



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 37 258 T2 2008.07.03

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 227 840 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 37 258.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/25854

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 956 885.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/032208

(86) PCT-Anmeldetag: 03.11.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 10.05.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.08.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.10.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.07.2008

(73) Patentinhaber:

Powderject Vaccines, Inc., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,  
80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 39/39 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61M 5/30 (2006.01)

(72) Erfinder:

HAYNES, Joel R., Madison, WI 53711, US;  
WIDERA, Georg, Madison, WI 53711, US; FULLER,  
James T., Madison, WI 53711, US; SHIPLEY,  
Timothy, Madison, WI 53711, US; FULLER,  
Deborah, Madison, WI 53711, US; WU, Mary,  
Madison, WI 53711, US

(54) Bezeichnung: GENETISCHE IMPFSTOFFE MIT ADJUVANS

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 eingelebt, 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**

**[0001]** Die Erfindung betrifft die allgemeinen Gebiete der Molekularbiologie und Immunologie, und betrifft generell Reagenzien, die bei Techniken der Nukleinsäure-Immunisierung nützlich sind. Genauer gesagt betrifft die Erfindung beschichtete Partikel und deren Verwendung in der Herstellung von Medikamenten zur Hervorrufung einer verstärkten Immunreaktion gegen ein ausgewähltes Antigen.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Techniken für die Injektion von DNA und mRNA in Säugergewebe für die Zwecke einer Immunisierung gegen ein Expressionsprodukt sind bereits zuvor beschrieben worden. Siehe z. B. europäische Patentschrift EP 0 500 799 und US-Patent Nr. 5.589.466. Von den hierin als "Nukleinsäure-Immunisierung" bezeichneten Techniken ist gezeigt worden, dass sie sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten hervorrufen. Zum Beispiel wurde von Seren von Mäusen, die mit einem DNA-Konstrukt immunisiert waren, das für das Hüll-Glykoprotein gp160 codierte, gezeigt, dass sie mit rekombinantem gp160 in Immunoassays reagieren, und von Lymphozyten von den injizierten Mäusen wurde gezeigt, dass sie sich als Reaktion auf rekombinantes gp120 vermehren. Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156–4160. Entsprechend zeigten Mäuse, die mit einem humanen Wachstumshormon-(hGH)-Gen immunisiert waren, eine Antikörper-basierte Immunantwort. Tang et al. (1992) Nature 356: 152–154. Von der intramuskulären Injektion von DNA, die für ein Influenza-Nukleoprotein, gesteuert durch einen Sägerpromotor, codiert, ist gezeigt worden, dass sie eine CD8+ zytolytische T-Lymphozyten-(CTL)-Antwort hervorruft, die Mäuse gegen eine anschließende letale Provokation mit Virus schützen kann. Ulmer et al. (1993) Science 259: 1745–1749. Immunhistochemische Untersuchungen der Injektionsstelle ergaben, dass die DNA durch Myeloblasten aufgenommen wird, und die zytoplasmatische Produktion von viralem Protein konnte für mindestens 6 Monate nachgewiesen werden.

**[0003]** Diese sogenannten "genetischen Impfstoffe" sind somit als eine Immunantwort in behandelten Tieren hervorrufend nachgewiesen worden, die ähnlich jener ist, die auf die Verabreichung von lebend abgeschwächten Impfstoffen, der wirksamsten Form von Impfstoff, die heutzutage in Anwendung ist, beobachtet werden. Die theoretische Wirksamkeit der Nukleinsäure-basierten Impfstoffe röhrt aus der Fähigkeit der Impfstoff-Zusammensetzungen her, die de novo-Produktion von korrekt gefalteten Proteinantigenen hervorzurufen, welche zur Auslösung von Antikörperreaktionen führen können, indem sie komplexe dreidimensionale Epitope erkennen. Außerdem führt die in vivo-Produktion dieser Antigene in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen zu der Präsentation von prozessierten Peptidfragmenten durch MHC Klasse I-Moleküle, was zur Aktivierung und Partizipierung der Antigen-spezifischen zytolytischen T-Lymphozyten (CTLs) führt.

**[0004]** Bis heute bezieht die wirksamste Technik der Nukleinsäure-Immunisierung die Verabreichung einer DNA-Impfstoffzusammensetzung über den Partikel-vermittelten, intrazellulären Transfer in die Epidermis ein. Siehe z. B. europäisches Patent Nr. 0 500 799. Mit dieser Technik werden die Fallgruben der extrazellulären Darreichung (z. B. über Nadel- und Spritzenübertragung in die Haut oder den Muskel) vermieden, da davon ausgegangen wird, dass der Großteil solch einer extrazellulär verabreichten DNA schnell abgebaut wird und es erforderlich macht, eine Überschussmenge an DNA einzumachen, nur um einen ausreichenden Grad der Antigenexpression zu erreichen. Der Partikel-vermittelte DNA-Transfer in die Epidermis dagegen erzielt eine direkte, intrazelluläre Ablagerung von Plasmid-DNA in den epidermalen Zellen, einschließlich der epidermalen Langerhans-Zellen. Aufgrund der direkten intrazellulären Übertragung ist die DNA vor extrazellulären Nukleasen geschützt und brauchen lediglich sehr geringe Mengen an DNA übertragen zu werden. In der Tat kann die Partikel-vermittelte Immunisierung mit Nanogramm-Quantitäten einer gegebenen Plasmid-DNA zur Hervorrufung sehr starker humoraler und CTL-Antworten führen, und zwar oftmals als Folge einer einzigen Verabreichung.

**[0005]** Malaria stellt eine weit verbreitete und signifikante Humanerkrankung dar, insbesondere in tropischen Ländern. Die Erkrankung wird durch die Moskito-übertragenen Parasiten Plasmodium falciparum und Plasmodium vivax verursacht. Die Forschung zu Malaria-Impfstoffen hat jedoch noch zur Entwicklung eines sicheren, praktischen und wirksamen prophylaktischen Impfstoffprodukts zu führen. Obwohl zahlreiche Beispiele einer signifikanten Immunantwort sowohl in Tiermodellen als auch bei freiwilligen Versuchspersonen unter Verwendung einer Vielfalt experimenteller Impfstoffe hervorgerufen worden sind, ist der tatsächliche Schutz, der durch diese Impfungen in klinischen Humanstudien erzielt worden ist, enttäuschend gering gewesen. Die zunehmende wissenschaftliche Kenntnis des Lebenszyklus des Malaria-Parasiten und die Identifizierung wichtiger Antigene aus verschiedenen parasitischen Lebensstadien haben die Entwicklung einer Vielfalt von Impfstoffstra-

tegen ermöglicht, die zur Hervorrufung der Bildung von schützenden Antikörpern als auch zellulären Effektorzellen, wie etwa CTLs, designed sind.

**[0006]** Der Erkrankungszyklus an Malaria beginnt mit einem Moskitobiss, bei dem die infektiösen Malaria-Sporoziten in die Blutbahn gelangen. Es erschiene daher naheliegend, dass Sporoziten-spezifische Antikörper eine wirksame Maßnahme zur Verhütung oder signifikanten Einschränkung der Infektion von Hepatozyten zu diesem Stadium darstellen würden. Auf die Hepatozyten-Infektion hin entwickelt sich der Parasit jedoch intrazellulär in der Hepatozyte und kann so den zirkulierenden Antikörpern entkommen. Zu diesem Stadium bietet die Präsentation von Sporoziten-spezifischen Antigenen an der Oberfläche der infizierten Hepatozyten vor der Merozoiten- oder Blutstadium-Merozoiten-Freisetzung ein attraktives Ziel für Malaria-spezifische CTLs. Solche Effektorzellen könnten entweder die infizierten Hepatozyten eliminieren oder die Zerstörung von intrazellulären Parasiten hervorrufen, bevor überhaupt erstmals reife Merozoiten im Blutstadium freigesetzt werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0007]** Es stellt ein primäres Ziel der vorliegenden Erfindung dar, neuartige beschichtete Partikel zur Verwendung bei Nukleinsäure-(genetischen)-Impfverfahren bereitzustellen. Diese beschichteten Partikel sind mit Nukleinsäuremolekülen beschichtet, die Sequenzen, die für ein Antigen von Interesse codieren, und ein Adjuvans enthalten, wobei das Adjuvans in einer anderen Form als DNA vorhanden ist, und die für den direkten, intrazellulären Transfer der Zusammensetzung – sowohl der für das Antigen codierenden Sequenz als auch des Nicht-DNA-Adjuvans – vorgesehen sind. Demgemäß stellen die vorliegenden beschichteten Partikel eine signifikante Abweichung von bisherigen DNA-Impfstoffzusammensetzungen dar, bei denen Antigen-codierende Sequenzen und Adjuvans-codierende Sequenzen kombiniert sein können. Außerdem ist der absichtliche Transfer des Nicht-DNA-Adjuvans in eine Zielzelle kontraintuitiv, da Adjuvantien bekanntermaßen auf einer extrazellulären Basis arbeiten, indem sie beispielsweise ein extrazelluläres Depot bilden, und es kann dann erfolgen, wenn diese Komponenten im extrazellulären Raum vorhanden sind, dass immunkompetente Zellen auf das Adjuvans treffen und mit ihm interagieren können, um eine gewünschte Adjuvanswirkung hervorzubringen. Die Adjuvans-Komponente dieser neuartigen beschichteten Partikel kann in einer Anzahl unterschiedlicher Formen bereitgestellt werden, wie zum Beispiel, ohne darauf beschränkt zu sein, in der Form eines Proteins, eines Lipids, eines Nicht-Protein-Hormons oder Analogons davon, eines Vitamins oder eines Analogons davon, eines gereinigten Protein-Derivats aus einer Bakterienkultur (z. B. Bacillus calmette-Guerin), eines mykobakteriellen Zellwand-Skelettmaterials, eines Saponins oder Derivats davon, oder ähnlichem.

**[0008]** Demgemäß stellt die Erfindung beschichtete Partikel bereit, die zur Verwendung in der Partikel-vermittelten Nukleinsäure-Immunisierung geeignet sind, welche Partikel Core-Trägerpartikel umfassen, beschichtet mit:

- einem Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Sequenz, die für ein Antigen codiert; und
- ein Adjuvans, welches darin wirksam ist, wenigstens eine Komponente einer Immunantwort, die gegen das Antigen hervorgerufen wird, zu verstärken, wobei das Adjuvans in der Zusammensetzung in einer anderen Form als DNA vorhanden ist.

**[0009]** Bei speziellen Ausführungsformen wird das Nukleinsäuremolekül in dem Zusammenhang mit einem Vektorkonstrukt, vorzugsweise einem Plasmid, bereitgestellt. Das Core-Trägerpartikel ist vorzugsweise beispielsweise ein ballistisches Gold- oder Wolfram-Trägerpartikel. Das ausgewählte Antigen kann von irgendeinem Agens erhalten oder abgeleitet sein, gegen das die Hervorrufung einer Immunantwort gewünscht ist, und kann somit von einem infektiösen oder parasitären Krankheitsvermittler, einem Tumor-spezifischen oder einem "Selbst"-Antigen, einem Allergen oder ähnlichem sein. Bei speziellen Ausführungsformen ist das Antigen ein virales Antigen, wie etwa ein Antigen von einem Hepatitis B-Virus (HBV), einem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder einem Influenza-Virus. Bei anderen Ausführungsformen ist das Antigen von einem Parasiten, wie etwa von einem Malaria-Parasiten. Das ausgewählte Adjuvans kann jegliche geeignete Adjuvans-Zusammensetzung sein. Bei besonderen Ausführungsformen ist das Adjuvans zumindest teilweise in Ethanol löslich. Zu bevorzugten Adjuvantien zählen Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und Saponine wie Quil-A. Weitere bevorzugte Adjuvantien sind die sogenannten Immunshift-Adjuvantien, wie hierin beschrieben. Alle diese Zusammensetzungen können in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei Techniken der Nukleinsäure-Immunisierung verwendet werden.

**[0010]** Die Erfindung stellt auch ein Partikelbeschleunigungsgerät bereit, das für die Partikel-vermittelte Nukleinsäure-Immunisierung geeignet ist, und das mit den beschichteten Partikeln geladen ist, und eine Transferkassette, die zur Verwendung in einem Partikel-vermittelten Transfergerät geeignet ist, welche Kassette mit

den beschichteten Partikeln geladen ist.

**[0011]** Die Erfindung stellt außerdem Anwendungen der oben beschriebenen beschichteten Partikel zur Hervorrufung einer Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen in einem geimpften Individuum bereit. Solche Anwendungen umfassen den Transfer der Zusammensetzungen direkt in die Zellen, die an einer Zielstelle in dem Individuum in einer ausreichenden Menge vorhanden sind, um die gewünschte Immunantwort hervorzubringen. Beschichtete Core-Trägerpartikel (z. B. ballistische Gold- oder Wolframpartikel) können unter Anwendung einer transdermalen Transfertechnik verabreicht werden, wie etwa einer Partikel-vermittelten Transfertechnik. Ein bevorzugtes Zielgewebe ist somit das epidermale Gewebe.

**[0012]** Demgemäß stellt die Erfindung außerdem bereit:

- Die Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz, die für ein Antigen codiert, und ein Adjuvans, welches darin wirksam ist, zumindest eine Komponente einer gegen das Antigen hervorgerufenen Immunantwort zu verstärken, wobei das Adjuvans in der Zusammensetzung in einer anderen Form als DNA vorhanden ist, für die Herstellung eines Medikaments zur Hervorrufung einer Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen in einem Individuum, mittels einer Methode, die das Übertragen des Medikaments direkt in Zellen umfasst, die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhanden sind;
- Die Verwendung eines Adjuvans, welches darin wirksam ist, zumindest eine Komponente einer gegen ein Antigen hervorgerufenen Immunantwort zu verstärken, wobei das Adjuvans in einer anderen Form als DNA vorhanden ist, für die Herstellung eines Medikaments zur Verstärkung einer Immunantwort in einem Individuum, wobei das Medikament direkt in Zellen übertragen wird, die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhanden sind, und gemeinsam mit einem Nukleinsäuremolekül verabreicht wird, umfassend eine Sequenz, die für ein Antigen codiert; und
- Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz, die für ein Antigen codiert, für die Herstellung eines Medikaments zur Hervorrufung einer Immunantwort in einem Individuum, wobei das Medikament gemeinsam mit einem Adjuvans verabreicht wird, welches darin wirksam ist, zumindest eine Komponente einer gegen das Antigen hervorgerufenen Immunantwort zu verstärken, wobei das Adjuvans in einer anderen Form als DNA vorhanden ist, und das Adjuvans direkt in die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhandenen Zellen übertragen wird.

**[0013]** Ebenfalls hierin beschrieben sind Zusammensetzungen zur Verwendung in Nukleinsäure-(genetischen)-Impfverfahren, welche Zusammensetzungen aus der Kombination eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Sequenz enthält, die für ein Antigen von Interesse codiert, und einem Immunshift-Adjuvans, welches darin wirksam ist, die Th1-Komponente einer gegen das Antigen in einem geimpften Individuum hervorgerufenen Immunantwort zu verstärken, gebildet wird. Auch hier ist das Immunshift-Adjuvans in der Zusammensetzung in einer anderen Form als DNA vorhanden, und ist die Zusammensetzung für den direkten, intrazellulären Transfer vorgesehen. Das Antigen kann von einem infektiösen oder parasitären Krankheitserreger sein und/oder das Immunshift-Adjuvans kann Monophosphoryl-Lipid A sein. Die Zusammensetzung kann auf ein Core-Trägerpartikel aufgeschichtet sein, um ein pharmazeutisches Präparat bereitzustellen.

**[0014]** Ebenfalls hierin beschrieben ist eine Methode zur Hervorrufung einer Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen in einem Individuum (z. B. Impfung gegen einen infektiösen Krankheitserreger), welche die Schritte des Übertragens in die Zellen des Individuums eines genetischen Konstrukt, welches die Expression in den Zellen des Individuums eines Antigens bei ausreichenden Mengen bewirkt, um eine Antigenspezifische Immunantwort hervorzubringen; und des gleichzeitigen Verabreichens an das Individuum in die Umgebung der Übertragung des genetischen Konstrukt einer wirksamen Menge eines Immunshift-Adjuvans, die ausreichend ist, um eine Verschiebung im Gleichgewicht der Immunantworten vom Th1- und Th2-Typ zu bewirken, die in dem geimpften Individuum durch jene Reaktion hervorgerufen würde, die ohne das Immunshift-Adjuvans erzielt werden würde, umfasst. Die Anwendung der genetischen Impfstoffe wird durch die Verwendung der Immunshift-Adjuvantien erleichtert, indem diese die immunologische Reaktion eines Individuums auf einen genetischen Impfstoff verändern oder umlenken.

**[0015]** Es stellt einen Vorteil durch die vorliegende Erfindung dar, dass die Wirksamkeit der genetischen Impfstoffzusammensetzungen verstärkt werden kann. Es stellt einen weiteren Vorteil dar, dass die hierin beschriebenen Methoden und Zusammensetzungen angewendet werden können, um die Natur einer Immunantwort spezifisch maßzuschneidern oder zu verändern, die unter Verwendung einer genetischen Impfstoffzusammensetzung hervorgerufen wird. Diese und andere Ziele, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung werden für die Fachleute des Gebiets bei der Lektüre der hier vorgelegten Beschreibung ohne weiteres erkennbar werden.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0016]** [Fig. 1](#) zeigt ein Histogramm, das die Ergebnisse aus Experiment darstellt.

## Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0017]** Bevor nun die vorliegende Erfindung ausführlich beschrieben werden wird, sollte klar sein, dass diese Erfindung nicht auf bestimmte Impfstoff-Formulierungen oder Verfahrensparameter beschränkt ist, da diese selbstverständlich variieren können. Es sollte ebenfalls klar sein, dass die hierin verwendete Terminologie lediglich dem Zwecke der Beschreibung bestimmter Ausführungsformen der Erfindung dient und keine Beschränkung darstellen soll.

