



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 26 304 T2** 2005.10.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 023 319 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 26 304.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/09652**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 922 216.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/019349**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.10.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 14/045**

C12N 15/86, A61K 39/00, G01N 33/569

(30) Unionspriorität:

950064	14.10.1997	US
21298	10.02.1998	US

(73) Patentinhaber:

City of Hope, Duarte, Calif., US

(74) Vertreter:

Hansmann & Vogeser, 81369 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**DIAMOND, Jeffrey, Don, Glendora, US; YORK,
Joanne, Montana 59808, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNOREAKTIVE PEPTID CTL EPI TOPE VON MENSCHLICHEM CYTOMEGALOVIRUS**

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****1. TECHNISCHES GEBIET**

[0001] Diese Erfindung betrifft das menschliche Cytomegalovirus (HCMV) und insbesondere Peptidfragmente von einer einzigen Proteinuntereinheit, die als T-Zell-Epitope des HCMV beim Menschen fungieren. Die Peptidfragmente sind in der Lage, menschliche zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zur Erkennung und zur Lyse von mit HCMV infizierten menschlichen Zellen anzuleiten. Die Peptidfragmente können unabhängig HCMV-spezifische CTL zur Lyse von Zellen anleiten, die mit dem Peptid inkubiert wurden und die HLA A, B oder C-Gene exprimieren.

2. BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK

[0002] Das HCMV-Genom ist relativ groß (etwa 235 kb) und hat die Kapazität zur Kodierung für mehr als zweihundert Proteine. HCMV ist aus einem nuklearen Komplex von Nukleinsäuren (doppelsträngige DNA) umgeben von Kapsid-Proteinen mit strukturellen oder enzymatischen Funktionen und einer äußeren, Glycopeptide und Glycolipide enthaltenden Hüllmembran aufgebaut. HCMV ist ein Mitglied der Herpesvirus-Familie und ist mit einer Anzahl klinischer Syndrome in Zusammenhang gebracht worden.

[0003] Die HCMV-Infektion ist relativ verbreitet und üblicherweise bei einem gesunden, immunkompetenten Kind oder Erwachsenen selbst-limitierend (L. Rasmussen, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154, 221–254, 1990). Etwa 10% aller Neugeborenen tragen HCMV und das Virus kann beim Fötus oder Säugling schwere angeborene Erkrankungen verursachen. Einige dieser neugeborenen Säuglinge erleiden angeborene Geburtsschäden. Andere neugeborene Säuglinge tragen das Cytomegalovirus für einige Zeit, bevor sie tatsächliche Krankheitssymptome zeigen. So ist HCMV z. B. eine häufige Ursache für geistige Retardation bei Kindern, die sich die Infektion in utero von Müttern zuziehen, die eine akute Infektion übertragen.

[0004] Einige Studien sind unter der Fragestellung begonnen worden, ob eine bei einem ansonsten gesunden Erwachsenen persistierende und augenscheinlich asymptomatische HCMV-Infektion für bestimmte Individuen ein Gesundheitsrisiko darstellt. Zum Beispiel entwickeln einige Individuen, bei denen eine koronare Angioplastie durchgeführt wurde, manchmal in der Folge eine Restenose als Ergebnis der arteriellen Umgestaltung. In einer Studie hatten etwa ein Drittel dieser Patienten mit Restenose nachweisbare HCMV-DNA in den arteriellen Läsionen (E. Speir et al., Science 265, 391–394 (1994)), wohingegen in einer anderen Studie CMV seropositive Patienten eine fünffach höhere Wahrscheinlichkeit hatten, eine Restenose zu entwickeln als die seronegative Vergleichsgruppe (Y. F. Zhou et al., New England J. Med. 335, 624–630 (1996)). Diese Studien legen nahe, dass eine Verringerung HCMV-infizierter Wirtszellen für bestimmte Individuen von Nutzen ist.

