



(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1789/2000  
(22) Anmeldetag: 18.10.2000  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.2002  
(45) Ausgabetag: 25.06.2003

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61K 39/39**

(56) Entgegenhaltungen:  
EP 905141A1 JP 8134096A JP 7070187A

(73) Patentinhaber:  
CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH  
A-1030 WIEN (AT).

## (54) VAKZIN-ZUSAMMENSETZUNG

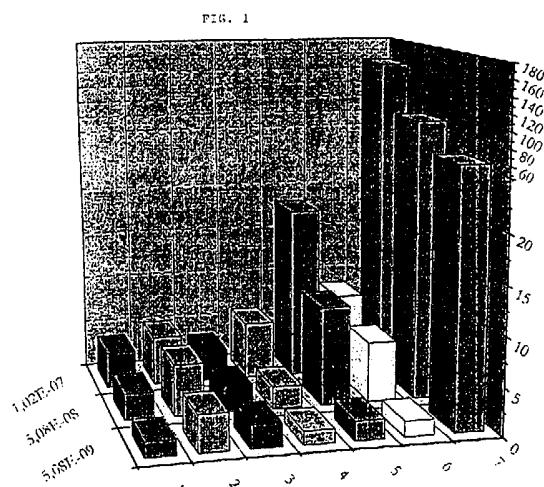
AT 410 635 B

(57) Die Erfindung betrifft ein Vakzin, welches mindestens ein Antigen und ein Peptid mit einer Sequenz  $R_1$ - $XXZX$ - $R_2$  aufweist, wobei

- N eine ganze Zahl zwischen 3 und 7, vorzugsweise 5, ist,
- X ein positiv geladener natürlicher und/oder nicht-natürlicher Aminosäurerest ist,
- Z ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F oder W, ist, und

$R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -H, - $NH_2$ , - $COCH_3$ , -COH oder einem Peptid mit bis zu 20 Aminosäureresten;  $X-R_2$  auch ein Amid, Ester oder Thioester des C-terminalen Aminosäurerestes sein kann,

sowie die Verwendung dieses Peptids zur Herstellung eines Adjuvans zur Verbesserung der Immunantwort auf mindestens ein Antigen.



Die vorliegende Erfindung betrifft Vakzine, welche mindestens ein Antigen und eine immunstimulierende Substanz umfassen.

Beim Schutz des Wirtes vor eindringenden Pathogenen spielen zelluläre und humorale Effektoren eine Rolle, und es ergibt sich aus der gemeinsamen Wirkung sowohl der nicht-adaptiven (angeborenen) als auch der adaptiven (erworbenen) Immunität. Letztere basiert auf einer spezifischen immunologischen Erkennung, die durch die Rezeptoren vermittelt wird, ist vom Immunsystem jüngst erworben und ist nur bei Vertebraten vorhanden. Erstere entwickelte sich vor der Entwicklung der adaptiven Immunität und besteht aus einer Vielfalt von Zellen und Molekülen, die im ganzen Organismus mit dem Ziel verteilt sind, potentielle Pathogene unter Kontrolle zu halten (Boman, H. (2000)), (Zanetti, M (1997)).

B- und T-Lymphozyten sind die Vermittler der erworbenen Antigen-spezifischen adaptiven Immunität, einschließlich der Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, welches das Hauptziel der Schaffung eines erfolgreichen Vakzins ist (Schijns, V. (2000)). Antigen-präsentierende Zellen (APCs) sind hoch-spezialisierte Zellen, die Antigene prozessieren können und ihre prozessierten Fragmente an der Zelloberfläche zusammen mit Molekülen, die für die Lymphozyten-Aktivierung notwendig sind, präsentieren. Dies bedeutet, dass APCs für die Initiierung spezifischer Immunreaktionen sehr wichtig sind. Die Haupt-APCs für die Aktivierung der T-Lymphozyten sind die Dendriten-Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen, wogegen die Haupt-APCs für B-Zellen follikuläre Dendriten-Zellen sind. Im Allgemeinen sind DCs die wirksamsten APCs hinsichtlich der Initiierung von Immunantworten, wobei sie schlafende naive und Gedächtnis-B- und T-Lymphozyten stimulieren.

Das natürliche Ziel der APCs an der Peripherie (z.B. DCs oder Langerhans-Zellen) ist es, Antigene zu fangen und zu prozessieren, wodurch sie aktiviert werden, und sie beginnen, Lymphozyten-costimulierende Moleküle zu exprimieren, zu Lymphoid-Organen wandern, Cytokine sezernieren und Antigene den verschiedenen Populationen von Lymphozyten zu präsentieren, wobei sie Antigen-spezifische Immunantworten initiieren. Sie aktivieren nicht nur Lymphozyten, unter bestimmten Umständen machen sie auch T-Zellen für Antigene tolerant (Bancherau, J. (1998)).