**[0018]** Es sollte zur Kenntnis genommen werden, dass, wie in dieser Beschreibung und den Ansprüchen im Anhang verwendet, die Singularformen "ein/eine/eines" und "der/die/das" die Pluralformen einbezieht, sofern der Zusammenhang nicht eindeutig anderes vorgibt. Somit umfasst beispielsweise die Bezugnahme auf "ein Partikel" zwei oder mehrere Partikel, die Bezugnahme auf "ein Antigen" oder "ein Adjuvans" ein Gemisch oder eine Kombination aus zwei oder mehreren solcher Agenzien, die Bezugnahme auf "einen Exzipienten" Gemische oder Kombinationen aus zwei oder mehreren Exzipienten, und so weiter.

## A. Definitionen

**[0019]** Sofern nicht anders definiert, weisen alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe dieselbe Bedeutung auf wie herkömmlicherweise durch einen Fachmann des Gebiets, zu dem diese Erfindung gehört, bei üblicher Sachkenntnis verstanden. Obschon eine Reihe von Methoden und Materialien, die den hierin beschriebenen ähnlich oder gleichwertig sind, in der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind die bevorzugten Materialien und Methoden hierin beschrieben.

**[0020]** In der Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe verwendet, wobei diese so definiert sein sollen, wie nachstehend angegeben.

**[0021]** Wie hierin verwendet, umfasst der Begriff "transdermale Verabreichung" die intradermale (z. B. in die Dermis oder Epidermis) und die transdermale (z. B. "perkutane") Verabreichung durch Passage eines Agens in oder durch wenigstens eine obere Schicht der Haut. Siehe z. B. Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft und Guy (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc. (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson und Lee (Hrsg.), Marcel Dekker Inc., (1987); und Transdermal Delivery of Drugs, Bände 1–3, Kydonieus und Berner (Hrsg.), CRC Press (1987).

**[0022]** Ein "Antigen" bezieht sich auf eine immunogene Komponente oder Agens, allgemein ein Makromolekül, welches eine immunologische Reaktion in einem Individuum hervorrufen kann. Der Begriff kann zur Bezugnahme auf ein individuelles Makromolekül oder auf eine homogene oder heterogene Population von antigenen Makromolekülen verwendet werden. Wie hierin verwendet, umfasst der Begriff "Antigen" auch Allergene. Somit umfasst der Begriff "Antigen" ganz breit Komponenten, einschließlich Proteinen, Polypeptiden, antigenen Proteinfragmenten, Oligosacchariden, Polysacchariden, organischen oder anorganischen Chemikalien oder Zusammensetzungen, und ähnliches. Weiter kann das Antigen von irgendeinem Virus, Bakterium, Parasit, Protozoe oder Pilz abgeleitet oder erhalten sein und kann ein ganzer Organismus sein. Der Begriff umfasst auch Tumorantigene oder sogenannte "Selbst"-Antigene, die an Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Entsprechend ist auch ein Oligonukleotid oder Polynukleotid, welches ein Antigen exprimiert, wie etwa bei Anwendungen in der Nukleinsäure-Immunisierung, ebenfalls in der Definition enthalten. Synthetische Antigene sind ebenfalls umfasst, zum Beispiel Polyepitope, flankierende Epitope und andere rekombinante oder synthetisch abgeleitete Antigene (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23: 2777–2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157: 3242–3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75: 402–408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Genf, Schweiz, 28. Juni–3. Juli 1998).

**[0023]** Die Begriffe "Nukleinsäuremolekül" und "Polynukleotid" werden austauschbar verwendet und beziehen sich auf eine polymere Form von Nukleotiden einer beliebigen Länge, und zwar sowohl Desoxyribonukleotide als auch Ribonukleotide, oder Analoga davon. Zu nicht-beschränkenden Beispielen der Polynukleotide zählen ein Gen, ein Genfragment, Exons, Introns, Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA, ribosomale RNA, Ribozyme, cDNA, rekombinante Polynukleotide, verzweigte Polynukleotide, Plasmide, Vektoren, isolierte DNA einer beliebigen Sequenz, isolierte RNA einer beliebigen Sequenz, Nukleinsäure-Sonden und Primer.

**[0024]** Ein "Gen", wie im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet, ist eine Sequenz von Nukleotiden in einem Nukleinsäuremolekül (Chromosom, Plasmid etc.), mit der eine genetische Funktion assoziiert ist. Ein Gen stellt eine hereditäre Einheit dar, zum Beispiel einen Organismus, umfassend eine Polynukleotidsequenz (z. B. eine DNA-Sequenz für Säuger), die eine spezifische physische Lokalisation (einen "Gen-Locus" oder "genetischen Locus") innerhalb des Genoms eines Organismus besetzt. Ein Gen kann für ein exprimiertes Produkt codieren, wie etwa ein Polypeptid oder ein Polynukleotid (z. B. tRNA). Alternativ kann ein Gen eine genomische Lokalisation für ein bestimmtes Ereignis/Funktion definieren, wie etwa die Bindung von Proteinen und/oder Nukleinsäuren (z. B. Phagen-Bindungsstellen), wobei das Gen nicht für ein exprimiertes Produkt codiert. Typischerweise umfasst ein Gen Codierungssequenzen, wie etwa Polypeptid-codierende Sequenzen, und nicht-codierende Sequenzen, wie Promotorsequenzen, Polyadenylierungssequenzen, Transkriptions-regulatorische Sequenzen (z. B. Enhancer-Sequenzen). Viele eukaryotische Gene weisen "Exons" (Codierungssequenzen) auf, die durch "Introns" (nicht-codierende Sequenzen) unterbrochen sind. In bestimmten Fällen kann ein Gen Sequenzen mit einem oder mehreren anderen Genen teilen (z. B. überlappende Gene).

**[0025]** Eine "Codierungssequenz" oder eine Sequenz, die für ein ausgewähltes Polypeptid "codiert", ist ein Nukleinsäuremolekül, die in ein Polypeptid in vivo transkribiert (im Falle von DNA) und translatiert (im Falle von mRNA) ist, wenn unter die Kontrolle der entsprechenden regulatorischen Sequenzen (oder "Kontrollelemente") gestellt. Der Begriff umfasst ein Gen. Die Begrenzungen der Codierungssequenz sind durch ein Startcodon an dem 5'-(Amino)-Terminus und ein Translationsstopcodon an dem 3'-(Carboxy)-Terminus bestimmt. Eine Codierungssequenz kann enthalten, ohne darauf beschränkt zu sein, cDNA von viraler, prokaryotischer oder eukaryotischer mRNA, genomische DNA-Sequenzen von viraler oder prokaryotischer DNA, und sogar synthetische DNA-Sequenzen. Eine Transkriptionsterminationssequenz kann 3' zu der Codierungssequenz lokalisiert sein. Die Transkription und Translation der Codierungssequenzen wird typischerweise durch "Kontrollelemente" reguliert, einschließlich, doch nicht beschränkt auf Transkriptionspromotoren, Transkriptionsenhancerelemente, Transkriptionsterminationssignale, Polyadenylierungssequenzen (die 3' zu dem Translationsstopcodon lokalisiert sind), Sequenzen für die Optimierung der Initiation der Translation (die 5' zu der Codierungssequenz lokalisiert sind) und Translationsterminationssequenzen.

**[0026]** Ein "Vektor" ist irgendeine Komponente, die zum Transferieren von Nukleinsäuremolekülen (z. B. Polynukleotid- oder Gensequenzen) zu Zielzellen fähig ist (z. B. virale Vektoren, nicht-virale Vektoren, partikuläre Träger und Liposome). Typischerweise meinen "Vektorkonstrukt", "Expressionsvektor" und "Gentransfervektor" jegliches Nukleinsäure-Konstrukt, das zum Steuern der Expression eines Gens von Interesse fähig ist und das Gensequenzen zu Zielzellen transferieren kann. Somit umfasst der Begriff ebenso Klonierungs- und Expressionsvehikel wie virale Vektoren.

**[0027]** "Operativ verknüpft" bezieht sich auf eine Anordnung von Elementen, worin die so beschriebenen Komponenten so konfiguriert sind, dass sie ihre übliche Funktion erfüllen. Somit ist ein gegebener Promotor, der operativ an eine Codierungssequenz (z. B. eine Sequenz, die für ein Antigen von Interesse codiert) geknüpft ist, zur Bewirkung der Expression der Codierungssequenz fähig, wenn die regulatorischen Proteine und entsprechenden Enzyme vorhanden sind. In einigen Fällen brauchen bestimmte Kontrollelemente nicht angrenzend an die Codierungssequenz zu sein, solange sie zur Steuerung ihrer Expression dienen. Zum Beispiel können dazwischenliegende untranslatierte, doch transkribierte Sequenzen zwischen der Promotorsequenz und der Codierungssequenz vorhanden sein, und dennoch kann die Promotorsequenz nach wie vor als "operativ geknüpft" an die Codierungssequenz erachtet werden.

**[0028]** "Rekombinant", wie hierin verwendet, um ein Nukleinsäuremolekül zu beschreiben, meint ein Polynukleotid von genomischem, cDNA, halbsynthetischem oder synthetischem Ursprung, welches, dank seines Ursprungs oder durch Manipulation: (1) nicht mit dem gesamten oder einem Abschnitt des Polynukleotids assoziiert ist, mit dem es von Natur aus assoziiert ist; und/oder (2) an ein anderes Polynukleotid geknüpft ist als das, an das es von Natur aus geknüpft ist. Der Begriff "rekombinant", wie in Bezug auf ein Protein oder Polypeptid verwendet, meint ein Polypeptid, das durch Expression eines rekombinanten Polynukleotids produziert ist.

**[0029]** Techniken zur Bestimmung der Nukleinsäure- und Aminosäure-"Sequenzidentität" sind ebenfalls im Fachgebiet bekannt. Typischerweise beinhalten solche Techniken die Bestimmung der Nukleotidsequenz der mRNA für ein Gen und/oder die Bestimmung der dadurch codierten Aminosäuresequenz, und das Vergleichen dieser Sequenzen zu einer zweiten Nukleotid- oder Aminosäuresequenz. Im Allgemeinen bezieht sich "Identität" auf eine exakte Nukleotid-zu-Nukleotid- oder Aminosäure-zu-Aminosäure-Entsprechung zweier Polynukleotide bzw. Polypeptidsequenzen. Zwei oder mehrere Sequenzen (Polynukleotid oder Aminosäure) können

durch Bestimmen ihrer "prozentualen Identität" verglichen werden. Die prozentuale Identität zweier Sequenzen, ob nun Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen, stellt die Anzahl der exakten Paarungen zwischen zwei angeordneten Sequenzen dar, dividiert durch die Länge der kürzeren Sequenzen und multipliziert mit 100. Eine annähernde Anordnung für Nukleinsäuresequenzen steht zur Verfügung durch den lokalen Homologie-Algorithmus von Smith und Waterman (1981) Advances in Applied Mathematics 2: 482–489. Dieser Algorithmus kann auf Aminosäuresequenzen unter Verwendung der Scoring-Matrix, entwickelt von Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff, Hrsg., 5 suppl. 3: 353–358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USA, und normalisiert durch Gribskov (1986) Nucl. Acids Res. 14(6): 6745–6763, angewendet werden. Ein Beispiel einer Umsetzung dieses Algorithmus zur Bestimmung der prozentualen Identität einer Sequenz ist zur Verfügung gestellt durch die Genetics Computer Group (Madison, WI) in der "BestFit"-Nutzanwendung. Die Default-Parameter für diese Methode sind beschrieben in dem Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (beziehbar von Genetics Computer Group, Madison, WI). Eine bevorzugte Methode zur Feststellung der prozentualen Identität im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung des MPSRCH-Package von Programmen, Copyright bei der University of Edinburgh, entwickelt von John F. Collins und Shane S. Sturrok, und vertrieben von IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Aus diesem Satz von Packages kann der Smith-Waterman-Algorithmus verwendet werden, bei dem Default-Parameter für die Scoring-Tabelle verwendet werden (zum Beispiel Gap Open Penalty von 12, Gap Extension Penalty von 1, und ein Gap von 6). Aus den generierten Daten reflektiert der "Match"-Wert die "Sequenzidentität". Weitere geeignete Programme zur Berechnung der prozentualen Identität oder Ähnlichkeit zwischen Sequenzen sind im Fachgebiet allgemein bekannt; so ist zum Beispiel ein anderes Alignment-Programm BLAST, das mit Default-Parametern verwendet wird. Zum Beispiel können BLASTN und BLASTP unter Anwendung der folgenden Default-Parameter verwendet werden: genetischer Code = Standard; Filter = keiner; Strang = beide; Cutoff = 60; Erwartung = 10; Matrix = BLOSUM62; Beschreibungen = 50 Sequenzen; Sortieren durch = HIGH SCORE; Datenbanken = nicht-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS Translations + Swiss-Protein + SPUpdate + PIR. Einzelheiten zu diesen Programmen sind zu finden bei der folgenden Internet-Adresse: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

**[0030]** Alternativ kann die Homologie durch Hybridisation von Polynukleotiden unter Bedingungen bestimmt werden, die stabile Duplexe zwischen homologen Regionen bilden, gefolgt von dem Verdau mit Einzelstrang-spezifischer/n Nuklease(n) und der Größenbestimmung der verdauten Fragmente. Zwei DNAs, oder zwei Polypeptidsequenzen, sind "im Wesentlichen homolog" zueinander, wenn die Sequenzen wenigstens etwa 80%–85%, bevorzugt wenigstens etwa 90%, und am bevorzugtesten wenigstens etwa 95%–98% Sequenzidentität über eine definierte Länge der Moleküle hinweg aufweisen, wie unter Anwendung der obigen Methoden bestimmt. Wie hierin verwendet, bezieht sich im Wesentlichen homolog auch auf Sequenzen, die eine vollständige Identität zu der spezifizierten DNA oder Polypeptidsequenz zeigen.

**[0031]** DNA-Sequenzen, die im Wesentlichen homolog sind, können in einem Southern-Hybridisierungsexperiment unter zum Beispiel stringenten Bedingungen, wie für das jeweilige System definiert, identifiziert werden. Zum Beispiel können stringente Hybridisationsbedingungen 50% Formamid, 5 × Denhardt-Lösung, 5 × SSC, 0,1% SDS und 100 µg/ml denaturierte DNA aus Lachssperma umfassen, und können die Waschbedingungen 2 × SSC, 0,1% SDS bei 37°C, gefolgt von 1 × SSC, 0,1% SDS bei 68°C, umfassen. Das Definieren der geeigneten Hybridisationsbedingungen liegt innerhalb der Sachkenntnis des Gebiets. Siehe z. B. Sambrook et al., supra; DNA Cloning; supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

**[0032]** Der Begriff "Impfstoffzusammensetzung" bezieht sich auf jegliche pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Antigen enthält (wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff insbesondere auf eine Zusammensetzung, die ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz enthält, die für ein Antigen codiert), welche Zusammensetzung zur Verhütung oder Behandlung einer Erkrankung oder Bedingung in einem Individuum verwendet werden kann. Impfstoffzusammensetzungen können auch ein oder mehrere Adjuvantien enthalten. Typischerweise wird eine Impfstoffzusammensetzung für die Prophylaxe einer durch ein Pathogen verursachten Erkrankung verwendet, doch können die Impfstoffzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung auch in einem therapeutischen Zusammenhang verwendet werden.

**[0033]** Eine "immunologische Reaktion" oder "Immunantwort" gegen ein ausgewähltes Agens, Antigen oder eine Zusammensetzung von Interesse stellt die Entwicklung in einem Individuum einer humoralen und/oder einer zellulären Immunreaktion auf Moleküle (z. B. Antigen) dar, die in dem Agens oder der Zusammensetzung von Interesse vorhanden sind. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bezieht sich eine "humorale Immunreaktion" auf eine Immunantwort, die durch Antikörper-Moleküle vermittelt ist, wohingegen eine "zelluläre Immunreaktion" eines solchen ist, die durch T-Lymphozyten und/oder andere weiße Blutzellen vermittelt ist.

**[0034]** Säuger-Immunreaktionen werden so verstanden, dass sie eine Immunkaskade auf eine oder zwei breite Kategorien einer Reaktion hin einbeziehen, die durch die Klasse der T-Helferzelle, die die Kaskade initiiert, charakterisiert sind. Somit kann eine Immunreaktion auf ein spezifisches Antigen als eine T-Helfer 1(Th1)-artige oder T-Helfer 2(Th2)-artige Reaktion charakterisiert werden, was von den Typen der Zytokine abhängt, die von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten auf die Antigenpräsentierung hin freigesetzt werden. Th1-Immunreaktionen sind allgemein durch die Freisetzung entzündlicher Zytokine, wie etwa IL-2, Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrose-Faktor Alpha (TNF- $\alpha$ ), aus den Antigen-stimulierten T-Helferzellen charakterisiert. Th1-Reaktionen sind auch mit einer starken zellulären Immunität (z. B. CTLs) und der Produktion von IgG-Antikörper-Unterklassen assoziiert, die eine opsonisierende und Komplement-fixierende Aktivität aufweisen, wie etwa IgG2a in dem herkömmlicherweise verwendeten Mausmodell. Andererseits sind Th2-Immunreaktionen durch die Freisetzung nicht-entzündlicher Zytokine, wie etwa IL-4 und IL-10, auf die Stimulierung der Antigen-spezifischen T-Helferzellen hin charakterisiert. Die Th2-Reaktionen begünstigen im Allgemeinen nicht eine maximale CTL-Aktivität, sind aber mit starken Antikörperreaktionen assoziiert, die für IgG-Subklassen stehen, wie etwa IgG1 in der Maus, Antikörper-Klassen, denen die opsonisierende und Komplement-fixierende Aktivität fehlt. Im Allgemeinen sind die mit Th2-Reaktionen assoziierten Antikörpermengen beträchtlich höher als die mit Th1-Reaktionen assoziierten Mengen.