[0005] HCMV ist auch mit Morbidität und Mortalität bei immunologisch beeinträchtigten Patienten in Verbindung gebracht worden. HCMV ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Behandlung von am erworbenen Immundefizienz-Syndrom (AIDS) leidenden Patienten. Die entsprechende Komplikation ist Retinitis, die, wenn sie unbehandelt bleibt, zur Erblindung führen kann. Historisch gesehen ist die CMV eine der vereierendsten opportunistischen Infektionen (OI) gewesen, die HIV-1-infizierte Individuen befällt, deren CD4⁺-T-Zellzahl unter 100/mm³ vermindert ist. Es treten auch weitere Krankheitsmanifestationen der CMV-Virämie auf, wenn die CD4⁺-T-Zellzahl unter 100/mm³ fällt, einschließlich Enzephalitis, Enteritis und Pneumonie. Bei Autopsien wurde eine Multiorgan-Beteiligung der CMV-Erkrankung bei der überwiegenden Mehrheit von AIDS-Patienten mit schwerer CMV-Retinitis gefunden.

[0006] Mit HCMV infizierte Patienten leiden als Ergebnis der Krankheitsauswirkungen häufig unter einer Beeinträchtigung lebenswichtiger Organe einschließlich Speicheldrüsen, Gehirn, Niere, Leber und Lunge. Weiterhin ist HCMV mit einem breiten Spektrum klassischer Symptome einschließlich Mononucleose und interstieller Pneumonie assoziiert. HCMV hat auch ein onkogenes Potential und eine mögliche Verbindung zu bestimmten Typen maligner Entartungen einschließlich dem Kaposi-Sarkom.

[0007] HCMV kann opportunistische Infektionen verursachen, die zu einer Vielzahl von Komplikationen zum Beispiel bei immunsupprimierten Organtransplantations-Patienten führen. Vor der Anwendung antiviraler Chemotherapie war die HCMV-Infektion für einen wesentlichen Anteil der Komplikationen nach Knochenmarkstransplantation (KMT) verantwortlich (J. Meyers et al., J. Infect Dis. 153, 478–488 (1986)). Die Einführung von Arzneimitteln wie Ganciclovir mit erheblicher anti-CMV-Aktivität hat die mit CMV-Infektionen assoziierten Kom-

plikationen nach KMT dramatisch reduziert (G. Schmidt et al., New England J. Med. 324, 1005–1011 (1991) und J. M. Goodrich et al., New England J. Med. 325, 1601–1607 (1991)). Ganciclovir ist äußerst wirksam, wenn es prophylaktisch vor der Diagnose einer HCMV-Infektion verabreicht wird. Dieser Ansatz hat einige negative Aspekte einschließlich dessen, dass ein größerer Anteil der Empfänger (ein Drittel) eine Neutropenie und eine damit einhergehende erhöhte Anzahl von tödlichen bakteriellen und Pilz-Erkrankungen entwickelt (J. M. Goodrich et al., Ann. Intern. Med. 118, 173–178 (1993)). Ein alternativer Ansatz, bei dem Ganciclovir gegeben wurde, wenn HCMV-Antigene oder -DNA das erste Mal durch Zellkultur-Verfahren nachgewiesen wurden, stellte bei allen Patienten im Vergleich zur Prophylaxe oder Behandlung nach Erkrankung keinen Überlebensvorteil dar (D. J. Winston et al., Ann. Intern. Med. 118, 179–184 (1993)). Schließlich besteht wegen der heftigen Ausprägung der Nebenwirkungen die Notwendigkeit einer vermehrten Krankenhausaufnahme und Verabreichung von Wachstumsfaktoren an die behandelten Patienten, was zusammen mit den Kosten der Ganciclovir-Prophylaxe die Kosten der KMT-Nachsorge erhöht.

[0008] Da das menschliche Cytomegalovirus relativ häufig, aber dennoch mit äußerst schwerwiegenden Erkrankungen verbunden ist, wurden zur Erforschung der Biologie des Virus erhebliche Anstrengungen mit dem Ziel unternommen, sowohl die Diagnostik der Erkrankung zu verbessern als auch die präventive und therapeutische Strategien zu entwickeln.

