



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 03 151 T2 2004.04.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 143 934 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 03 151.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/00730**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 901 411.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/41679**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **20.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **04.06.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.04.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 9/16**

**A61K 38/19, A61K 39/39, A61K 9/51**

(30) Unionspriorität:

**115849 P 13.01.1999 US**

**116242 P 15.01.1999 US**

(73) Patentinhaber:

**Johns Hopkins University School of Medicine,  
Baltimore, Md., US**

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,  
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**LIU, Quin, Shu, Baltimore, US; SONG, Ruijiang,  
Baltimore, US; AUGUST, Thomas, J., Baltimore,  
US; LEONG, W., Kam, Ellicott City, US**

(54) Bezeichnung: **GENETISCHE IMMUNISIERUNG MIT GLEICHZEITIGER VERABREICHUNG VON NUKLEINSÄUREN UND ZYTOKINEN**

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**

## Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft verbesserte Immunisierungsverfahren für Säuger zum Erreichen zellvermittelter und humoraler Immunreaktionen.

## Stand der Technik

[0002] Nach Immunisierung kann Plasmid-DNA, die für Gene für virale und bakterielle Antigene kodiert, die Synthese der Antigene in einer nativen Form steuern und sie dem Immunsystem effizient präsentieren. Beispielsweise wurden durch Impfung mit HIV-1-DNA starke humorale und zellvermittelte Immunreaktionen in Nagern und nicht-humanen Primaten induziert [1, 2]. Die Plasmide werden üblicherweise als Bolusinjektionen in den Muskel oder mittels einer Genkanone verabreicht.

[0003] Jüngere Entdeckungen bei Nagern, daß Immunisierung mit DNA Immunreaktionen gegen virale Proteine auslösen und protektive Immunität gegen Infektion durch das Virus vermitteln kann, haben zu einem starken Interesse geführt, diese Strategie zur Entwicklung von HIV-Impfstoffen zu optimieren [3–5]. Frühere Generationen von HIV-Impfstoffen, die auf rekombinanten Antigenen oder Antigenen abgetöteter Viren beruhen, die mit einem Adjuvans formuliert wurden, konnten keine effizienten CTL-Reaktionen hervorrufen. Eine Immunisierung mit DNA bietet den Vorteil, daß das Antigen in seiner nativen Form exprimiert wird, die zu einer optimalen Prozessierung und Präsentation für die antigen-präsentierenden Zellen zur Induktion sowohl humoraler als auch zellulärer Immunreaktionen führen kann.

[0004] Obwohl Vacciniavektoren effiziente Mittel sind, um fremde Gene in vivo zu applizieren, bleiben Bedenken hinsichtlich der Sicherheit dieser Vektoren bestehen. Obwohl umfangreiche und elegante Untersuchungen durchgeführt werden, um sicherere Virusvektoren zu konstruieren, werden zunehmend nicht-virale Vektoren als Alternative vorgeschlagen. An erster Stelle für die HIV-Impfung stehen hierbei die direkte Injektion der Plasmid-DNA in das Muskel- oder Hautgewebe und der Beschuß mit DNA-beschichteten Goldpartikeln unter hohem Druck mit einer Genkanone. Leider ist die Transfektionseffizienz üblicherweise gering. Es besteht daher auf diesem Gebiet ein Bedarf an Verfahren zur Applikation von DNA, die zu einer besseren Immunreaktion führen.

[0005] Die Verwendung von Zytokinen zur Förderung einer Immunreaktion auf Impfstoffe hat große Aufmerksamkeit erregt, insbesondere auf dem Gebiet der Immuntherapie von Krebs. Ein Ansatz besteht darin, Zytokingene direkt in die Tumorzellen einzubringen [6–23]. Die Zytokine fördern entweder die Präsentation von Antigenen für T-Zellen oder sie liefern zusätzliche co-stimulierende Signale für die Aktivierung von T-Zellen. In vielen Fällen lösen die lo-

kal sekretierten Zytokine eine entzündliche Reaktion aus, die zur Abstoßung der injizierten Tumorzellen führt. In einigen Fällen können diese genetisch veränderten Tumorzellen eine systemische Immunität gegen eine nachfolgende Challenge parentaler Tumorzellen und gelegentlich sogar gegen etablierte Mikrometastasen erzeugen.

[0006] Es wurde gefunden, daß GM-CSF und TNF- $\alpha$  mit IL-12 synergistisch wirken, indem sie die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen HIV-1-MN-Impfstoff-Konstrukte fördern [1]. Bei einer getrennten Untersuchung führte eine gemeinsame Applikation von IL-12 mit HIV-1-Impfstoffen bei Mäusen zu Splenomegalie und verminderter humoraler Reaktion, während GM-CSF die gegenteilige Wirkung hat [24]. Beide Zytokine stimulierten antigenspezifische T-Zellreaktionen, wobei bei der gemeinsamen Applikation mit IL-12 eine dramatische Zunahme der CTL-Reaktion beobachtet wurde. Es besteht auf diesem Gebiet ein Bedarf an weiteren Verfahren, mit denen Säugern Zytokine appliziert werden können, um Immunreaktionen zu stimulieren.

## Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Eine Aufgabe der Erfindung ist es, feste Mikrokügelchen zur Immunisierung von Säugern bereitzustellen.

[0008] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung fester Mikrokügelchen zur Immunisierung von Säugern bereitzustellen.

[0009] Eine Aufgabe der Erfindung ist es, ein Medikament zur Immunisierung von Säugern mit festen Mikrokügelchen bereitzustellen.

[0010] Diese und weitere Aufgaben der Erfindung werden gelöst, indem ein festes Mikrokügelchen zur Verwendung im Zusammenhang mit einer genetischen Immunisierung eines Säugers bereitgestellt wird. Das Mikrokügelchen umfaßt ein Koazervat aus einem polymeren Kation und einem Polyanion; das polymere Kation kann beispielsweise ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Gelatine und Chitosan. Das Zytokin ist in dem Mikrokügelchen eingebettet.

[0011] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Medikament zur Immunisierung eines Säugers bereitgestellt, um eine Immunreaktion gegen ein Antigen auszulösen. Das Medikament umfaßt:

eine Nukleinsäure, die für ein Antigen kodiert, und ein festes Mikrokügelchen. Das Mikrokügelchen umfaßt üblicherweise ein Koazervat aus einem polymeren Kation, wie Gelatine oder Chitosan, und einem Polyanion. Das Mikrokügelchen bettet das Zytokin ein.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Bildung fester Mikrokügelchen zur Immunisierung eines Säugers bereitgestellt. Das Verfahren umfaßt den Schritt:

Bilden fester Mikrokügelchen durch Koazervation eines Polyanions und eines polymeren Kations, wobei

das polymere Kation ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chitosan und Gelatine, wobei die Koazervation in Gegenwart eines Zytokins erfolgt, wodurch das Zytokin in die festen Mikrokügelchen eingebettet wird.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0013] **Fig. 1.** Proliferation von CT-4S-Zellen als Reaktion auf mittels Mikrokügelchen appliziertes IL-4. DNA-Gelatine-Mikrokügelchen wurden mit verschiedenen Beladungsmengen von murinem IL-4 (bezeichnet mit 0, 100 und 1000 U, die der Koazervationsreaktion zugegeben wurden) hergestellt, wurden anschließend gereinigt und mit CT-4S-Zellen inkubiert. 30 Stunden nach der Zugabe der Mikrokügelchen wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-Thymidin markiert, dann wurde 18 Stunden später die mit den Zellen assoziierte Radioaktivität gemessen. Die Dosis an Mikrokügelchen ist als Gesamtmenge DNA angegeben. Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Versuchen ± SD.

[0014] **Fig. 3.** Anti-βGal-Antikörper-Reaktion in Mäusen, denen IL-4 eingebettet in Mikrokügelchen oder in freier Form injiziert wurde. Gruppen von 4 Mäusen wurden i.m. Mikrokügelchen, die mit 20 U freiem IL-4 vermischt waren, Mikrokügelchen, in die 20 U IL-4 pro 1 mg p43-clacZ-DNA eingebettet waren, DNA oder mit 20 U freiem IL-4 vermischte DNA injiziert. Jede Gruppe wurde zweimal in Abständen von vier Wochen mit insgesamt 1 mg DNA geimpft. In Woche 8 wurden die Seren der einzelnen Gruppen gepoolt und dann auf die Gesamtmenge an Anti-βGal-IgG-Antikörpern getestet. Die Daten sind Mittelwerte von drei Versuchen ± SD.