**[0035]** Der Begriff "Adjuvans" bezieht sich auf jegliches Material oder Zusammensetzung, das oder die zur spezifischen oder nicht-spezifischen Veränderung, Verstärkung, Steuerung, Umlenkung, Potenzierung oder Auslösung einer Antigen-spezifischen Immunantwort fähig ist. Somit kann die gemeinsame Verabreichung eines Adjuvans und eines Antigens (z. B. als einer Impfstoffzusammensetzung) zu einer geringeren Dosis oder weniger Dosen an Antigen führen, die erforderlich sind, um eine gewünschte Immunantwort in einem Individuum zu erzielen, dem das Antigen verabreicht wird. Bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann die gemeinsame Verabreichung eines Adjuvans mit einer Nukleinsäure, die für eine Antigen codiert, die Immunantwort gegen das Antigen umlenken, zum Beispiel dort, wo die Immunantwort von einer Immunantwort vom Th2-Typ zu einem Th1-Typ umgelenkt wird oder umgekehrt. Die Wirksamkeit eines Adjuvans kann durch Verabreichen des Adjuvans mit einer Impfstoffzusammensetzung und Impfstoffzusammensetzungs-Kontrollen an Tiere und Vergleichen der Antikörpertiter und/oder zellulär vermittelten Immunität gegen die beiden unter Anwendung standardmäßiger Assays, wie etwa dem Radioimmunoassay, ELISAs, CTL-Assays und ähnlichem, die im Fachgebiet wohlbekannt sind, bestimmt werden. Typischerweise ist in einer Impfstoffzusammensetzung das Adjuvans eine separate Komponente zu dem Antigen, obschon ein einzelnes Molekül sowohl Adjuvans- als auch Antigen-Eigenschaften aufweisen kann (z. B. Cholera-Toxin). Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird ein Adjuvans entweder zur Verstärkung der Immunantwort auf ein spezifisches Antigen verwendet, wobei z. B. dann, wenn ein Adjuvans gemeinsam mit einer Impfstoffzusammensetzung verabreicht wird, die resultierende Immunantwort größer als die Immunantwort ist, die durch eine äquivalente Menge der Impfstoffzusammensetzung hervorgerufen wird, die ohne das Adjuvans verabreicht wird, oder wird das Adjuvans zur Umlenkung der Natur der Immunantwort verwendet. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird außerdem eine "wirksame Menge" eines Adjuvans eine solche Menge sein, die eine immunologische Reaktion auf ein gemeinsam verabreichtes Antigen in einer Impfstoffzusammensetzung verstärkt, sodass geringere oder weniger Dosen des Antigens erforderlich sind, um eine wirksame Immunantwort zu generieren, oder wird eine "wirksame Menge" eines Adjuvans eine solche Menge sein, die ausreicht, um eine Verschiebung oder Umlenkung der Immunantwort relativ zu der Immunantwort auf das Antigen alleine hervorzubringen. Eine "Adjuvans-Zusammensetzung" meint jegliche pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Adjuvans enthält.

**[0036]** Ein "Immunshift-Adjuvans" ist ein Adjuvans, das darin wirksam ist, die Natur einer Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen zu verändern oder zu lenken (umzulenken), wobei sowohl das Antigen als auch das Immunshift-Adjuvans erhalten worden ist. Das Verändern oder Umlenken erfolgt relativ zu der Natur der Immunantwort, die gegen das Antigen in der Abwesenheit des Immunshift-Adjuvans gerichtet ist. Somit werden diese Adjuvantien hierin zur Verschiebung der Natur einer Immunantwort verwendet, die gegen ein ausgewähltes Antigen (ein Antigen, das durch eine Nukleinsäuresequenz codiert ist, die in einer genetischen Impfstoffzusammensetzung vorhanden ist) hervorgerufen wird, um eine Reaktion vom Th1-Typ anstelle einer Reaktion vom Th2-Typ zu begünstigen, oder um eine Reaktion vom Th2-Typ anstelle einer Reaktion vom Th1-Typ zu begünstigen. Eine Anzahl bekannter Adjuvantien kann hierin als Immunshift-Adjuvans verwendet werden, einschließlich, doch nicht beschränkt auf das Monophosphoryl-Lipid A-(MPL)-Adjuvans. Die Fähigkeit eines Adjuvans, als ein Immunshift-Adjuvans zu dienen, kann durch Beurteilung der Natur der Immunantworten bestimmt werden, die durch Verabreichung der Impfstoffzusammensetzung alleine und durch Verabreichung der Impfstoffzusammensetzung mit dem Adjuvans hervorgerufen werden. Diese Beurteilung kann eine Charakterisierung oder Identifizierung der Typen von Zytokinen einbeziehen, die aus Antigenspezifischen T-Lymphozyten auf eine Antigen-Präsentation in einem Individuum freigesetzt werden, und/oder die Charakterisierung oder Identifizierung der vorherrschenden IgG-Subklassen, die durch eine Antigen/Adjuvans-Kombination relativ zu

dem Antigen alleine hervorgerufen werden. Alle diese Charakterisierungen oder Identifizierungen befinden sich durchaus innerhalb des Vermögens eines Fachmanns des Gebiets, auf die sich die vorliegende Beschreibung bezieht.

**[0037]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "gemeinsam verabreicht", wie dann der Fall, wenn ein Adjuvans mit einer Nukleinsäure, die für ein Antigen codiert, "gemeinsam verabreicht" wird (z. B. als eine Impfstoffzusammensetzung), entweder auf die gleichzeitige oder die gemeinsame Verabreichung von Adjuvans und Antigen, z. B. dann, wenn die beiden in derselben Zusammensetzung vorhanden sind oder in separaten Zusammensetzungen zu nahezu demselben Zeitpunkt, aber an unterschiedlichen Stellen, verabreicht wird, als auch die Verabreichung von Adjuvans und Antigen in separaten Zusammensetzungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zum Beispiel kann die Adjuvans-Zusammensetzung vor oder nach der Verabreichung des Antigens an derselben oder einer unterschiedlichen Stelle verabreicht werden. Die Zeitspanne zwischen den Adjuvans- und Antigen-Verabreichungen können in einem Bereich von ungefähr mehreren Minuten Abstand bis zu mehreren Stunden Abstand bis zu mehreren Tagen Abstand reichen.

**[0038]** Wie hierin verwendet, umfasst der Begriff "Behandlung" irgendeines der folgenden: die Verhütung einer Infektion oder Reinfektion; die Verminderung oder Beseitigung von Symptomen; und die Verminderung oder vollständige Beseitigung eines Pathogens. Eine Behandlung kann prophylaktisch (vor der Infektion) vorgenommen werden.

**[0039]** Die Begriffe "Individuum" und "Subjekt" werden hierin austauschbar verwendet und beziehen sich dabei auf jedliches Mitglied der Subphylum cordata, einschließlich, ohne Einschränkung, auf Menschen und andere Primaten (einschließlich nicht-menschlicher Primaten, wie etwa Schimpansen und andere Menschenaffen und Affen-Spezies); landwirtschaftliche Nutztiere, wie etwa Rinder, Schafe, Schweine, Ziegen und Pferde; Haustiere, wie etwa Hunde und Katzen; Labortiere, einschließlich Nagern, wie etwa Mäuse, Ratten und Meerschweinchen; Vögel (einschließlich Haus-, Wild- und Jagdvögel, wie etwa Hühner, Truthähne und andere Hühnervögel, Enten, Gänse); Fische und ähnliche. Die Begriffe kennzeichnen kein spezielles Alter. Somit sollen sowohl erwachsene als auch neugeborene Individuen davon abgedeckt sein. Die hierin beschriebenen Methoden sind zur Verwendung bei jeglicher der obigen Vertebraten-Spezies vorgesehen, da die Immunsysteme aller dieser Vertebraten ähnlich funktionieren.

## B. Allgemeine Methoden

**[0040]** Eine Grundvoraussetzung der vorliegenden Erfindung stellt die Entdeckung dar, dass ein Nicht-DNA-Adjuvans in eine auf Nukleinsäure basierende Impfstoffzusammensetzung (z. B. eine DNA- oder genetische Impfstoffzusammensetzung) aufgenommen und zur Veränderung, Verstärkung, Lenkung oder Umlenkung der Natur der Immunantwort auf ein Antigen in einem behandelten Individuum verwendet werden kann. Zusammensetzungen, die eine Kombination aus einem Nukleinsäuremolekül, das eine Sequenz enthält, die für ein Antigen von Interesse codiert, und einem Adjuvans, welches in einer anderen Form als DNA vorliegt, enthalten, werden direkt in die in einem Zielgewebe in einem zu behandelnden Individuum vorhandenen Zellen verabreicht. Die Zusammensetzung wird auf ein Core-Trägerpartikel aufgeschichtet, was den direkten, intrazellulären Transfer der neuartigen Zusammensetzungen stark erleichtert. Die Adjuvans-Komponente der Zusammensetzung ist darin wirksam, wenigstens einen Aspekt einer gegen das begleitende Antigen hervorgerufenen Immunantwort zu verstärken. In einigen Aspekten der Erfindung ist das Adjuvans so ausgewählt, dass es die Natur der Antigen-spezifischen Immunantwort relativ zu der Antigen-spezifischen Immunantwort verschiebt oder umlenkt, die in der Abwesenheit des gemeinsam verabreichten Adjuvans hervorgerufen wird. In anderen Aspekten der Erfindung wird das Adjuvans so ausgewählt, dass es die T-Helfer 1-(Th1)-Komponente der Antigen-spezifischen Immunantwort verstärkt.

**[0041]** Ein einem bestimmten Aspekt der Erfindung ist festgestellt worden, dass die Hinzufügung eines geeigneten Immunantwort-verschiebenden Adjuvans zu einem DNA-Impfstoff die Wirkung zeigt, die Antigen-spezifische Immunantwort, die durch den Impfstoff hervorgerufen wird, zu stimulieren und zu verschieben, wodurch eine Th1-Reaktion anstelle einer Th2-Reaktion begünstigt wird. Ein bestimmtes Adjuvans, bei dem diese Wirkung festgestellt worden ist, ist Monophosphoryl-Lipid A (MPL), obschon andere Adjuvantien von ähnlicher Wirkung identifiziert worden sind. Eine derartige Verschiebung der Immunantwort in einem DNA-Impfstoff erhöht die Wirksamkeit der DNA-Impfstoffe auf eine Vielzahl von Infektionskrankheiten, wie etwa Malaria.

## Antigene

**[0042]** Die Nukleinsäuremoleküle für die genetische Impfstoff-Komponente der vorliegenden Zusammenset-

zungen erfordern keine komplizierten Präparationstechniken. Der entscheidendste Präparationsschritt ist demnach ziemlich eindeutig die Auswahl einer geeigneten Sequenz, die für ein Antigen von Interesse codiert. Das Antigen wird so ausgewählt, dass die Immunantwort, wenn hervorgerufen, dem geimpften Individuum einen gewissen Grad an therapeutischer Wirkung verleiht, zum Beispiel einen gewissen Grad an wirksamem Schutz gegen einen Krankheitserreger. Bei diesen Ausführungsformen, bei denen beabsichtigt ist, dass die Immunantwort von einem DNA-Impfstoff modifiziert wird, um den Th1-Charakter der Immunantwort zu verstärken, wird das durch die DNA in dem Impfstoff codierte Antigen unter Berücksichtigung dieser Wirkung ausgewählt werden.

**[0043]** Folglich wird das Antigen im Allgemeinen unter Berücksichtigung einer bestimmten Verabreichungsmethode, Zielgewebe und begleitendem Adjuvans ausgewählt werden. Zum Beispiel führt die Partikel-vermittelte Immunisierung von Mäusen mit Vektoren, die für das Influenza-Virus-Nukleoprotein-Antigen (NP), humane karzinoembryonale Antigen (CEA) oder *P. falciparum* CS-Antigen codieren, vorhersagbar zu der Induktion von Antikörperreaktionen, die für eine Th2-Reaktion indikativ sind. Eine Immunisierung von Mäusen mit Vektoren hingegen, die für HIV-Proteine codieren, führt zu anfänglich Th1-artigen Reaktionen, die durch zusätzliche Immunisierungen zu Th2-Reaktionen umgewandelt werden können. Weiterhin führt eine Immunisierung mit Vektoren, die für die Hepatitis B-Virus-(HBV)-Oberflächen- und -Core-Antigene codieren, zu einer Reaktion, die als Th0 klassifiziert werden könnte aufgrund der gleichen Repräsentation beider Haupt-Unterklassen von IgG bei der Antigen-spezifischen Immunantwort. Somit ist es für bestimmte infektiöse oder parasitäre Erkrankungen möglich, dass das immunologische Ergebnis auf eine DNA-Impfung hin für die Bereitstellung eines optimalen Schutzes angemessen sein wird, wohingegen für andere eine Modulation oder Umlenkung des immunologischen Ergebnisses erforderlich sein wird, um eine wirksame Höhe an Schutz zu erzielen, die höher als die ohne Verwendung des Adjuvans beobachtete ist. Zum Beispiel ist es ebenfalls möglich, dass für bestimmte infektiöse oder parasitäre Erkrankungen die immunologischen Reaktionen zwar von signifikanter Stärke sind, doch möglicherweise nicht angemessen zur Bereitstellung einer optimalen therapeutischen Wirkung, z. B. Schutz, sind. In anderen Worten kann die Immunantwort quantitativ ausreichend, doch qualitativ ungenügend sein. Solchiges kann der Fall sein bei Malaria, bei welcher frühere Impfdaten anzeigen, dass Th1-Reaktionen wichtig sein können, wobei aber Th2-Reaktionen über eine DNA-Beimpfung der Epidermis hervorgerufen werden, wenn ein CS-codierender Plasmidvektor verwendet wird. Somit kann die Wirkung der Art von Adjuvans, die hier ins Auge gefasst wird, die sein, nicht die quantitative Höhe einer Immunantwort zu verstärken, sondern stattdessen die Immunantwort einfach umzulenken, um die Th1-Komponente jener Reaktion zu verstärken.

**[0044]** Demgemäß wird für die Nukleinsäure-Komponente der vorliegenden Zusammensetzungen ein geeignetes Promotorsystem operativ an eine Sequenz geknüpft, die für ein Antigen von Interesse codiert. Das Antigen von Interesse wird vorzugsweise mit einem Pathogen, wie etwa einem viralen, bakteriellen oder parasitären Pathogen, assoziiert sein, oder das Antigen kann ein Tumor-spezifisches Antigen, ein Selbst-Antigen oder ein Allergen sein. Das Antigen kann ein Volllängen-Protein sein. Alternativ kann das Antigen lediglich aus im Wesentlichen einem B-Zellepitop oder einem T-Zellepitop eines Antigens bestehen.

**[0045]** Zu Tumor-spezifischen Antigenen zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, jegliche der verschiedenen MAGEs (Melanom-assoziiertes Antigen E), einschließlich MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (HLA-A1-Peptid), MAGE 4, etc.; jegliche der verschiedenen Tyrosinassen (HLA-A2-Peptid); Mutanten-ras; Mutanten-p53; und p97-Melanom-Antigen. Zu weiteren Tumor-spezifischen Antigenen zählen das Ras-Peptid und p53-Peptid, das mit fortgeschrittenen Krebse assoziiert ist, die HPV 16/18- und E6/E7-Antigene, die mit Gebärmutterhalskrebsen assoziiert sind, das MUC1-KLH-Antigen, das mit Brustkarzinom assoziiert ist, CEA (karzinoembryonales Antigen), das mit kolorektalem Krebs assoziiert ist, gp100- oder MART1-Antigene, die mit Melanom assoziiert sind, und das PSA-Antigen, das mit Prostatakrebs assoziiert ist. Die p53-Gensequenz ist bekannt (siehe z. B. Harris et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 4650–4656) und ist bei GenBank unter der Zugriffs-Nr. M14694 hinterlegt.

**[0046]** Zu geeigneten viralen Antigenen zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Antigene, die von der Hepatitis-Familie der Viren erhalten oder abgeleitet sind, einschließlich des Hepatitis A-Virus (HAV), Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV), des Delta-Hepatitis-Virus (HDV), Hepatitis E-Virus (HEV) und Hepatitis G-Virus (HGV). Beispielsweise ist die virale Genomsequenz von HBV bekannt, ebenso wie Methoden zum Erhalt der Antigen-codierenden Sequenzen daraus. Siehe z. B. Ganem et al. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56: 651–693; Hollinger, F. B. (1990) Hepatitis B Virus, Bd. II, S. 2171–2235 in Fields et al. (Hrsg.), Virology, 2. Aufl., Raven Press, New York, NY; und Valenzuela et al. (1980) The Nucleotide Sequence of the Hepatitis B Viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes, S. 57–70, in Fields et al. (Hrsg.), Animal Virus Genetics, Academic Press, New York, NY). Das HBV-Genom codiert mehrere virale Proteine, einschließlich der gro-

ßen, mittleren und Haupt-Oberflächenantigen-Polypeptide, des X-Gen-Polypeptids und des Core-Polypeptids. Siehe z. B. Yokosuka et al., (1986) N. Engl. J. Med. 315: 1187–1192; Imazeki et al. (1987) Hepatology 7: 753–757; Kaneko et al. (1988) J. Virol. 62: 3979–3984; und Ou et al. (1990) J. Virol. 64: 4578–4581. In ähnlicher Weise ist die virale Genomsequenz von HCV bekannt, ebenso wie Methoden zum Erhalt der Sequenz. Siehe z. B. internationale Veröffentlichungen Nrn. WO 89/04669; WO 90/11089 und WO 90/14436. Das HCV-Genom codiert für mehrere virale Proteine, einschließlich E1 und E2. Siehe z. B. Houghton et al. (1991) Hepatology 14: 381–388. Die Sequenzen, die für diese HBV- und HCV-Proteine codieren, als auch die antigenen Fragmente davon, werden bei den vorliegenden Methoden Anwendung finden. Entsprechend ist die Codierungssequenz für das 6-Antigen von HDV bekannt (siehe z. B. US-Patent Nr. 5.378.814).