Die Antigen-Erkennung durch T-Lymphozyten ist durch den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) eingeschränkt. Ein bestimmter T-Lymphozyt erkennt ein Antigen nur dann, wenn das Peptid an ein bestimmtes MHC-Molekül gebunden ist. Im Allgemeinen werden T-Lymphozyten nur in Gegenwart von Eigen-MHC-Molekülen stimuliert, und Antigen wird nur als Peptide, die an Eigen-MHC-Moleküle gebunden sind, erkannt. Die MHC-Einschränkung definiert die T-Lymphozyten-Spezifität hinsichtlich des erkannten Antigens und hinsichtlich des MHC-Moleküls, das sein Peptid-Fragment bindet.

Intrazelluläre und extrazelluläre Antigene stellen an das Immunsystem ganz verschiedene Herausforderungen, sowohl hinsichtlich einer Erkennung als auch hinsichtlich einer geeigneten Reaktion. Die Präsentation von Antigenen gegenüber den T-Zellen wird durch zwei verschiedene Klassen von Molekülen vermittelt -MHC-Klasse I (MHC-I) und MHC-Klasse II (MHC-II), die verschiedene Antigen-Prozessierungswege benutzen. Man konnte hauptsächlich zwischen zwei Haupt-Antigenprozessierungswegen, die sich entwickelt haben, unterscheiden. Peptide, die aus intrazellulären Antigenen stammen, werden den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert, die auf praktisch allen Zellen exprimiert werden, wogegen von extrazellulären Antigenen stammende Peptide den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch MHC-II-Moleküle präsentiert werden (Monaco, J. (1992); Harding, C. (1995). Es gibt jedoch bestimmte Ausnahmen zu dieser Dichotomie. Mehrere Studien zeigten, dass Peptide, die aus endozytisierten teilchenförmigen oder löslichen Proteinen generiert wurden, auf MHC-I-Molekülen in Makrophagen sowie in Dendriten-Zellen präsentiert werden (Harding, C. (1996); Brossart, P. (1997)). Daher sind APCs, wie Dendriten-Zellen, die an der Peripherie sitzen, die eine hohe Wirksamkeit zum Einfangen und Prozessieren extrazellulärer Antigene ausüben und sie auf MHC-I-Molekülen den T-Lymphozyten präsentieren, interessante Ziele, um sie extrazellulär mit Antigenen in vitro und in vivo zu pulsen.

Die wichtige und einzigartige Rolle der APCs, einschließlich der stimulierenden Wirkung auf verschiedene Typen von Leukozyten, spiegelt ihre zentrale Position als Ziele für geeignete Strategien bei der Entwicklung erfolgreicher Vakzine wider. Theoretisch ist ein Weg dazu die Verbesserung oder Stimulation ihres natürlichen Ziels, die Aufnahme von Antigen(en). Sobald sie mit den entsprechenden Antigenen, gegen die das Vakzin gerichtet ist, gepulst sind, sollten die APCs das

(die) aufgenommene(n) Antigene zu prozessieren beginnen, wodurch sie aktiviert werden, Lymphozyten-costimulierende Moleküle exprimieren, zu Lymphoid-Organen wandern, Cytokine sezernieren und Antigene verschiedenen Populationen von Lymphozyten zu präsentieren, wodurch sie Immunreaktionen initiieren.

5 Aktivierte T-Zellen sezernieren im Allgemeinen eine Anzahl von Effektor-Zytokinen in stark regulierter Weise, z.B. Interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Die funktionelle Detektion von zytotoxischen T-Lymphozyten-Reaktionen auf spezifische Antigene (z.B. Tumor-Antigene, im Allgemeinen Antigene, die in einem Vakzin verabreicht werden) wird allgemein mittels eines ELISpot-Assays (enzymelinked immunospot assay) überwacht, einer Technik, die die Cytokin-Produktion auf Einzelzell-Niveau analysiert. Bei der vorliegenden Erfindung wurde ein ELISpot-Assay für das Zellimmunitäts-fördernde Cytokin-IFN- $\gamma$  verwendet, um die Peptid-spezifische T-Zellen-Aktivierung erfolgreich zu überwachen.

Es wurde bereits früher gezeigt, dass Polykationen die Aufnahme von zur MHC-Klasse I passenden Peptiden in Tumorzellen wirksam verbessert, ein Peptid- oder Protein-Pulsverfahren, welches "TRANSloading" genannt wurde (Buschle, M. (1997)). Weiters wurde gezeigt, dass Polykationen Peptide oder Proteine in Antigen-präsentierende Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* "TRANS-loaden" können (Buschle, M. (1998)). Außerdem schütze die Co-Injektion einer Mischung aus Poly-L-Arginin oder Poly-L-Lysin zusammen mit einem geeigneten Peptid als Vakzin Tiere vor Tumorwachstum in Maus-Modellen (Schmidt, W. (1997)). Dieses chemisch definierte Vakzin kann eine große Anzahl von Antigen/Peptid-spezifischen T-Zellen induzieren. Es zeigte sich, dass dies zumindest teilweise auf eine verbesserte Aufnahme von Peptiden in APCs, die durch das Polykation vermittelt war, zurückzuführen war (Buschle, M. (1998)), was anzeigt, dass APCs, wenn sie *in vivo* mit Antigenen gepulst werden, eine T-Zellen-vermittelte Immunität gegen das verabreichte Antigen induzieren können.