[0015] **Fig. 4.** Potenzierung von CTL-Reaktionen bei Verwendung von in Mikrokügelchen eingebettetem IL-2 und γ-IFN. Gruppen von 4 Mäusen wurden einmal i.m. 2 mg Gesamtmenge p43-clacZ-DNA entweder in Form von Mikrokügelchen, Mikrokügelchen, in die IL-2 (20 U pro 1 mg p43-clacZ-DNA) eingebettet war, Mikrokügelchen, in die IL-2 und γ-IFN (100 U pro 1 mg p43-clacZ-DNA) eingebettet waren, oder "nackte" DNA injiziert. Standard-CTL-Assays wurden in Woche 4 durchgeführt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD.

[0016] **Fig. 5.** Antigen-spezifische zytosolische Reaktion, wenn nackte DNA zur Immunisierung der Tiere mit oder ohne Mikrokügelchen, in die GM-CSF eingebettet war, verwendet wurde.

[0017] **Fig. 6.** Das für p815A kodierende Gen wurde intradermal mit oder ohne GM-CSF in Mäuse injiziert. Es wird die antigen-spezifische CTL jeder einzelnen Maus gezeigt. In **Fig. 6a** wurden nicht gleichzeitig Zytokin-Mikrokügelchen verabreicht.

#### Ausführliche Beschreibung

[0018] Die Offenbarung der früheren US-Patentanmeldungen mit den Seriennummern 08/265 966 und

08/657 913.

[0019] Die Erfinder haben gefunden, daß Mikrokügelchen-Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung von Zytokinen tagelang einen hohen lokalen Zytokinspiegel an der Impfstelle aufrechterhalten können, was co-stimulierende Signale für infiltrierende Lymphozyten liefert. Der Impfstoff der vorliegenden Erfindung umfaßt daher eine DNA, die für ein Antigen kodiert, und ein in Mikrokügelchen eingebettetes Zytokin. Die beiden Komponenten können zusammen in einer einzigen Formulierung oder getrennt verabreicht werden. Die DNA kann in jeder beliebigen Form vorliegen, eingebettet oder nackt, komplexiert oder frei. Die DNA kann sich in den Mikrokügelchen befinden, die die Zytokine liefern.

[0020] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung können Mikrokügelchen durch salzinduzierte komplexe Koazervation eines Polyanions, wie Chondroitinsulfat oder Nukleinsäuren, mit einem Polykation, wie Gelatine oder Chitosan, hergestellt werden. Auch andere Zusammensetzungen für die Mikrokügelchen sind möglich, solange eine kontrollierte Freisetzung erfolgt. Zytokine werden in die Mikrokügelchen eingebettet, um die Effizienz der genetischen Impfung zu verbessern und eine gewünschte Immunreaktion zu erzeugen. Die grundlegende durch den Impfstoff ausgelöste Immunreaktion wird durch die Wechselwirkung zwischen den spezifischen und unspezifischen Immunmechanismen beeinflusst. Der Typ von Immunzellen, der zur Impfstelle gezogen wird, kann beispielsweise die letztendliche Antitumor-Immunität bestimmen, die durch ein tumor-assoziiertes Antigen induziert wird. Das Repertoire dieser Zellen wird umgekehrt durch die zeitliche und räumliche Verteilung von Zytokinen bestimmt. Durch Einbetten der Zytokingene in die Mikrokügelchen kann die zeitliche und räumliche Verteilung der Zytokine weiter verändert werden. Dies kann die Immunreaktion in Richtung eines spezifischen Immunarms lenken, beispielsweise den Th1- oder den Th2-Weg. Diese Strategie kann beispielsweise verwendet werden, um die Immunreaktion gegen HIV-Infektion durch Betonen des humoralen oder des zellulären Arms zu modulieren.

[0021] Obwohl man jedes Zytokin verwenden kann, das sich auf humorale oder zellvermittelte Immunreaktionen auswirkt, ist GM-CSF ein besonders bevorzugtes Zytokin. GM-CSF wurde als ein kritischer Faktor bei der Induktion der Differenzierung primitiver hämatopoetischer Vorläufer zu Dendritenzellen identifiziert. In vitro benötigt diese Differenzierung wenigstens sechs Tage Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF. Bei Verabreichung als Bolusinjektion in den Muskel haben jedoch frühere Untersuchungen an Tumorigenimpfstoffen gezeigt, daß die Zytokine innerhalb von Stunden von der Injektionsstelle verschwinden. Eine kontrolliert freisetzende Formulierung mit Mikrokügelchen kann tagelang einen hohen lokalen Zytokinspiegel an der Impfstelle aufrechterhalten, was co-stimulierende Signale für infiltr-

rierende Lymphozyten liefert. Es wurde gefunden, daß GM-CSF und TNF- $\alpha$  mit IL-12 synergistisch wirken, indem sie die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen HIV-1-MN-Impfstoff-Konstrukte verbessern. Bei einer getrennten Untersuchung führte eine gemeinsame Applikation von IL-12 mit HIV-1-Impfstoffen bei Mäusen zu Splenomegalie und verminderter humoraler Reaktion, während GM-CSF die gegenteilige Wirkung hat. Beide Zytokine stimulierten antigenspezifische T-Zellreaktionen, wobei bei der gemeinsamen Applikation mit IL-12 eine Zunahme der CTL-Reaktion beobachtet wurde.

[0022] Um die rezeptorvermittelte Endozytose zu stimulieren und um möglicherweise zielgerichtet eine Zelle/ein Gewebe anzusteuern (Targeting), können Liganden mit den Mikrokügelchen konjugiert werden. Lysosomolytische Mittel können inkorporiert werden, um das Entweichen von Zytokinen oder von DNA in das Zytoplasma zu fördern. Andere bioaktive Agenzien wie RNA, Oligonukleotide, Proteine oder zahlreiche Plasmide können gleichzeitig eingebettet werden. Wichtig für die Applikation des Impfstoffs ist, daß das Proteinantigen auch in das Mikrokügelchen eingebettet sein kann, um die Immunreaktion durch Klasse II-Präsentation und, wie durch neuere Entdeckungen nahegelegt wird, auch durch Klasse I-Präsentation, wenn das Mikrokügelchen durch Antigen-präsentierende Zellen internalisiert wird, potentiell zu verstärken.

[0023] Die Bioverfügbarkeit der verabreichten Nucleinsäuren läßt sich durch Targeting der Nucleinsäuren zum endolysosomalen Weg verbessern. Dies kann beispielsweise durch LAMP-Targeting erfolgen. Das prälysosomale/lysosomale Lokalisierungssignal der LAMP (Lysosome-Associated Membrane Proteins)-Familie lysosomaler Membranproteine kann die Immunreaktion gegenüber dem Antigen deutlich verbessern. Die LAMP-Moleküle sind Typ 1-Transmembranproteine, die eine Transmembrandomäne von 24 Aminosäuren und einen zytoplasmatischen Schwanz mit 11 Aminosäuren mit einer carboxyterminalen YQ-TI-Sequenz enthalten, die notwendig und ausreichend ist, um rekombinante Proteine auf einem vesikulären Weg gezielt zu Lysosomen zu steuern. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß LAMP-Proteine gemeinsam mit MHC-Molekülen der Klasse II in prälysosomalen Kompartimenten lokalisiert sind. Eine chimäre DNA, die für ein Antigenprotein mit einem Targeting-Signal für den MHC II-Prozessierungsweg kodiert, kann dazu verwendet werden, die Präsentation des Antigens für CD4+-T-Helferzellen zu verbessern.

[0024] Die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen sind in Plasmaelektrolyten stabil und können ohne Verlust an Bioaktivität lyophilisiert werden. Daher können die Mikrokügelchen, was Herstellung, Reproduzierbarkeit und Aufbewahrung betrifft, eher wie herkömmliche pharmazeutische Formulierungen gehandhabt werden. Die Geschwindigkeit und die Dauer der Zytokinapplikation lassen sich variieren, indem

man die Eigenschaften der Mikrokügelchen verändert. Zahlreiche Zytokine lassen sich ohne weiteres verwenden, und das Verhältnis von Tumorantigen zu Zytokin kann leicht verändert werden.

[0025] Komplexe Koazervation ist ein Prozess spontaner Phasentrennung, der auftritt, wenn zwei entgegengesetzt geladene Polyelektrolyten in wäßriger Lösung gemischt werden. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den beiden Makromolekülspezies führt zur Trennung eines Koazervats (polymerreiche Phase) vom Überstand (polymerarme Phase). Dieses Phänomen kann zur Bildung von Mikrokügelchen und zur Einbettung zahlreicher verschiedenartiger Verbindungen verwendet werden. Der Einbettungsprozess kann vollständig in wäßriger Lösung und bei niedrigen Temperaturen erfolgen, und daher bestehen gute Aussichten, daß die Bioaktivität der eingebetteten Substanz erhalten bleibt.