**[0047]** In entsprechender Weise können Sequenzen, die für eine breite Vielfalt von Proteinantigenen aus der Herpesvirus-Familie codieren, bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich Antigenen, die vom Herpes simplex-Virus (HSV) der Typen 1 und 2 abgeleitet oder erhalten sind, wie etwa HSV-1 und HSV-2 Glykoproteine gB, gD und gH; Antigene von dem Varicella zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalovirus (CMV), einschließlich CMV gB und gH; und Antigene von anderen humanen Herpesviren, wie etwa HHV6 und HHV7. (Siehe z. B. Chee et al. (1990) Cytomegaloviruses (J. K. McDougall, Hrsg., Springer-Verlag, S. 125–169; McGeoch et al. (1988) J. Gen. Virol. 69: 1531–1574; US-Patent Nr. 5.171.568; Baer et al. (1984) Nature 310: 207–11; und Davison et al. (1986) J. Gen. Virol. 67: 1759–1816).

**[0048]** HIV-Antigene, wie etwa die gp120-Sequenzen für eine Vielzahl von HIV-1- und HIV-2-Isolaten, einschließlich Mitgliedern der verschiedenen genetischen Subtypen von HIV, sind bekannt und wurden berichtet (siehe z. B. Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); und Modrow et al. (1987) J. Virol. 61: 570–578), und Antigene, die von irgendeinem dieser Isolate abgeleitet sind, werden bei den vorliegenden Methoden Anwendung finden. Weiterhin ist die Erfindung gleichermaßen anwendbar auf andere immunogene Komponenten, die von irgendeinem der verschiedenen HIV-Isolate abgeleitet sind, einschließlich jeglicher der verschiedenen Hüllproteine, wie etwa gp160 und gp41, gag-Antigene, wie etwa p24gag und p55gag, als auch Proteine, die von den pol-, env-, tat-, vif-, nef-, vpr-, vpu- und LTR-Regionen von HIV abgeleitet sind.

**[0049]** Sequenzen, die von anderen Viren abgeleitete oder erhaltene Antigene codieren, werden ebenfalls Anwendung finden bei den beanspruchten Methoden, wie etwa, ohne Beschränkung, Sequenzen von Mitgliedern der Familien Picornaviridae (z. B. Polioviren, etc.); Caliciviridae, Togaviridae (z. B. Röteln-Virus, Dengue-Virus, etc.), Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae, Birnaviridae; Rhabodoviridae (z. B. Tollwut-Virus, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (z. B. Mumps-Virus, Masern-Virus, respiratorisches Synzytial-Virus, etc.); Bunyaviridae, Arenaviridae; Retroviridae (z. B. HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (auch bekannt als HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)) einschließlich, doch nicht beschränkt auf Antigene aus den Isolaten HIV<sub>IIIb</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>MN</sub>; HIV-1<sub>CM235</sub>, HIV-1<sub>US4</sub>; HIV-2, unter anderem. Siehe z. B. Virology, 3. Auflage (W. K. Jolik Hrsg. 1988); Fundamental Virology, 2. Auflage (B. N. Fields und D. M. Knipe, Hrsg. 1991), für eine Beschreibung dieser und weiterer Viren.

**[0050]** Sequenzen, die für geeignete bakterielle und parasitäre Antigene codieren, werden erhalten oder abgeleitet von bekannten Erregern, die für Erkrankungen verantwortlich sind wie Diphtherie, Pertussis, Tetanus, Tuberkulose, bakterielle oder fungale Pneumonie, Cholera, Typhus, Pest, Shigellose oder Salmonellose, Legionärskrankheit, Lyme-Krankheit, Lepra, Malaria, Hakenwurm, Onchocerciasis, Schistosomiasis, Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Giardia, Amöbiasis, Filariasis, Borelia und Trichinosis. Noch weitere Antigene können erhalten werden oder sind abgeleitet von unkonventionellen Viren oder Virus-artigen Agenzien, wie etwa den Erregern von Kuru, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), Traberkrankheit, transmissible Nerzenzephalopathie und chronisch zehrenden Krankheiten (Chronic Wasting Diseases), oder von proteinhaltigen infektiösen Partikeln, wie etwa Prionen, die mit der Rinderwahnsinn-Krankheit assoziiert sind.

**[0051]** Zu Sequenzen, die für geeignete Allergene codieren, die bei der vorliegenden Erfindung Anwendung finden können, zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Allergene von Pollen, Tierschuppen, Gräsern, Schimmeln, Stäuben, Antibiotika, Stechinsektengiften und eine Vielfalt von Umwelt-, Arzneimittel- und Lebensmittelallergenen. Zu herkömmlichen Baumallergenen zählen Pollen von Baumwolle, Tulpenbaum, Esche, Birke, Ahorn, Eiche, Ulme, Hickorybaum und Pekanussbäumen; zu verbreiteten Pflanzenallergenen zählen jene von Roggen, Traubenkraut, Spitzwegerich, Sauerampfer und Quinoa; zu Pflanzen-Kontaktallergenen zählen solche von Gifteiche, Giftefeu und Brennnesseln; zu verbreiteten Grasallergenen zählen Timothy, Johnson, Bermuda, Schwingel- und Blaugras-Allergene; verbreitete Allergene können auch von Schimmeln oder Pilzen erhalten werden, wie etwa Alternaria, Fusarium, Hormodendrum, Aspergillus, Mikropolyspora, Mucor und thermophile Actinomyceten; Penicillin und Tetracyclin sind verbreitete antibiotische Allergene; epidermale Allerge-

ne können erhalten werden von Hausstaub oder organischem Staub (typischerweise von fungalem Ursprung), von Insekten, wie etwa Hausmilben (*Dermatophagoides pterosynensis*) und von tierischen Quellen, wie etwa Federn und Katzen- und Hundeschuppen; zu verbreiteten Lebensmittelallergenen zählen Milch und Käse (Milchprodukte), Eier, Weizen, Nüsse (z. B. Erdnuss), Meeresfrüchte (z. B. Schalentiere), Erbsen, Bohnen und Gluten-Allergene; zu verbreiteten Arzneimittel-Allergenen zählen Lokalanästhetikum- und Salicylat-Allergene; zu antibiotischen Allergenen zählen Penicillin und Sulfonamid-Allergene; und zu verbreiteten Insektenallergenen zählen Bienen-, Wespen- und Ameisengift, und Kakerlaken-Calyx-Allergene. Zu besonders gut charakterisierten Allergenen zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, die Haupt- und kryptischen Epitope des Der p I-Allergens (Hoyne et al. (1994) *Immunology* 83: 190–195), Bienengift-Phospholipase A2 (PLA) (Akdis et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676–1683), Birkenpollen-Allergen Bet v 1 (Bauer et al. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 536–541) und das multiepitope rekombinante Grasallergen rKBG8.3 (Cao et al. (1997) *Immunology* 90: 46–51). Diese und weitere geeignete Allergene sind kommerziell verfügbar und/oder können anhand der bekannten Techniken ohne weiteres präpariert werden.

**[0052]** Die Codierungssequenz für das Antigen von Interesse kann unter Anwendung bekannter Methoden erhalten und/oder präpariert werden. Zum Beispiel können im Wesentlichen reine Antigen-Präparate unter Anwendung standardmäßiger molekularbiologischer Methoden erhalten werden. Das heißt, Polynukleotidsequenzen, die für die oben beschriebenen Antigene codieren, können unter Anwendung rekombinanter Methoden erhalten werden, wie etwa durch Screening von cDNA- und genomischen Bibliotheken von Zellen, die das Gen exprimieren, oder durch Ableiten des Gens von einem Vektor, der bekanntermaßen dasselbe enthält. Weiterhin kann die gewünschte Sequenz direkt aus Zellen und Geweben, die dieselbe enthalten, unter Anwendung standardmäßiger Techniken isoliert werden, wie etwa der Phenolextraktion und der PCR von cDNA oder genomicscher DNA. Siehe z. B. Sambrook et al., supra, für eine Beschreibung der Techniken, die zur Gewinnung und Isolierung von DNA angewendet werden. Polynukleotidsequenzen können auch synthetisch hergestellt werden, anstelle der Klonierung.

**[0053]** Noch eine weitere bequem geeignete Methode zur Isolierung spezifischer Nukleinsäuremoleküle stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar. Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155: 335–350. Diese Technik verwendet eine DNA-Polymerase, üblicherweise eine hitzestabile DNA-Polymerase, um eine gewünschte Region der DNA zu replizieren. Die zu replizierende Region der DNA wird durch Oligonukleotide einer spezifizierten Sequenz identifiziert, die zu entgegengesetzten Enden und entgegengesetzten Strängen der gewünschten DNA komplementär ist, um die Replikationsreaktion zu primen. Das Produkt der ersten Runde der Replikation ist selbst eine Template für die anschließende Replikation, wodurch wiederholte aufeinanderfolgende Zyklen der Replikation zu einer geometrischen Amplifikation des DNA-Fragments, begrenzt durch das verwendete Primerpaar, führen.

**[0054]** Ist die spezielle Codierungssequenz von Interesse einmal erhalten worden, so kann sie an geeignete Kontrollelemente operativ geknüpft werden, um ein exprimierbares Nukleinsäuremolekül unter Anwendung standardmäßiger Klonierungs- oder molekularbiologischer Techniken bereitzustellen. Siehe z. B. Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair et al. (1984) *Science* 223: 1299; und Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311. Das Nukleinsäuremolekül kann dann als solches verwendet werden oder ebenso einfach in einen geeigneten Vektor, etwa ein Expressionsplasmid oder virales Vektorkonstrukt, eingeführt werden.

**[0055]** Somit umfassen die Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung typischerweise entweder eine homologe oder heterologe Promotorsequenz und andere geeignete Kontrollsequenzen. Diese anderen Kontrollsequenzen können eine Terminator- und/oder Translationsinitiationssequenz (z. B. GCCACCATGG oder GCCCCCCATGG) und/oder ein Translationsstopcodon (z. B. TAA, TAG oder TGA) und/oder ein Polyadenylierungssignal und/oder eine RNA-Pause-Stelle umfassen. Außerdem können native oder heterologe Enhancersequenzen für die Promotorsequenz vorhanden sein. Einmal konstruiert, können die Nukleinsäuremoleküle unter Anwendung standardmäßiger Gentransfer-Protokolle verabreicht werden. Methoden für den Gentransfer sind im Fachgebiet bekannt. Siehe z. B. US-Patent Nrn. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Die Gene können entweder direkt an ein Individuum verabreicht werden oder können alternativ ex vivo auf Zellen übertragen werden, die von dem Individuum stammen, und die Zellen dann in das Individuum reimplantiert werden.

#### Adjuvantien

**[0056]** Die zweite Komponente der neuartigen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ist die Adjuvans-Komponente, die jegliches geeignete Adjuvans oder eine Kombination von Adjuvantien umfassen kann. Zu geeigneten Adjuvantien zählen zum Beispiel, ohne Beschränkung, Adjuvantien, die aus Aluminiumsalzen (Alaun) gebildet sind, wie etwa Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat, etc.;

Öl-in-Wasser- und Wasser-in-Öl-Emulsionsformulierungen, wie etwa komplettes Freund-Adjuvans (CFA) und inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA); Mineralgele; Blockcopolymere, Avridine™ Lipid-Amin; SEAM62; Adjuvantien, die aus bakteriellen Zellwand-Komponenten gebildet sind, wie etwa Adjuvantien einschließlich Lipopolysacchariden (z. B. Lipid A oder Monophosphoryl-Lipid A (MPL), Imoto et al. (1985) Tet. Lett. 26: 1545–1548), Trehalosedimycolat (TDM) und Zellwandskelett (CWS); Hitzeschock-Protein oder Derivaten davon; Adjuvantien, die von ADP-ribosylierten bakteriellen Toxinen abgeleitet sind, einschließlich Diphtherie-Toxin (DT), Pertussis-Toxin (PT), Cholera-Toxin (CT), die *E. coli* hitzelabilen Toxine (LT1 und LT2), Pseudomonas-Endotoxin A, Pseudomonas-Exotoxin S, *B. cereus*-Exoenzym, *B. sphaericus*-Toxin, *C. botulinum* C2- und C3-Toxine, *C. limosum*-Exoenzym, als auch Toxine von *C. perfringens*, *C. spiriforma* und *C. difficile*, *Staphylococcus aureus* EDIN, und ADP-ribosyierte bakterielle Toxin-Mutanten, wie etwa CRM<sub>197</sub>, eine nichttoxische Diphtherie-Toxin-Mutante (siehe z. B. Bixler et al. (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251: 175; und Constantino et al. (1992) Vaccine); Saponin-Adjuvantien, wie etwa Quil A (US-Patent Nr. 5.057.540), oder Partikel, die aus Saponinen generiert sind, wie etwa ISCOMs (immunstimulierende Komplexe); Chemokine und Zytokine, wie etwa Interleukine (z. B. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, etc.), Interferone (z. B. Gamma-Interferon), Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Defensine 1 oder 2, RANTES, MIP1-α und MIP-2 etc., Muramyl-Peptide, wie etwa N-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamin (MTP-PE) etc.; Adjuvantien, die von der CpG-Familie der Moleküle abgeleitet sind, CpG-Dinukleotide und synthetische Oligonukleotide, die CpG-Motive umfassen (siehe z. B. Krieg et al., Nature (1995) 374: 546, Medzhitov et al. (1997) Curr. Opin. Immunol. 9: 4–9 und Davis et al. J. Immunol. (1998) 160: 870–876), wie etwa TCCATGACGTTCTGATGCT und ATC *C. limosum*-Exoenzym GACTCTCGAGCGTTCTC; und synthetische Adjuvantien, wie etwa PCPP (Poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene] (Payne et al., Vaccines (1998) 16: 92–98). Diese Adjuvantien sind kommerziell verfügbar von einer Reihe von Herstellern, wie etwa Accurate Chemicals; Ribi Immunochemicals, Hamilton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO.

**[0057]** Bevorzugte Adjuvantien zur Verwendung bei den vorliegenden Zusammensetzungen sind solche, die zumindest teilweise in Ethanol löslich sind. Eine besonders bevorzugte Klasse von Adjuvantien zur Verwendung hierin sind solche, die als "Saponine" klassifiziert sind, das heißt, Adjuvantien, die aus Saponin-produzierenden Pflanzen der Gattung *Quillaja*, *Saponaria* oder *Gypsophila* stammen. Saponine sind glykosidische natürliche Pflanzenprodukte, die sich aus einer Ringstruktur (dem Aglykon) zusammensetzen, an die ein oder mehrere Zuckerketten gebunden sind. Das Aglykon kann asteroid, triterpenoid oder ein Steroidalalkaloid sein, und die Zahl der Zucker, die an die glykosidischen Bindungen geknüpft sind, kann stark variieren. Die häufigsten als pharmazeutische Adjuvantien verwendeten Saponine sind die Triterpenglykoside, die aus dem südamerikanischen Baum *Quillaja saponaria* extrahiert sind und als Quil A bezeichnet werden (siehe z. B. US-Patent Nr. 5.688.772; 5.057.540 und 4.432.969; und internationale Veröffentlichung Nr. WO 88/09336, veröffentlicht am 01. Dezember 1988), dessen Aktivkomponente als QS-21 bezeichnet wird. Ein anderes bevorzugtes Adjuvans ist ein Muramyldipeptid-Analogon, bezeichnet als "GMTP-N-DPG" (N-Acetylglucosaminyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-dipalmitoylpropylamid). Siehe Fast et al. (1997) Vaccine 15: 1748–1752.

**[0058]** Mehrere Adjuvantien sind zur Verwendung als ein Immunshift-Adjuvans bei der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Das entscheidende Attribut solch eines Adjuvans ist, dass es zur Umlenkung der hervorgerufenen Immunantwort in eine bestimmte gewünschte Richtung neigt, relativ zu der Verwendung der Antigen-codedierenden DNA alleine. Es ist besonders wünschenswert, dass das Adjuvans das Attribut aufweist, die Immunantwort zu einer Th1-Reaktion, im Gegensatz zu einer Th2-Reaktion, hin zu lenken oder zu verschieben. Da alle Immunantworten auf ein Antigen komplex sind, und viele, wenn nicht alle Immunantworten Elemente sowohl der Th1- als auch Th2-Reaktionen einbeziehen, ist es nicht praktisch, eine völlige Umlenkung der Reaktion anzustreben. Was stattdessen erwogen wird, ist eine relative Verschiebung des Typs von Immunantwort, zum Beispiel durch Verwenden eines Adjuvans zur Verstärkung einer Reaktion vom Th1-Typ. Wo zum Beispiel festgestellt worden ist, dass ein bestimmtes Antigen vorwiegend eine Th2-Reaktion produziert und wo eine Th1-Reaktion ein erwünschteres Ergebnis darstellt, wird eine Verschiebung in Richtung von Th1 eine größere klinische Wirksamkeit des Impfstoffs zeigen. Ein Immunshift-Adjuvans, wie hierin beschrieben, kann oder kann auch nicht zu einer Zunahme der gesamten quantitativen Immunantwort in dem Individuum führen, was das üblicherweise durch die Aufnahme von Adjuvantien in Impfstoffe verfolgte Ergebnis ist. Stattdessen soll das Immunshift-Adjuvans die Natur oder Qualität der Immunantwort und nicht so sehr ihre Größe oder Menge verschieben oder umlenken.

**[0059]** Ein Beispiel eines Immunshift-Adjuvans, welches die Th1-Reaktion begünstigt, ist Monophosphoryl-Lipid A, oder MPL, das von Ribi Immunochemical Research, Inc., beziehbar ist. Ein Beispiel eines Im-

munshift-Adjuvans, welches die Th2-Reaktion begünstigt, ist 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>. Zu anderen möglichen Immunshift-Adjuvantien zählen PPD, ein gereinigtes Protein-Derivat von *Bacillus calmette-Guerin* (BOG), Trehalosedimycarat und mykobakterielles Zellwand-Skelettmaterial.