15 Im Gegensatz zur adaptiven Immunität, die durch eine hoch-spezifische, jedoch relativ langsame Antwort gekennzeichnet ist, basiert die angeborene Immunität auf Effektor-Mechanismen, die durch Unterschiede in der Struktur mikrobieller Komponenten gegenüber dem Wirt ausgelöst werden. Diese Mechanismen können eine ziemlich rasche anfängliche Antwort auslösen, die hauptsächlich zur Neutralisierung schädlicher Agentien führt. Reaktionen angeborener Immunität sind die einzige Verteidigungsstrategie der niedrigeren Ordnung und wurden bei Vertebraten als die erste Verteidigungslinie des Wirts, bevor das adaptive System mobilisiert wird, beibehalten.

Bei höheren Vertebraten sind die Effektorzellen der angeborenen Immunität Neutrophile, Makrophagen und natürliche Killer-Zellen und wahrscheinlich auch Dendriten-Zellen (Mizukawa, N. (1999)), wogegen die humoralen Komponenten in diesem Weg die Komplement-Kaskade und eine Vielfalt verschiedener Bindungsproteine sind (Boman, H. (2000)).

25 Eine rasche und wirksame Komponente der angeborenen Immunität ist die Produktion einer großen Vielfalt mikrobizider Peptide mit einer Länge von üblicherweise zwischen etwa 12 und etwa einhundert Aminosäureresten. Mehrere Hundert verschiedene antimikrobielle Peptide wurden aus einer Vielfalt von Organismen, die von Schwämmen, Insekten bis zu Tieren und Menschen reichen, isoliert, was auf eine weite Verbreitung dieser Moleküle hinweist. Antimikrobielle Peptide werden auch von Bakterien als antagonistische Substanzen gegen konkurrierende Organismen erzeugt.

Die Hauptquellen antimikrobieller Peptide sind Granula von Neutrophilen und Epithelzellen, die den Atem-, Magen-Darm- und Urogenital-Trakt auskleiden. Im Allgemeinen findet man sie an jenen anatomischen Stellen, die einer Mikroben-Invasion am meisten ausgesetzt sind, sie werden in innere Körperflüssigkeiten sezerniert oder in zytoplasmatischen Granula professioneller Phagozyten (Neutrophilen) gelagert (Ganz, T. (1997); Ganz, T. (1998); Ganz, T. (1999); Boman, H. (2000); Gudmundsson GH. (1999)).

Es wurde bereits früher gezeigt WO 02/13857 A1, dass natürlich vorkommende, von Cathelicidin stammende antimikrobielle Peptide oder deren Derivate eine die Immunantwort stimulierende Aktivität besitzen und daher hochwirksame Adjuvantien darstellen.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Adjuvans/"Trägerpeptid" zu schaffen, das die Immunantwort auf ein spezifisches, gemeinsam verabreichtes Antigen stark verbessern kann und daher ein hochwirksames Adjuvans darstellt.

55 Dieses Aufgabe wird durch ein Vakzin gelöst, welches mindestens ein Antigen und ein Peptid

mit einer Sequenz  $R_1\text{-XZXZ}_N\text{XZX-R}_2$  aufweist, wobei

- N eine ganze Zahl zwischen 3 und 7, vorzugsweise 5, ist,
  - X ein positiv geladener natürlicher und/oder nicht-natürlicher Aminosäurerest ist,
  - Z ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F oder W, ist, und
- $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -H, -NH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -COH oder einem Peptid mit bis zu 20 Aminosäureresten; X-R<sub>2</sub> auch ein Amid, Ester oder Thioester des C-terminalen Aminosäurerestes sein kann.

Außer den natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden wurden synthetische antimikrobielle Peptide erzeugt und untersucht. Es zeigte sich, dass das synthetische antimikrobielle Peptid KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> eine bedeutende chemotherapeutische Aktivität bei mit *Staphylococcus aureus* infizierten Mäusen hat; Human-Neutrophile wurden aktiviert, um das Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) über Zelloberflächen-Calreticulin zu erzeugen. Es zeigte sich, dass die genaue Anzahl und Position von K und L für die antimikrobielle Aktivität des synthetischen Peptids von kritischer Bedeutung ist (Nakajima, Y. (1997); Cho, J-H. (1999)).

Es zeigte sich nun überraschenderweise im Laufe der vorliegenden Erfindung, dass Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung, die eine Sequenz  $R_1\text{-XZXZ}_N\text{XZX-R}_2$  aufweisen, worin

- N eine ganze Zahl zwischen 3 und 7, vorzugsweise 5, ist,
- X ein positiv geladener natürlicher und/oder nicht-natürlicher Aminosäurerest ist,
- Z ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F oder W, ist, und
- $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -H, -NH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -COH oder einem Peptid mit bis zu 20 Aminosäureresten; X-R<sub>2</sub> auch ein Amid oder Ester (oder sogar Thioester) des C-terminalen Aminosäurerestes sein kann,

(nachfolgend als "Peptide A" bezeichnet), antigene Peptide oder Proteine weit besser in APCs TRANSloaden können als bekannte Adjuvantien, einschließlich natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide. Sie haben weiters eine starke Immunantwort-stimulierende Aktivität und stellen daher hoch wirksame Adjuvantien dar.