[0026] Erfindungsgemäß wird Gelatine oder ein anderes polymeres Kation mit einer ähnlichen Ladungsdichte wie Gelatine verwendet, um mit einem Polyanion unter Bildung von Mikrokügelchen zu komplexieren. Solche polymeren Kationen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Gelatine und Chitosan. Die Quelle der Gelatine wird für unkritisch gehalten; sie kann von Rind, Schwein, Mensch oder aus einer anderen tierischen Quelle stammen. Üblicherweise besitzt das polymere Kation ein Molekulargewicht von 19000-30000. Poly-L-Lysin oder Chitosan eignen sich besonders als polymeres Kation der vorliegenden Erfindung. Polyaminosäuren, synthetisch oder natürlich vorkommend, wie Polylysin, Polylysin-Polyarginin, Polyarginin, Protamin, Spermin, Spermidin etc., können ebenfalls verwendet werden. Auch Polysaccharide können verwendet werden. Zweckmäßig wird Natriumsulfat verwendet, um die Koazervation von polymerem Kation und Nucleinsäuren zu induzieren. Ethanol in einer Konzentration von etwa 40 bis 60% kann ebenfalls zur Induktion der Koazervation verwendet werden. Auch Chondroitinsulfat kann in die Mikrokügelchen inkorporiert werden, was besonders vorteilhaft ist, wenn andere Substanzen wie Arzneimittel und lysosomolytische Mittel in das Mikrokügelchen inkorporiert werden sollen. Üblicherweise liegt die Konzentration an Chondroitinsulfat zwischen etwa 0,005% und 0,1%.

[0027] Die Größe der Mikrokügelchen beträgt weniger als 5 Mikrometer. Besonders bevorzugt sind Mikrokügelchen mit weniger als 3 Mikrometer und ganz besonders bevorzugt sind Mikrokügelchen mit weniger als 2, 1, 0,5 und 0,1 Mikrometer. Obwohl die Größe durch die Koazervationsbedingungen und die Größe des einzelnen Polyanions und Polykations beeinflusst werden kann, können Mikrokügelchen der gewünschten Größe auch durch Größenselektion mit einer Methode erhalten werden, bei der die Mikrokügelchen auf Basis ihrer Größe aufgetrennt werden.

[0028] Targeting-Liganden können, falls gewünscht, direkt an die Oberfläche des Mikrokügelchens gebunden werden, oder sie können mittels einer "Brü-

cke" oder eines "Spacers" indirekt angehängt werden. Wegen der Aminogruppen, die von den Lysingruppen der Gelatine stammen, kann die Oberfläche der Mikrokügelchen zur direkten Kupplung von Targeting-Gruppen leicht derivatisiert werden. Beispielsweise können Carbodiimide als Derivatisierungsmittel verwendet werden. Alternativ können Spacer (Linkermoleküle und derivatisierende Gruppen an Targeting-liganden), beispielsweise Avidin-Biotin, zur indirekten Kupplung von Targeting-Liganden an die Mikrokügelchen verwendet werden. Biotinylierte Antikörper und/oder andere biotinylierte Liganden können wegen der hohen Affinität von Biotin ( $k_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) für Avidin (Hazuda et al., 1990, Processing of precursor interleukin 1 Beta and inflammatory disease, *J. Biol. Chem.*, 265: 6318-22, Wilchek et al., 1990, Introduction to avidin-biotin technology, *Methods In Enzymology*, 184: 5-13) effizient an die Avidin-beschichtete Oberfläche der Mikrokügelchen gekuppelt werden. Orientierungsselektives Anhängen von IgGs läßt sich durch Biotinylierung des Antikörpers an den Oligosaccharidgruppen erreichen, die sich am  $F_c$ -Teil finden (O'Shannessy et al., 1984, A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties, *Immunol. Lett.*, 8: 273-277). Diese Anordnung hilft, die Gesamtzahl verfügbarer Bindungsstellen zu erhalten, und sorgt dafür, daß die angehängten Antikörper weniger immunogen für Zellen wie Makrophagen sind, die den  $F_c$ -Rezeptor tragen. Andere Sparer als die Biotin-Avidin-Brücke, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, können ebenfalls verwendet werden. Beispielsweise kann Staphylococcus-Protein A auf die Mikrokügelchen aufgebracht werden, um die  $F_c$ -Teile von Immunglobulinmolekülen an die Mikrokügelchen zu binden.

[0029] Die Vernetzung von Linkermolekülen oder Targeting-Liganden mit dem Mikrokügelchen wird dazu benutzt, um die Stabilität des Mikrokügelchens zu verbessern und das Linkermolekül oder den Targeting-Liganden kovalent an das Mikrokügelchen zu binden. Der Vernetzungsgrad wirkt sich unmittelbar auf die Geschwindigkeit aus, mit der die Nukleinsäuren aus den Mikrokügelchen freigesetzt werden. Die Vernetzung kann mit Glutaraldehyd, Carbodiimiden wie EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), Carboxylverbrückung (Peptidbindung), Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, Dimethylsuberimidate etc. erfolgen.

[0030] Erfindungsgemäße Targeting-Liganden sind alle Moleküle, die an spezifische Typen von Zellen im Körper binden.

[0031] Dies können alle Arten von Molekülen sein, für die ein zellulärer Rezeptor existiert. Vorzugsweise werden die zellulären Rezeptoren nur auf bestimmten Zelltypen exprimiert. Beispiele für Targeting-Liganden, die verwendet werden können, sind Hormone, Antikörper, Zelladhäsionsmoleküle, Saccharide, Arzneimittel, die an Zellrezeptoren binden, und Neurotransmitter.

[0032] Die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung haben gute Beladungseigenschaften.

[0033] Die erfindungsgemäße Koazervation beinhaltet üblicherweise die Wechselwirkung von polymeren Kationen und Polyanionen. Weil dieser Prozess von der Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen polymeren Kationen und den negativ geladenen Polyanionen, beispielsweise Nukleinsäuren, abhängt, kann er als ein komplexer Koazervationsprozess betrachtet werden. Natriumsulfat (oder Ethanol) induzieren jedoch die Koazervationsreaktion, indem sie einen Phasenübergang induzieren, und daher könnte er auch als einfache Koazervationsreaktion betrachtet werden. Nukleinsäuren können in der Koazervationsmischung in einer Konzentration von 1 ng/ml bis 500 µg/ml vorliegen. Zweckmäßig haben die Nukleinsäuren eine Länge von wenigstens 2-3 kb. Natriumsulfat kann zwischen 7 und 43 mM vorliegen. Gelatine oder andere polymere Kationen können zwischen etwa 2 und 7% in der Koazervationsmischung vorhanden sein.

[0034] Ein attraktives Mikrokügelchen-Applikationssystem erfordert ein feines Gleichgewicht zwischen Faktoren wie Einfachheit der Herstellung, Kosteneffizienz, Grad der Nukleinsäurebeladung, Fähigkeit zur kontrollierten Freisetzung, Lagerstabilität und Immunogenität der Komponenten. Die hier beschriebenen Mikrokügelchen bieten Vorteile im Vergleich mit anderen partikulären Applikationssystemen, einschließlich dem Liposomensystem. Die Probleme von Instabilität, geringem Beladungsgrad und Fähigkeit zur kontrollierten Freisetzung werden mit dem polymeren Mikrokügelchensystem besser gelöst. Gelatine hat zunehmend biologische Verwendung erlangt, die wegen der Biokompatibilität und enzymatischen Abbau-barken in vivo vom chirurgischen Gewebekleber (Weinschelbaum et al., 1992, Surgical treatment of acute type A dissecting aneurysm with preservation of the native aortic valve and use of biologic glue. Follow-up to 6 years, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 130: 369-74) über quantitative immunhistochemische Assays (Izumi et al., 1990, Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field, *J. Clinical Microbiol.*, 28: 525-9) bis zum Träger für die Arzneimittelapplikation reicht (Tabata et al., 1991, Effects of recombinant alphainterferon-gelatin conjugate on in vivo murine tumor cell growth, *Cancer Res.*, 51: 5532-8). Verglichen mit anderen synthetischen Polymersystemen, wie den ausgiebig untersuchten Polylactat/Polyglycol-Copolymeren, sind die milden Bedingungen für die Formulierung der Mikrokügelchen reizvoll. Anders als bei der Lösungsmittelverdampfung und den Heißschmelzmethoden, die zur Formulierung synthetischer polymerer Mikrokügelchen verwendet wurden, erfordert die komplexe Koazervation weder Kontakt mit organischen Lösungsmitteln noch Hitze. Sie eignet sich auch besonders, um Biomakromoleküle wie Zytokine und Nukleinsäuren nicht nur durch passives Einfangen aus Lösungsmitteln (Solvent-Capturing), sondern auch

durch direkte Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung einzubetten.