**[0060]** Das Adjuvans kann in den vorliegenden Zusammensetzungen einzeln oder in einer Kombination von zwei oder mehr Adjuvantien vorhanden sein. In dieser Hinsicht können kombinierte Adjuvantien eine additive oder eine synergistische Wirkung in der Förderung oder Verschiebung einer Immunantwort aufweisen. Eine synergistische Wirkung ist eine solche, bei der das durch Kombinieren zweier oder mehrerer Adjuvantien erzielte Ergebnis größer ist, als erwartet werden könnte, wenn lediglich das mit jedem Adjuvans bei individueller Verabreichung erzielte Ergebnis aufaddiert wird.

**[0061]** Unglücklicherweise ist ein Großteil der oben genannten Adjuvantien als in hohem Grade toxisch bekannt, weshalb sie allgemein als zu toxisch für die Humanwendung erachtet werden. Aus diesem Grunde ist das einzige derzeit für die Anwendung durch den Menschen genehmigte Adjuvans Alau, eine Aluminiumsalz-Zusammensetzung. Nichts desto trotz wird eine Anzahl der obigen Adjuvantien häufig bei Tieren verwendet und ist demnach für zahlreiche vorgesehene Individuen geeignet, wobei mehrere vorklinischen und klinischen Studien für die Anwendung beim Menschen unterzogen werden. Allerdings ist festgestellt worden, dass Adjuvantien, die generell als zu toxisch für die Anwendung durch den Menschen erachtet werden, mit einer Pulverinjektionstechnik (wie etwa der hierin beschriebenen bevorzugten Partikelvermittelten Transfertechnik) ohne begleitende Toxizitätsprobleme verabreicht werden können. Ohne sich an eine bestimmte Theorie binden zu wollen, scheint es so zu sein, dass die Verabreichung geringer Mengen an Adjuvantien an die Haut eine Interaktion mit Langerhans-Zellen in der epidermalen Schicht und dendritischen Zellen in der kutanen Schicht der Haut erlaubt. Diese Zellen sind für die Auslösung und Aufrechterhaltung einer Immunantwort wichtig. Somit kann eine verstärkte Adjuvans-Wirkung durch Anzielen der Verabreichung in oder nahe solcher Zellen erzielt werden. Darüber hinaus kann die transdermale Verabreichung von Adjuvantien Toxizitätsprobleme vermeiden, da (1) die obersten Schichten der Haut schwach vaskularisiert sind, weshalb die Menge an Adjuvans, die in den systemischen Kreislauf gelangt, vermindert ist, was die toxische Wirkung reduziert; (2) Hautzellen sich ständig ablösen, weshalb restliches Adjuvans eliminiert und nicht absorbiert wird; und (3) wesentlich weniger Adjuvans verabreicht werden kann, um eine geeignete Adjuvans-Wirkung zu erzeugen (im Vergleich zu einem Adjuvans, das unter Anwendung der herkömmlichen Techniken, wie etwa einer intramuskulären Injektion, verabreicht wird).

**[0062]** Das oder die Adjuvantien werden in einer ausreichenden Menge vorhanden sein, um die gewünschte Wirkung hervorzubringen, das heißt, entweder die Schleimhautreaktion gegen das gleichzeitig verabreichte Antigen von Interesse zu verstärken und/oder die Schleimhaut-Immunantwort gegen das Antigen von Interesse zu richten. Generell werden etwa 0,1 µg bis 1000 µg Adjuvans, bevorzugter etwa 1 µg bis 500 µg Adjuvans, und noch bevorzugter etwa 5 µg bis 300 µg Adjuvans darin wirksam sein, eine Immunantwort auf ein gegebenes Antigen zu verstärken. Somit werden beispielsweise für Quil A Dosen im Bereich von etwa 0,5 bis 50 µg, vorzugsweise etwa 1 bis 25 µg, und bevorzugter etwa 5 bis 20 µg Anwendung mit den vorliegenden Methoden finden. Für MPL wird eine Dosis im Bereich von etwa 1 bis 250 µg, vorzugsweise etwa 20 bis 150 µg, und bevorzugter etwa 40 bis 75 µg Anwendung mit den vorliegenden Methoden finden.

**[0063]** Die Dosen für weitere Adjuvantien können durch einen Fachmann des Gebiets unter Anwendung routinemäßiger Methoden ohne weiteres bestimmt werden. Die zu verabreichende Menge wird von einer Anzahl von Faktoren abhängen, einschließlich des gemeinsam verabreichten Antigens, als auch der Fähigkeit des Adjuvans, als Stimulator einer Immunantwort zu wirken oder als ein Immunshift-Adjuvans zu agieren.

#### Herstellung der Zusammensetzungen

**[0064]** Die Nukleinsäuremoleküle und/oder Adjuvantien werden auf Core-Trägerpartikel aufgeschichtet, die für den intrazellulären Transfer geeignet sind, z. B. Gold oder Wolfram. Partikel-vermittelte Methoden zur Verabreichung solcher Impfstoff-Präparate sind im Fachgebiet bekannt. Genauer gesagt können, einmal präpariert und in geeigneter Weise gereinigt, die Nukleinsäuremoleküle, die für Antigene codieren, und/oder die Adjuvantien auf Trägerpartikel (z. B. ballistische Core-Träger) unter Anwendung einer Vielzahl von im Fachgebiet bekannten Techniken aufgeschichtet werden. Die Trägerpartikel werden aus Materialien ausgewählt, die eine geeignete Dichte in dem Bereich der Partikelgrößen aufweisen, die typischerweise für den intrazellulären Transfer mit einer Genpistolen-Vorrichtung verwendet werden. Die optimale Träger-Partikelgröße wird natürlich von dem Durchmesser der Zielzellen abhängen.

**[0065]** Der Transfer unter Anwendung Partikel-vermittelter Techniken wird aus mehreren Gründen angewen-

det. Ein sehr wichtiger Grund ist der, dass es sich erwiesen hat, dass diese Technik für den Gentransfer in Säugern denselben Grad an Wirksamkeit in allen bisher getesteten Säugersystemen aufweist. Die Signifikanz dieser Tatsache ist, dass Daten für Tiermodelle direkter anwendbar und auf die Behandlung von Menschen übertragbar sind als dies mit anderen Techniken möglich ist, wie etwa der intramuskulären Genverabreichung, von der sich erwiesen hat, dass sie eine enorm unterschiedliche Wirksamkeit bei Nagern zeigt. Partikel-vermittelte Transfergeräte beschleunigen im Allgemeinen das genetische Material in das Tier hinein unter Verwendung einer einstellbaren Antriebskraft entweder in Form der Entladung eines elektrischen Zündfunkens oder der Entladung von unter Druck gesetztem Gas, was eine einfache Auswahl der Zielgewebe, in die die Nukleinsäure-Impfstoffzusammensetzungen zu verabreichen sind, möglich macht.

**[0066]** Gemäß der etablierten Partikel-vermittelten Transfertechniken kann das zu verabreichende genetische Material in wässriger Lösung präpariert und dann auf kleine biologisch inerte Core-Trägerpartikel ausgefällt werden. Jegliches geeignete Trägerpartikel kann verwendet werden, zum Beispiel Partikel, die aus Polymeren oder Metallen (z. B. Wolfram, Gold, Platin und Iridium) hergestellt sind; bevorzugt sind jedoch die Wolfram- und Gold-Trägerpartikel. Wolframpartikel sind ohne weiteres verfügbar in mittleren Größen von 0,5 bis 2,0 µm im Durchmesser. Obschon solche Partikel eine optimale Dichte für die Verwendung bei Partikel-vermittelten Transfermethoden aufweisen und eine hocheffiziente Beschichtung mit DNA erlauben, kann Wolfram für bestimmte Zelltypen potenziell toxisch sein. Goldpartikel oder mikrokristallines Gold (z. B. Goldpulver A1570, beziehbar von Engelhard Corp., East Newark, NJ) werden ebenfalls mit den vorliegenden Methoden Verwendung finden. Goldpartikel bieten eine Gleichförmigkeit in der Größe (beziehbar von Alpha Chemicals in Partikelgrößen von 1–3 µm, oder beziehbar von Degussa, South Plainfield, NJ, in einem Bereich von Partikelgrößen einschließlich 0,95 µm) und eine reduzierte Toxizität. Mikrokristallines Gold bietet eine diverse Partikelgrößen-Verteilung, typischerweise im Bereich von 0,5–5 µm. Allerdings sorgt der irreguläre Oberflächenbereich des mikrokristallinen Goldes für eine hocheffiziente Beschichtung mit Nukleinsäuren, Antigenen und Adjuvanten. Goldpartikel mit einer nominalen Größe von etwa 0,1 µm bis etwa 10 µm können hierin verwendet werden.

**[0067]** Eine Anzahl von Methoden ist bekannt und ist für das Beschichten oder Ausfällen von DNA oder RNA auf Gold- oder Wolframpartikel beschrieben worden. Bei diesen Methoden wird generell eine zuvor bestimmte Menge an Gold oder Wolfram mit Plasmid-DNA, CaCl<sub>2</sub> und Spermidin kombiniert. Die resultierende Lösung wird während des Beschichtungsverfahrens kontinuierlich gevortext, um die Gleichförmigkeit des Reaktionsgemisches zu gewährleisten. Nach Ausfällung der Nukleinsäure können die beschichteten Partikel auf geeignete Membranen übertragen werden und können vor der Verwendung trocknen, woraufhin sie auf die Oberflächen eines Probenmoduls, Patrone oder Kassette aufgeschichtet oder in eine Transferkassette zur Verwendung in Partikel-vermittelten Transfergeräten (z. B. Genpistolen-Instrumente) geladen werden.

**[0068]** Peptid-Adjuvantien können an dieselbe oder an eine unterschiedliche Charge der Core-Trägerpartikel durch einfaches Vermischen der beiden Komponenten in einem empirisch bestimmten Verhältnis, durch Ammoniumsulfat-Präzipitation oder andere Lösungsmittel-Präzipitationsmethoden, die den Fachleuten des Gebiets vertraut sind, oder durch chemische Kopplung des Peptids an das Trägerpartikel gebunden werden. Die Kopplung von L-Cysteinresten an Gold ist zuvor beschrieben worden (Brown et al. (1980) Chemical Society Reviews 9: 271–311). Zu weiteren Methoden zählen zum Beispiel das Lösen des Peptids in absolutem Ethanol, Wasser oder einem Alkohol/Wasser-Gemisch, das Zugeben der Lösung zu einer Quantität der Trägerpartikel und dann das Trocknen des Gemisches unter einem Strom von Luft oder Stickstoffgas unter Vortexen. Alternativ können die Peptide auf den Trägerpartikeln durch Zentrifugieren unter Vakuum getrocknet werden. Einmal getrocknet, können die aufgeschichteten Partikel in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Ethylacetat oder Aceton) resuspendiert und trituriert (z. B. durch Beschallung) werden, um eine im Wesentlichen gleichförmige Suspension zu erhalten.

**[0069]** Bei einer Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines MPL-Adjuvans in einer genetischen Impfstoffzusammensetzung bereit, wobei MPL ein komplexes Lipidmolekül ist. Dort, wo bestimmte Verbindungen ganz einfach in das wässrige Nukleinsäure-(z. B. DNA)-Präparat vor der Aufschichtung auf die Trägerpartikel gemischt werden können, und da dieses im Falle von MPL funktionieren kann, können MPL oder andere Ethanol-lösliche Verbindungen ganz einfach der Ethanollösung zugegeben werden, die typischerweise zur Suspendierung der DNA-beschichteten Goldpartikel verwendet wird. Obschon das Ethanol schließlich aus den DNA-beschichteten Goldpartikeln ausgedampft wird, verbleibt ausreichend Adjuvan (z. B. MPL, welches nicht-flüchtig ist) nach der Verdampfung. Eben diese allgemeinen Techniken können auch mit anderen Klassen von biologischen Materialien in dem Partikel-vermittelten Gentransfer-Prozess angewendet werden, wie etwa mit Adjuvantien, die aus Nicht-Proteinhormonen, Vitaminen oder Analoga davon hergestellt sind.

**[0070]** Partikel-vermittelte Transfertechniken machen es möglich, die Impfstoffzusammensetzungen auf jeg-

lichen Typ oder Kategorie von Zielgewebe im Körper zu richten. Am bequemsten ist es jedoch, die DNA tragenden Trägerpartikel in die Epidermis zu verabreichen. Bequemerweise hat sich die Epidermis als eine besonders erwünschte Lokalisation für den Transfer von DNA-Impfstoffen erwiesen. Es ist bereits gezeigt worden, dass eine quantitativ höhere Immunantwort auf einen genetischen Impfstoff in der Epidermis hervorgerufen werden kann als bei anderen möglichen Zielgeweben. Die kraftvolle Immunantwort, die bei der Genübertragung in die Epidermis hervorgerufen wird, kann auf Immunzellen zurückzuführen sein, wie etwa die Langerhans-Zellen oder andere Antigen-präsentierende Zellen, die regelmäßig in die epidermale Schicht der Haut auf der Suche nach antigenen Zielen infundieren.

**[0071]** Demgemäß werden auf ihre Bildung hin die mit Antigen beschichteten Trägerpartikel und/oder Adjuvans-Präparate an die Ziel-Hautstelle unter Anwendung einer Partikelvermittelten Transfertechnik verabreicht. Verschiedene Partikelbeschleunigungsgeräte, die für den Partikel-vermittelten Transfer geeignet sind, sind im Fachgebiet bekannt und sind alle zur Verwendung in der Ausführung der Erfindung geeignet. Die aktuellen Geräte-Designs machen Gebrauch von einer explosiven, elektrischen oder gasförmigen Entladung, um die beschichteten Trägerpartikel vorwärts auf die Zielzellen zu treiben. Die beschichteten Trägerpartikel können selbst an eine bewegliche Trägerplatte freisetzbar gebunden sein oder an eine Oberfläche entfernbar gebunden sein, über die ein Gasstrom passiert, der die Partikel von der Oberfläche abhebt und sie auf das Ziel zu beschleunigt. Ein Beispiel eines gasförmigen Entladungsgeräts ist beschrieben in US-Patent Nr. 5.204.253. Ein Gerät vom explosiven Typ ist beschrieben in US-Patent Nr. 4.945.050. Ein Beispiel eines Partikelbeschleunigungsapparats vom Helumentladungs-Typ ist das PowderJect® XR-Instrument (PowderJect Vaccines, Inc., Madison, WI), welches Instrument beschrieben ist in US-Patent Nr. 5.120.657. Ein elektrischer Entladungsapparat, der zur Verwendung hierin geeignet ist, ist beschrieben in US-Patent Nr. 5.149.655.

**[0072]** Einzelne Dosierungen der beschichteten Trägerpartikel können in einem geeigneten Behälter bereitgestellt werden, zum Beispiel in einer Patrone, die eine Länge des Rohrs umfasst, welche eine Dosis der ihre innere Oberfläche überziehenden Partikel enthält. Methoden zur Herstellung solcher Behälter sind beschrieben in den US-Patenten Nrn. 5.733.600 und 5.780.100 desselben Inhabers.

**[0073]** Die beschichteten Partikel werden dem Individuum in einer mit der Dosisformulierung kompatiblen Weise verabreicht, und in einer Menge, die für die Zwecke der Erfindung wirksam sein wird. Die Menge der zu verabreichenden Zusammensetzung (z. B. etwa 0,01 µg bis 10 mg, bevorzugter 1 bis 50 µg der Antigensequenz, hängt von dem zu testenden Individuum und dem/den jeweiligem/n Antigen(en) oder Allergen(en), die zu verabreichen sind, ab. Die exakt erforderliche Menge wird in Abhängigkeit von dem Alter und dem Allgemeinzustand des zu behandelnden Individuums variieren, und eine geeignete wirksame Menge kann durch einen Fachmann des Gebiets auf die Lektüre der vorliegenden Beschreibung hin ohne weiteres bestimmt werden.

#### Verabreichung und Dosierungsschemata

**[0074]** Die Impfstoff-Zusammensetzungen (enthaltend die Antigen-codierende Sequenz und/oder das Adjuvans) werden dem Individuum in einer mit der Dosierungsformulierung kompatiblen Weise verabreicht, und in Mengen, die wirksam sind, um eine gewünschte Schleimhaut-Immunantwort hervorzubringen. Die Menge des pro Verabreichung zu übertragenden Antigens liegt, im Falle der Nukleinsäure-Moleküle, die für ein Antigen codieren, allgemein in dem Bereich von etwa 0,001 µg bis 10 mg, und vorzugsweise etwa 0,01 bis 5000 µg Nukleinsäuremolekül pro Dosis (generell in dem Bereich von 0,5 µg/kg bis 100 µg/kg an Nukleinsäuremolekül pro Dosis). Die exakte Menge wird natürlich sowohl von dem Individuum als auch dem zu behandelnden oder verhütenden Zustand abhängen. Genauer gesagt wird die exakt erforderliche Menge in Abhängigkeit von dem Alter und dem Allgemeinzustand des Individuums, und dem/den jeweilig ausgewählten Antigen(en) und Adjuvans/tien, als auch weiteren Faktoren variieren. Eine geeignete wirksame Menge kann durch einen Fachmann des Gebiets auf die Lektüre der vorliegenden Beschreibung hin ohne weiteres bestimmt werden und/oder kann durch routinemäßige Versuche bestimmt werden.

