagenlinie zu induzieren. Zweimal pro Woche wurde die Hälfte des Überstandes durch frisches Medium ersetzt, das mit dem am Tag 0 eingesetzten identisch war. Die Reifung von DC in den mit Cytokinen behandelten Vertiefungen wurde anhand typischer morphologischer Veränderungen, wie Clusterbildung, Adhäsionsverlust und Entwicklung von Ablegerzellen, detektiert. Die ohne Cytokine kultivierten Monocyten-/Makrophagen-adhärenenten Zellen wurden durch EDTA-Behandlung (0,5 mM in PBS-A) abgelöst, zweimal gewaschen, gezählt und bei unterschiedlichen Konzentrationen, abhängig vom durchgeführten Experiment, in frischem Medium resuspendiert.

[0204] Für die allogenen gemischten Leukozytenreaktionen (AMLR) wurden die erhaltenen APCs (DC oder Makrophagen) mit einer festgelegten Menge allogener T-Lymphocyten, gereinigt mittels Ficoll- und Percoll-Gradienten und Adhäsion, getestet und dann eingefroren. Die AMLR wurde in Platten mit 48 Vertiefungen mit $0,5 \times 10^6$ T-Lymphocyten und Reihenverdünnungen von APCs durchgeführt. Am Tag 4 der Kultur wurde eine festgelegte Menge der Zellsuspension in einer Platte mit 96 Vertiefungen dreifach angeimpft. Ein μCi von ^3H -Thymidin wurde in jede Vertiefung gegeben und die Platte dann 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Menge an von den Zellen aufgenommenem ^3H -Thymidin mit einem β -Zähler gemessen und in Counts pro Minute (cpm) ausgedrückt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhaltenen DC potente APC sind, wie sich durch die höhere Induktion der Proliferation in allogenen menschlichen Lymphocyten im Vergleich zur Makrophagenstimulation und durch die Fähigkeit zur Induktion einer T-Lymphocytenproliferation in Affen bei allen verwendeten Konzentrationen zeigt (**Fig. 16B**).

[0205] Zur Verwendung für die Impfung werden DC in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/100 μl in RPMI 1640, ergänzt mit 5% autologem Serum, 10 mM Hepes-Puffer, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 0,5 mg/ml Amphotericin B und 0,03% Glutamin resuspendiert, und dann 2 Stunden bei 37°C in Gegenwart von Tat-Protein oder Tat-Peptiden oder einer Kombination aus Tat, Rev, Nef, Gag und/oder Cytokinen inkubiert. Diese behandelten DC werden dann innerhalb 2-4 Wochen nach der Erstinjektion zweimal oder öfter intravenös inokuliert. Alternativ dazu werden die DC mit tat-Gen-enthaltenden Vektoren alleine oder in Verbindung mit anderen, oben erwähnten Vektoren transduziert und dann intravenös injiziert.

Vorausschauendes Beispiel 9

[0206] Die beschriebenen Immunogene werden dazu eingesetzt werden, eine spezifische Immunantwort auf mukosaler Ebene zu induzieren und/oder zu potenzieren. Einer der Ansätze basiert auf der Verwendung von Bakterien (*S. Gordonii* und *Lactobacillus*) die „manipuliert“ wurden, um die oben erwähnten viralen Antigene zu exprimieren. Diese Bakterien kolonisieren die Mund- und Vaginalschleimhaut von Mäusen und induzieren eine spezifische, sowohl lokale als auch systemische Antikörperantwort gegen heterologe Antigene, die an der Oberfläche von rekombinanten Bakterien exprimiert werden (Ref. 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). Diese Bakterien können als lebende Vektoren für Impfstoffe dienen und diesen Vorteil nutzen, um eine lang anhaltende Stimulation des Immunsystems zu verursachen. Zudem werden wir die Möglichkeit evaluieren, virale Antigene und Moleküle, die an der Immunantwort beteiligt sind, wie die B-Untereinheit des temperaturempfindlichen Toxins von *E. Coli* oder Cytokine, an der bakteriellen Oberfläche zu co-exprimieren. Die Herstellung der rekombinanten Stämme von *S. Gordonii* wird wie zuvor beschrieben durchgeführt werden (Ref. 116), kurz gesagt: (i) chromosomale Integration rekombinanter DNA-Moleküle; (ii) transkriptionale Fusionen mit starken chromosomalen Promotoren; (iii) transkriptionale Fusionen mit dem Gen, das für das Protein M6, ein Oberflächenprotein von *Streptococcus*, kodiert. Die rekombinanten Stämme von *S. Gordonii* werden eingesetzt werden, um die Vaginalschleimhaut der Affen zu kolonisieren. Es wurde gezeigt, dass die rekombinanten Stämme von *S. Gordonii*, welche die V3-Region von gp120 von HIV-1 und das E7-Protein von HPV-16 exprimieren, die Vaginalschleimhaut der Maus nach einem einzigen Inokulum dauerhaft kolonisieren, was eine antigenspezifische Antikörperantwort sowohl lokal als auch systemisch induziert. Die systemische Antwort besteht vorwiegend aus IgG2a-Antikörpern, was eine Antwort vom Th1-Typ nahelegt (Ref. 105, 106). Wir werden menschliche vaginale Stämme von *Lactobacillus* auswählen, die in der Lage sind, die Vaginalschleimhaut der Affen zu kolonisieren. Danach wird ein bereits entwickeltes genetisches System eingesetzt werden, das die Expression heterologer Antigene an der Oberfläche von *Lactobacillus* gestattet (Rush, 1997). Diese Strategie beruht auf: (i) dem Klonieren genetischer Fusionen (emm6/heterologes Gen) in Insertionsvektoren, die Homologien zum konjugativen Transposon Tn916 tragen; (ii) der Transformation der Vektoren in Bakterienstämmen, die als Zwi-

schenwirt dienen (*Bacillus subtilis*); (iii) der konjugativen Mobilisierung der rekombinanten Transposons aus *B. subtilis* zu *Lactobacillus*. Die rekombinanten Stämme von *Lactobacillus* werden zum Kolonisieren der Vaginalschleimhaut der Affen eingesetzt werden.

[0207] Vaginale Proben werden unter Einsatz spezieller absorbierender Filter erhalten werden (Ref. 38, 105, 106). Die Kolonisierung wird durch Plattieren der vaginalen Proben auf selektiven Platten evaluiert werden, und die Expression von HIV-Antigenen in vivo wird mittels Immunfluoreszenz an Vaginalabstrichen überprüft werden (Ref. 105). Mit bereits standardisierten Verfahren (Ref. 38) werden die Vaginalabstriche eingesetzt werden für i) den Papanicolau-Test im Falle einer vaginalen Impfung; ii) das Vorliegen von Impfstoffantigenen in den Zellen; iii) die Phänotypcharakterisierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie-Analyse (CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD20, CD28, CD40, CD25, HLA-DR); iv) die Evaluation der Cytokinproduktion (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-15, semiquantitative RT-PCR), die Bestimmung des Vorliegens von Cytokinen und β -Chemokinen in den mukosalen Fluiden mittels Elisa-Assays; v) die Dosierung der gesamten und der spezifischen Immunglobuline (IgA und IgG) im mukosalen Fluid mittels Elisa [Di Fabio et al., Vaccine 15: 1 (1997)]. Einen Monat nach dem letzten Inokulum des Immunogens werden die Affen intravenös oder auf mukosalem Wege mit dem SHIV 89.6P infiziert werden. Die Nachuntersuchung der Affen wird wie im Beispiel 4 beschrieben durchgeführt werden. Blutproben werden genommen werden, um die routinemäßigen Laboruntersuchungen, die Evaluierung immunologischer Parameter, sowohl humoral als auch zellulär, wie in Beispiel 4 beschrieben durchzuführen. Die Erfinderin geht davon aus, dass dieses Verfahren erfolgreich eingesetzt werden kann, um eine spezifische Immunisierung von Affen auf vaginalem Wege zu induzieren. Alternativ dazu kann die mukosale Immunität durch Verabreichung der Proteinimmunogene, wie oben beschrieben, direkt auf mukosalem Weg in Gegenwart von Adjuvanzen, wie dem thermosensitiven Toxin von *E. Coli* und dem Cholera-toxin, oder unter Verwendung anderer bakterieller und nicht-bakterieller Zuführungssysteme, wie Cytocfectine und Liposome, oder durch Inokulation über andere Wege induziert werden, welche die wirksamste und den besten Schutz bietende Immunantwort induzieren können (Ref. 83, 81, 62).

[0208] Zudem geht die Erfinderin davon aus, dass rekombinante Herpesvektoren, welche die oben beschriebenen viralen Proteine exprimieren, hervorragende Systeme zum Induzieren einer wirksamen mukosalen Immunantwort sein können. Rekombinante virale Vektoren des Herpes Simplex Typ 1-Virus (HSV-1) werden eingesetzt, um virale Proteine zur Induktion einer systemischen Antwort (durch kutane Immunisierung, i. d.) und einer mukosalen Antwort (auf oralem, vaginalem oder nasalem Wege) zu exprimieren. Nicht-pathogene, nicht-replikative Herpes-Vektoren werden eingesetzt (Ref. 99) wegen ihrer Fähigkeit, große exogene Sequenzen zu enthalten, ohne die Wirksamkeit der Infektion zu beeinträchtigen (Ref. 52, 64). Daher werden Vektoren konstruiert, die mehr als ein HIV-Gen (akzessorisch, regulatorisch und strukturell) enthalten. Die mukosale Immunität könnte durch einen Oral-, Vaginal- oder Nasalimpfstoff induziert werden. Die Herpes-Vektoren können in diesen Impfmethode verwendet werden, da HSV-1 direkt auf mukosalem Wege verabreicht werden kann (Ref. 176, 75). Die rekombinanten Viren werden unter Nutzung eines zweistufigen Verfahrens konstruiert, das die Insertion exogener Sequenzen in das virale Genom erleichtert. Der erste Schritt erfordert die Insertion einer Expressionskassette mit einem Reporter-gen (β -Galactosidase, LacZ), kloniert in die Restriktionsstelle PacI, die im HSV-1-Genom nicht vorhanden ist, flankiert von der gewünschten Zielsequenz von HSV-1, unter Anwendung des üblichen Vorgehens für die homologe Rekombination, um das HSV-1-Gen zu unterbrechen. Das rekombinante Virus wird durch Bildung von Plaques mit einem blauen Phänotyp mittels „X-Gal-Färbung“ ausgewählt. Der Verdau der viralen DNA mit Pac1 setzt das Markergen frei und erzeugt zwei große Fragmente viraler DNA, die nicht in der Lage sind, infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Der zweite Schritt besteht aus einer Cotransfektion der viralen DNA, verdaut mit dem gleichen Plasmid, das zum Erzeugen der Deletion verwendet wurde, wobei das Reporter-gen durch das gewünschte Gen substituiert wird. Die rekombinanten Viren werden durch die Auswahl von Plaques mit einem weißen Phänotyp nach „X-Gal-Färbung“ identifiziert. Diese Rekombination führt zur Elimination von Pac1-Stellen, wodurch dieses Verfahren viele Gene an unterschiedlichen Orten des HSV-1-Genoms insertieren kann (Ref. 74). Durch Kreuzen der unterschiedlichen Vektoren, welche die einzelnen Gene enthalten, könnten wir möglicherweise all die verschiedenen genetischen Kombinationen erzeugen. Der Vektor, der alle gewünschten Gene enthält, wird durch Screening mit unterschiedlichen Markern, Phänotypen und selektives Wachstum auf kompetenten Zellen isoliert. Alle Kombinationen werden durch Alternieren von DNA-Transfektionen und viralen Rekombinationen erzeugt werden.

[0209] Vektoren, welche die einzelnen Gene tat, rev, nef oder gag enthalten, werden konstruiert werden, indem als Grundvektor der verwendet wird, der die Mutationen in den Genen 4-/22/27/41 enthält und im Vergleich mit den anderen nicht-replikativen HSV1-Vektoren besser für die niedrige Toxizität und die starke Expression ist. Konstitutive Promotoren werden, wie die von HCMV (Immediate Early Promoter des menschlichen Cytomegalovirus) oder ICP0 lep (Immediate Early Promoter von infiziertem Zellprotein) und die Moloney-Mäuseleukämievirus LTR verwendet werden, um die Expression der oben erwähnten Gene zu induzieren.

Nicht-replikative HSV-1-Vektoren, die HIV-Proteine in unterschiedlichen Kombinationen exprimieren, werden konstruiert werden. Die Produktion dieser Viren, die mehr unterschiedliche Gene enthalten, wird durch genetische Kreuzung der Vektoren, welche die unter dem vorhergehenden Punkt beschriebenen, einzelnen Gene enthalten, erhalten werden. Zweifach-, Dreifach- und Vierfachvektoren werden erzeugt werden. Die Vektoren werden in die Affen i.d. oder auf mucosalem (oralem, vaginalem oder nasalem) Wege inokuliert werden, mit besonderem Augenmerk auf der letztgenannten Art der Verabreichung (Ref. 176, 101, 102). Das Impfschema besteht aus Mehrfach-Inokula zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die im Verhältnis zum Immunogen oder zur Kombination von Immunogenen bestimmt werden müssen. Während der Immunisierung werden die Tiere zur Evaluation hämatochemischer und immunologischer Parameter, wie in Beispiel 4 beschrieben, überwacht werden. Mit bereits standardisierten Methoden werden Vaginalproben erhalten, die wie zuvor in diesem Beispiel beschrieben untersucht werden.