Im Bereich der vorliegenden Erfindung kann die Sequenz an ihrem Carboxy-Ende amidiert sein oder eine weitere Aminosäuresequenz tragen, vorzugsweise ist jedoch das Carboxy-Ende frei.

Weiters können im Bereich der vorliegenden Erfindung alle X, die in den Peptiden A umfasst sind, denselben Aminosäurerest darstellen. Vorzugsweise repräsentiert X jedoch in einem Peptid A nur einen spezifischen Aminosäurerest, z.B. entweder K oder R, usw.. Dasselbe kann in Bezug auf Z angewendet werden: alle Z in den Peptiden A können eine einzige Aminosäure-Spezies oder verschiedene Aminosäure-Spezies sein: z.B. entweder L oder V usw.. Vorzugsweise sind  $R_1$  und  $R_2$  gleich, vorteilhaft sind beide H (d.h. freie Amino- oder Carboxy-Termini).

Im Bereich der vorliegenden Erfindung umfasst der Ausdruck "nicht-natürlich" jeglichen Aminosäurerest, der nicht natürlich vorkommt bzw. nicht in natürlichen Proteinen vorkommt.

Das Peptid  $R_1\text{-KLKL}_5\text{KLK-R}_2$  ist speziell bevorzugt, es sind jedoch auch  $R_1\text{-KIKL}_5\text{KIK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KVKL}_5\text{KVK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KFKL}_5\text{KVK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KLKL}_6\text{KLK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KWKL}_5\text{KLK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KWKL}_3\text{WKWK-R}_2$ ,  $R_1\text{-KLKL}_4\text{KLK-R}_2$  oder Permutationen in Bezug auf die Positionen von I, F oder L vorteilhaft.

Selbstverständlich kann das Vakzin auch zwei oder mehrere Antigene, je nach der gewünschten Immunantwort, umfassen. Das (die) Antigen(e) kann (können) auch modifiziert sein, um die Immunantwort weiter zu verbessern.

Vorzugsweise werden die Proteine oder Peptide, die von viralen oder bakteriellen Pathogenen, von Pilzen oder Parasiten sowie von Tumor-Antigenen (Krebs-Vakzine) oder Antigenen mit einer putativen Rolle bei Autoimmunerkrankungen stammen, als Antigene (einschließlich derivatisierter Antigene, wie glykosylierter, lipidisierter, glykolipidisierter oder hydroxylierter Antigene) verwendet. Weiters können Kohlehydrate, Lipide oder Glykolipide selbst als Antigene verwendet werden. Der Derivatisierungsprozess kann die Reinigung eines spezifischen Proteins oder Peptids aus dem Pathogen, die Inaktivierung des Pathogens sowie die proteolytische oder chemische Derivatisierung oder Stabilisierung eines solchen Proteins oder Peptids inkludieren. Alternativ kann auch das Pathogen selbst als Antigen verwendet werden. Die Antigene sind vorzugsweise Peptide oder Proteine, Kohlehydrate, Lipide, Glykolipide oder Mischungen davon.

Vorzugsweise ist das Antigen ein Peptid, das aus 5 bis 60, vorzugsweise 6 bis 30, insbesondere 8 bis 11 Aminosäureresten besteht. Antigene dieser Länge erwiesen sich als für die T-Zellen-

Aktivierung besonders geeignet. Die Antigene können weiters mit einem Schwanz gekoppelt werden, beispielsweise gemäß A 657/2000, US 5,726,292 oder WO 98/01558.

Die relativen Mengen der Ingredienzien der vorliegenden Zusammensetzung hängen sehr von den Notwendigkeiten der individuellen Zusammensetzung ab. Vorzugsweise werden zwischen  
5 10 ng und 1 g Antigen und Peptid A verwendet. Bevorzugte Mengen an Antigen/ Peptid A liegen im Bereich von 0,1 bis 1000 µg Antigen pro Vakzination und 0,1 bis 1000 µg Peptid A. Die Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung kann weiters Hilfssubstanzen, wie Puffer, Salze, Stabilisatoren, Antioxidantien usw., oder andere Wirksubstanzen, wie Entzündungshemmer oder antinozeptive Arzneistoffe, enthalten.

Die vorliegenden Zusammensetzungen können einem Patienten, z.B. einem Impfkandidaten, in wirksamen Mengen, z.B. in wöchentlichen, zweiwöchigen oder monatlichen Intervallen verabreicht werden. Patienten, die mit der vorliegenden Zusammensetzung zu behandeln sind, können auch wiederholt oder nur einmal geimpft werden. Eine bevorzugte Verwendung der vorliegenden Erfindung ist die aktive Immunisierung, insbesondere von Menschen oder Tieren, die keinen Schutz  
10 gegen das spezifische Antigen haben.

Die vorliegende Zusammensetzung kann subkutan, intramuskulär, rektal, intravenös, intradermal, intrapinial, transdermal sowie durch orale Aufnahme verabreicht werden.