**[0075]** Die Dosierungsbehandlung kann in einem Einzeldosis-Schema oder einem Vielfachdosis-Schema bestehen. Für Impfstoff-Zusammensetzungen ist ein Vielfachdosis-Schema ein solches, bei dem eine primäre Impfabfolge 1–10 separate Dosen betragen kann, gefolgt von weiteren Dosen, die in späteren Zeitintervallen gegeben werden und dabei so gewählt sind, dass die Immunantwort aufrechterhalten und/oder erneuert wird, zum Beispiel nach 1–4 Monaten für eine zweite Dosis und, sofern erforderlich, einer oder mehreren nachfolgenden Dosen nach mehreren Monaten. Das Dosierungsschema wird außerdem zumindest zum Teil durch die Bedürfnisse des Individuums bestimmt werden und wird von der Beurteilung des ausführenden Arztes abhängen. Ist weiterhin die Verhütung einer Erkrankung erwünscht, so werden die Zusammensetzungen generell vor

der Primärinfektion mit dem Pathogen von Interesse verabreicht. Wird eine Behandlung gewünscht, z. B. die Verminderung von Symptomen oder eines Wiederauftretens, so werden die Zusammensetzungen generell nach der Primärinfektion verabreicht.

### C. Beispiele

**[0076]** Nachstehend folgen Beispiele für spezifische Ausführungsformen zur Durchführung der vorliegenden Erfindung. Die Beispiele werden lediglich zu Zwecken der Veranschaulichung angeboten und sind in keiner Weise als eine Beschränkung des Rahmens der vorliegenden Erfindung vorgesehen.

**[0077]** Es wurden Anstrengungen unternommen, die Akkuratheit bezüglich der verwendeten Zahlen (z. B. Mengen, Temperaturen, etc.) zu gewährleisten, doch sollte natürlich ein gewisser experimenteller Fehler und Abweichung einkalkuliert werden.

#### Beispiel 1

##### Umlenkung einer Immunantwort auf CEA unter Anwendung der Partikel-vermittelten Transfertechnik

**[0078]** Um den Einfluss des MPL-Adjuvans auf die Immunantwort für einen nackten DNA-Impfstoff zu zeigen, wurde die folgende Studie durchgeführt. Das Adjuvan und das Nukleinsäuremolekül, enthaltend die Sequenz, die für das Antigen von Interesse codiert, wurden gemeinsam über den Partikel-vermittelten Transfer unter Verwendung einer Genpistole verabreicht. Das für dieses Beispiel speziell verwendete Antigen war das humane karzinoembryonale Antigen ("CEA"), ein humanes Tumorantigen, das in Experimenten zur Untersuchung von krebstherapeutischen Behandlungen breit eingesetzt wird. Die bisherige Arbeit hat aufgezeigt, dass dann, wenn ein für CEA codierendes Gen mittels des Partikel-vermittelten Transfers in Mäuse verabreicht wurde, eine Immunantwort vom Th2-Typ dominant war, wie durch das vorherrschende Vorhandensein von IgG1 in dem Serum-Antikörpertiter des Tiers angezeigt. Ohne ein Adjuvan werden CEA-spezifische Antikörper (IgG1) vom Th2-Typ in Mengen nachgewiesen, die mehr als zwanzigmal höher sind als die Mengen der CEA-spezifischen Antikörper (IgG2a) vom Th1-Typ in Balb/c-Mäusen. Die hierin vorgenommene Arbeit wurde zum Nachweis dessen verwendet, dass die Th2-Immunantwort zu einer Th1-Antwort durch die Verwendung eines Immunshift-Adjuvans umgelenkt werden konnte.

**[0079]** Für dieses Protokoll wurde ein Plasmid-Konstrukt, das eine Codierungsregion für das CEA-Antigen unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Immediate-Early-Promotoren (CMV) mit dem CMV-Intron A zwischen dem Promotoren und der Codierungsregion enthielt, verwendet. Um die Zusammensetzung herzustellen, wurden 64 µg des Plasmids, das als WRG7083 bezeichnet wurde, in 120 µl Wasser zu 32 Milligramm an Goldkügelchen von 0,9 Mikronen in einem Eppendorf-Röhrchen, d. h. 2 µg DNA/mg Gold, zugegeben. Als Nächstes wurden 13,5 µl Ammoniumacetat-Lösung und 135 µl Isopropanol zugegeben, und das Röhrchen wurde kurz gevortext. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei -20°C zur Ausfällung der DNA auf das Gold inkubiert. Die DNA-beschichteten Kügelchen wurden mittels einer Zentrifugierung für zehn Sekunden pelletiert, und die Überstände wurden entfernt. Die Gold/DNA-Pellets wurden viermal durch Vortexen in 1 ml Ethanol, Zentrifugieren in der Mikrofuge für 10 Sekunden und Entfernen der Überstände gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden die DNA-beschichteten Gold-Trägerpartikel in 1,14 ml Ethanol resuspendiert, sodass jeweils 250 µl der Ethanoluspension 7 mg der Gold-Trägerpartikel mit 2 µg DNA pro mg Gold enthielten.

**[0080]** Separat davon wurde 1 mg/ml Lösung von MPL in Ethanol zubereitet und als eine MPL-Lagerlösung verwendet. Daraufhin wurde jede der folgenden Lösungen hergestellt:  
(0 MPL) – 250 µl Trägerpartikel-Suspension, 750 µl zusätzliches Ethanol und 0 µl MPL-Lagerlösung.  
(0,05 mg/ml MPL) – 250 µl Trägerpartikel-Suspension, 750 µl zusätzliches Ethanol und 50 µl MPL-Lagerlösung.  
(0,2 mg/ml MPL) – 250 µl Trägerpartikel-Suspension, 750 µl zusätzliches Ethanol und 200 µl MPL-Lagerlösung.  
(0,5 mg/ml MPL) – 250 µl Trägerpartikel-Suspension, 750 µl zusätzliches Ethanol und 500 µl MPL-Lagerlösung.  
(1 mg/ml MPL) – 250 µl Trägerpartikel-Suspension, wobei Ethanol durch Zentrifugation entfernt und durch MPL-Lagerlösung ersetzt ist.

**[0081]** Jedes Präparat wurde für zehn Sekunden in einem Ultraschallbad beschallt, um eine gleichmäßige Gold-Trägerpartikel-Suspension in dem Ethanol zu erzeugen.

**[0082]** Der hierin beschriebene Partikel-vermittelte Transfer wurde unter Verwendung eines Gentransferinstruments vorgenommen, das durch Druckgas angetrieben wurde. Dieses Instrument wurde erhalten von Agra-cetus, Inc. und ist bezeichnet als das ACCELL®-Gerät, wobei im Wesentlichen dasselbe Instrument derzeit erhalten werden kann von PowderJect Vaccines, Inc., das als das PowderJect™ XR-Gerät bezeichnet ist. Der generelle Typ dieses Instruments, welches beschrieben ist in der PCT-Patentanmeldung PCT/US95/00780 und US-Patenten Nrn. 5.865.796 und 5.584.807 ist so konstruiert, dass die DNA-beschichteten Trägerpartikel selbst auf das Innere eines zylindrischen Partikelträgers platziert oder darauf aufgeschichtet werden. Für diesen Träger wurden zylindrische Abschnitte des Tefzel™-Rohrs verwendet. Unter Verwendung einer Spritze, die mit einem zu diesem Zweck erzeugen Adaptor ausgestattet war, wurden die obigen Suspensionen jeweils in eine Länge von 30 Inch des Tefzel™-Rohrs gezogen, wobei ein Milliliter (7 mg DNA-beschichtete Goldpartikel) jeder Suspension eine Länge von 7 Inch des Rohrs füllen, was eine nominale Verteilung von 1 mg an DNA-beschichteten Gold-Trägerpartikeln mit oder ohne MPL pro Inch des Rohrs ergab. Das Rohr wurde auf eine Vorrichtung übertragen, die das Rohr in einer linearen horizontalen Konfiguration hielt. Nachdem sich die Trägerpartikel für einen Moment sichtbar absetzen konnten, wurde überschüssiges Ethanol aus dem Rohr von einem Ende ablaufen gelassen, und das Rohr wurde für dreißig Sekunden rotiert, um die Trägerpartikel gleichmäßiger um das Innere des zylindrischen Rohrs zu verteilen. Das restliche Ethanol wurde dann entfernt, indem Stickstoff für drei Minuten durch das Rohr geschickt wurde. Das Rohr wurde in Abschnitte geschnitten, von denen jeder 0,5 Inch lang war. Jeder Rohrabschnitt wurde als eine Charge der Dosis für das Beschleunigungsgerät verwendet, welches einen Strahl an komprimiertem Heliumgas durch das Innere der Rohrabschnitte freisetzte, um die Trägerpartikel aus dem Rohr aufzunehmen und sie weiter zu dem experimentellen Subjekt zu tragen.

**[0083]** Die Modelltiere waren sechs bis acht Wochen alte Balb/c-Mäuse (Harlan/Sprague/Dawley, Indianapolis, Indiana), die anästhesiert worden waren und deren Bauchhaar abgeschoren worden war. An jeder von zwei benachbarten Stellen auf dem Bauch jedes Tieres wurde eine einzelne Dosis an DNA-beschichteten Trägerpartikeln in die Epidermis mittels einer Heliumladung mit einem Druck von 400 psi übertragen. Somit erhielt jede Stelle 1 µg DNA auf 0,5 mg Gold-Trägerpartikeln, mit variierenden Mengen an MPL, und bei jeweils zwei Stellen pro Tier.

**[0084]** In einem parallelen Experiment wurde die MPL-Lagerlösung direkt auf die Haut der Behandlungsstellen an dem Tier durch Auftupfen vor dem Gentransfer aufgebracht. Dieses erfolgte durch Auftupfen auf den Bauch des Tieres eines Baumwollapplikators, der in die MPL-Lagerlösung getaucht worden war, woraufhin das Ethanol für 10 Sekunden verdampfen durfte, bevor die DNA-beschichteten Trägerpartikel bei einer entsprechenden Dosierung verabreicht wurden.

**[0085]** Vier Wochen nach der Behandlung wurden Serumproben von den immunisierten Tieren erhalten, und die CEA-spezifischen Antikörper (IgG und IgG<sub>2a</sub>) wurden unter Verwendung eines ELISA-Kits von Southern Biotech quantifiziert. Durch Vergleich mit standardmäßigen Immunoglobulin-Isotypen einer bekannten Konzentration wurde die Quantifizierung der Typen der CEA-spezifischen Immunglobuline vorgenommen.

**[0086]** Die Ergebnisse der Studie sind in [Fig. 1](#) dargestellt. Wie daraus erkennbar ist, sind die drei Mäuse, die jeder der Dosierungsmengen des genetischen Impfstoffs und dem Adjuvans unterzogen wurden, durch einen einzelnen Balken in dem Graphen dargestellt. An der linken Kante der Graphen stehen die drei Balken für die Tiere, die kein MPL in ihren Dosierungen erhalten hatten, wobei die Immunantworten jener Tiere, wie daraus entnommen werden kann, vorwiegend vom Th2-Typ waren, bei im Mittel 27,5-mal mehr Antikörpern vom IgG1-Typ im Vergleich zu den IgG2a-Antikörpern. Die größte Veränderung in der Natur der immunologischen Reaktion bei den behandelten Tieren lag bei einer Rate von 0,2 mg/ml MPL vor, wohingegen das Verhältnis von IgG1 zu IgG2a auf 4,5 reduziert worden war. Wurde MPL auf die Tiere aufgetupft, wie in den Balken auf der ganz rechten Seite in [Fig. 1](#) gezeigt, so waren die Ergebnisse zu der Transfermethode mit der Genpistole von 0,2 mg/ml vergleichbar, bei der das Verhältnis von IgG1 zu IgG2a etwa 4,0 betrug. Die anderen MPL-Dosierungen zeigten eine Variation in der Menge der Umlenkung der Immunantwort, doch zeigten alle ganz eindeutig eine robustere IgG<sub>2a</sub>-Reaktion als mit dem genetischen Impfstoff alleine ohne das Adjuvans erzielt werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung des MPL-Adjuvans in der Tat die Natur der immunologischen Reaktion auf den genetischen Impfstoff durch Verschieben der Reaktion zugunsten einer Antikörper-Produktion vom Th1-Typ hin verändert.

**[0087]** Die Studien aus Beispielen 2–5, die hierin nachstehend beschrieben sind, wurden zur Beurteilung der Adjuvans-Wirkung durchgeführt, die durch die intrazelluläre gemeinsame Verabreichung von verschiedenen Antigen-codierenden Sequenzen mit einem Quil A-Adjuvans erhalten wurde. In jeder Studie wurden DNA-Moleküle, die Sequenzen enthielten, die für virale Antigene codierten, mit dem Quil A-Adjuvans kombiniert und

auf Goldpartikel aufgeschichtet, um beispielhafte Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung zu erhalten. Die beschichteten Partikel wurden tierischen Subjekten verabreicht, und die Fähigkeit der Zusammensetzungen, Antigen-spezifische Th-, CTL- und Antikörperreaktionen hervorzurufen, wurde gegen die extrazelluläre intradermale oder subkutane Verabreichung des Quil A-Adjuvans unmittelbar vor dem DNA-Transfer verglichen. Bei jeder der Studien wurden die folgenden allgemeinen Techniken angewendet.

**[0088]** Beschichtung der Core-Trägerpartikel: Geeignete Gewichte der Goldpartikel wurden direkt in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen abgewogen. 400–500 µl eines 0,05 M Spermidins wurden dann zugegeben, und Klumpen des Goldes in der Gold/Spermidin-Lösung wurden unter Verwendung eines Ultraschall-Wasserbades für 3–5 Sekunden aufgebrochen. DNA-Lagerlösung, die das relevante DNA-Plasmidmolekül enthielt, wurde der Gold/Spermidin-Lösung zugegeben, was zu einer Kugelchen-Beladungsrate von 2,0 µg DNA/mg Au führte, und die Röhrchen wurden zugestöpselt und zum Mischen umgedreht und dann kurz gevortext. Nach Herabregulierung der Vortexer-Geschwindigkeit und unter weiterem sanften Vortexen wurde ein Volumen von 10% CaCl<sub>2</sub> einer Menge tropfenweise zugegeben, die gleich dem Volumen an zu dem trockenen Gold gegebenen Spermidin war. War das gesamte Volumen an CaCl<sub>2</sub> zugegeben, so wurde die resultierende Lösung bei hoher Geschwindigkeit für etwa 5 Sekunden gevortext. Die Lösung durfte sich dann bei Raumtemperatur für mindestens 10 Minuten absetzen. Mittlerweile wurde eine Polyvinylpyrrolidon(PVP)/Ethanol-Lagerlösung bei einer Konzentration von 0,03 mg PVP/ml EtOH gebildet. Nach der zehnminütigen Präzipitation wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert (10–15 Sekunden), um das gesamte Gold zu pelletieren. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Röhrchen wurden auf einem Eppendorf-Rack "ausgerecht", um das Goldpellet aufzulockern. 800 µl EtOH wurden zugegeben, und die Röhrchen wurden mehrfach umgedreht, um das DNA-beschichtete Gold zu waschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, woraufhin die Röhrchen nochmals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde. Die gewaschenen DNA-beschichteten Goldpartikel wurden dann der PVP-Lagerlösung zugegeben, und 50 µg Quil A wurden der PVP-DNA-beschichteten Goldpartikel-Lösung unter Beschaltung für 3 Sekunden zugegeben. Die resultierenden Partikel, die mit der DNA + Quil A-Impfstoff-Zusammensetzung beschichtet waren, wurden dann in Längen des Tefzel™-Rohrs geladen, wie oben in Beispiel 1 beschrieben.

**[0089]** Maus-ELISPOT-Assays: Die Materialien und Reagenzien waren wie folgt. Die Beschichtungs-Antikörper enthielten Ratte-Anti-Maus-1FN-γ-Ak, Ratte-Anti-Maus-IL-4-Ak oder Ratte-Anti-Maus-IL-5-Ak (Pharmingen); die Nachweis-Antikörper enthielten biotinyliertes Ratte-Anti-Maus-IFN-γ, biotinyliertes Ratte-Anti-Maus-IL-4 oder biotinyliertes Ratte-Anti-Maus-IL-5 (Pharmingen); steril filtrierten Carbonatpuffer pH 9,6 (Pierce), 96-Well-ELISPOT-Platten (Millipore), sterile 1X Phosphat-gepufferte Saline (PBS, Gibco), Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (Mabtech); alkalische Phosphatase-Substratkit (BioRad) und RPMI-10% FCS Zellkulturmedium (Sigma). Die Zellstimulierung wurde wie folgt vorgenommen. Für die T-Helferzell-Zytokin-Freisetzung wurden Splenozyten von den geimpften Tieren bei  $6 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-10% FCS, ergänzt mit Natriumpyruvat und nicht-essenziellen Aminosäuren, kultiviert. Ein ml der Zellen wurde in jedes Well einer 24-Well-Platte übertragen und für jedes Subjekt war ein Well = nur Medium (für die Hintergrund-Kontrolle) und ein Well = Antigen der Wahl oder Klasse II Peptid der Wahl. Die Platten wurden dann in einem Gewebekultur-Inkubator für 3 Tage inkubiert. Für die CTL Vorläufer-IFN-γ-Freisetzung wurden Splenozyten von den geimpften Tieren bei  $6 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-10% FCS, ergänzt mit Natriumpyruvat und nicht-essenziellen Aminosäuren, kultiviert. Ein ml der Zellen wurde in jedes Well einer 24-Well-Platte übertragen, und die Platte wurde für 2 Tage inkubiert, woraufhin CTL-Peptid in die Peptid-Wells hinzugefügt wurde. Für jedes Subjekt war ein Well = nur Medium, ein Well = CTL-Peptid der Wahl bei  $10^{-5}$  M, und ein Well = irrelevantes CTL-Peptid. Die Platten wurden dann für weitere 24 Stunden nach der Zugabe des Peptids und vor dem Ausplattieren der Zellen in eine ELISPOT-Platte inkubiert.