Vorausschauendes Beispiel 10

Zuführungssysteme

[0210] Tat (Protein und/oder DNA) wird alleine oder in Kombination (wie oben beschrieben) unter Verwendung neuer Zuführungssysteme, wie Erythrozyten oder Nanopartikel, inokuliert werden. Das Zuführungssystem unter Verwendung von Erythrozyten basiert auf der Möglichkeit, das Antigen an autologe Erythrozyten gebunden abzugeben. Tatsächlich werden Erythrozyten am Ende ihrer Lebensspanne (beim Menschen etwa 120 Tage) durch die Makrophagen, die bekanntlich die Funktion professioneller Antigen-präsentierender Zellen haben, aus dem Kreislauf entfernt. Diese Eigenschaft lässt sich für Impfstoffstrategien nutzen. Somit werden Antigene an die Erythrozyten mit einer bestimmten Technik gebunden (Ref. 95, 96), welche die Bewahrung der immunogenen Eigenschaften des Antigens erlaubt (Ref: 29, 30). Durch diese Prozedur kann eine Biotinilierung von Erythrozyten ohne signifikante Modifikation ihrer Eigenschaften und Lebensspanne durchgeführt werden (Ref. 95). Eine Phagocytose alter Erythrozyten durch Makrophagenzellen wird eine Immunantwort auslösen. Eine Antikörper-Opsonisierung von Erythrozyten, die das Antigen tragen, unterstützt die Antigenentfernung aus dem Kreislauf. Die Hauptvorteile dieser Methodologie sind: 1) Bedarf an einer geringen Menge des Antigens, um eine humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren, 2) lang andauernde Immunisierung aufgrund der anhaltenden Gegenwart von Antigenen, die von den Erythrozyten an der Peripherie getragen werden, 3) Adjuvansfunktionen, die vom System selbst bereitgestellt werden.

[0211] Tatsächlich wurde in Tierstudien gezeigt, dass die Verabreichung an die Membran autologer Erythrozyten gebundener Antigene eine ähnliche oder stärkere Immunantwort als die Immunantwort induziert, die mit dem gleichen Antigen, verabreicht mit Freund-Adjuvans (Ref. 29), erhalten wird. Diese Eigenschaften sind sehr nützlich zur Entwicklung eines Anti-HIV-Impfstoffs, insbesondere wenn er benötigt wird, um die Immunogenität des Antigens und die Antigenverfügbarkeit zu erhöhen, und wenn eine geringe Anzahl Immunisierungen erforderlich ist. Zudem kann diese Strategie eingesetzt werden, wenn keine Adjuvanzien im Impfprotokoll enthalten sind. Tatsächlich wurde im Mausmodell gezeigt, dass durch autologe Erythrozyten verabreichte Antigene ähnliche oder stärkere Immunantworten induzieren, als sie mit dem gleichen Antigen erhalten werden, wenn es mit Freund-Adjuvans verabreicht wird, das als das stärkste im Handel erhältliche Adjuvans bekannt ist (Ref. 29), obwohl es aufgrund beträchtlicher Nebenwirkungen nicht für menschliche Studien zugelassen ist. Daher wird der Adjuvans-effekt von Erythrozyten, die das Tat-Protein alleine oder in Kombination mit anderen zuvor beschriebenen Immunogenen tragen, in nicht-menschlichen Primaten analysiert werden. Es wird ein Vergleich zwischen diesen Daten und den bei Verabreichung des Tat-Proteins in Gegenwart von Alaun, RIBI oder ISCOM erhaltenen durchgeführt werden.

[0212] Die Verwendung von Nanopartikeln kann eine zusätzliche Zuführungsstrategie darstellen. Funktionale Nanopartikel stellen ein wichtiges System für den Transport und die Freisetzung von Proteinen und DNA dar (Ref. 27, 172). Die Nanosphären sind kolloidale Polymerpartikel unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung mit einem großen Durchmesserbereich von 10 bis 1000 nm. Es ist möglich, unterschiedliche Arten von Substanzen an der Oberfläche oder im Inneren der Nanosphären zu adsorbieren (Oligonukleotide, Arzneimittel, Proteine, Peptide, DNA), die dann zum Cytoplasma oder zum Kern von Zellen verbracht werden, wo sie langsam freigesetzt werden. Zudem muss aufgrund der Charakteristiken von Nanosphären nur eine kleine Menge des Immunogens zugeführt werden. Nanopartikel sind ein gute Zuführungssystem, insbesondere für Moleküle mit geringer Stabilität in der extrazellulären Umgebung, oder wenn die Zuführung gegen eine spezifische Zielzelle gerichtet ist.

[0213] Die Erfinderin geht davon aus, dass Nanosphären verwendet werden können, um die oben beschriebenen viralen Antigene abzugeben. Es ist möglich, drei Arten von Nanosphären herzustellen und zu charak-

terisieren, die für die Zuführung und kontrollierte Freisetzung von DNA (Nanosphären Typ 1 und 2) und Proteinen (Nanosphären Typ 3) vorgesehen sind.

[0214] Für die DNA-Zuführung sind zwei Arten von Nanosphären (Nanosphären Typ 1 und 2) verfügbar. Der erste Typ Nanosphären (Nanosphären Typ 1) weist einen dreischichtigen Aufbau mit einer äußeren Schicht aus Polyoxyethylenglykol (PEG) auf. Jüngste Berichte, die auf Studien von Tarnsystemen beruhen (Ref. 180, 78), zeigen, dass PEG Nanosphären für Kupferzellen unsichtbar macht. Im Gegensatz dazu besteht die weiter innen gelegene Schicht aus Monomeren mit die Oberflächenspannung beeinflussenden Merkmalen, die quaternäre Ammoniumgruppen enthalten, welche die DNA durch einen Ionenaustausch-Mechanismus und einen inneren Kern aus Methylmethacrylat als Monomer reversibel adsorbieren. Diese Nanosphären sind erhältlich durch Polymerisation in Mikroemulsion unter Beteiligung der Polymerisation eines Vinyl- oder Vinylidenmonomers in Gegenwart einer Mischung von die Oberflächenspannung beeinflussenden Reagenzien. Diese Reagenzien sind somit in der Lage, das Monomer zu polymerisieren. Eines davon weist eine quaternäre Ammoniumgruppe auf, die mit Oligonukleotiden interagiert, und das andere hat eine lange PEG-Kette.

[0215] Der zweite Typ eines DNA-Zuführungssystems besteht aus funktionalen Nano- und Mikrosphären (Nanosphären Typ 2) mit Hydrogelmerkmalen. Diese Nanosphären sollten in Gegenwart von DNA hergestellt werden, um diese im Zuführungssystem einzuschließen. Kern-Hülle-Nanosphären werden benötigt, um Proteine zuzuführen (Nanosphären Typ 3). Sie bestehen aus einem inneren Kern aus Polymethylmethacrylat und einer äußeren Hülle aus wasserlöslichem, statistischem Copolymer von Acrylsäure und Methylmethacrylat, das bekanntlich eine hochgradige Affinität gegenüber Proteinen hat (Ref. 79, 80). Dieses Copolymer ist im Handel erhältlich (EUDRAGIT) und wird mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen der beiden Co-Monomere erhalten. Das Herstellungsverfahren, das zur Herstellung dieses zweiten Typs von Nanosphären führt, beinhaltet die Polymerisation in Dispersion. Die Synthese umfasst die Radikalpolymerisation eines Vinyl- oder Vinylidenmonomers in Gegenwart von EUDRAGIT mit sterischen Stabilisierungsfunktionen. Nach der Nanosphären-Keimbildung lagert sich das EUDRAGIT außerhalb der Partikel an. Durch Ändern der Konzentration des Radikalinitiators, des Verhältnisses zwischen dem Monomer und EUDRAGIT sowie der Reaktionszeit, werden somit zahlreiche Nanosphären-Proben mit unterschiedlichen morphologischen und chemischen Merkmalen erhalten.

[0216] Damit kann evaluiert werden, ob die Zuführung von Tat-Protein oder Tat-DNA durch Nanopartikel, alleine oder in Kombination mit den oben erwähnten Immunogenen (Protein oder DNA), eine Immunantwort gegen HIV induziert. Insbesondere werden die humoralen oder zellvermittelten Immunantworten evaluiert und mit denen verglichen werden, die mit den nicht zugeführten Immunogenen im Affenmodell erhalten wurden.

[0217] Die Erfinderin geht davon aus, dass die aus diesen Studien abgeleiteten Informationen für die Entwicklung eines Anti-HIV-Impfstoffes nützlich sein können. Zudem werden die aus diesem Versuchsprotokoll abgeleiteten Informationen auch auf andere Impfstoffstudien, insbesondere auf solche, die sich mit rekombinanten Proteinen oder Peptiden geringer Immunogenität befassen, übertragen werden. Die Möglichkeit, einen Impfstoff zur einmaligen Verabreichung zu entwickeln, wird enorme Vorteile hinsichtlich der Effizienz des Impfstoffes und eine Senkung der Durchführungskosten von Impfstoffprogrammen mit sich bringen.

Literaturstellen

1. Agostini et al., Blood 90: 1115 (1997)
2. Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4838 (1995)
3. Allan et al., Science 230: 813 (1985)
4. Antibodies-A laboratory manual, Hrsg. Hariow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
5. Arya et al., Science 229: 69 (1985)
6. Aryoshi et al., AIDS 9: 555 (1995)
7. Audibert et al., Immunol. Today 14: 281 (1993)
8. Badolato et al., Blood 90: 2804 (1997)
9. Barillari et al., J. Immunol. 149: 3727 (1992)
10. Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7941 (1993)
11. Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149: 3727 (1993)
12. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 160: 27-34 (1993)
13. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 168: 267-273 (1994)
14. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 193: 199-206 (1996)
15. Bohan et al., Gene Expr. 2: 391 (1992)
16. Bourgault et al., J. Virol. 66: 75 (1992)
17. Boyer et al., Nature Med. 3: 526 (1997)

18. Bruisten et al., *J. Infect. Dis.* 166: 620 (1992)
19. Buseyne et al., *J. Virol.* 67: 694 (1993)
20. Butera et al., *J. Virol.* 65: 4645 (1991)
21. Butera et al., *J. Virol.* 68: 2726 (1994)
22. Cafaro et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 7: 204 (1991)
23. Carrol et al, *Science.* 276: 273-276, (1997)
24. Carson et al., *J. Clin. Invest.* 99: 937 (1997)
25. Chang et al., *J. Biomed. Sci.* 2: 189 (1995)
26. Chang et al., *AIDS* 11: 1421 (1997)
27. Chavany et al., *Phar. Res.* 9: 441 (1994)
28. Chef et al., *J. Immunol.* 149: 4060 (1992)
29. Chiarantini et al., *Vaccine* 15: 276 (1997)
30. Chiarantini eat., *Clin. Diag. Lab.Immunol.* 5: 235 (1998)
31. Chirmule et al., *J. Virol.* 69: 492 (1995)
32. Choppin et al., *J. Immunol.* 147: 569 (1991)
33. Corallin et al., *Cancer Res.* 53: 1 (1993)
34. Corallin et al., *Cancer Res*, 53: 5569 (1993)
35. Culman et al., *J. Immunol.* 146: 1560 (1991)
36. Couillin et al., *J. Exp. Med.* 180: 1129 (1994)
37. Danko et al., *Vaccine* 12: 1499 (1994)
38. Di Fabio et al., *Vaccine* 15: 1 (1997)
39. Ensoli et al., *IV International Conference on AIDS, Stockholm*, 1: 241 (1988)
40. Ensoli et al., *Nature* 345: 84 (1990)
41. Ensoli et al., *J. Virol.* 67: 277 (1993)
42. Ensoli et al., *Nature* 371: 674 (1994)
43. Ensoli et al., *AIDS Updates*, Hrsg. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S. A., Lippincott J. B., Philadelphia; 7: 1 (1994)
44. Felber et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1495 (1989)
45. Fine et al., *Ann. Plast. Surg.* 20: 6 (1988)
46. Fiorelli et al., *J. Clin. Invest.* 95: 1723 (1995)
47. Folks et al., *Science* 238: 800 (1987)
48. Franchini et al., *Virology* 155: 593 (1986)
49. Frankel et al., *Cell* 55: 1189 (1988)
50. Fugier-Vivier et al, *J. Exp. Med.* 186: 813 (1997)
51. Gait et al., *Trends Biochem. Sci.* 18: 255 (1993)
52. Glorioso et al., *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 675 (1995)
53. Gobert et al., *Virology* 176: 458 (1990)
54. Goletti et al., *J. Virol.* 69: 2540 (1995)
55. Gorman et al., *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044 (1982)
56. Grabstein et al., *Science* 264: 965 (1994)
57. Grosjean et al, *J. Exp. Med.* 186: 801 (1997)
58. Guy et al., *Nature* 330: 266 (1987)
59. Harrer et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 12: 585 (1996)
60. Harrich et al., *EMBO J.* 16: 6 (1997).
61. Hinkula et al., *J. Virol.* 71: 5528 (1997)
62. Honenbang et al., *Infect. Immun.* 62: 15 (1994)
63. Huang et al., *EMBO J.* 13: 2886 (1994)
64. Huard et al. *Gene Ther.* 2: 385 (1995)
65. Igarashi et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 10: 1021 (1994)
66. Jonuleit et al., *J. Immunol.* 158: 2610 (1997)
67. Jullien et al., *J. Immunol.* 158: 800 (1997)
68. Kanai et al., *J.Immunol.* 157: 3681 (1996)
69. Karlosson et al., *J. Virol.* 71: 4218 (1997)
70. Kashanchi et al., *J. Virol.* 70: 5503 (1996)
71. Kestler et al., *Science* 248: 1109 (1991)
72. Kim et al., *Oncogene* 7: 1525 (1992)
73. Koup et al., *J. Virol.* 68: 4650 (1994)
74. Krisky et al., *Gene Ther.* 4: 1120 (1997)
75. Kuklin et al., *J. Virol.* 240: 245 (1998)
76. Landes, Austin, S.107 (1997)