Selbstverständlich kann das Vakzin gemäß der vorliegenden Erfindung jedwede weitere Substanz, wie beispielsweise jeden anderen pharmazeutisch akzeptablen Träger usw. umfassen. Das  
20 Vakzin gemäß der vorliegenden Erfindung kann gemäß bekannter Verfahren formuliert werden, z.B. als i.v.-Vakzine, DNA-Vakzine, transdermale Vakzine, topische Vakzine, intranasale Vakzine und als Kombinationsvakzine. Die Dosierung kann mittels Standardverfahren für Vakzine, die Verbesserungen der bekannten Vakzine sind, ausgewählt werden, es ist jedoch eine niedrigere Dosierung als beim bekannten Vakzin für denselben Schutz möglich und daher bevorzugt.

Vorzugsweise ist das Vakzin in lagerbarer Form, z.B. lyophilisiert, gegebenenfalls in Kombination mit einer geeigneten Rekonstitutionslösung, vorgesehen.

Vorzugsweise ist X in der Peptidsequenz ein Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus K, R, Ornithin und/oder Homoarginin. Wiederum kann das X eines Peptids A verschiedene Aminosäurereste, ausgewählt aus dieser Gruppe, sein, vorzugsweise ist X entweder K  
30 oder R oder Ornithin oder Homoarginin in einem Peptid A.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist X in der Peptidsequenz K. Das Peptid A, welches diese Aminosäure als X aufweist, erwies sich als besonders stark für die Induktion einer Immunantwort.

Vorzugsweise ist Z in der Peptidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F und/oder W. Wie für X erwähnt wurde, kann auch das Y in einem Peptid A verschiedene Aminosäurereste darstellen. Es ist jedoch bevorzugt, dass Z eines Peptids A nur ein Aminosäurerest ist, z.B. entweder L oder V oder I oder F oder W.

Noch mehr bevorzugt steht Z in der Peptidsequenz A für L. Dadurch kann das Peptid A eine besonders starke Immunantwort hervorrufen.

Am meisten bevorzugt ist das Peptid A H-KLKLLLLLK-H. Selbstverständlich soll auch die physiologische Form dieses Peptids beispielsweise mit einem protonisierten N-Terminus ( $\text{NH}_3^+$ ) und einem entprotonisierten C-Terminus ( $\text{COO}^-$ ) als von dieser Formel (wie für alle Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung) mit eingeschlossen gelten.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform ist/sind in der Peptidsequenz  $R_1$  und/oder  
45  $R_2$  10 bis 20 Aminosäurereste. Dadurch ist ein Peptid A vorgesehen, welches eine Länge aufweist, mit welcher eine besonders starke Immunantwort hervorgerufen oder verbessert wird.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  nicht negativ geladene Aminosäurereste.

Wiederum können die Aminosäurereste natürliche und/oder nicht natürliche Aminosäurereste  
50 sein. Durch Hinzufügen nicht-negativ geladener Aminosäurereste entweder an einem oder an beiden Enden des Peptids A weist dieses Peptid eine starke Fähigkeit zur Verbesserung oder Induktion einer Immunantwort auf.

Vorzugsweise bilden  $R_1$  und/oder  $R_2$  einen hydrophoben Schwanz für das Peptid A. Daher sind die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
55 L, V, I, F oder W. Noch mehr bevorzugt sind die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  ausgewählt

aus der Gruppe bestehend aus L, I oder F. Am meisten bevorzugt sind die zusätzlichen Aminosäurereste L. Diese Peptide A weisen eine besonders starke Fähigkeit auf, eine stärkere Immunantwort hervorzurufen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Aminosäurereste von R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> positiv geladene natürliche und/oder nicht natürliche Aminosäurereste. Vorzugsweise sind die zusätzlichen Aminosäurereste ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus K, R, Ornithin und/oder Homoarginin. Noch mehr bevorzugt sind die Aminosäurereste von R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> K. Diese Peptide A zeigen auch eine besonders gute Fähigkeit, die Immunantwort zu verbessern.

Es ist bevorzugt, dass die Aminosäurereste von R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> ausgewählt sind aus der ersten Gruppe (bestehend aus L, V, I, F oder W oder aus der zweiten Gruppe (bestehend aus positiv geladenen Aminosäureresten). Es ist jedoch auch möglich, dass die Aminosäurereste von R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> aus beiden Gruppen für ein einziges Peptid A ausgewählt sind.

Vorzugsweise weist das Vakzin mindestens eine weitere, die Immunantwort stimulierende Substanz auf. Als Immunantwort stimulierende Substanz kann jede Substanz oder jedes Molekül verwendet werden, von welcher (welchem) bekannt ist, dass sie (es) als Adjuvans wirksam ist. Solche Substanzen sind in WO 93/19768 geoffenbart. Andere Substanzen können beispielsweise Polykationen, wie z.B. Polylysin oder Polyarginin, sein. Andere Adjuvantien können Bestandteile in Form von Partikeln, wie z.B. Silikagel oder Dextran-Kügelchen, sein, die klein genug sind, so dass sie in die Zellen eindringen können. Die Zugabe dieser weiteren, die Immunantwort stimulierenden Substanz macht das Vakzin sogar noch wirksamer.