[0035] Anders als virale Vektoren, mit denen sich keine Gene applizieren lassen, die größer als 10 kb sind, hat das Applikationssystem auf Basis der Mikrokügelchen keine solchen Größenbeschränkungen. Es können Nukleinsäuremoleküle größer als etwa 2 kb verwendet werden, und sogar Nukleinsäuremoleküle größer 10 kb können verwendet werden. Üblicherweise ist die Nukleinsäure größer als 300 Basen und üblicherweise größer als 0,5, 1, 2, 5 oder 10 kb. Üblicherweise ist das Nukleinsäuremolekül kleiner als 200, 100 oder 50 kb.

[0036] Im allgemeinen hängt das Spektrum möglicher Targets vom Injektionsweg ab, z.B. intravenös oder intraarteriell, subkutan, intraperitoneal, intrathekal etc. Bei systemischen Injektionen wird die Spezifität dieses Applikationssystems durch die Zugänglichkeit des Targets für die im Blut befindlichen Mikrokügelchen beeinflusst, was wiederum durch den Größenbereich der Teilchen beeinflusst wird. Die Größe der Teilchen wird durch die Temperatur, die Konzentration der einzelnen Komponenten und den pH der Koazervationsmischung beeinflusst. Die Teilchen können auch größenfraktioniert werden, z.B. durch Ultrazentrifugation über einen Sucrosegradienten. Teilchen mit einer Größe von weniger als 150 nm können in den interstitiellen Raum gelangen, indem sie durch die Fensterungen hindurchtreten, die die Wände der meisten Blutgefäße auskleiden. Unter solchen Umständen gibt es ein umfangreiches Spektrum von Zellen, die als Target dienen können. Eine verkürzte Liste von Zellen, die als Target dienen können, umfaßt die Parenchymzellen des Lebersinusoids, die Fibroblasten der Bindegewebe, die Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas, die Herzmyozyten, die Haupt- und Belegzellen des Darms, die Osteozyten und Chondrozyten des Knochens, Keratinozyten, Nervenzellen des peripheren Nervensystems, Epithelzellen der Niere und der Lunge, Sertolizellen der Hoden etc. Die Targets für Teilchen mit einer Größe über 0,2 Mikrometer befinden sich hauptsächlich im vaskulären Kompartiment. Hier umfassen die als Targets geeigneten Zellen Erythrozyten, Leukozyten (d.h. Monozyten, Makrophagen, Bund T-Lymphozyten, Neutrophile, natürliche Killerzellen, Nachkommenzellen, Mastzellen, Eosinophile), Thrombozyten und Endothelzellen. Es ist jedoch nicht erforderlich, daß die Zytokin enthaltenden Mikrokügelchen von den Zellen aufgenommen werden. Sie können ihre vorteilhafte Wirkung auch extrazellulär ausüben. Die Größe der Teilchen ist also für die Zytokinapplikation unkritisch.

[0037] Das Zytokin und die DNA müssen nicht genau zur selben Zeit oder im selben Träger verabreicht werden. Sie können getrennt formuliert und hintereinander, d.h. innerhalb weniger Sekunden oder Minuten, verabreicht werden. Alternativ kann es zweckmäßig sein, daß die Verabreichungen zeitlich Stunden oder sogar Tage getrennt voneinander erfolgen.

Wenn die Verabreichungen innerhalb von weniger als 72 Stunden an dasselbe Individuum erfolgen, hat erfindungsgemäß eine gleichzeitige Verabreichung stattgefunden.

[0038] Die obige Offenbarung beschreibt die vorliegende Erfindung in allgemeiner Form. Ein vollständigeres Verständnis läßt sich unter Bezug auf die folgenden spezifischen Beispiele erlangen, die lediglich der Veranschaulichung dienen und den Umfang der Erfindung nicht einschränken sollen.

#### BEISPIEL 1

##### Immunologische Reaktionen von pCI-clacZ-Plasmid-DNA-Vektoren.

[0039] Die Anti-βGal-Immunreaktionen, die durch zwei lacZ-Expressionsvektoren ausgelöst wurden, die sich hauptsächlich in der Anwesenheit der ade-no-assoziierten viralen terminalen "Inverted Repeats" (AAV-ITR) unterscheiden, wurden ausgewertet. Die Insertion der CMV-IntronA-lacZ (CMV/lacZ)-Kassette von p43-clacZ in einen Expressionsvektor, dem die AAV-ITR fehlten (pCI-neo), führte bei Mäusen, die i.m. mit "nackter" DNA immunisiert waren, zu deutlich verminderten Anti-βGal-Antikörpern und CTL-Reaktionen. Bei hoher DNA-Dosis (100 mg) übertraf der p43-clacZ-Vektor den pCI-clacZ-Vektor ebenfalls noch, obwohl der Unterschied in den Reaktionen im Vergleich zu dem, der bei der niedrigen Dosis (1 mg) beobachtet wurde, signifikant geringer war. Mit Ausnahme des Gens für die Neomycinresistenz ("neo") auf pCI-clacZ besteht der einzige Unterschied zwischen pCI-clacZ und p43-clacZ in den AAV-ITR, die die CMV/lacZ-Kassette flankieren. Da das neo-Gen nicht zur Genexpression von LacZ beiträgt und es bei Untersuchungen, bei denen es eingesetzt wurde, keine bekannten immunologischen Folgen hat, lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die bei den Anti-βGal-Immunreaktionen beobachteten Unterschiede auf die Anwesenheit der AAV-ITR zurückzuführen sind. In vitro-Transfektionsstudien mit Lipofectamin-Reagenzien, die an 293-Zellen durchgeführt wurden, zeigten für diese beiden Vektoren keine Unterschiede in der Stärke der Genexpression (Daten nicht gezeigt), was vermuten läßt, daß die Unterschiede in der Immunreaktion nicht mit der Stärke der Genexpression zusammenhängen.

#### BEISPIEL 2

##### Immunologische Reaktionen von pCI-clacZ-Plasmid-DNA-Vektoren.

[0040] Die Anti-βGal-Immunreaktionen, die durch zwei lacZ-Expressionsvektoren ausgelöst wurden, die sich hauptsächlich in der Anwesenheit der ade-no-assoziierten viralen terminalen "Inverted Repeats" (AAV-ITR) unterscheiden, wurden ausgewer-

tet. Die Insertion der CMV-IntronA-lacZ (CMV/lacZ)-Kassette von p43-clacZ in einen Expressionsvektor, dem die AAV-ITR fehlten (pCI-neo), führte bei Mäusen, die i.m. mit "nackter" DNA immunisiert waren, zu deutlich verminderten Anti- $\beta$ Gal-Antikörpern und CTL-Reaktionen. Bei hoher DNA-Dosis (100 mg) übertraf der p43-clacZ-Vektor den pCI-clacZ-Vektor ebenfalls noch, obwohl der Unterschied in den Reaktionen im Vergleich zu dem, der bei der niedrigen Dosis (1 mg) beobachtet wurde, signifikant geringer war. Mit Ausnahme des Gens für die Neomycinresistenz ("neo") auf pCI-clacZ besteht der einzige Unterschied zwischen pCI-clacZ und p43-clacZ in den AAV-ITR, die die CMV/lacZ-Kassette flankieren. Da das neo-Gen nicht zur Genexpression von LacZ beiträgt und es bei Untersuchungen, bei denen es eingesetzt wurde, keine bekannten immunologischen Folgen hat, lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die bei den Anti- $\beta$ Gal-Immunreaktionen beobachteten Unterschiede auf die Anwesenheit der AAV-ITR zurückzuführen sind. In vitro-Transfektionsstudien mit Lipofectamin-Reagenzien, die an 293-Zellen durchgeführt wurden, zeigten für diese beiden Vektoren keine Unterschiede in der Stärke der Genexpression (Daten nicht gezeigt), was vermuten läßt, daß die Unterschiede in der Immunreaktion nicht mit der Stärke der Genexpression zusammenhängen.

#### BEISPIEL 3

Zytokinproduktion von Lymphozyten aus mit Mikrokügelchen geimpften Mäusen.

[0041] Um die immunologische Reaktion von Mäusen, die mit Mikrokügelchen geimpft waren, die verschiedene Dosen von IL-4 enthielten, genauer zu charakterisieren, wurden die Lymphozyten geerntet, mit  $\beta$ Gal-Protein stimuliert und anschließend auf IL-4- und  $\gamma$ -INF-Produktion getestet. Übliche ELISA-Assays, die mit drei Tage lang kultiviertem Serum durchgeführt wurden, ergaben, daß Mäuse, die mit Mikrokügelchen mit zunehmendem IL-4-Gehalt immunisiert worden waren, nach erneuter Stimulierung mit Antigenen proportional mehr IL-4 produzierten. Bei diesen Seren wurde eine dosisbezogene Abnahme der  $\gamma$ -INF-Produktion beobachtet. Da die Produktion von IL-4 mit aktiv proliferierenden  $T_h^2$ -Helferzellen assoziiert ist, während die  $\gamma$ -INF-Produktion mit  $T_h^1$ -Helferzellen assoziiert ist, wird gefolgert, daß die Reaktion der  $T_h^2$ -Helferzellen bei Mäusen, die mit IL-4-Mikrokügelchen geimpft waren, potenziert wurde, während die Reaktion der  $T_h^1$ -Helferzellen gesenkt wurde. Dieses Ergebnis, in Kombination mit einer dosisbezogenen Potenzierung von Anti- $\beta$ Gal-Antikörpern und einer gleichzeitigen Hemmung von CTL-Reaktionen, steht in Einklang mit einem IL-4-vermittelten immunologischen Switch von einer  $T_h^1$ -lastigen Reaktion auf eine  $T_h^2$ -lastige Reaktion.