77. Lanzavecchia, *Science* 260: 937 (1993)
78. Lasic et al., *Chemical Reviews* 95: 2601 (1995)
79. Laus et al., *Polymer* 37: 343 (1996)
80. Laus et al., *Polymers for Adv. Techn.* 7: 548 (1996)
81. Lehnen et al., *Vaccine Research* 1: 319 (1992)
82. Levine et al., *Science*. 272: 1939-1943 (1996)
83. Lewis et al., *Vaccine Press, Hrsg. Robinson, Farrar, Wiblin; Human Press, Totowa, New Jersey* (1996)
84. Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8116 (1997)
85. Li et al., *J. AIDS* 5: 639 (1992)
86. Li et al., *Science* 268: 229 (1995)
87. Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8116 (1997)
88. Lippincott J. B., *Stockholm, Schweden, 31. Mai – 3. Juni* (1997)
89. Littaua et al., *J. Virol.* 65: 40 (1991)
90. Lvgren et al., *Vaccine* 14: 753 (1996)
91. Lu et al., *J. Virol.* 70: 3978 (1996)
92. Lubaki et al., *J. Infect. Dis.* 175: 1360 (1997)
93. Lucey et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 43 (1997)
94. Luciw et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7490 (1995)
95. Magnani et al., *Biotech. Appl. Biochem.* 16: 188 (1992)
96. Magnani et al., *Biotech. Appl. Biochem.* 20: 335 (1994)
97. Malim et al., *Nature* 338: 254 (1989)
98. Mann et al., *EMBO J.* 10: 1733 (1991)
99. Marconi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 93: 11319 (1996)
100. Marcuzzi et al., *J. Virol.* 66: 4228 (1992)
101. McLean et al., *J. Infect. Dis.* 66: 341 (1994)
102. McLean et al., *Vaccine* 14: 987 (1996)
103. Mcfarland et al., *J. Inf. Dis.* 170: 766 (1994)
104. Medagliani et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995)
105. Medagliani et al., *Biotech. Annu. Rev.* 3: 297 (1997)
106. Medagliani et al., *Vaccine* 15: 1330 (1997)
107. Medagliani et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 39: 199 (1998)
108. Meyerhans et al., *Cell* 58: 901 (1989)
109. Morein et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 510: 5109 (1994)
110. *Molecular cloning-A laboratory manual; Hrsg. Maniais T., Fritsch E. F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York* (1992)
111. Myers et al., *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM, S. 1* (1993)
112. Myers et al., *Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH* (1995)
113. Neuvet et al., *J. Virol.* 70: 5572 (1996)
114. Nietfield et al., *J. Immunol.* 154: 2189 (1995)
115. Nixon et al., *Nature* 336: 484 (1988)
116. Oggioni et al., *Vaccine* 13: 775 (1995)
117. Oggioni, et al., *Gene* 169: 85 (1996)
118. O'Hagan et al., *Novel Delivery Systems for Oral Vaccines, Hrsg. O'Hagan, D. T. CRC Press Boca Raton, FL, S. 176* (1994)
119. Parslow, *Human Retroviruses, Ed. B. R. Cullen, IRLpress, Oxford, England, S. 101* (1993)
120. Pilkington et al., *Mol. Immunol.* 33: 439 (1996)
121. Pozzi et al., in „Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization“, Hrsg. Pozzi G. & Wells, J. M.-Landes, Austin, S. 35 (1997)
122. Puri et al., *Cancer Res.*, 52: 3787 (1992)
123. Puri et al., *AIDS Res.* 11: 31 (1995)
124. Quesada-Rolander et al., *ABS 6-S1, 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Schweden, 31. Mai – 3. Juni* (1997)
125. Quinn et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 6 (1997)
126. Ratner et al., *Nature* 313: 277 (1985)
127. Re et al., *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 10: 408 (1995)
128. Reimann et al., *J. Virol.* 70: 3189 (1996)
129. Reimann et al., *J. Virol.* 70: 6922 (1996)
130. Reiss et al., *J. Med Virol.* 30: 163 (1990)

131. Reiss et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5: 621 (1989)
132. Riley et al., *J. Immunol.* 158: 5545-5553, (1997)
133. Rinaldo et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11: 481 (1995)
134. Rinaldo et al., *J. Virol.*, 69: 5838 (1995)
135. Rodman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7719 (1993)
136. Rodman et al., *J. Exp. Med.* 175: 1247 (1992)
137. Rosenberg et al., *Vint. Immunol.* 9 (5): 703 (1997)
138. Rosenthal et al., *Seminars in Immunology* 9: 303 (1997)
139. Rush, et al., in „Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization“, Hrsg. Pozzi G. & Wells, J. M.-Landes, Austin, S.107 (1997)
140. Sadaie et al., *New Biol.* 2: 479 (1990)
141. Saiki et al., *Science* 230: 1350 (1985)
142. Sakuragi et al., *J. Gen. Virol.* 73: 2983 (1992)
143. Salter et al., *Immunogenetics* 21: 235 (1985)
144. Schnorr et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5326 (1997)
145. Sharma et al., *Biochem. Biophys. Res. Co.* 208: 704 (1995)
146. Shibata et al., *J. Virol.* 65: 314 (1991)
147. Sipsas et al., *J. Clin. Invest.* 99: 752 (1997)
148. Sodroski et al., *Science* 227: 171, (1985)
149. Steinaa et al., *Arch. Virol.* 139: 263 (1994)
150. Steinman R. M., *Exp. Hematol.* 24: 859 (1996)
151. Tahtinen et al., *Virology* 187: 156 (1992)
152. *Theoretical Biology and Biophysics*, Los Alamos, NH, (1995)
153. Titti et al., *Cell. Pharmacol. AIDS* 3: 123 (1996)
154. Trinchieri, *Curr. Opin. Hematol.* 4: 59 (1997)
155. van Baalen et al., *J.Gen. Virol.*, 77: 1659 (1996)
156. van Baalen et al., *J.Gen. Virol.* 78: 1913 (1997)
157. Vellutini et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11: 21 (1995)
158. Venet et al., *J. Immunol.* 148: 2899 (1992)
159. Viscidi et al., *Science* 246: 1606 (1989)
160. Vogel et al., *Nature* 335: 601 (1988)
161. Voss et al., *Virology* 208: 770 (1995)
162. Wain-Hobson, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 878 (1993)
163. Westendorp et al., *J. Virol.* 68: 4177 (1994)
164. Westendorp et al., *Nature* 375: 497 (1995)
165. Wolf et al., *J.Immunol.* 146: 3074 (1991)
166. Yang et al., *J. Virol.* 70: 4576 (1996)
167. Yang et al., *J. Virol.* 70: 5799 (1996)
168. Yasutomi et al., *J. Virol.* 70: 678 (1996)
169. Zauli et al., *Blood* 86: 3823 (1995)
170. Zauli et al., *Blood* 80: 3036 (1996)
171. Zauli et al., *J. Immunol.* 157: 2216 (1996)
172. Zobel et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 483 (1997)
173. Gibellini et al., *Blood* 89: 1654 (1997)
174. Bauer et al., *J. Infect. Dis.* 165: 419 (1992)
175. Klein et al., *J. Exp. Med.* 181: 1365 (1995)
176. Bowen et al., *Res. Virol.* 143: 269 (1992)
177. Zamarchi et al., *AIDS Res. Human Retrov.* 9: 1139 (1993)
178. Fiore et al., *AIDS* 5: 1034 (19912)
179. Roman et al., *Nature Med.* 3: 849 (1997)
180. Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1237: 99 (1995)

SEQUENCE LISTING

<110> ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

<120> HIV-1 Tat, or derivatives thereof, alone or in combination, for prophylactic and therapeutic vaccination against AIDS, tumors and related syndromes

<130> 1354PTWO

<140> RM97A000743

<141> 1997-12-01

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 261

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 1

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60
gcttgacca attgctattg taaaaagtgt gctttcatt gccaaagttg ttcataaca 120
aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctctcaa 180
ggcagtcaga ctcacaaagt tctctatca aagcagccca cctccaatc ccgaggggac 240
ccgacaggcc cgaaggaata g 261

<210> 2

<211> 83

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 2

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser Gln
1 5 10 15

Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe His
20 25 30

Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys
35 40 45

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val
50 55 60

Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly
65 70 75 80

Pro Lys Glu

<210> 3

<211> 260

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 3

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60
gcggtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagttgt ttcataaca 120

aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca ggcacgaaga cctcctcaag 180
gcagtcagac tcatcaagtt tctctatcaa agcagccac ctccaatcc cgaggggacc 240
cgacaggccc gaaggaatag 260

<210> 4
<211> 261
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 4
atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcadc caggaagtca gcctaaaact 60
gcttgacca attgctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaagttg ttcataaca 120
aacgccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
ggcagtcaga ctcacaaagt ttctctatca aagcagccca cctccaatc ccgaggggac 240
ccgacaggcc cgaaggaata g 261

<210> 5
<211> 252
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 5
atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcadc caggaagtca gcctaaaact 60
gcttgacca attgctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaagttg ttcataaca 120
aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
ggcagtcaga ctcacaaagt ttctctatca aagcagccca cctccaatc cccgacaggc 240
ccgaaggaat ag 252

<210> 6
<211> 252
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 6
atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcadc caggaagtca gcctaaaact 60
gcttgacca attgctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaagttg ttcataaca 120
aacgccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
ggcagtcaga ctcacaaagt ttctctatca aagcagccca cctccaatc cccgacaggc 240
ccgaaggaat ag 252

<210> 7
<211> 86
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 7
Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu

85

<210> 8
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 8
 Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu
 85

<210> 9
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 9
 Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
 65 70 75 80

Pro Lys Glu

<210> 10
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 10
 Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
 65 70 75 80

Pro Lys Glu

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 11
 Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 12
 Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe His Cys Gln Val
 1 5 10 15

Cys Phe Ile Thr
 20

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 13
 Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 14
 Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 15
 Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 16
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 17
 Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly Pro Lys Glu
 1 5 10

<210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 18
 atggcaggaa gaagc 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 19
 ctattcttta gtcc 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 20
 atgggtggca agtgg 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 21
 tcagcagtc ttgta 15

<210> 22
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 22
 atgggtgcga gagcg 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 23
 ttattgtgac gaggg 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 24
 atgtggcccc ctggg 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 25
 rtaggaagca tcag 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 26
 atgagaattt cgaaa 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 27
 tcaagaagtg ttgat 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 28
 atggagccag tagat 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Aids-associated retrovirus

<400> 29

ctattccttc gggcc

15

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 30

ggcccgaagg aaatggcagg aagaagc

27

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 31

ggcccgaagg aaatgggtgg caagtgg

27

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 32

ggcccgaagg aaatgggtgc gagagcg

27

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 33

ggcccgaagg aaatgtggcc ccctggg

27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 34

ggcccgaagg aaatgagaat ttcgaaa

27

Patentansprüche

1. Impfstoff zur Verwendung als Arzneimittel in einem Menschen, wobei besagter Impfstoff ein isoliertes Tat-Protein umfasst, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in seiner nicht-oxidierten Form vorliegt.
2. Impfstoff nach Anspruch 1, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein ein Tat-Protein vom Wild-Typ ist.
3. Impfstoff nach Anspruch 2, wobei besagtes Tat-Protein vom Wild-Typ eine Aminosäuresequenz umfasst, welche durch die Nukleotidsequenz der Sequenz ID 1 kodiert ist.
4. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-3, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in Kombination mit einem HIV-Antigen vorliegt, welches Nef, Rev, Gag oder ein Teil davon ist.
5. Impfstoff nach Anspruch 4, wobei besagte Kombination ein Tat/Nef-, ein Tat/Rev- oder ein Tat/Gag-Fusionsprotein ist.
6. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-5, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in Kombination mit einem immun-modulierenden Cytokin vorliegt.
7. Impfstoff nach Anspruch 6, wobei besagtes immun-modulierendes Cytokin IL-12 oder IL-15 ist.

8. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-7, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein mit einem T-Hilfsepitop konjugiert ist.
9. Impfstoff nach Anspruch 8, wobei besagtes T-Hilfsepitop ein T-Hilfsepitop des Tetanus-Toxoidepitops ist.
10. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-9, wobei besagter Impfstoff formuliert ist zur Zuführung zum Menschen durch mukosale, nasale, orale, vaginale, rektale, intramuskuläre, subkutane, intradermale, systemische oder lokale Verabreichung.
11. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-10, wobei besagter Mensch mit HIV infiziert ist.
12. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-11, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein gereinigt wird.
13. Impfstoff nach Anspruch 12, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein nach einem Verfahren gereinigt wird, welches die Durchführung der Heparin-Affinitätschromatographie vorsieht.
14. Impfstoff nach Anspruch 13, wobei besagter Durchführungsschritt gefolgt wird von den Schritten (a) Lyophilisieren des besagten isolierten Tat-Proteins, und (b) Resuspendieren des lyophilisierten Tat-Proteins in einem entgastem Puffer.
15. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-14, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in einer Menge von ungefähr 10 ng/ml bis ungefähr 1 µg/ml anwesend ist.
16. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-15, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in einer lyophilisierten Form vorliegt.
17. Impfstoff nach Anspruch 13, wobei besagter Durchführungsschritt gefolgt wird von den Schritten (a) Lyophilisieren besagten isolierten Tat-Proteins, und (b) Resuspendieren des lyophilisierten Tat-Proteins in einem biologisch verträglichen Fluid.
18. Impfstoff nach Anspruch 17, wobei das biologisch verträgliche Fluid ein Serum, Plasma oder eine Fraktion davon ist.
19. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-18, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein in einem biologisch verträglichen Fluid transportiert wird.
20. Impfstoff nach Anspruch 19, wobei besagtes biologisch verträgliches Fluid Serum, Plasma oder eine Fraktion davon ist.
21. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-20, welches weiter einen Hilfsstoff umfasst.
22. Impfstoff nach Anspruch 21, wobei besagter Hilfsstoff Alum, RIBI, ISCOM oder eine Mischung davon ist.
23. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-22, welcher weiter einen Inhibitor der viralen Replikation umfasst.
24. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-23, welcher weiter einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipienten umfasst.
25. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-24, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein für die Verabreichung durch ein Zuführungssystem formuliert ist.
26. Impfstoff nach Anspruch 25, wobei besagtes Zuführungssystem ein Erythrozyt, ein Nanopartikel oder ein Bakterium ist.
27. Impfstoff nach Anspruch 26, wobei besagtes Zuführungssystem ein Bakterium ist, welches *Streptococcus gordonii* oder *Lactobacillus* ist.
28. Impfstoff nach Anspruch 26, wobei besagtes Zuführungssystem ein Bakterium ist, welches so modifi-

ziert ist, dass es ein virales Antigen exprimiert.

29. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-28, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein für die intradermale Verabreichung mit einer Menge von 1-6 µg ohne Hilfsmittel dient.

30. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-29, wobei besagtes isoliertes Tat-Protein der Schleimhaut zugeführt wird.

31. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-30 für die Verwendung bei der Induktion einer spezifischen Immunreaktion im Menschen.

32. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-30 für die Verwendung bei der Immunisierung der peripheren Blutzellen aus einer Person, welche mit HIV infiziert ist, erweitert durch Co-Stimulation mit magnetischen Kügelchen, welche mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet sind.

33. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1-30 für die Verwendung in der therapeutischen und/oder prophylaktischen Behandlung eines Tumors, der mit einer HIV-Infektion verbunden ist, einem Syndrom, welches mit HIV-Infektion verbunden ist, einem Symptom, welches mit HIV-Infektion verbunden ist, oder AIDS.

34. Verfahren zur Herstellung des Impfstoffs nach einem der Ansprüche 1-30, welches das Lyophilisieren und das Resuspendieren des besagten isolierten Tat-Proteins in einem biologisch verträglichen Fluid umfasst.

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei besagtes biologisch verträgliches Fluid Serum, Plasma oder eine Fraktion davon ist.

36. Verfahren zur Herstellung des Impfstoffs nach einem der Ansprüche 1-30, umfassend: (a) Reinigen des besagten isolierten Tat-Proteins durch ein Verfahren, welches das Durchführen der Heparin-Affinitätschromatographie umfasst; (b) Lyophilisieren des besagten isolierten Tat-Proteins und (c) Resuspendieren des lyophilisierten Tat-Proteins in einem entgasten Puffer.

37. Verwendung eines Impfstoffs nach einem der Ansprüche 1-33 für die Herstellung eines Arzneimittels für die therapeutische und/oder prophylaktische Behandlung eines Tumors, der mit einer HIV-Infektion verbunden ist, einem Syndrom, welches mit einer HIV-Infektion verbunden ist, einem Symptom, welches mit einer HIV-Infektion verbunden ist, oder AIDS.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

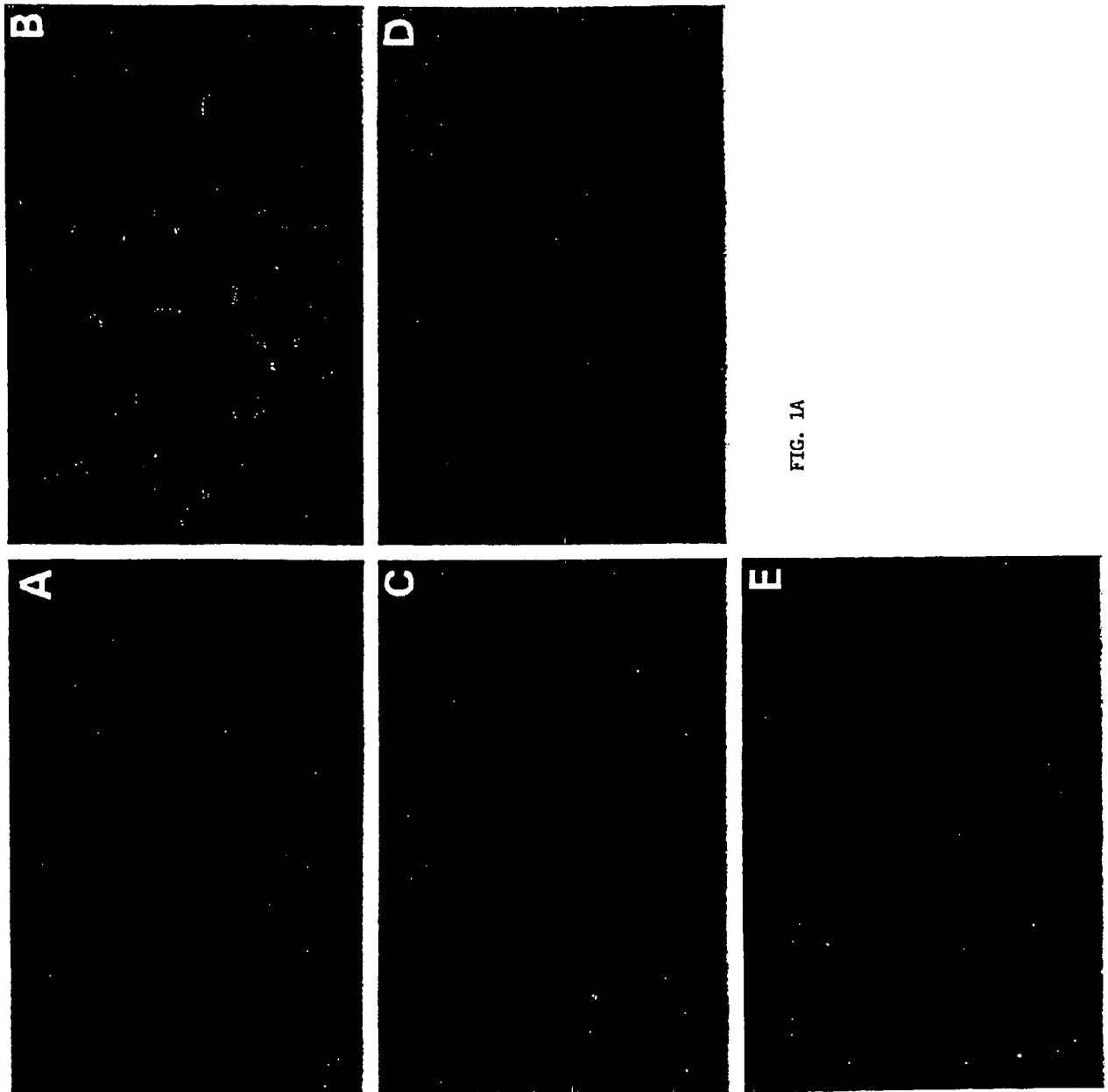


FIG. 1A

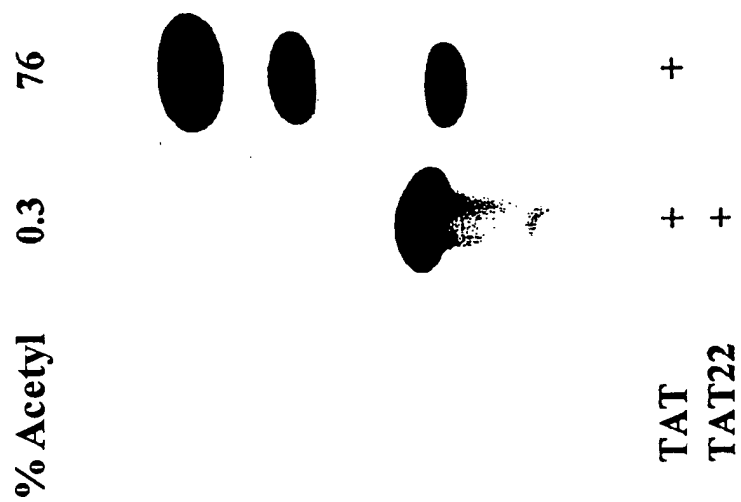
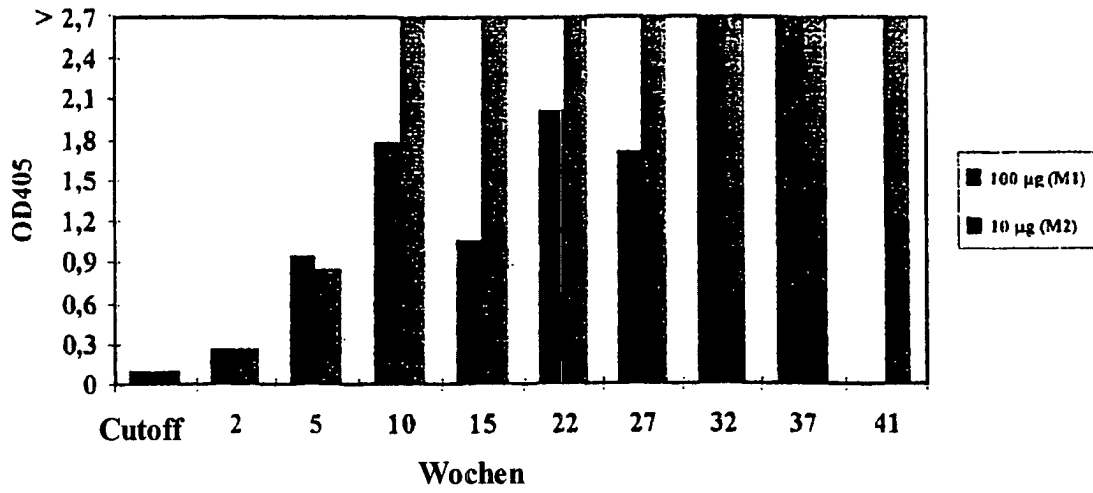