Vorzugsweise ist die die Immunantwort stimulierende Substanz ein Cytokin. Cytokine spielen bei der Aktivierung und Stimulierung von B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen, Makrophagen, Dendriten-Zellen und verschiedenen anderen Zellen, die an der Induktion von Immunantworten beteiligt sind, eine wichtige Rolle. Jedes Cytokin, welches die Immunantwort auf das (die) Antigen(e) zusätzlich verbessert, kann verwendet werden.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des Peptids, welches die Sequenz R<sub>1</sub>-XZXZ<sub>N</sub>XZX-R<sub>2</sub> (Peptid A), wie oben definiert, aufweist, für die Herstellung eines Adjuvans, um die Immunantwort auf mindestens ein Antigen zu verbessern.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Adjuvans einem Vakzin zugegeben. Es ist natürlich möglich, das Adjuvans dem Säuger direkt zu verabreichen, z.B. vorzugsweise vor der Impfung. Es ist jedoch für die Verabreichung einfacher, das Adjuvans einem Vakzin zuzusetzen, welches dann auf einmal dem Säuger verabreicht wird.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Impfung eines Säugers, einschließlich Menschen, gegen ein spezifisches Antigen oder eine Gruppe von spezifischen Antigenen, welches Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Vakzins gemäß der vorliegenden Erfindung an diesen zu impfenden Säuger, einschließlich Menschen, umfasst. Alternativ umfasst das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Adjuvans, umfassend das Peptid A wie voranstehend beschrieben, wonach ein Vakzin verabreicht wird.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Figuren genauer beschrieben, doch ist die Erfindung natürlich nicht auf diese eingeschränkt.

Fig. 1 zeigt die TRANSloading-Kapazität des (synthetischen, antimikrobiellen) Peptids KLKLLLLLKLK (SEQ. ID. Nr. 1) im Vergleich zu verschiedenen, früher beschriebenen "Trägerpeptiden".

Fig. 2 zeigt die Menge der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen bei Mäusen, die mit einem antigenen Peptid in Verbindung mit dem (synthetischen, antimikrobiellen) Peptid KLKLLLLLKLK geimpft wurden.

## BEISPIELE

### Beispiel 1

**TRANSloading muriner Makrophagen mit einem synthetischen, antimikrobiellen Peptid als "Trägerpeptid"**

Um zu testen, ob das (synthetische, antimikrobielle) Peptid KLKLLLLLKLK als "Trägerpeptid" für Antigene funktionieren kann, um APCs *in vitro* zu TRANSloaden, was heißt, die Antigen-Aufnahme in APCs zu verbessern, wurde ein Fluoreszenz-markiertes Peptid als antigenes Peptid verwendet. Es wurde mit verschiedenen Konzentrationen von KLKLLLLLKLK und anderen früher beschriebenen "Trägerpeptiden", wie angegeben, gemischt.

Um die Effizienz der Peptid-Abgabe dieser verschiedenen "Trägerpeptide" zu vergleichen, wurde die Menge der Peptid-Aufnahme in APCs überwacht, indem P388D1-Zellen (murine Monozyten-Makrophagen-Antigen-präsentierende Zelllinie; erworben von ATCC (TIB-63)) 1 h lang bei 37°C mit einer konstanten Menge von mit Fluorescein-markiertem Peptid alleine oder in Kombination mit verschiedenen "Trägerpeptiden" in den angegebenen Konzentrationen inkubiert wurden. Vor dem Analysieren der Zellen durch Durchfluss-Zytometrie wurden die Zellen extensiv gewaschen, um freies Peptid zu entfernen. Die relative Menge des von den Zellen aufgenommenen, mit Fluorescein markierten Peptids wurde mittels Durchfluss-Zytometrie gemessen.

Das verwendete antigenes Peptid ist ein von Influenza-Haemagglutinin stammendes MHC-Klasse I (Kd)-Bindungspeptid (Buschle, M. (1997)). 2 µg dieses antigenen Peptids (FL-LFEAIEGFI) wurden mit 3 verschiedenen Mengen jedes Trägerpeptids gemischt, getestet bei Konzentrationen, die  $1,02^{E-07}$ ,  $5,08^{E-08}$  und  $5,08^{E-09}$  Mol positive Ladungen repräsentieren. (Fig. 1 zeigt die x-fache Steigerung an verbesserter Peptid-Aufnahme im Vergleich zum Peptid alleine):

Peptid FL-LFEAIEGFI gemischt mit

- (1) + Poly-L-Arginin
- (2) + murinem, von Cathelicitin stammendem antimikrobiellem Peptid; SEQ. ID. Nr. 2
- (3) + LL-37; SEQ. ID. Nr. 3
- (4) + L-Indolicidin; SEQ. ID. Nr. 4
- (5) + linearem, bovinem Dodecapeptid; SEQ ID: Nr. 5
- (6) + zyklisiertem, bovinem Dodecapeptid
- (7) + KLKLLLLLKLK; SEQ. ID. Nr. 1

Während bekannt ist, dass die Fluoreszenz bei Zellen, die nur mit Peptid alleine behandelt wurden, gering ist (wie früher gezeigt), wurde eine intensive Fluoreszenz von "TRANSloaded" Zellen insbesondere bei solchen Zellen gefunden, die mit dem (synthetischen, antimikrobiellen) Peptid KLKLLLLLKLK als "Trägerpeptid" "TRANSloaded" wurden, was anzeigt, dass es APCs mit einem antigenen Peptid sehr effizient pulsen kann.