[0009] Es wird angenommen, dass das Auslösen einer CD8⁺-CTL-Antwort eine wichtige Reaktion eines Säugtier-Wirts auf bestimmte akute virale Infektionen ist. Die Beobachtungen, dass die HCMV-Infektion weitverbreitet und persistent ist, sowie auch reaktiviert und bei einem immunsupprimierten Patienten klinisch zu Tage tritt, haben nahe gelegt, dass virus-spezifische T-Zellen einschließlich HCMV-spezifischer CTL eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer persistierenden Infektion und bei der Erholung von der CMV-Erkrankung spielen.

[0010] Beim Menschen korreliert der Schutz vor der Entstehung der CMV-Erkrankung bei immunsupprimierten KMT-Empfängern mit dem Wiedererlangen messbarer CD8⁺-CMV-spezifischen, MHC-Klasse 1-restringierten T-Zellantworten (Quinnan et al., New Eng. J. Med. 307, 7–13 (1982); Reusser et al., Blood 78, 1373–1380 (1991)). Diese Beobachtungen haben Forscher zur Durchführung klinischer Untersuchungen veranlasst, bei denen als Alternative zur Ganciclovir-Prophylaxe und -Therapie KMT-Empfängern von Spendern stammende, CMV-spezifische CD8⁺-CTL infundiert wurden (S. R. Riddell et al., Science 257, 238–241 (1992)). Die Übertragung von CD8⁺-CTL-Klonen auf Empfänger einer allogenen Knochenmarkstransplantation führte zu nachweisbarer, auf CTL-beruhender CMV-Immunität und zu statistisch signifikanter Abnahme der CMV-Erkrankung nach KMT (E. A. Walter et al., N. Eng. J. Med. 333, 1038–1044 (1995)).

[0011] Obwohl dieser Ansatz bei der Anwendung erfolgreich ist, hat er den Nachteil, dass dazu eine technisch hoch entwickelte Laboreinrichtung erforderlich ist (die außerdem sehr arbeitsintensiv und teuer ist), um die HCMV-spezifische CTL in vitro zur Reinfusion in einen Patienten zu gewinnen. Eine wünschenswerte Alternative wäre die Bereitstellung eines aus HCMV gewonnenen Impfstoffs, der einem KMT-Empfänger, dem Empfänger eines Organtransplantats, einem Herzpatienten, einem AIDS-Patienten oder einer Frau im gebärfähigen Alter ohne die Erfordernis einer ex vivo-Vermehrung HCMV-spezifischer CTL Immunität verleihen würde. Um einen solchen Impfstoff zu entwickeln, müssen die beim Wirt als Schutzmechanismus die Erkennung von HCMV auslösenden viralen Proteine identifiziert werden, damit deren Aminosäuresequenz-Information bestimmt werden kann. Derzeit ist jedoch kein solcher Impfstoff verfügbar.

[0012] Der Lebenszyklus des Virus verleiht Erkenntnisse über den wirksamsten Zeitrahmen für den gezielten Einsatz eines Impfstoffs, um die Virus-Produktion und -Verbreitung maximal zu unterbrechen.

[0013] Nach dem Eindringen von HCMV in die Wirtszelle und dem Abstreifen der Virushülle, wird das virale Genom über die unmittelbar frühen (immediate early (0–2 h)), die frühen (2–24 h) sowie die späten (> 24 h) viralen Proteine nacheinander exprimiert. Es gelangen jedoch bestimmte virale Strukturproteine wie pp65 wegen ihres Vorliegens im Virus-Partikel in großer Menge mit Begleitmolekülen (chaperons) in die Zelle. Große Aufmerksamkeit konzentrierte sich auf die Strukturproteine des Virions als potentielle immundominante Ziel-Antigene für HCMV-spezifische CTL-Antworten.