FIG. 1B

A



B

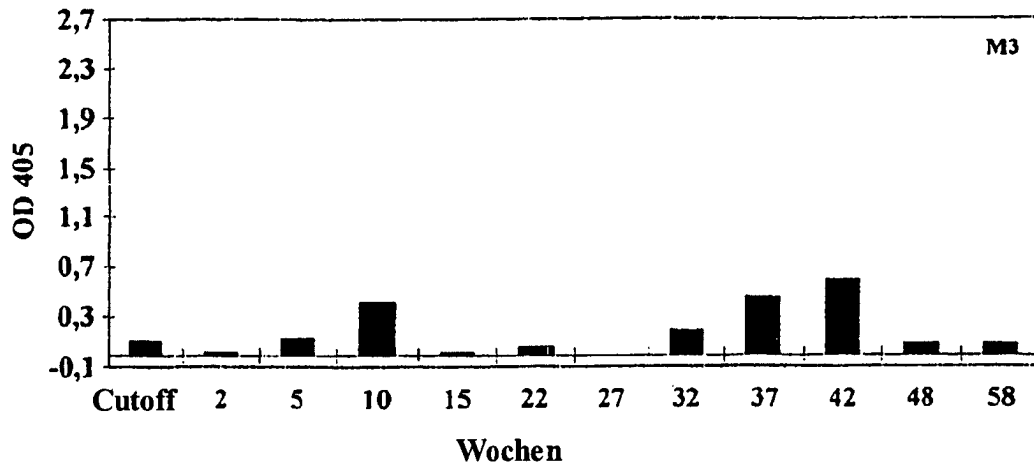


FIG. 2

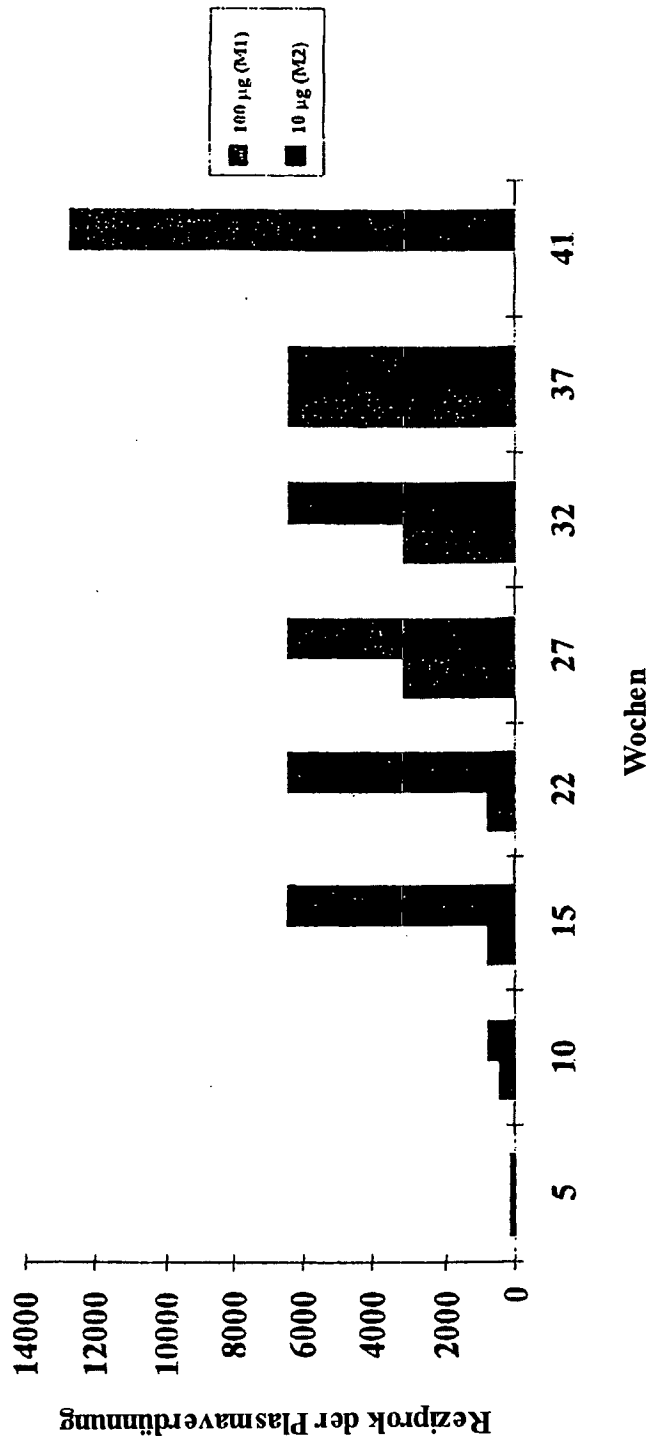
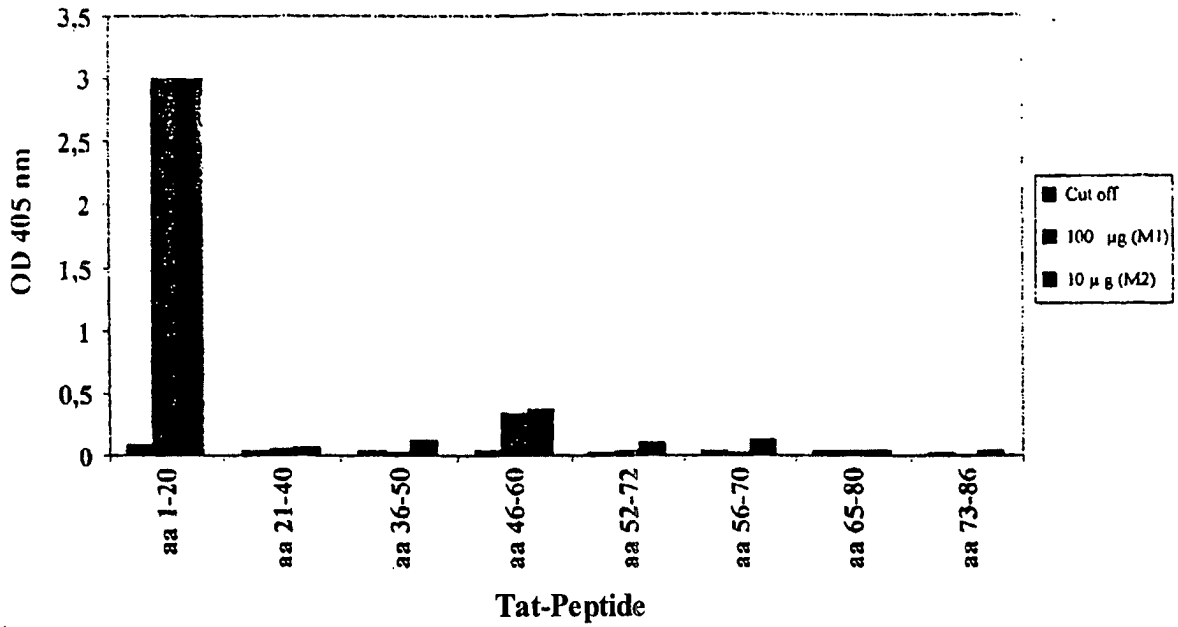