#### BEISPIEL 4

Die Wirkungen von IL-4 bei Gabe in in Mikrokügelchen eingebetteter Form gegenüber freier Form.

[0042] Die Effizienz von IL-4 bei der Potenzierung einer Antikörperreaktion wurde an Mäusen untersucht, die mit Mikrokügelchen geimpft waren, die IL-4 entweder in in Mikrokügelchen eingebetteter Form oder in freier Form enthielten. ELISA-Assays, die in Woche 8 (nach zwei Immunisierungen) an Mäuseserum durchgeführt wurden, zeigten, daß diejenigen, denen Mikrokügelchen injiziert worden waren, die mit freiem IL-4 vermischt waren, keine stärkere Anti- $\beta$ Gal-Antikörperreaktion generieren konnten (**Fig. 3**). Im Gegensatz dazu generierten Mäuse, die mit IL-4 geimpft waren, das in Mikrokügelchen eingebettet war, eine deutlich stärkere Antikörperreaktion. Außerdem konnten Mäuse, denen "nackte" DNA in Gegenwart der gleichen IL-4-Dosis injiziert worden war, im Vergleich mit solchen, die mit DNA allein geimpft waren, ebenfalls keine stärkere Immunreaktion hervorbringen. Die Daten lassen vermuten, daß die bei obigem Versuch eingesetzte IL-4-Dosis nur in der in Mikrokügelchen eingebetteten Form eine Potenzierung der Antikörperreaktion bewirkt.

#### BEISPIEL 5

Potenzierung der CTL-Reaktion bei Verwendung von in Mikrokügelchen eingebettetem IL-2 und  $\gamma$ -INF.

[0043] Die Möglichkeit einer Modulation der Immunreaktion durch gleichzeitig mit Mikrokügelchen applizierte Zytokine wurde ferner durch die Untersuchung der Wirkungen von IL-2 und  $\gamma$ -INF, die in Mikrokügelchen eingebettet waren, auf die CTL-Reaktionen nachgewiesen. Mäuse, die mit einer einzigen Injektion von Mikrokügelchen immunisiert waren, die p43-clacZ-DNA allein (Gesamtmenge 2 mg DNA), zusammen mit IL-2 oder zusammen mit IL-2 und  $\gamma$ -INF enthielten, wurden in Woche 4 auf die Ausbildung von Anti- $\beta$ Gal-CTL-Reaktionen untersucht. Mäuse, die mit Mikrokügelchen allein oder mit nackter DNA geimpft waren, bildeten eine schlechte CTL-Reaktion aus (**Fig. 4**). Dies stand in Einklang mit unseren früheren Untersuchungen, die zeigten, daß für starke CTL-Reaktionen wenigstens zwei oder drei Immunisierungen notwendig waren. Wenn IL-2 jedoch in den Mikrokügelchen enthalten war, wurde eine verstärkte CTL-Reaktion beobachtet. Die CTL-Reaktion wurde synergistisch potenziert, wenn  $\gamma$ -INF gleichzeitig mit IL-2 in den Mikrokügelchen appliziert wurde. Die Inklusion sowohl von IL-2 als auch von  $\gamma$ -INF in die Mikrokügelchen verbesserte die Anti- $\beta$ Gal-CTL-Reaktion bei nur einer einzigen Immunisierung von 25% Lyse (bei einem E : T-Verhältnis von 64 : 1) auf wenigstens 65%.

## BEISPIEL 6

[0044] Zum Vergleich des LAMP-Targetingeffekts testeten wir t-PA LSS/HIVgagINS/LAMP gegenüber HIVgagINS (nackte DNA) mit und ohne 1 g GM-CSF in Mikrokügelchen. Wie in **Fig. 5** gezeigt, zeigten Tiere, die mit dem Chimären Gen immunisiert waren, bei einem E : T-Verhältnis von 10 eine HIV-1 gag-spezifische CTL-Reaktion von 38,2 Lyse im Vergleich mit 21,4% für das Gen ohne LAMP-Targeting. Wenn auch 1 g in Mikrokügelchen eingebettetes GM-CSF im Impfstoff enthalten war, waren die entsprechenden CTL-Reaktionen bei gleichem E : T-Verhältnis auf 100% bzw. 75,6 Lyse erhöht. Für das Gen ohne LAMP-Targeting konnte die gleichzeitige Applikation von in Mikrokügelchen eingebettetem GM-CSF bei einem E : T-Verhältnis von 10 die HIV gag-spezifische CTL-Reaktion von 21% Lyse auf 75,6 Lyse verbessern, wohingegen mit dem LAMP-Targeting-Gen eine Verbesserung von 38,2 auf 100 erfolgte. Dies zeigt eindeutig den Vorteil, der bei Co-Applikation von Zytokin, das in Mikrokügelchen mit verzögerter Freisetzung eingebettet ist, erhalten wird.

## Klonierungsverfahren

[0045] Die Leadersignal-Sequenz (LSS) von humanem Gewebefibrinogenaktivator (t-PA) wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der genomischen DNA von humanen 293-Zellen amplifiziert, wobei die Primer t-PA-Sense (5' AAG CTGGCTAGCC CACCATGGATGC AATGAAGA GAGGG CTC 3') und t-PA & c-myc-Antisense (5' CGGCC GCTCGAG CAGATC CTCTTCTGA GATGAGTTTTTGTTC-GAGGGGCGGGACACAGGGATC 3') verwendet wurden. Das c-myc-Epitop wurde zu dem Antisense-Primer gegeben. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit NheI und XhoI verdaut und in pCDNA3.1(-) kloniert. Das HIV-1 gag INS-Gen wurde aus Plasmid HIV-1 gag INS neo pCDNR3.1 mit den Primern gagINS-Sense (5' TCTAGACTCGAG ATGGGTGCGAGAGCGTCA 3') und gagINS-Antisense (5'GTGGTGAATTCCTGTGAC-GAGGGGTCGTT 3') amplifiziert und nach Verdau mit XhoI und EcoRI in t-PA LSS & c-myc neo pCDNA3.1(-) kloniert.

[0046] Die Transmembrandomäne und der C-terminale Schwanz (Tmct) des Lysosom-assoziierten Membranproteins (LAMP-1) der Maus wurde mittels PCR aus dem Plasmid LAMP-1 neo pCDNA3.1, das das LRMP-1-Gen enthält, mit den Primern LAMP Tmct-Sense (5' TCTGCAGAATTCCTGATC-CCCATCGC TG TG 3') und LAMP Tmct-Antisense (5' AAGCTTGGTACCCTAGATAG TCTGGTAGCC 3') amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Verdau mit EcoRI und KpnI in t-PA LSS & c-myc/HIV-1 gag INS neo pCDNA3.1(-) kloniert, was zu unserem t-PA LSS/HIV-1 gag INS/LRMP neo pCDNA3.1 (-)-Konstrukt führte, das den "immediate early" Promotor des Cytomegalovirus (CMV) enthält, um die Expression

unseres Chimären Gens zu verstärken.

## Immunisierung von Mäusen und CTL-Assay

[0047] Verwendeter Mäusestamm: Der Mäusestamm Balb/c(H2d) wurde von Charles Rivers erhalten. DNA wurde durch CsCl/Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt. Balb/c-Mäuse wurden zweimal intramuskulär in Abständen von zwei Wochen mit 10 g Plasmid immunisiert. Die DNA wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS gelöst und 25 l (5 g) wurden mit oder ohne 1 g GM-CSF in Mikropartikeln mit einer 28er-Nadel in jeden Tibialis anterior Muskel injiziert. Drei Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und ihre Milzen und Lymphknoten wurden geerntet. Splenozyten wurden durch Homogenisieren der Milzen und Lymphknoten und anschließendes Passieren der Suspension durch ein Nylonsieb und nachfolgende Ficoll-Gradientenzentrifugation isoliert.