[0014] Ein virales Strukturprotein, pp65, ist als Zielantigen für die CMV-spezifische MHC-Klasse I restringierte CTL bestimmt worden, die aus dem peripheren Blut der meisten asymptomatischen CMV-seropositiven Individuen stammen (E. McLaughlin-Taylor et al., J. Med. Virol. 43, 103–110 (1994)). Bedeutsamerweise erkennen CD8⁺ MHC Klasse I restringierte, für pp65 spezifische CTL autologe HCMV-infizierte Zellen, ohne dass eine virale Genexpression erforderlich ist, vermutlich wegen der Prozessierung des während der Infektion in die Zelle eingebrachten internen Depots an pp65, das während der Infektion in die Zelle eingebracht wird (M. J. Gil-

bert et al., J. Virology 67, 3461–3469 (1993)). CTL gegen pp65 oder pp150 (ein weiteres, häufig erkanntes Matrix-Protein) sind in der Lage HCMV-infizierte Zellen in vitro innerhalb einer Stunde nach Infektion in Abwesenheit viraler Genexpression zu erkennen und zu lysieren (S. R. Riddell und P. D. Greenberg, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 189, 9–34 (1994)). Daher könnten diese CTL ein wichtiger Effektor bei der Begrenzung der HCMV-Reaktivierung und der Ausbreitung der CMV-Erkrankung darstellen und eine solche zelluläre Immunantwort wäre sowohl bei immunologisch beeinträchtigten als auch bei normalen Individuen äußerst wichtig (C.-R. Li et al., Blood 83, 1971–1979 (1994)). Alternativ ist die CTL-Erkennung der Hüllproteine kein Ersatz für pp65- und pp150-CTL, weil sie selten vorkommen sind, spät im Verlauf der Infektion auftreten und wegen der Herunterregulation der erforderlichen MHC-Klasse I-Moleküle schlechte Lyse-Effektoren sind (M. J. Gilbert et al., J. Virology 67, 3461–3469 (1993)).

[0015] Schließlich wird das früh nach Infektion im Überfluss produzierte HCMV-Hauptprotein IE als Stimulator von CD8⁺-CTL durch eine CMV-abhängige Blockade seiner Präsentation spezifisch inhibiert (M. J. Gilbert et al., Nature [London] 383, 720–722, 1996). Deshalb wären die Immunität gegen pp65 oder pp150 stimulierende Impfstoffe der bevorzugte Mechanismus zur Auslösung des Immunschutzes vor der CMV-Infektion.

[0016] Es wurde festgestellt, dass einzelne MHC-Klasse I-Moleküle bevorzugt Peptide mit einem vorgegebenen Motiv binden und dass die Aminosäuresequenz bestimmter Positionen des Motivs festgelegt ist, was es einem vorgegebenen Peptid gestattet, mit hoher Affinität an MHC-Klasse I-Moleküle zu binden. Diese werden als „Anker-Positionen“ bezeichnet (K. Falk et al., Nature 351, 290–296 (1991)). Spätere Studien legten nahe, dass noch weitere Aminosäurepositionen als die Ankerpositionen ebenfalls zur Spezifität der Peptidbindung an MHC Klasse I-Moleküle beitragen. Zusätzlich können Reste an nicht mit MHC interagierenden Positionen innerhalb des CTL-Epitops vermutlich durch Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) mit T-Zellen interagieren. Die Bindung von Peptidaminosäureresten an MHC- oder TCR-Strukturen wird unabhängig geregelt, so dass die Substitution der TCR-bindenden Aminosäurereste in vielen Fällen keinen Einfluss auf die Bindung an die MHC-Moleküle auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle hat.

[0017] Edman-Abbau gefolgt von N-terminaler Sequenzanalyse wurde zur Sequenzierung des an die MHC-Klasse I-Peptid-Bindungsgrube bindenden Peptidgemisches verwendet. In den meisten Fällen liegt die Länge dieser Peptide zwischen 9 bis 11 Aminosäuren. Massenspektroskopie von über HPLC getrennten Peptidmischungen kann die Primärstruktur individueller Peptide erhellen. Auf diese Weise identifizierte, an MHC-bindende Peptidfragmente werden als „natürlich prozessierte Epitope“ bezeichnet. Alternativ kann vorhergesagt werden, welche Peptide einer vorgegebenen Länge zwischen 9 bis 11 Aminosäuren aufgrund ihrer Übereinstimmung mit einem Motiv optimal an individuelle HLA Klasse I-Allele binden (K. Falk et al., Nature 351, 290–296 (1991)). Ein solches Motiv wurde für HLA A*0201 bestimmt. Die Positionen 2 und 9 eines Nonapeptids sind Ankerreste für HLA A*0201 mit geringen Beiträgen der Positionen 1, 4, 3, 5, 6, 7, 8 zur Bindung in abnehmender Anordnung bezüglich ihrer Wichtigkeit auf die Bindungsstärke (J. W. Drijfhout et al. Human Immunology 43, 1–12 (1995)). Ähnliche Motive sind für die Decamere und die Undecamere für HLA A*0201 bestimmt worden. Entsprechend wurden für einen Untersatz weiterer HLA A- und B-Allele einzelne Aminosäuremotive zur Vorhersage von Bindungspeptiden zwischen 8–11 Aminosäuren bestimmt (H. G. Rammensee et al., Immunogenetics 41(4), 178–228 (1995)).