FIG. 3

A



B

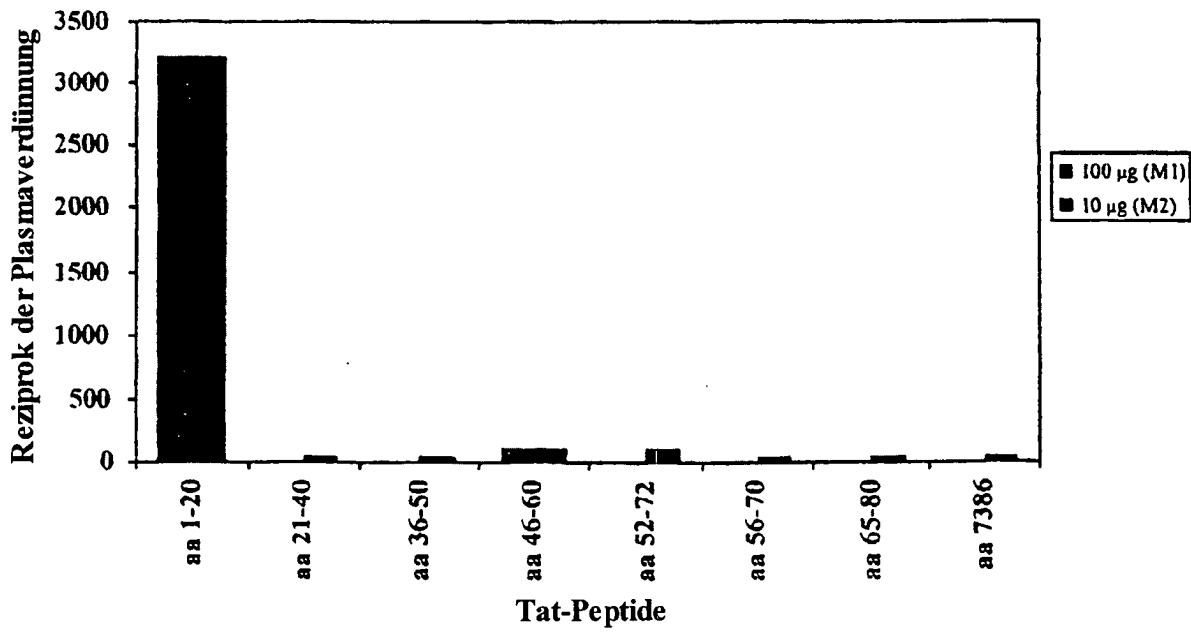


FIG. 4

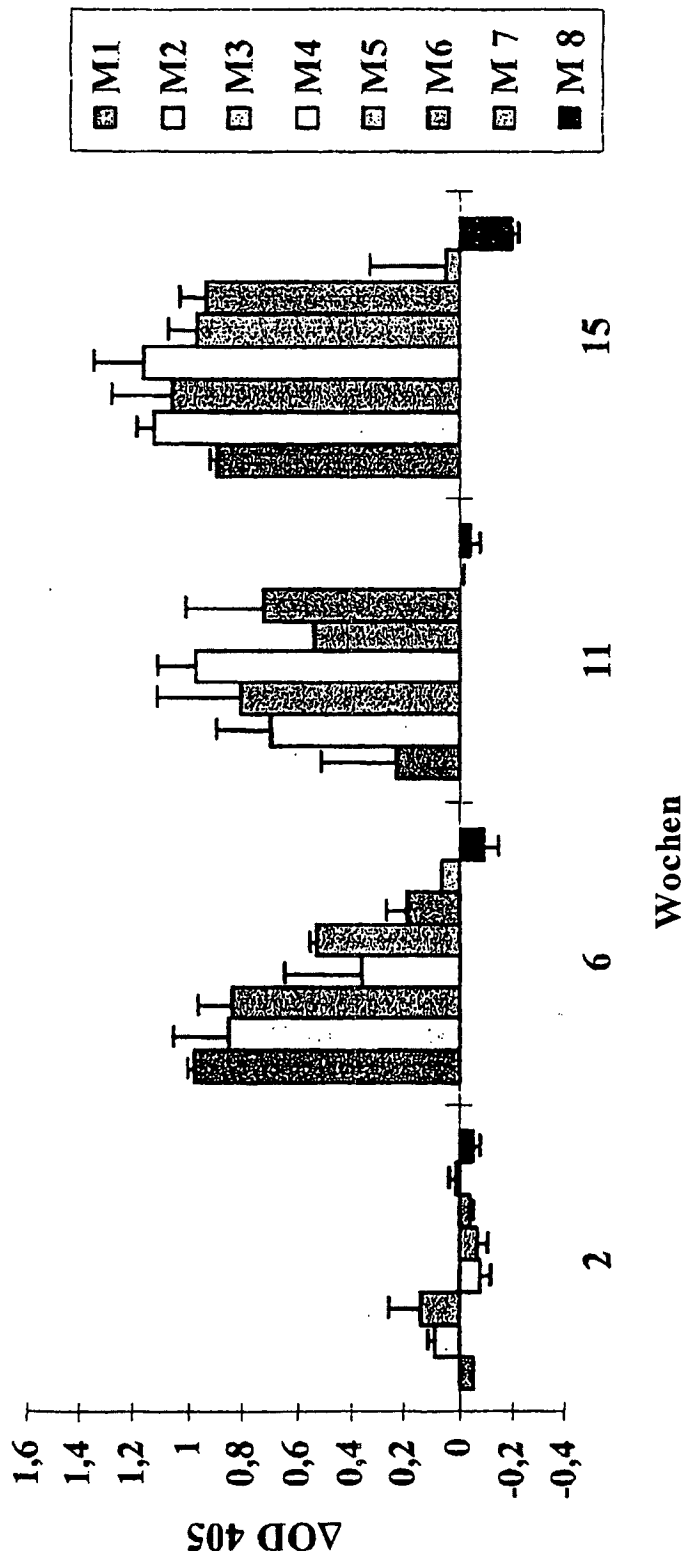


FIG. 5

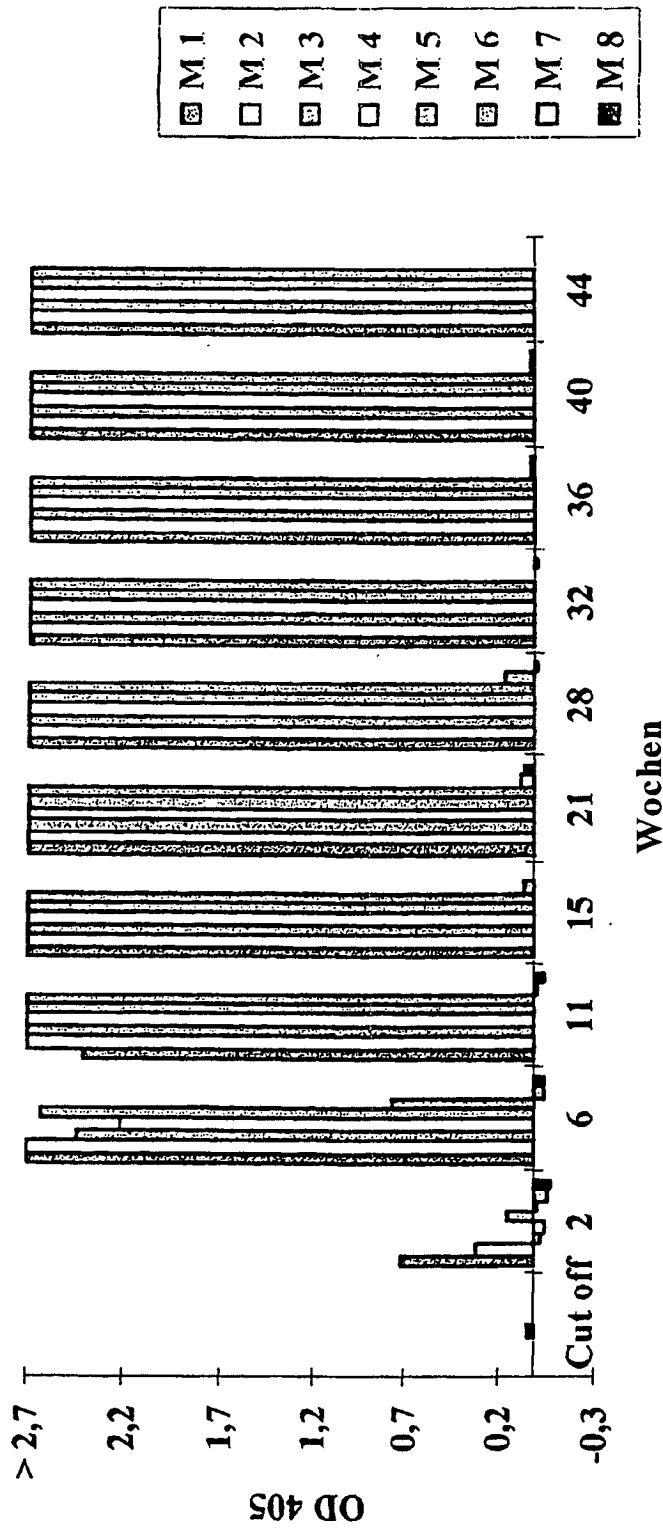


FIG. 6

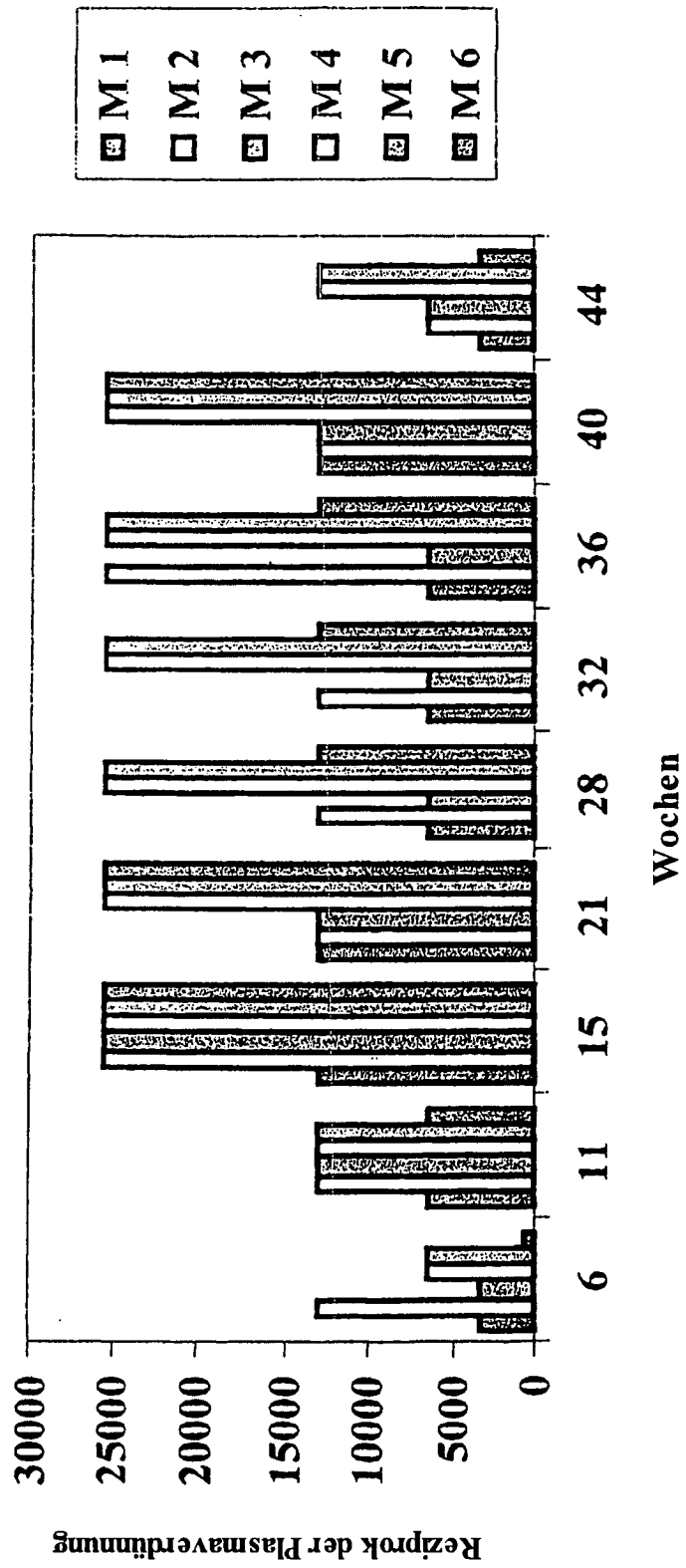
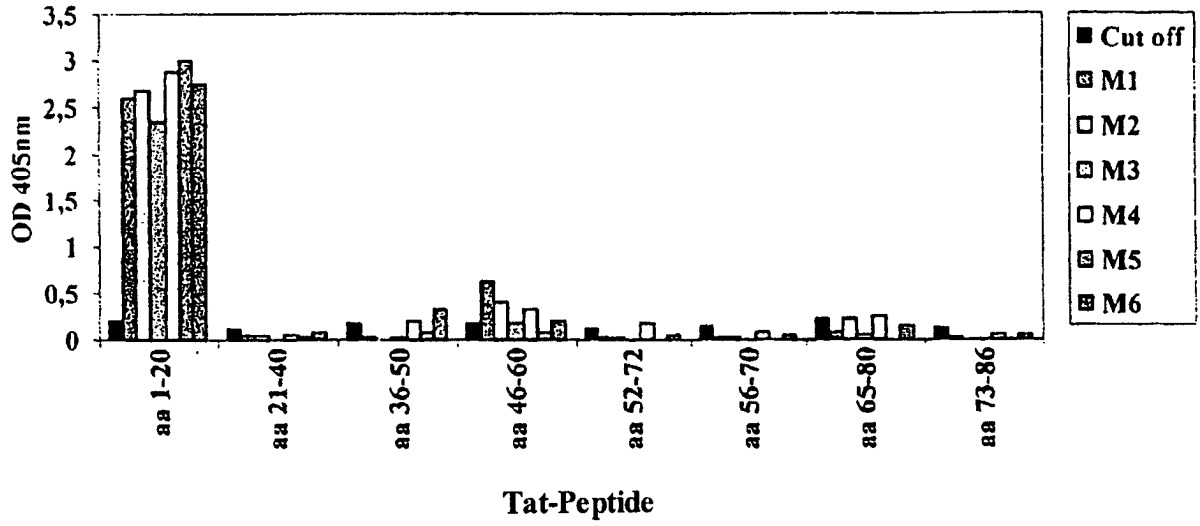