[0048] Splenozyten aus naiven Mäusen wurden mit HIV-1 gag-spezifischem Klasse I-MHC-Peptid markiert und durch Behandlung mit Psoralen und W-Exposition für APC-Zellen inaktiviert. T-Zellen wurden durch Nicht-Adhärenz an Nylonwolle-Säulen angereichert und dann in Gegenwart von IL-2 und APC-Zellen sieben Tage lang inkubiert. Die stimulierten Splenozyten wurden dann in einem üblichen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay für CTL-Aktivität als Effektoren verwendet.

[0049] Zytokin-Mikrokügelchen: Mikrokügelchen, die GM-CSF enthielten, wurden wie zuvor beschrieben hergestellt.

## BEISPIEL 7

[0050] Das für p815A, ein für Mastrozytoma-Zellen spezifisches Antigen, kodierende Gen wurde intradermal mit oder ohne GM-CSF-Mikrokügelchen mit kontrollierter Freisetzung in DAB/2-Mäuse injiziert. **Fig. 6A** zeigt die antigenspezifische CTL jeder einzelnen Maus (10 in einer Gruppe). Es wurde keine signifikante CTL beobachtet, was mit den in der Literatur typischen Ergebnissen übereinstimmte, wenn der DNA-Impfstoff ohne Booster-Shots verabreicht wird. Eine signifikante CTL konnte in 10 von 10 Tieren beobachtet werden, wenn die DNA mit kontrollierter Applikation von GM-CSF in Mikrokügelchen verabreicht wurde.

## Literaturstellen:

1. Ahlers, J.D., N. Dunlop, D.W. Alling, P.L. Nara und J.A. Berzofsky, Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs. *J Immuno*, 1997. 158(8): S. 3947.
2. Arthos, S.L., et al., Simian immunodeficiency Virus DNA Vaccine Trial in Macaques. *J Viro*, 1996. 70: S. 3978.
3. Donnelly, J.J., J.B. Ulmer und M.A. Liu, DNA vac-

- cines. *Life Sci*, 1997. 60: S. 163.
4. Regby, M.A., et al., Comparative efficiency of feline immunodeficiency virus infection by DNA inoculation. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1997. 13(5): S. 405.
  5. Wilson, J.M., Vectors-shuttle vehicles for gene therapy. *Clin Exp Immunol*, 1997. 107 Suppl 1: S. 31.
  6. Tepper, R., P. Pattengale and P. Leder, Murine interleukine-4 displays potent anti-tumor activity. *in vivo. Cell*, 1989. 57 (5. Mai): S. 503–512.
  7. Watanabe, Y., K. Kuribayashi, S. Miyatake, K. Nishihara, E. Nakayama, T. Taniyama and T. Sakata, Exogenous expression of mouse interferon cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci*, 1989. 86 (Dezember): S. 9456–9460.
  8. Fearon, E., et al., Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*, 1990. 60 (9. Februar): S. 397–403.
  9. Gansbacher, B., R. Bannerji, B. Daniels, K. Zier, K. Cronin and E. Gilboa, Retroviral vector-mediated interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer research*, 1990. 50 (15. Dezember): S. 7820–7825.
  10. Golumbek, P.T., A.J. Lazenby, H.I. Levitsky, E.M. Jaffe, H. Karasuyama, M. Baker and D.M. Pardoll, Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete Interleukin-4. *Science*, 1991. 254; S. 713–716.
  11. Hock, H., M. Darsch, T. Diarnantstein and T. Blankenstein, Interleukin 7 induces CD4 T cell-dependent tumor rejection. *J Exp Med*, 1991. 174 (Dezember): S. 1291–1298.
  12. Restifo, N., P. Speiss, S. Karp, J. Mule and S. Rosenberg, A nonimmunogenic sarcoma transduced with the cDNA for interferon elicits T cells against wild-type tumor: correlation with antigen presentation capability. *J Exp Med*, 1992. 175 (Juni): S. 1423–1431.
  13. Asher, A., et al., Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor: evidence for paracrine immune effects of tumor necrosis factor against tumors, *J of Immunology*, 1991. 9 (1. Mai): S. 3227–3234.
  14. Cavallo, F., M. Geovarelli, A. Gulino, A. Vacca, A. Stoppacciaro, A. Modesti and G. Forni, Role of neutrophils and CD4 T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J of Immunology*, 1992. 11 (1. Dezember): S. 3627–3635.
  15. Colombo, M., G. Ferrari, A. Stoppacciaro, M. Parenza, M. Rodolfo, F. Mavilio and G. Parmiani, Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma *in vivo*. *J Exp Med*, 1991, 173 (April): S. 889–897.
  16. Colombo, M., L. Lombardi, A. Stoppacciaro, C. Melani, M. Parenza, B. Bottazzi and G. Parmiani, Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition *in vivo* of immunology. *J. of Immunology*, 1992. 149, Nr. 1 (1. July): S. 113–119.
  17. Dranoff, G., et al., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci*, 1993. 90 (April): S. 3539–3543.
  18. Porgador, A., E. Tzeheval, E. Vadai, M. Feldman and L. Eisenbach, Immunotherapy via gene therapy: comparison of the effects of tumor cells transduced with the interleukin-2, interleukin-6 or interferon genes. *J Immunother*, 1993. 14, Nr. 3: S. 191–201.
  19. Porgador, A., M. Feldman and L. Eisenbach, Immunotherapy of tumor metastasis via gene therapy. *Nat Immun*, 1994. 13: S. 113–130.
  20. Patel, P., C. Flemming, S. Russell, S. Eccles and M. Collins, Cytokine gene transfer as a therapeutic strategy. *J of Immunotherapy*, 1993. 14, Nr. 4: S. 310–313.
  21. Yanagihara, K., T. Seyama and Y. Watanabe, Antitumor potential of interferon: retroviral expression of mouse interferon cDNA in two kinds of highly metastatic mouse tumor lines reduces their tumorigenicity. *Nat Immun*, 1994. 13: S. 102–112.
  22. Zatloukal, K., et al., Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2 based vaccine. *J. Immunology*, 1995. 154: S. 3406.
  23. Tahara, H., et al., Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J. Immunology*, 1995. 154: S. 6466.
  24. Kim, J.J., et al., *In vivo* engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J Immunol*, 1997. 158: S. 816.

### Patentansprüche

1. Festes Mikrokügelchen von weniger als 5 Mikrometer zur Verwendung bei der genetischen Immunisierung eines Säugers, umfassend ein polymeres Kation, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Chitosan, Gelatine, Poly-L-Lysin, Polylysin, Polylysine-Polyarginin, Polyarginin, Protamin, Spermin und Spermidin, wobei ein Zytokin in dem Mikrokügelchen eingebettet ist, wobei das feste Mikrokügelchen keine DNA umfaßt.
2. Mikrokügelchen nach Anspruch 1, welches Gelatine umfaßt.
3. Mikrokügelchen nach Anspruch 1, welches Chitosan umfaßt.
4. Mikrokügelchen nach Anspruch 1, wobei ein Zelltargeting-Ligand an das Mikrokügelchen gebunden ist.

5. Mikrokügelchen nach Anspruch 4, wobei der Targeting-Ligand mittels Glutaraldehyd-Verknüpfung kovalent an das Mikrokügelchen gebunden ist.

6. Mikrokügelchen nach Anspruch 1, wobei das Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4,  $\gamma$ -IFN und Kombinationen davon.

7. Mikrokügelchen nach Anspruch 1, welches ferner ein eingebettetes Antigen umfaßt.

8. Verwendung einer für ein Antigen codierenden Nukleinsäure und eines festen Mikrokügelchens, das ein eingebettetes Zytokin umfaßt, wobei das Mikrokügelchen keine DNA umfaßt, zur Herstellung eines Medikaments zum Immunisieren eines Säugers, um eine Immunreaktion gegen ein Antigen auszulösen.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Mikrokügelchen ein polymeres Kation umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gelatine und Chitosan.

10. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur Injektion in einen Muskel ist.

11. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zur subkutanen Injektion ist.

12. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Medikament zum Beschuß mit Mikrokügelchen aus einer Hochdruck-Genkanone ist.

13. Verfahren zur Bildung von festen Mikrokügelchen zur Immunisierung eines Säugers, umfassend die Schritte:

Bilden fester Mikrokügelchen durch Koazervation eines Polyanions und eines polymeren Kations, wobei das polymere Kation ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chitosan, Gelatine, Poly-L-Lysin, Polylysine, Polylysine-Polyarginin, Polyarginin, Protamin, Spermin und Spermidin, wobei die Koazervation in Gegenwart eines Zytokins erfolgt, wobei das Polyanion keine Nukleinsäure ist, wodurch das Zytokin in die festen Mikrokügelchen eingebettet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, welches ferner die Schritte umfaßt:

Verknüpfen eines Zelltargeting-Liganden mit den Mikrokügelchen.