[0018] Die WO 94/00150 offenbart Immunogene zur Verwendung als Impfstoff gegen das menschliche Cytomegalovirus oder Hauttests, die menschliche Cytomegalo-Matrixproteine oder Fraktionen davon enthalten. Es wird ebenfalls offenbart, dass solche Matrix-Proteine Ziel-Antigene der gegen das menschliche Cytomegalovirus gerichteten spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten sind.

[0019] Diamond et al. (Blood Vol. 90, No. 5, 1997, 1751–1767) beschreibt die Verwendung von das HLA A*0201-Motiv bindenden Peptiden als Impfstoff ohne Adjuvans.

[0020] Es wurde erkannt, dass CTL ein wichtiger Mechanismus sind, durch den sich ein Säugetierorganismus vor Infektionen durch Viren und möglicherweise Krebs schützt. Eine prozessierte Form von z. B. einem minimalen zytotoxischen Epitop (MCE) in Kombination mit MHC Klasse I-Molekülen wird von T-Zellen wie zum Beispiel CD8⁺-CTL erkannt. Funktionsstudien von viralen und tumorspezifischen T-Zellen haben bestätigt, dass ein MCE mit 8–12 Aminosäuren die Lyse einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) durch CD8⁺-CTL in Gang setzen kann, solange die Antigen-präsentierende Zelle das korrekte MHC-Molekül exprimiert.

[0021] Es wurde gezeigt, dass der Eintrittsweg eines Proteins in die Zelle festlegt, ob es als entweder als an MHC Klasse I- oder als an Klasse II-Molekül gebundenes Antigen prozessiert wird. Der endogene oder Klasse I-Stoffwechselweg für den Abbau von Proteinen wird häufig von infektiösen Viren benutzt, wenn sie innerhalb

von Zellen zugegen sind. Virale Nucleoproteine, die evt. die Zelloberfläche nie als Moleküle in Gesamtlänge erreichen, werden noch innerhalb der Zelle prozessiert und abgebaute Anteile werden von MHC Klasse I-Molekülen an die Zelloberfläche befördert. Die Glucoproteine der Virushülle leiten nicht, nur weil Zelloberflächenmoleküle sind, obligatorisch die CTL-Erkennung ein. Es wurde gefunden, dass virale Nucleoproteine vorwiegend in Form von prozessierten Epitopen, die von CD8⁺-CTL erkannten Zielantigene sind (A. Townsend et, Philos. Trans. P. Soc. Lond. (Biol). 323, 527–533 (1989)).

[0022] Seit es offensichtlich geworden ist, dass über exogene Wege in die Zelle gelangende (Pinocytose etc.) Antigene typischerweise nicht prozessiert und von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, sind Verfahren zum direkten Einschleusen von Proteinen in das Cytoplasma in das Blickfeld der Impfstoffentwickler gerückt. Ein bevorzugter Ansatz war, rekombinante Vakziniaviren zur Infektion von Zellen zu verwenden, wobei große Mengen eines intrazellulären Antigens eingebracht wurden. Die Begeisterung bei der Verwendung von Vakziniaviren als Impfstoff hat jedoch nachgelassen, weil diese Viren bei immunsupprimierten Menschen, wie z. B. KMT-Empfängern, das Potential zur Krankheitsauslösung haben. Ein weiterer Ansatz zur Impfung ist das Mischen des Antigen-Proteins mit einem Adjuvans und das Einbringen dieser Mischung durch subkutane Injektion unter die Haut.