FIG. 7

A



B

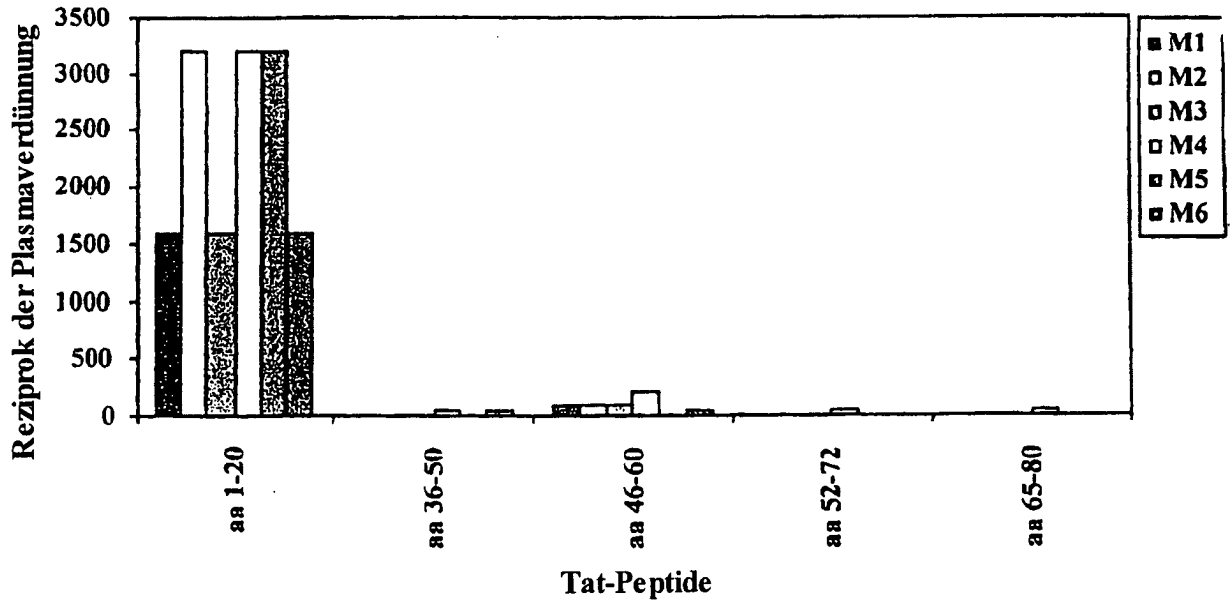


FIG. 8

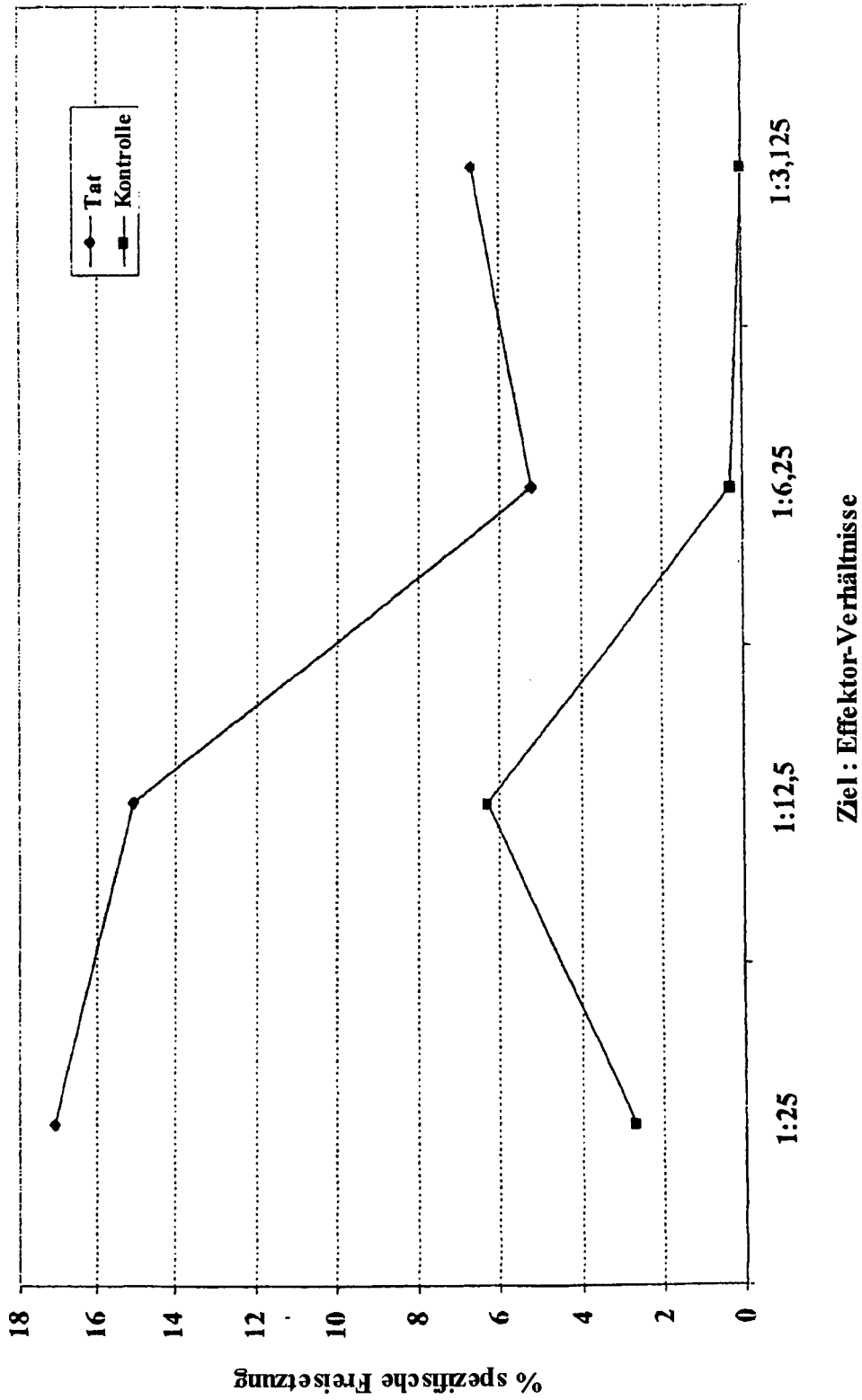


FIG. 9

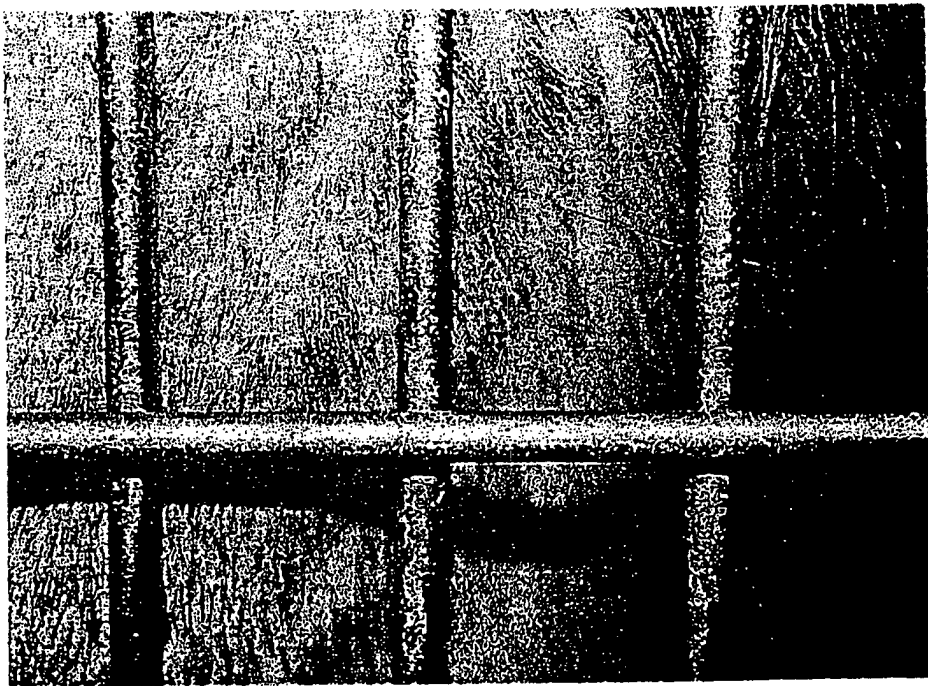


FIG. 10

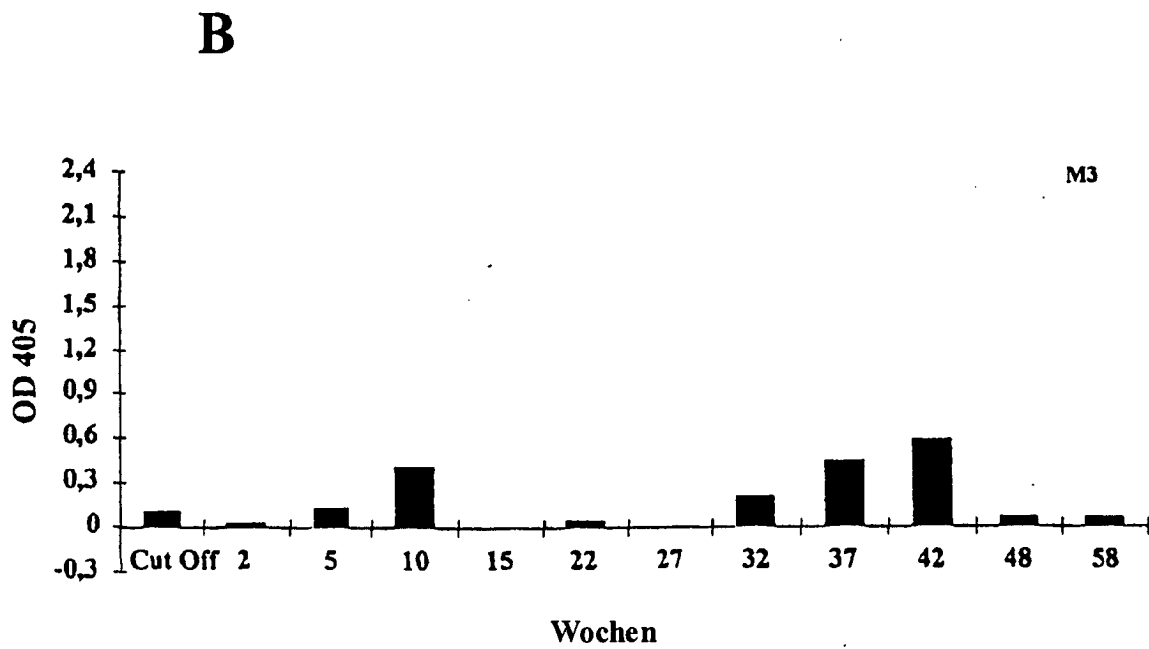
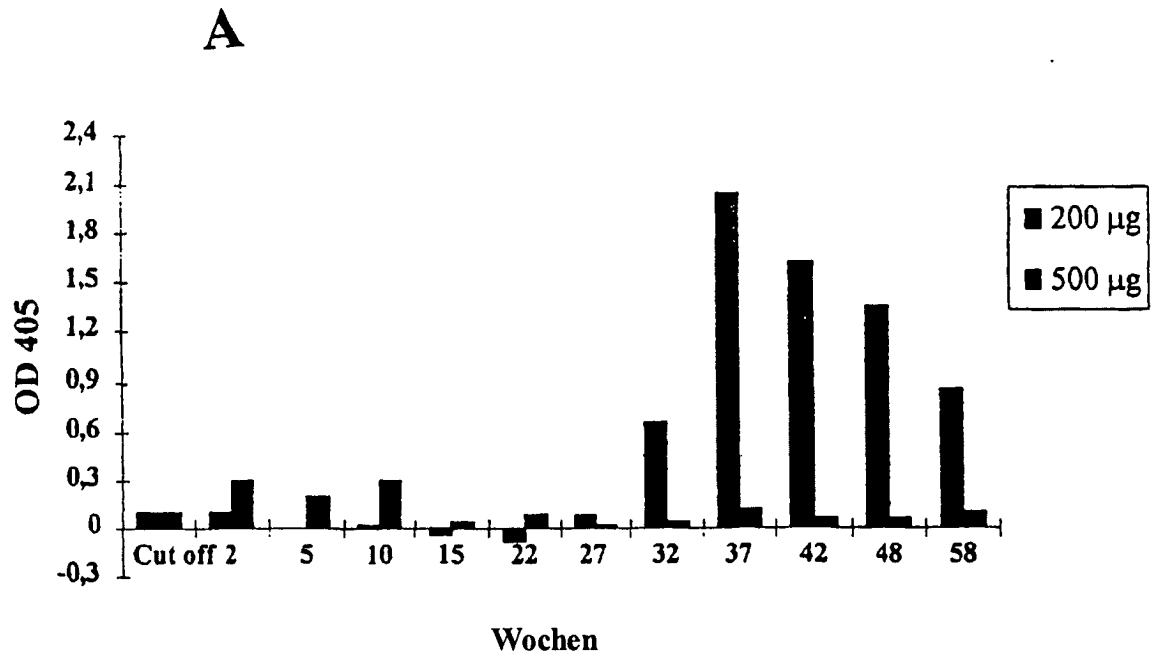