**[0090]** Die Beschichtung und Blockierung der ELISPOT-Platten wurde wie folgt vorgenommen. Die ELISPOT-Platten wurden einen Tag vor dem Ausplattieren der Zellen unter Verwendung von 50 µl pro Well an 15 µg/ml beschichtetem Antikörper in steriles Carbonatpuffer, pH 9,6, beschichtet. Die beschichteten Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, woraufhin sie sechsmal mit 100 µl PBS gewaschen wurden, um ungebundenen Beschichtungs-Ak zu entfernen, und dann vorsichtig aufgetupft. Jedes Well wurde unter Verwendung von 200 µl RPMI-10% FCS für 1–2 Stunden in einem Gewebekultur-Inkubator bei Raumtemperatur blockiert. Das gesamte Blockierungsmedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen entfernt. Die Zellen wurden wie folgt ausplattiert. Nach 3 Tagen wurden Zellen und Überstand aus jedem Well entnommen und in ein konisches 15 ml-Röhrchen übertragen. Die Zellen wurden in einer Zentrifuge zum Sammeln des Überstands zentrifugiert, welcher dann bei –80°C bis zur Verwendung in den Zytokin-ELISA-Analysen gelagert wurde. Die pelletierten Zellen wurden in 2–5 ml Medium resuspendiert und dann auf eine Endkonzentration von  $1 \times 10^7$ /ml gebracht. Die Zellen wurden den ELISPOT-Wells bei  $1 \times 10^6$ /Well zu gegeben.

**[0091]** Die ELISPOT-Platten wurden wie folgt entwickelt. Die Zellen wurden ausgeklopft und die Platten zweimal mit PBS unter Verwendung einer Spritzflasche gewaschen. Die Wells wurden mit DI-Wasser gewaschen (wobei das Wasser für einige wenige Minuten in den Wells belassen wurde, um die verbliebenen Zellen zu lysieren) und die Platten wurden zwei weitere Male gewaschen. Der Nachweis-Antikörper wurde auf 1 µg/ml in sterilem PBS verdünnt und dann bei 50 µl/Well zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden fünfmal mit PBS gewaschen, und 50 µl Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (verdünnt 1:1000 in PBS) und die Platten wurden bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Die Platten wurden dann fünfmal mit PBS gewaschen, und 50 µl chromogenes alkalische Phosphatase-Substrat wurde hinzugefügt, und die Platten durften bei Raumtemperatur inkubieren, bis dunkle Flecken auftauchten (etwa 2 Stunden). Die Farbreaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit 200 µl Leitungswasser gestoppt, die Platten durften lufttrocknen und die Flecken wurden unter einem Präpariermikroskop (40×) ausgezählt.

**[0092]** Maus-Peptid-gepulste CTL-Assays: Die Materialien und Reagenzien waren wie folgt. RPMI-10-Medium (500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin und Hepes, 55 ml hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS), 0,5 ml Gentamycin, 5,5 ml antibiotisch/antimykotische Lösung); Sensibilisierungsmedium ("SM") ohne IL-2 (500 ml RPMI-10, 5,0 ml an 100 mM Na-Pyruvat, 5,0 ml an 100X nicht-essenziellen Aminosäuren); und SM mit IL-2 (SM mit einer Endkonzentration von 20 U/ml rekombinantem Ratten-IL-2); CTL-Epitop-Peptid (Peptid, gelöst in DMSO einer Gewebekultur-Güte zu einer Lagerkonzentration von  $10^{-2}$  M); ACK-Lysepuffer (BioWhittaker), rekombinantes Ratten-IL-2 (Collaborative); Mitomycin CC (Aldrich, gelöst in sterilem PBS zum Erhalt einer 500 µg/ml Lagerlösung; konische 50 ml-Röhrchen (Falcon), Nylonitter-Siebbecher-Einsätze (Falcon);  $^{51}\text{Chrom}$  und Lumaplates (Packard).

**[0093]** Für Peptid-gepulste Stimulatoren wurden naive syngene Milzen (etwa  $1,2 \times 10^7$  Stimulatoren/Maus) durch Entnehmen der Milzen und Mahlen durch Pressen zwischen zwei autoklavierten gefrostenen Trägern, um den Sack aufzubrechen und die Zellen in eine kleine Petrischale freizusetzen, bereitgestellt. Die Zellklumpen wurden durch Auf- und Abpipettieren der Zellen mit einer 3 ml-Transferpipette aufgebrochen, und die resultierende Zellsuspension wurde durch ein 70 µm-Nylon-Zeltsieb in ein konisches 50 ml-Röhrchen unter Verwendung von 5–10 ml RPMI-10-Medium gegossen, um die Zellen zu waschen. Die rückgewonnenen Splenozyten wurden bei 1500 rpm für 5 Minuten zum Pelletieren zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Die RBCs wurden durch Resuspendieren der Splenozyten in 5 ml ACK-Lysepuffer für 1–2 Minuten lysiert, wodurch die Zellen zweimal mit 20 ml nicht-ergänztem RPMI und einmal mit RPMI-10 gewaschen wurden. Die Zellen wurden dann bei etwa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Die Stimulatoren wurden mit Mitomycin C behandelt (für jeweils 10 ml Zellen wurden 500 µl an 0,5 mg/ml Mitomycin C zugegeben) und die Zellen wurden mit dem Mitomycin C für 25–45 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit nicht-ergänztem RPMI und einmal mit RPMI-10 gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden zu  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in SM mit 20 U/ml Ratten-IL-2 resuspendiert, und das Lager-CTL-Epitop-Peptid wurde zugegeben. Diese Stimulator-Zellen wurden bei einem Verhältnis von 3/1 Responder/Stimulator in 24-Well-Platten dispesiert und über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert.

**[0094]** Die in vitro-Stimulation der Responderzellen wurde wie folgt durchgeführt. Milzen wurden von geimpften und Kontroll-Mäusen entnommen, und die Responder-Splenozyten wurden durch Mahlen der Milzen wie oben beschrieben isoliert. RBCs wurden mit 5 ml ACK-Lysepuffer für 2–3 Minuten lysiert, und die Zellen wurden zweimal mit 20 ml nicht-ergänztem RPMI und einmal mit RPMI-10 gewaschen. Die Splenozyten wurden dann bei  $6 \times 10^6$  Zellen/ml in SM ohne IL-2 resuspendiert. Für jede Maus wurde 1 ml Splenozyten in jedes Wele einer 24-Well-Platte, die 1 ml der  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Peptid-gepulsten Stimulator-Zellen enthielten, wie oben beschrieben in SM mit IL-2 dispensierte (Endkonzentration an IL-2 betrug 10 U/ml), und die Platten wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 5–7 Tage inkubiert.

**[0095]** CTL  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay: Für die Peptid-spezifische Lyse wurden die folgenden Techniken angewendet. Syngene Zielzellen in der Log-Phase wurden in 96-Well-Platten bei etwa 30.000 Zellen/Well ausplattiert. Eine geeignete Menge an Zielzellen wurde in konischen Röhrchen pelletiert und in 20 µl hitzeinaktiviertem FBS resuspendiert. 100–200 µl an  $^{51}\text{Cr}$  (Natriumchromat) wurden jedem Pellet zugegeben, dieses gut vermischt und dann für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zeilen wurden dann viermal mit 6–10 ml RPMI-10 pro Pellet gewaschen und dann bei  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI-10 resuspendiert. Für die Peptid-gepulsten Ziele wurde eine entsprechende Menge des Lager-CTL-Epitop-Peptids zugegeben, um eine abschließende optimale Peptidkonzentration zu erreichen (etwa  $10^{-5}$  M). Die Zielzellen wurden mit den Peptiden für mindestens 30 Minuten (bei 37°C) vor dem Ausplattieren mit den Effektorzellen gepulst.

**[0096]** Nach 5–7 Tagen der in vitro-Stimulation wurden die Effektor-Splenozyten aus den 24-Well-Platten entnommen, und die Zellen von jeder Maus wurden in konischen 15 ml-Röhrchen gepoolt und dann bei  $1,5 \times 10^7$

Zellen/ml resuspendiert. Für das Ausplattieren wurden Splenozyten von jeder Maus bei 50, 17, 5,6 und 1,9 Effektor/Ziel-Verhältnissen ausplattiert. Nach den Verdünnungen wurden 100 µl der  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Ziele jedem Well zugegeben. Die Platten wurden dann kurz zentrifugiert und daraufhin 4–6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Lyse wurde gegen sowohl Peptid-gepulste als auch ungepulste Kontrollzielen für jede Maus gemessen.

**[0097]** Für die nicht-spezifische Lyse wurde dasselbe Protokoll befolgt, außer, dass 100 µl der ungepulsten Ziele ebenfalls ausplattiert wurden. Nach einer 4- bis 6-stündigen Inkubation wurden die Platten zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren, und lysiert. 25 µl des Überstandes wurden dann auf Lumaplates übertragen und durften für 2 Stunden oder über Nacht trocknen. Die Platten wurden versiegelt und unter Verwendung eines standardmäßigen Programms für  $^{51}\text{Cr}$ -Feststoff ausgezählt. Um die prozentuale Lyse zu berechnen wurde (Test-cpm – spont. cpm) durch (max. cpm – spont. cpm) dividiert und mit 100 multipliziert. Um die prozentuale spezifische Lyse zu erhalten, wurde die prozentuale Lyse der ungepulsten Ziele von der prozentualen Lyse der Peptid-gepulsten Ziele subtrahiert.

**[0098]** ELISA: Die Antikörperreaktion auf die verschiedenen Impfstoff-Zusammensetzungen wurde mittels eines standardmäßigen ELISA-Verfahrens bestimmt. Genauer gesagt wurden Medium-bindende Platten (Costar) mit 100 µl/Well mit einer 1 µg/ml Antigen-Lagerlösung (in PBS) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antigenlösung wurde abgesaugt, und die Platten wurden mit 5% Trockenmilch/PBS für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer (10 mM TBS/0,1% Brij-35) gewaschen, und 100 µl Probenserum wurden zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnungspuffer: 2% Trockenmilch/PBS/0,05% Tween-20). Die Platten wurden dreimal gewaschen und mit Biotin-markierten Ziege-Antikörpern, die für Maus-Immunglobulin IgG oder spezifische IgG-Subklassen spezifisch waren, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei zusätzlichen Waschgängen wurden die ELISA-Platten mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugaten für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Platten gewaschen und mit TMB-Substrat (Kit von Bio-Rad, Richmond, CA) entwickelt, wobei sie sich für 30 Minuten entwickeln durften. Die Reaktionen wurden mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Platten bei A<sub>450</sub> ausgelesen. Die mittlere Hintergrund-Absorbanz wurde anhand der Wells bestimmt, die alle Reagenzien mit Ausnahme der Testseren erhalten hatten.

## Beispiel 2

### Intrazelluläre Koverabreichung von Quil A mit DNA auf Goldkugelchen zur Verstärkung einer Influenza-NP-spezifischen Immunantwort

**[0099]** Um zu bestimmen, ob die gemeinsame Verabreichung einer Zusammensetzung, enthaltend einen DNA-Impfstoff-Vektor, der das Influenza-NP-Antigen codierte, und des Quil A-Adjuvans direkt in Zellen eine Antigen-spezifische Immunantwort verstärken kann, wurde die folgende Studie vorgenommen. Experimentelle Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden wie folgt eingerichtet: (Gruppe 1) 3 Kontrollmäuse, die mit irrelevanter DNA beschichtete Goldkugelchen über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät erhielten; (Gruppe 2) 3 Mäuse, die lediglich mit dem NP DNA-Vektor beschichtete Goldkugelchen über das PowderJect™ XR-Gerät erhielten; (Gruppe 3) 4 Mäuse, die lediglich mit dem NP DNA-Vektor beschichtete Goldkugelchen über das PowderJect™ XR-Gerät erhielten und inokuliert mit Trehalose oder Saline vor der DNA-Verabreichung; (Gruppe 4) 3 Mäuse, die mit dem NP DNA-Vektor und dem Quil A-Adjuvans beschichtete Goldkugelchen erhielten; (Gruppe 5) 3 Mäuse, die mit dem NP DNA-Vektor beschichtete Goldkugelchen erhielten, gemeinsam verabreicht unmittelbar nach einer intradermalen Injektion von Quil A; und (Gruppe 6) 3 Mäuse, die mit dem NP DNA-Vektor beschichtete Goldkugelchen erhielten, gemeinsam verabreicht unmittelbar nach einer subkutanen Injektion einer Lösung, die Quil A enthielt.

**[0100]** Der NP DNA-Vektor enthielt eine Sequenz, die für das Influenza NP-Antigen (von dem PR8-Stamm) codierte und beschrieben ist bei Pertmer et al. (1995) Vaccine 13: 1427–1430. Alle Goldkugelchen wurden wie oben beschrieben bei einer Kugelchen-Beladungsrate von 0,5 mg Au/Ziel und einer DNA-Beladungsrate von 2,0 µg/mg Au beladen. Die Verabreichung mit dem PowderJect™ XR-Gerät erfolgte an zwei Zielstellen bei einem Betriebsdruck von 400 psi und stellte ein Experiment nur mit Priming dar. Nach einem Monat wurden die Mäuse geopfert und wurden Blut- und Milzproben für die Analyse entnommen, wie ebenfalls oben beschrieben. Für den ELISPOT-Assay war das zur Stimulierung der CTL-Vorläufer verwendete Peptid TYQRTRALV (bei 10<sup>-8</sup> M), und das lysierte Influenza-PR8-Virus wurde bei 5 µg/ml für die Th-Stimulierung verwendet. Für die Chrom-Analyse war das zur Stimulierung der Responder verwendete Peptid TYQRTRALV (bei 10<sup>-8</sup> M); und das zum Pulsen der Ziele verwendete Peptid war TYQRTRALV (bei 10<sup>-5,5</sup> M). Für den ELISA war das Fang-Antigen das PR8 NP-Antigen (Sprafas) bei 1 mg/ml.

**[0101]** Die Ergebnisse aus der Studie sind nachstehend in Tabelle 1 dargestellt. Wie zu erkennen ist, verstärkt die intrazelluläre Verabreichung von Quil A in Verbindung mit dem DNA-Vektor (Gruppe 4) die Antigen-spezifische T-Helfer-Reaktion, die CTL- und Antikörper-Reaktionen, und ist der extrazellulären intradermalen (Gruppe 5) oder subkutanen (Gruppe 6) Koverabreichung des Quil A unmittelbar vor dem DNA-Transfer sowohl bezüglich der Induktion von CTL- als auch von Antikörper-Reaktionen überlegen.

TABELLE 1

Gruppe #	mittl. CTLp SFC/ $10^6$ Zellen	mittl.% Lyse (40:1 E/T)	Th1-Reaktion (IFN- $\gamma$ )	Th2-Reaktion (IL-4)	IgG (Titer)
1	0	0	0	0	< 100
2	18	12,6	15	3	14.642
3	nb	17,5	Nb	Nb	5.171
4	52	43,0	53	14	40.637
5	6	5,7	55	28	5.283
6	4	19,7	Nb	Nb	25.600

## Beispiel 3

Intrazelluläre Koverabreichung von Quil A mit DNA auf Goldkügelchen zur Verstärkung einer Influenza-NP-spezifischen Immunantwort

**[0102]** Als Hilfe zur Bestätigung der oben in Beispiel 2 erhaltenen Ergebnisse wurde die folgende Studie durchgeführt. Experimentelle Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden wie folgt eingerichtet: Experimentelle Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden wie folgt eingerichtet: (Gruppe 1) 4 Kontrollmäuse, die mit irrelevanter DNA beschichtete Goldkügelchen über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät erhielten; (Gruppe 2) 4 Mäuse, die mit irrelevanter DNA und Quil A beschichtete Goldkügelchen bei gemeinsamer Verabreichung über das PowderJect™ XR-Gerät erhielten; (Gruppe 3) 4 Mäuse, die lediglich mit dem NP DNA-Vektor beschichtete Goldkügelchen über das PowderJect™ XR-Gerät erhielten; und (Gruppe 4) 4 Mäuse, die mit dem NP DNA-Vektor und dem Quil A-Adjuvans beschichtete Goldkügelchen erhielten.

**[0103]** Auch hier enthielt der NP DNA-Vektor eine Sequenz, die für das Influenza NP-Antigen (von dem PR8-Stamm) codierte und beschrieben ist bei Pertmer et al. (1995) Vaccine 13: 1427–1430. Alle Goldkügelchen wurden wie oben beschrieben bei einer Kügelchen-Beladungsrate von 0,5 mg Au/Ziel und einer DNA-Beladungsrate von 2,0  $\mu$ g/mg Au beladen. Die Verabreichung mit dem PowderJect™ XR-Gerät erfolgte an zwei Zielstellen bei einem Betriebsdruck von 400 psi und stellte ein Experiment nur mit Priming dar. Die Beimpfung erfolgte lediglich einmal, und nach einem Monat wurden die Mäuse geopfert und wurden Blut- und Milzproben für die Analyse entnommen, wie ebenfalls oben beschrieben. Für den ELISPOT-Assay war das zur Stimulierung der CTL-Vorläufer verwendete Peptid TYQRTRALV (bei  $10^{-8}$  M), und das lysierte Influenza-PR8-Virus wurde bei 5  $\mu$ g/ml für die Th-Stimulierung verwendet. Für die Chrom-Analyse war das zur Stimulierung der Responder verwendete Peptid TYQRTRALV (bei  $10^{-8}$  M); und das zum Pulsen der Ziele verwendete Peptid war TYQRTRALV (bei  $10^{-5,5}$  M). Für den ELISA war das Fang-Antigen das PR8 NP-Antigen (Sprafas) bei 1 mg/ml.

**[0104]** Die Ergebnisse aus der Studie sind nachstehend in Tabelle 2 dargestellt. Wie zu erkennen ist, liefert die intrazelluläre Verabreichung von Quil A in Verbindung mit dem DNA-Vektor (Gruppe 4) eine verstärkte Antigen-spezifische T-Helfer-Reaktion, CTL-Reaktion und Antikörper-Reaktion.