15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Koazervation in Gegenwart von Natriumsulfat erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das polymere Kation Gelatine ist.

17. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das polymere Kation Chitosan ist.

18. Verfahren nach Anspruch 13, wobei ein Targeting-Ligand an die Oberfläche des Mikrokügelchens gebunden wird, wobei der Targeting-Ligand ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Hormonen, Zelladhäsionsmolekülen, Sacchariden, Arzneimitteln, die an Zellrezeptoren binden, und Neurotransmittern.

19. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Gelatine in dem Koazervationsschritt in einer Konzentration von etwa 2–7% vorliegt.

20. Verfahren nach Anspruch 13, wobei Natriumsulfat in dem Koazervationsschritt in einer Konzentration zwischen 7 und 43 mM vorliegt.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

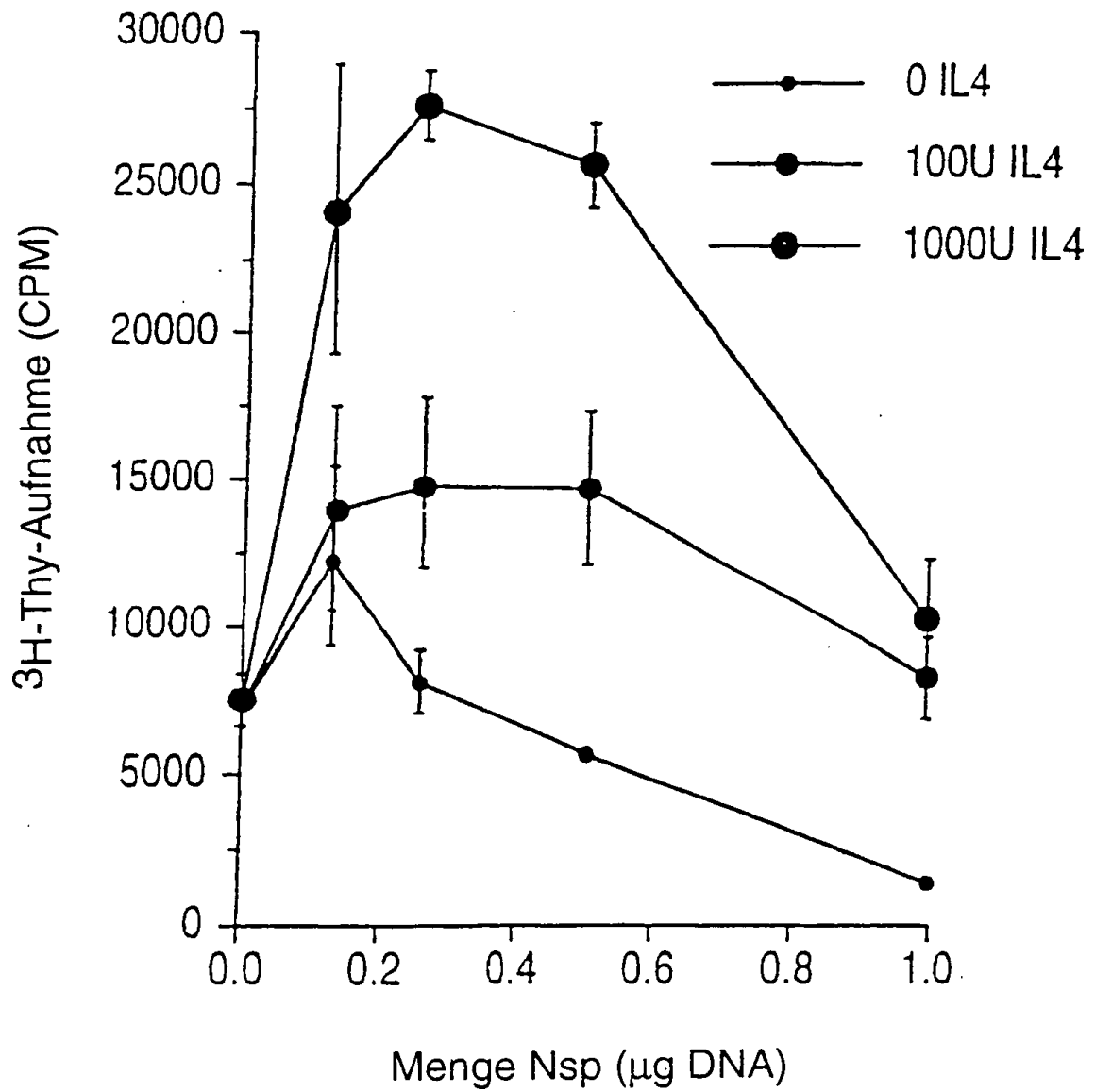


FIG. 3

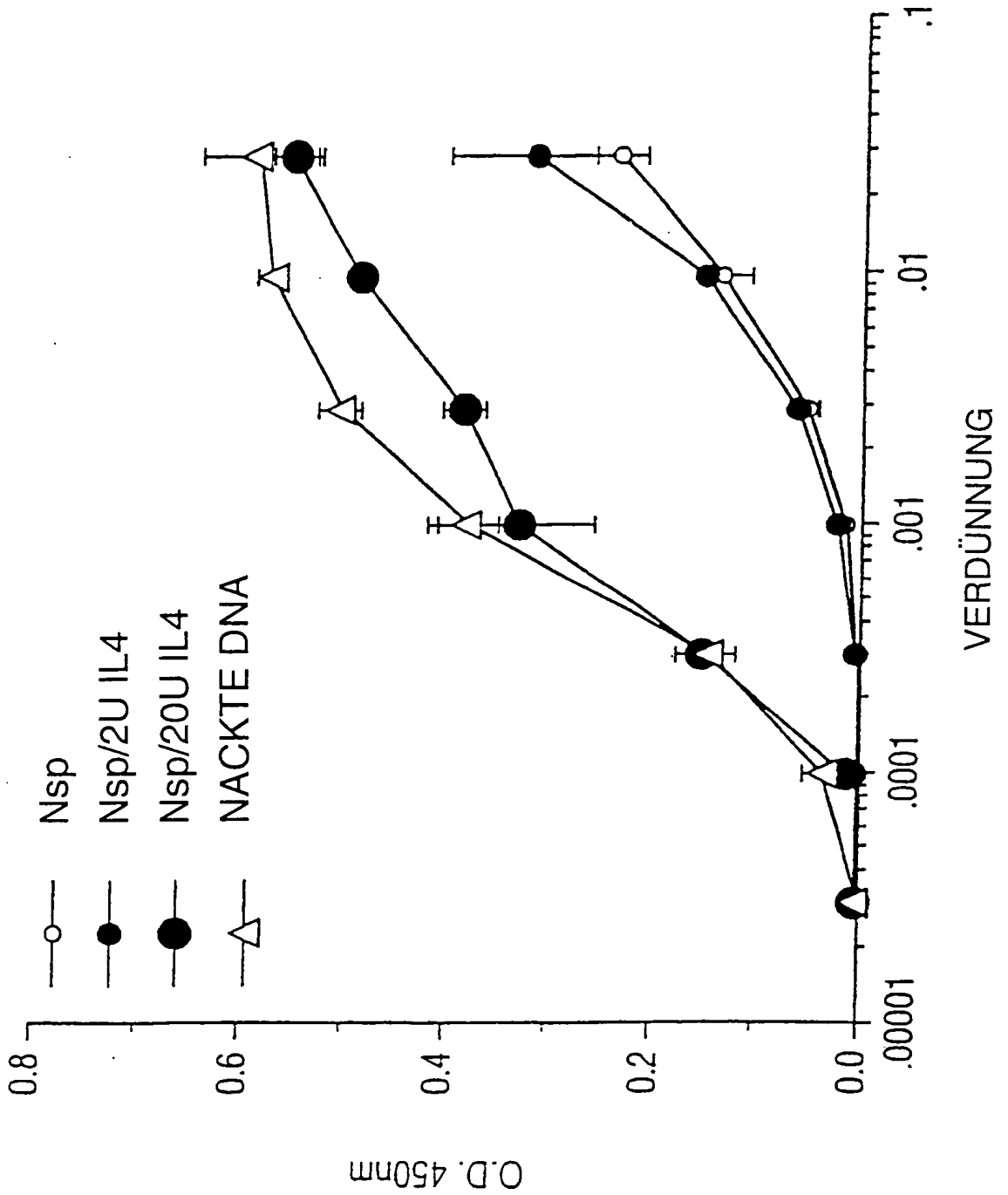


FIG. 4

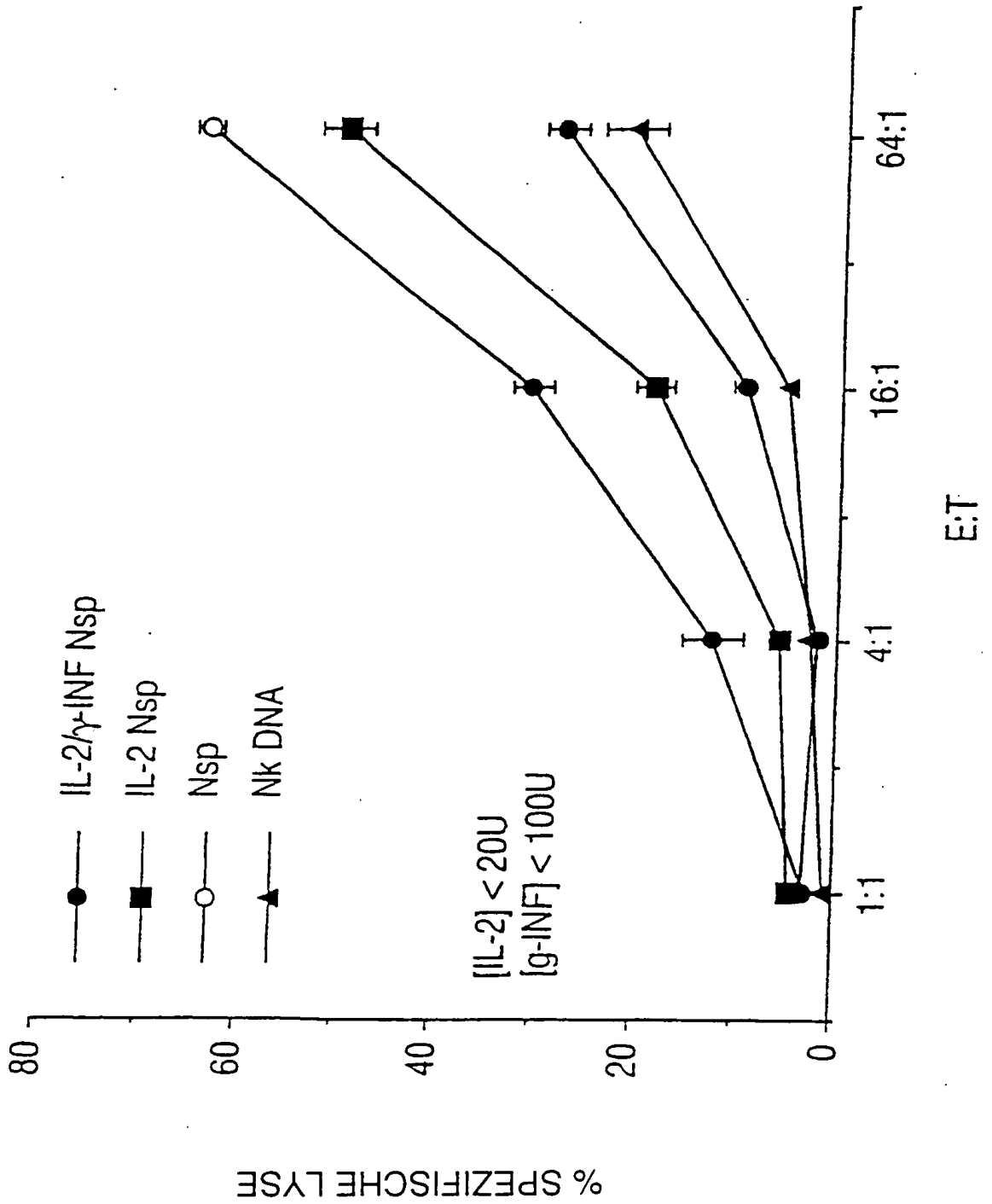
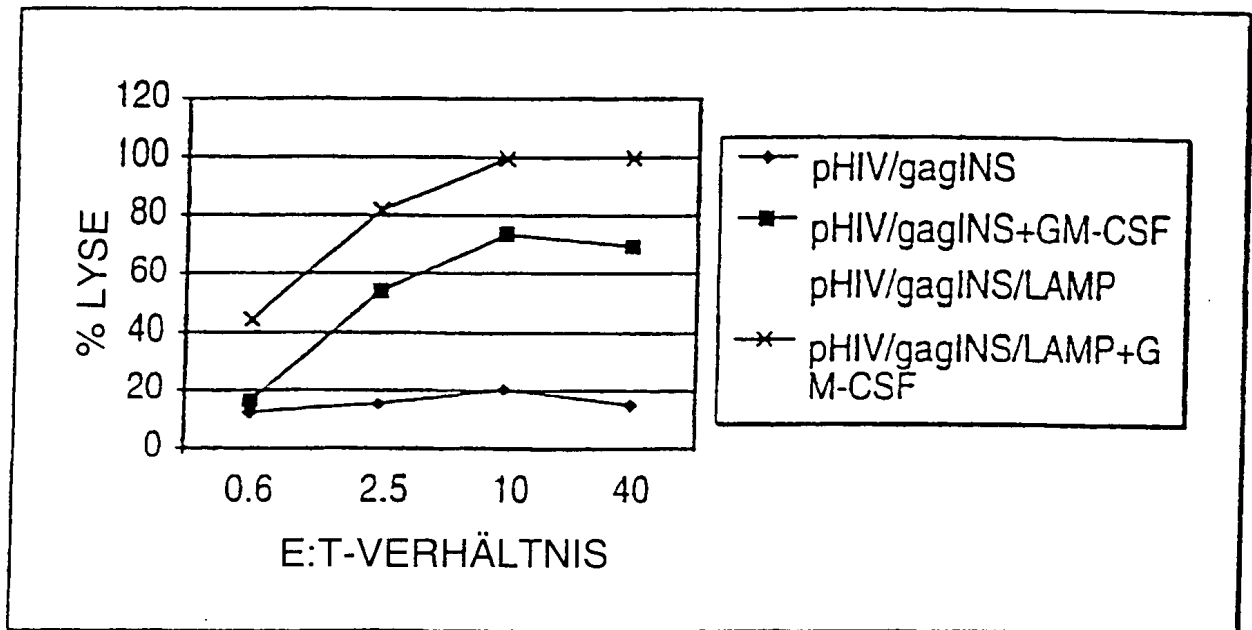
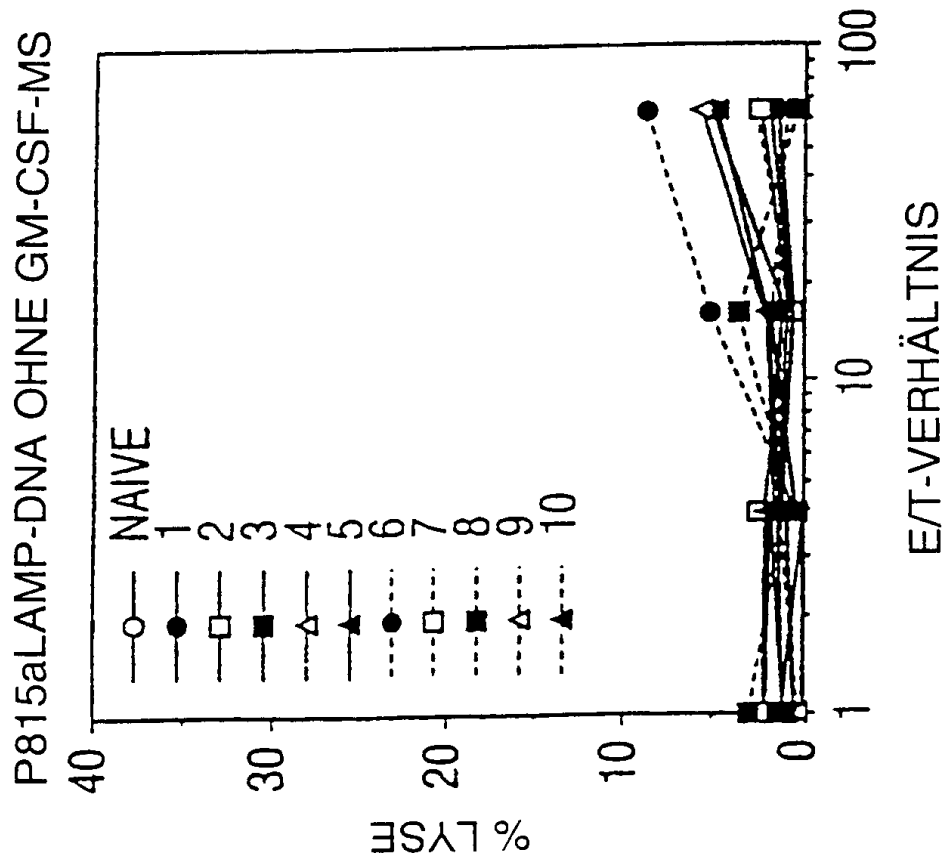


FIG. 5



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**