## Beispiel 2

**Testen der Fähigkeit, die Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen-Reaktionen *in vivo* zu verbessern.**

Zum Testen der Fähigkeit des (synthetischen, antimikrobiellen) Peptids KLKLLLLLKLK, die Induktion von Peptid-spezifischen T-Zellen-Reaktionen *in vivo* zu verbessern, wurden bei Gruppen von 4 Mäusen (C57BL/6, weiblich, 8 Wochen alt, H-2b) subkutan 3 Mal (Tage 0, 28 und 56) in die Flanke ein antigenes Melanom-Peptid (100 µg), das von TRP-2 (Maus-Tyrosinase-related Protein-2) stammte, alleine oder in Kombination mit entweder Poly-L-Arginin oder dem (synthetischen, antimikrobiellen) Peptid KLKLLLLLKLK als "Trägerpeptid" injiziert. Die Mengen des verwendeten (synthetischen, antimikrobiellen) Peptids KLKLLLLLKLK repräsentieren vier verschiedene Mengen bei Konzentrationen, die die gleiche Menge (100 µg) an Poly-L-Arginin hinsichtlich µg, die gleiche (168 µg), die doppelte (336 µg) und die dreifache (504 µg) Menge an Poly-L-Arginin hinsichtlich positiver Ladungen darstellen. Die Gruppen der Mäuse erhielten Folgendes injiziert (angegebene Mengen/pro Maus).

- (1) 100 µg Peptid
  - (2) 100 µg Peptid + 100 µg Poly-L-Arginin (pR 60)
  - (3) 100 µg Peptid + 100 µg KLKLLLLLKLK
  - (4) 100 µg Peptid + 168 µg KLKLLLLLKLK
  - (5) 100 µg Peptid + 336 µg KLKLLLLLKLK
  - (6) 100 µg Peptid + 504 µg KLKLLLLLKLK
- 12 Tage nach der 3. Impfung wurden drainierte (inguinale) Lymphknoten entfernt, und die

Lymphknotenzellen (Fig. 2) wurden *ex vivo* mit von TRP-2 (Maus-Tyrosinase-related Protein-2)-Peptid aktiviert, um IFN- $\gamma$ -produzierende, spezifische Zellen in einem ELISpot-Test zu bestimmen (Anzahl der IFN- $\gamma$ -ELISpots pro Million Lymphknotenzellen).

Fig. 2 zeigt, dass die Injektion von Peptid plus zunehmende Mengen an KLKLLLLLKLK in Mäusen zu weit mehr IFN- $\gamma$ -produzierenden spezifischen Zellen führte als wenn Mäusen Peptid alleine oder in Kombination mit Poly-L-Arginin injiziert wurde. Es wurde auch bestätigt, dass das Peptid KLKLLLLLKLK keine IFN- $\gamma$ -produzierenden, Peptid-spezifischen T-Zellen hervorruft (wie mittels ELISpot-Test bestätigt), d.h. dass nur nicht-KLKLLLLLKLK-spezifische T-Zellen bei den vorliegenden Versuchen erhalten wurden.

Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass das (synthetische, antimikrobielle) Peptid KLKLLLLLKLK die Induktion von Peptid-spezifischen T-Zellen-Reaktionen *in vivo* verbessert.

Zusammenfassend zeigte das (synthetische, antimikrobielle) Peptid KLKLLLLLKLK eine hohe "TRANSLoading" und immunstimulierende Effizienz, was anzeigt, dass die Peptide A fähig sind, APCs mit antigenen Peptiden *in vitro* und *in vivo* sehr effizient zu pulsen und gute Adjuvans/"Trägerpeptide" für antigene Peptide bei der Induktion adaptiver Immunantworten sind.

#### Literaturstellen:

Banchereau, et al. (1998), "Dendritic cells and the control of immunity", *Nature* 392(6673): 245-52.

Boman (2000), "Innate immunity and the normal microflora", *Immunol. Rev.* 173: 5-16.

Brossart, et al. (1997), "Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines", *Blood* 90(4): 1594-9.

Buschle, et al. (1998), "Chemically defined, cell-free cancer vaccines: use of tumor antigen-derived peptides or polypeptide proteins for vaccination", *Gene Therapy and molecular Biology* 1: 309-21.

Buschle, et al. (1997), "Transloading of tumor antigen-derived peptides into antigen-presenting cells", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94(7): 3256-61.

Cho, et al. (1999), "Activation of human neutrophils by a synthetic anti-microbial peptide, KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>, via cell surface calreticulin", *Eur. J. Biochem.* 266: 878-85.