TABELLE 2

Gruppe #	mittl. CTLp SFC/ $10^6$ Zellen	mittl.% Lyse (50:1 E/T)	IgG (Titer)
1	6,5	0,3	< 100
2	0,5	0	< 100
3	14,5	17,0	16.846
4	25,0	28,8	62.706

## Beispiel 4

Intrazelluläre Koverabreichung von Quil A mit DNA auf Goldkügelchen zur Verstärkung einer HIV gp120-spezifischen CTL-Immunantwort

**[0105]** Um zu bestimmen, ob die gemeinsame Verabreichung einer Zusammensetzung, enthaltend einen DNA-Impfstoff-Vektor, der das humane Immunodefizienz-Virus (HIV) gp120-Antigen codierte, und des Quil A-Adjuvans direkt in Zellen eine Antigenspezifische Immunantwort verstärken kann, wurde die folgende Studie vorgenommen. Experimentelle Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden wie folgt eingerichtet: (Gruppe 1) 4 Kontrollmäuse, die mit irrelevanter DNA beschichtete Goldkügelchen über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät erhielten; (Gruppe 2) 4 Mäuse, die mit irrelevantem DNA-Vektor und Quil A beschichtete Goldkügelchen erhielten, die über das PowderJect™ XR-Gerät verabreicht wurden; (Gruppe 3) 3 Mäuse, die lediglich mit dem HIV gp120 DNA-Vektor beschichtete Goldkügelchen über das PowderJect™ XR-Gerät erhielten und einmal geprämt und dreimal aufgefrischt wurden; (Gruppe 4) 3 Mäuse, die lediglich mit dem HIV gp120-DNA-Vektor beschichtete Goldkügelchen erhielten, verabreicht über das PowderJect™ XR-Gerät; (Gruppe 5) 3 Mäuse, die mit dem HIV gp120-DNA-Vektor und dem Quil A-Adjuvans beschichtete Goldkügelchen erhielten, die gemeinsam verabreicht wurden mit dem PowderJect™ XR-Partikel-vermittelten Transfergerät, und welche einmal geprämt und dreimal aufgefrischt wurden; und (Gruppe 6) 3 Mäuse, die dem HIV gp120-DNA-Vektor und dem Quil A-Adjuvans beschichtete Goldkügelchen erhielten, die verabreicht wurden mit dem PowderJect™ XR-Partikel-vermittelten Transfergerät, welche einmal geprämt und einmal aufgefrischt wurden.

**[0106]** Der HIV gp120-DNA-Vektor enthielt eine Sequenz, die für das HIV gp120-Antigen (von dem LAI-Stamm) codierte und beschrieben ist bei Heydenburg et al. (1994) AIDS Res. and Hum. Retroviruses 10: 1433–1441. Alle Goldkügelchen wurden wie oben beschrieben bei einer Kügelchen-Beladungsrate von 0,5 mg Au/Ziel und einer DNA-Beladungsrate von 2,0 µg/mg Au beladen. Die Verabreichung mit dem PowderJect™ XR-Gerät erfolgte an zwei Zielstellen bei einem Betriebsdruck von 400 psi. Variierende Anzahlen an Impfungen wurden vorgenommen (einige mit einer Auffrischung, andere mit drei Auffrischungen), wobei die Impfung alle vier Wochen verabreicht wurde. Die Opferung aller Mäuse erfolgte nach Woche 14 der Studie, und die Milzproben für die Analyse wurden wie oben beschrieben entnommen. Für den ELISA-Assay war das zur Stimulierung der CTL-Vorläufer verwendete Peptid RGPGRAFVTI (bei  $10^{-7}$  M). Für die Chrom-Analyse war das zur Stimulierung der CTL-Responder und zum Pulsen der Ziele verwendete Peptid RGPGRAFVTI (bei  $10^{-7}$  M).

**[0107]** Die Ergebnisse aus der Studie sind nachstehend in Tabelle 3 berichtet. Wie zu erkennen ist, bestätigen die Ergebnisse die oben mit dem Influenza-Antigen erhaltenen Daten darin, dass die intrazelluläre Koverabreichung von Quil A und DNA-Vektor die HIV gp120-spezifischen CTL-Reaktionen nach einem Priming und einer Auffrischung in den geimpften Mäusen verstärkten, bei keinem signifikanten Unterschied, wenn die Mäuse dreimal geboostet wurden.

TABELLE 3

Gruppe #	mittl.% Lyse (50:1 E/T)
1	3,2
2	3,5
3	36,7
4	14,7
5	32,7
6	35,4

## Beispiel 5

Intrazelluläre Koverabreichung von Quil A mit DNA auf Goldkügelchen zur Verstärkung einer HBsAg-spezifischen CTL-Immunantwort

**[0108]** Um zu bestimmen, ob die gemeinsame Verabreichung einer Zusammensetzung, enthaltend einen DNA-Impfstoff-Vektor, der das Hepatitis B-Virus-Oberflächen-Antigen (HBsAg) codierte, und des Quil A-Adjuvans direkt in Zellen eine Antigenspezifische Immunantwort verstärken kann, wurde die folgende Studie vor-

genommen. Experimentelle Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden wie folgt eingerichtet: (Gruppe 1) 4 Kontrollmäuse, die mit irrelevanter DNA beschichtete Goldkügelchen über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät erhielten; (Gruppe 2) 4 Mäuse, die mit HbsAG-DNA-Vektor beschichtete Goldkügelchen erhielten, die über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät verabreicht wurden; (Gruppe 3) 4 Mäuse, die mit dem HbsAg-DNA-Vektor und dem Quil A-Adjuvans beschichtete Goldkügelchen erhielten, und verabreicht über das PowderJect™ XR-Partikel-vermittelte Transfergerät. Das Experiment wurde wiederholt, wobei exakt dieselben experimentellen Gruppen verwendet wurden.

**[0109]** Der HbsAg-DNA-Vektor enthielt eine Sequenz, die für das HBV-Oberflächenantigen codiert, und die als pWRG7128 bezeichnet ist. Das Plasmid pWRG7128 enthält, zusätzlich zu den geeigneten Kontrollelementen, eine Sequenz, die für das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsSAg) codiert, die unter der Transkriptionskontrolle eines Cytomegalovirus-(CMV)-Promotoren steht, und von dem gezeigt worden ist, dass es HBsAg-Partikel auf die Transfektion in die meisten Zelltypen hin produziert. Das pWRG7128-Plasmid wurde wie folgt konstruiert. Ein Klonierungsvektor pWRG7077 (Schmaljohn et al. (1997) J. Virol. 71: 9563–9569) wurde so, dass er eine HBsAG-Codierungssequenz akzeptiert, durch Verdau des Vektors bis zur Vollständigkeit mit BamHI, gefolgt von einem teilweisen Verdau mit Hind3, präpariert. Nach dem Stumpfmachen der 5'-Überhänge durch Behandlung mit einem Klenow-Fragment und Desoxyribonukleotiden wurde das 4,3 kB-Vektorfragment isoliert. Das 1,35 kB HBsAg-Insertfragment (das die untranslatierte pre-S2-Sequenz, die HBsAG-Codierungssequenz des adw-Stamms von 226 Aminosäuren und das HBV-Enhancerelement enthielt) wurde aus Plasmid pAM6 (ATCC, Rockford, MD) durch Verdau mit BamHI ausgeschnitten. Nach dem Stumpfendig machen durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment und Desoxyribonukleotiden wurde das Fragment isoliert und in das oben beschriebene 4,3 kB-Vektorfragment ligiert. Die resultierenden Rekombinanten wurden auf die geeignete Orientierung des Inserts gescreent, und ein korrektes Isolat wurde identifiziert und als ein Intermediat-Plasmid bezeichnet (pWRG7074). Um den Start des Codons des X-Proteins (vorhanden an dem 3'-Ende des pAM6 1,35 kB-Inserts) zu entfernen, wurde ein 4,86 kB-Vektorfragment aus dem pWRG7074-Plasmid durch Verdau mit BglI2 isoliert, mit dem Klenow-Fragment und Desoxyribonukleotiden stumpfendig gemacht und dann mit BstX1 verdaut. Als Nächstes wurde ein Insertfragment von 754 bp aus dem pWRG7074-Konstrukt durch Verdau mit Ncol isoliert, mit Mungobohnen-Nuklease behandelt und mit BstX1 verdaut. Der resultierende Vektor und die Insertfragmente wurden dann zusammen ligiert, um das klinische Plasmid pWRG7128 zu bilden. Alle Goldkügelchen wurden wie oben beschrieben bei einer Kügelchen-Beladungsrate von 0,5 mg Au/Ziel und einer DNA-Beladungsrate von 2,0 µg/mg Au beladen. Die Verabreichung mit dem PowderJect™ XR-Gerät erfolgte an zwei Zielstellen bei einem Betriebsdruck von 400 psi. Die Impfung erfolgte nur einmal, und nach einem Monat wurden die Mäuse geopfert und die Milzproben für die Chrom-Freisetzungsspezifische Lyse-Analyse wie oben beschrieben entnommen. Für den ELISPOT-Assay war das zur Stimulierung der CTL-Vorläufer verwendete Peptid IPQSLDSWWTS (bei  $10^{-6}$  M). Für die Chrom-Analyse wurde eine P815-Zelllinie, die das HBV-Oberflächenantigen exprimiert, anstelle des Peptids zur Stimulierung der Responder (bei 40.000/Well) und für die Effektoren (bei 30.000/Well) verwendet.

**[0110]** Die Ergebnisse der Studie sind nachstehend in Tabelle 4 berichtet. Wie daraus ersehen werden kann, bestätigen die Ergebnisse die oben sowohl mit dem Influenza-Antigen als auch dem HIV-Antigen erhaltenen Daten darin, dass die intrazelluläre Koverabreichung von Quil A und DNA-Vektor die HbsAg-spezifischen CTL-Reaktionen verstärkte.

TABELLE 4

% Spezifische Lyse bei Effektor: Ziel-Verhältnis	Tiere der Gruppe 2, erstes Experiment	Tiere der Gruppe 3, erstes Experiment	Tiere der Gruppe 2, zweites Experiment	Tiere der Gruppe 3, zweites Experiment
17:1	26,9	44,2	53,4	78,6
5,6:1	16,5	36,3	34,7	70,9
1,9:1	7,4	18,0	22,3	41,9

#### Patentansprüche

1. Beschichtete Partikel, die zur Verwendung in der Partikel-vermittelten Nukleinsäure-Immunisierung geeignet sind, welche Partikel Core-Trägerpartikel umfassen, beschichtet mit:
  - einem Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Sequenz, die für ein Antigen kodiert; und
  - ein Adjuvans, welches darin wirksam ist, wenigstens eine Komponente einer Immunantwort, die gegen das

Antigen hervorgerufen wird, zu verstärken, wobei das Adjuvans in einer anderen Form als DNA vorhanden ist.

2. Beschichtete Partikel nach Anspruch 1, worin das Nukleinsäuremolekül in einem Vektorkonstrukt vorhanden ist.
3. Beschichtete Partikel nach Anspruch 2, worin das Antigen ein Antigen von einem viralen, bakteriellen, Parasiten- oder fungalen Pathogen ist.
4. Beschichtete Partikel nach Anspruch 3, worin das Virus ausgewählt ist aus Hepatitis B-Virus (HBV), humanem Immundefizienz-Virus (HIV) und einem Influenza-Virus.
5. Beschichtete Partikel nach Anspruch 3, worin das Antigen ein Circumsporozoiten-Antigen (CS) von einem Malaria-Parasit ist.
6. Beschichtete Partikel nach Anspruch 1 oder 2, worin das Antigen ein Tumor-spezifisches Antigen oder ein mit einer Autoimmunerkrankung assoziiertes Virus ist.
7. Beschichtete Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Adjuvans in der Form eines Proteins, eines Lipids, eines Nicht-Protein-Hormons oder eines Vitamins vorhanden ist.
8. Beschichtete Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Adjuvans ein gereinigtes Protein-Derivat von Bacillus Calmette-Guerin (BOG), mycobakterielles Zellwand-Skelettmaterial, Monophosphoryl-Lipid A oder ein Saponin ist.
9. Beschichtete Partikel nach Anspruch 8, worin das Adjuvans Quil A ist.
10. Beschichtete Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Adjuvans zumindest teilweise in Ethanol löslich ist.
11. Beschichtete Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das Adjuvans ein Immunshift-Adjuvans ist.
12. Beschichtete Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Core-Trägerpartikel Wolfram- oder Goldpartikel sind.
13. Beschichtete Partikel nach Anspruch 12, worin die Goldpartikel eine nominale Größe von etwa 0,1 bis 10 µm aufweisen.
14. Partikelbeschleunigungsgerät, das für die Partikel-vermittelte Nukleinsäure-Immunisierung geeignet ist, wobei das Gerät mit beschichteten Partikeln, wie in einem der vorangehenden Ansprüche definiert, geladen ist.
15. Transferkassette, die zur Verwendung in einem Partikel-vermittelten Transfergerät geeignet ist, welche Kassette mit beschichteten Partikeln, wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 definiert, geladen ist.
16. Verwendung von beschichteten Partikeln, wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 definiert, in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in der Nukleinsäure-Immunisierung.
17. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, und eines Adjuvans, wie in einem der Ansprüche 1 und 7 bis 11 definiert, für die Herstellung eines Medikaments zur Hervorruft einer Immunantwort gegen ein ausgewähltes Antigen in einem Individuum, mittels einer Methode, umfassend das Übertragen des Medikaments direkt in die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhandenen Zellen.
18. Verwendung eines Adjuvans, wie in einem der Ansprüche 1 und 7 bis 11 definiert, für die Herstellung eines Medikaments zur Verstärkung einer Immunantwort in einem Individuum, wobei das Medikament direkt in die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhandenen Zellen übertragen wird und gemeinsam mit einem Nukleinsäuremolekül, wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, verabreicht wird.
19. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert, für die Herstellung

lung eines Medikaments zur Hervorrufung einer Immunantwort in einem Individuum, wobei das Medikament gemeinsam mit einem Adjuvans, wie in einem der Ansprüche 1 und 7 bis 11 definiert, verabreicht wird, und das Adjuvans direkt in die an einer Zielstelle in dem Individuum vorhandenen Zellen übertragen wird.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei das Nukleinsäuremolekül und/oder das Adjuvans auf Core-Trägerpartikel aufgeschichtet wird.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Core-Trägerpartikel Wolfram- oder Goldpartikel sind.

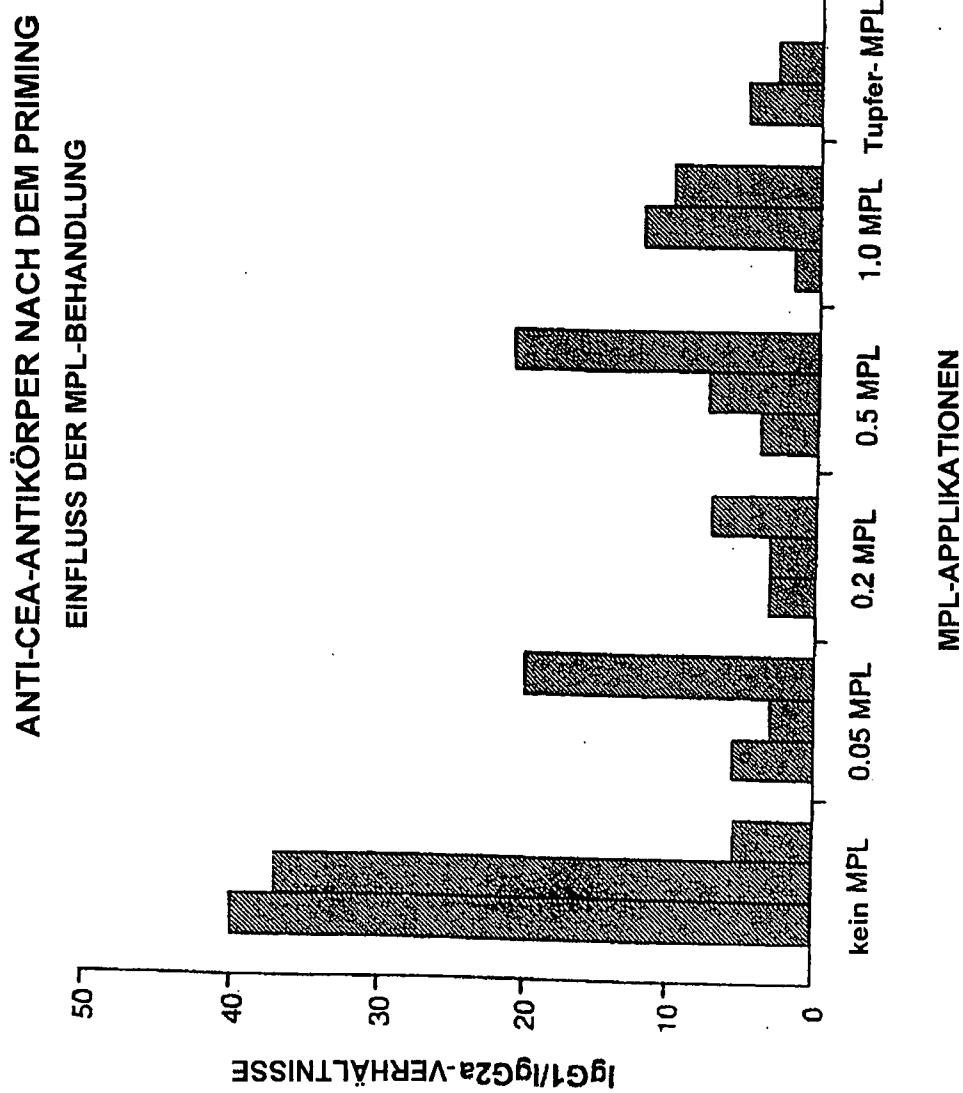
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Goldpartikel eine nominale Größe von etwa 0,1 bis 10 µm aufweisen.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei das Nukleinsäuremolekül und/oder das Adjuvans unter Anwendung einer Partikel-vermittelten Transfertechnik übertragen wird/werden.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 23, wobei die Zielstelle epidermales Gewebe ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1