FIG. 11

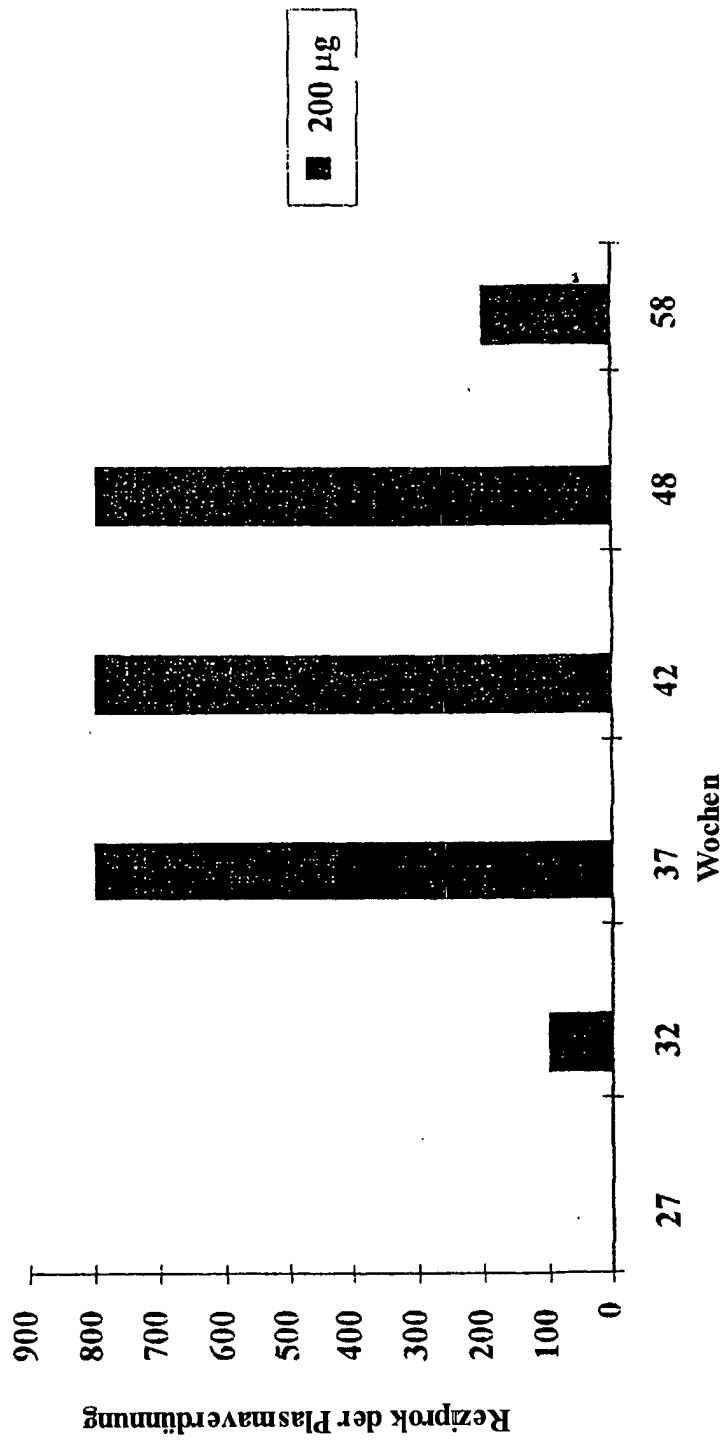


FIG. 12

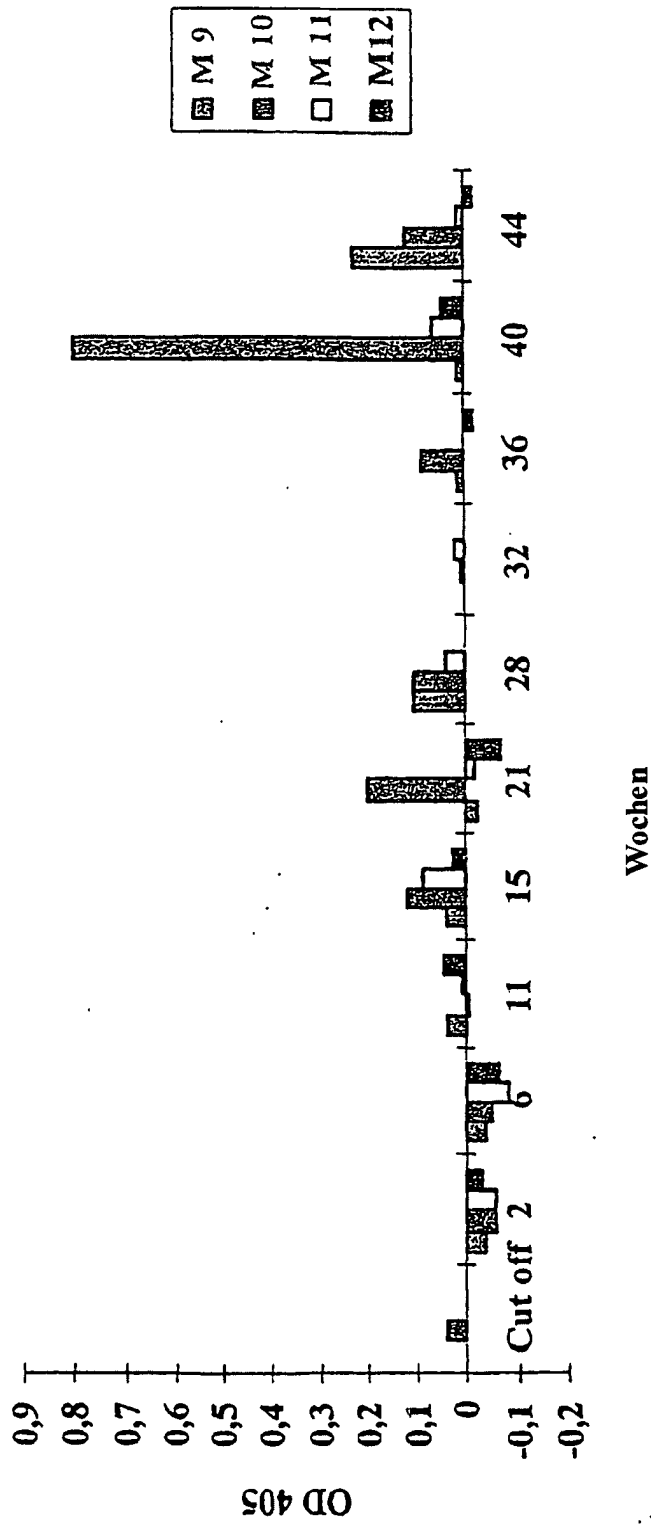


Fig. 13

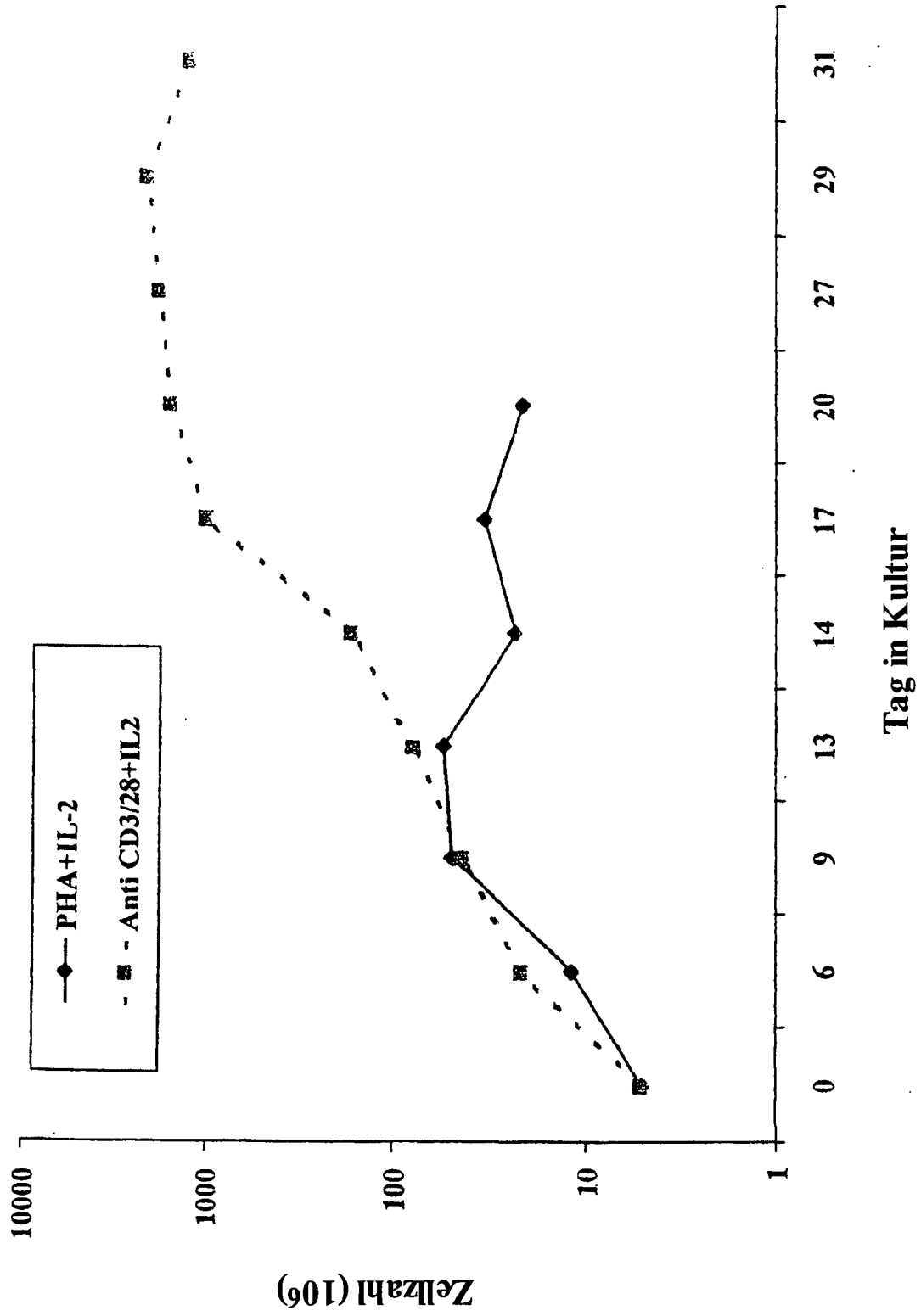
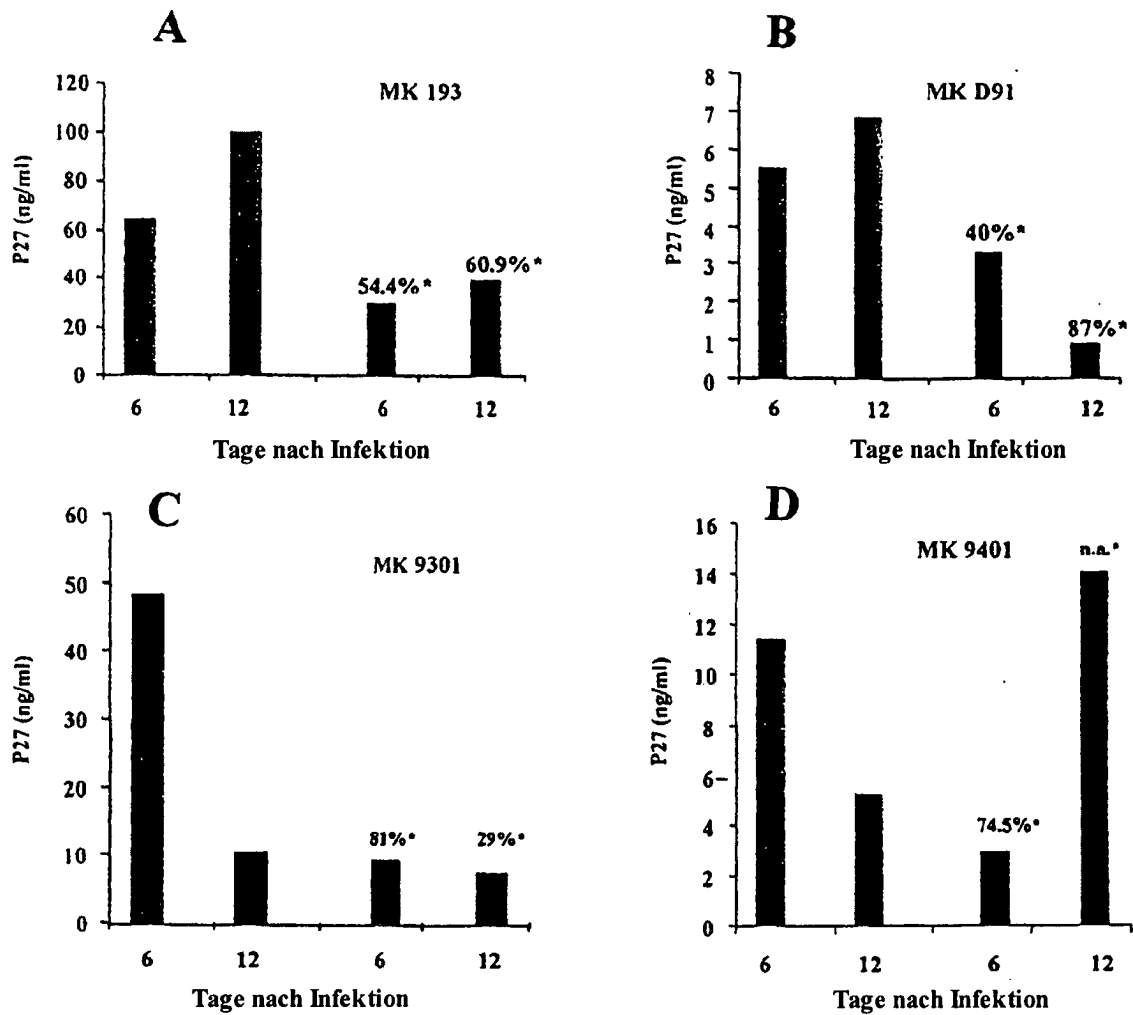


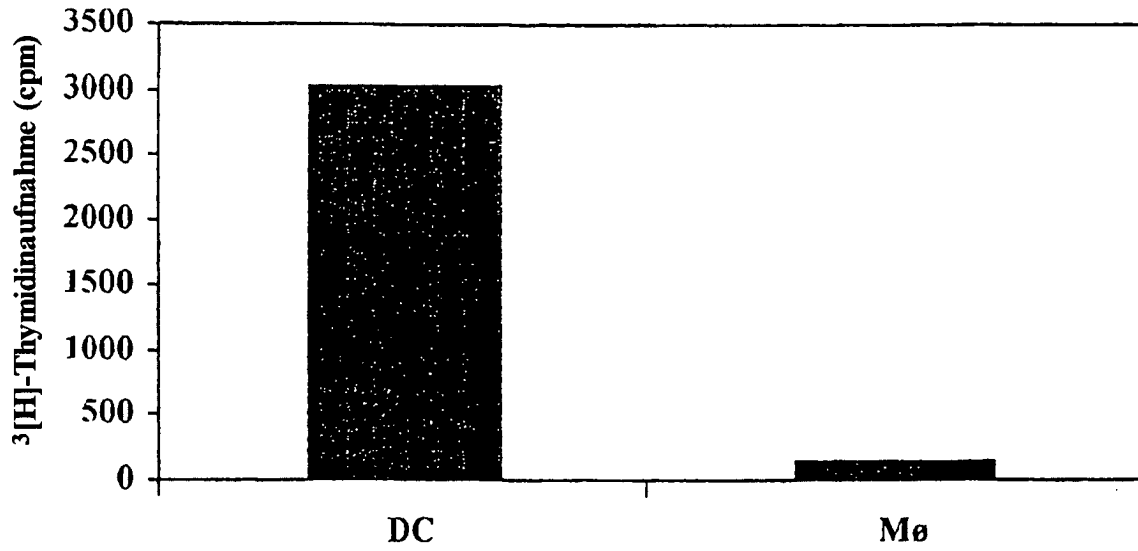
FIG. 14



*: Prozentsatz der Inhibierung

FIG. 15

A



B

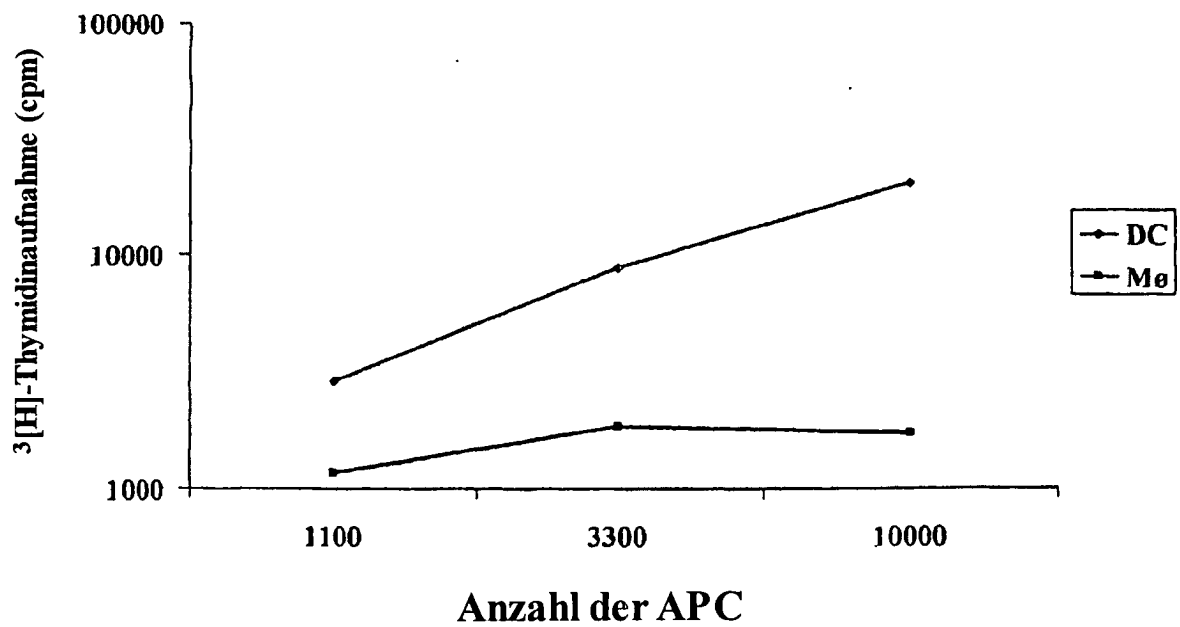


FIG. 16