Ganz, et al. (1997), "Antimicrobial peptides of leukocytes", *Curr. Opin. Hematol.* 4(1): 53-8.

Ganz, T., (1998), "Antimicrobial peptides of vertebrates", *Curr. Opin. Immunol.* 10(1): 41-4.

Ganz, et al. (1999), "Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications." *Mol. Med. Today* 5(7): 292-7.

Gudmundsson, et al. (1999), "Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system", *J. Immunol. Methods* 232(1-2): 45-54.

Harding (1995), "Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules", *Trends in Cell Biology* 5(3): 105-09.

Harding (1996), "Class I MHC presentation of exogenous antigens", *J. Clin. Immunol.* 16(2): 90-6.

Mizukawa, et al. (1999), "Presence of defensin in epithelial Langerhans cells adjacent to oral carcinomas and precancerous lesions", *Anticancer Res.* 19(4B): 2669-71.

Monaco (1992), "A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing", *Immunol. Today* 13(5): 173-9.

Nakajima, et al. (1997), "Chemotherapeutic activity of synthetic antimicrobial peptides: correlation between chemotherapeutic activity and neutrophil-activating activity", *FEBS Lett.* 415: 64-66.

Schijns (2000), "Immunological concepts of vaccine adjuvant activity", *Curr. Opin. Immunol.* 12(4): 456-63.

Schmidt, et al. (1997), "Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94(7): 3262-7.

Zanetti, et al. (1997), "The cathelicidin family of antimicrobial peptide precursors: a component of the oxygen-independent defense mechanisms of neutrophils", *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 832: 147-62.

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Cistem Biotechnologies GmbH  
 <120> Vakzin Zusammensetzung  
 <130> Vakzin Zusammensetzung  
 10 <140>  
 <141>  
 <160> 5  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 15 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 20 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid  
 <400> 1  
 25 Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 31  
 30 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid  
 35 <400> 2  
 Arg Leu Ala Gly Leu Leu Arg Lys Gly Gly Glu Lys Ile Gly Glu Lys  
 1 5 10 15  
 40 Leu Lys Lys Ile Gly Gln Lys Ile Lys Asn Phe Phe Gln Lys Leu  
 20 25 30  
 <210> 3  
 <211> 37  
 45 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid  
 50 <400> 3  
 Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu  
 1 5 10 15  
 55

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val  
 20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser  
 35

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> AMIDATION

<400> 4  
 Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 5  
 Arg Leu Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg  
 1 5 10

# PATENTANSPRÜCHE:

1. Vakzin, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens ein Antigen und ein Peptid mit einer Sequenz R<sub>1</sub>-XZX<sub>N</sub>XZX-R<sub>2</sub> aufweist, wobei  
 - N eine ganze Zahl zwischen 3 und 7, vorzugsweise 5, ist,  
 - X ein positiv geladener natürlicher und/oder nicht-natürlicher Aminosäurerest ist,  
 - Z ein Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F oder W, ist, und  
 R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -H, -NH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -COH oder einem Peptid mit bis zu 20 Aminosäureresten; X-R<sub>2</sub> auch ein Amid, Ester oder Thioester des C-terminalen Aminosäurerestes sein kann.
2. Vakzin nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X in der Peptidsequenz ein Aminosäurerest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus K, R, Ornithin oder Homoarginin ist.
3. Vakzin nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass X in der Peptidsequenz K ist.
4. Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass Z in der Peptidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus L, I oder F.
5. Vakzin nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Z in der Peptidsequenz für L steht.
6. Vakzin nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidsequenz H-KLKLLLLLK-LK-H ist.
7. Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass in der Peptid-

sequenz  $R_1$  und/oder  $R_2$  10 bis 20 Aminosäurereste ist (sind).

8. Vakzin nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  nicht negativ geladene Aminosäurereste sind.
9. Vakzin nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L, V, I, F oder W.
10. Vakzin nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L, I oder F.
11. Vakzin nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  L sind.
12. Vakzin nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  positiv geladene, natürliche und/oder nicht-natürliche Aminosäurereste sind.
13. Vakzin nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus K, R, Ornithin und Homoarginin.
14. Vakzin nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste von  $R_1$  und/oder  $R_2$  K sind.
15. Vakzin nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine weitere, die Immunantwort stimulierende Substanz umfasst.
16. Vakzin nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunantwort stimulierende Substanz ein Cytokin ist.
17. Verwendung eines Peptids, welches die Sequenz  $R_1$ -XZXZ<sub>N</sub>XZX- $R_2$ , wie in einem der Ansprüche 1 bis 16 definiert, aufweist, zur Herstellung eines Adjuvans oder Trägerproteins zur Verbesserung der Immunantwort auf mindestens ein Antigen.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvan oder Trägerprotein die Aufnahme von mindestens einem Antigen in Antigen-präsentierende Zellen (APC) verbessert.
19. Verwendung nach Anspruch 16 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvan oder Trägerprotein einem Vakzin zugesetzt wird.

## HIEZU 2 BLATT ZEICHNUNGEN

FIG. 1