[0023] Noch ein weiterer Ansatz, um CTL zur Immunisierung zu aktivieren, ist die Verwendung eines im Zusammenhang mit einem bestimmten MHC-Restriktionselement als virales Antigen definierten MCE, um die CTL-Gedächtnis (Memory)-Antwort auf das Virus aufzufrischen. Die Fähigkeit eines MCE Immunschutzes gegenüber der Provokation mit einer letalen Dosis eines infektiösen Virus zu verleihen, ist in der Literatur diskutiert worden. Impfstoffentwickler haben wachsendes Interesse an der Verwendung von einem MCE als Impfstoff entwickelt, weil dieses zur Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle durch externe Bindung der Zelloberflächenmoleküle ohne die Notwendigkeit des Einbringens in die Zelle oder der Prozessierung in der Lage ist. Das MCE ist als Immunogen am wirksamsten, wenn es als mit Lipidresten versehenes Peptid zusammen mit einem Helfer CD4-Epitop synthetisiert wird (A. Vitiello et al., J. Clin. Invest. 95, 341–349 (1995) und B. Livingston et al., J. Immunol. 159, 1383–1392, 1997). Weitere Modifikationen des bivalenten Vakzins beinhalten den Einbau einer Signalsequenz (KDEL) zur Retention im cytoplasmatischen Reticulum und zur Erzielung maximaler Aktivität. Es gibt in der Literatur auch Hinweise, dass ein von einem bestimmten Typ Antigen-präsentierender Zellen (z. B. dendritische Zellen) präsentiertes MCE eine primäre Immunreaktion in Abwesenheit einer viralen Infektion oder vor dem Kontakt mit dem Virus oder einer Tumorzelle in Gang setzen kann.

[0024] Entsprechend werden trotz der bedeutenden Anstrengungen hinsichtlich der Identifizierung der von CTL erkannten HCMV-Proteine sowie auch hinsichtlich der spezifischen Identifizierung des späten HCMV-Proteins pp65 verbesserte Verfahren zur Verhütung und Behandlung von HCMV-Infektionen benötigt. Die Einbringung von CMV-spezifischer CTL in einen Empfänger ist nicht eine allgemein verwendbare und praktikable Strategie, all denjenigen Risikoindividuen Immunität zu verleihen, die Immunisierung gegen HCMV-Infektionen nötig haben könnten.

[0025] Die ebenfalls anhängige Anmeldung PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) betrifft ein immunologisch aktives Peptid, das zur Auslösung einer zellulären Immunreaktion gegenüber dem menschlichen Cytomegalovirus in der Lage ist, das ein aus der Gruppe bestehend aus NX₁VPMVATX₂, worin X₁ L, I, M, T oder V und X₂ V, A, C, I, L oder T sind (SEQ ID Nr. 2), YXEHPTFSQY, worin X S, T oder L ist (SEQ ID Nr. 4), FX₁FPTKDVALX₂, worin X₁ V oder T und X₂ L, R oder K sind (SEQ ID Nr. 6), TPRVTGGGAX, worin X L, M oder F ist (SEQ ID Nr. 8) und FPTKDVAL (SEQ ID Nr. 9) ausgewähltes Peptid umfasst.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft weitere immunologisch aktive, zur Auslösung einer zellulären Immunantwort auf HCMV beim Menschen befähigte Peptide. Insbesondere sind die Peptide aus der Gruppe bestehend aus RIPHERNGFTVL (SEQ ID Nr. 19) und SVLGPISGHVLC (SEQ ID Nr. 20) ausgewählt. Die Peptide sind befähigt, menschliche CTL zur Erkennung und Lyse von mit HCMV infizierten menschlichen Zellen zu lenken. Solche immunologisch aktiven Peptide werden in Verbindung mit einem MHC-Klasse I-Molekül von CTL von Personen mit einer latenten (inaktiven) HCMV-Infektion erkannt.

[0027] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung eines wie oben definierten Peptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung bei der Augmentation der Reaktion des Immunsystems auf die HCMV-Infektion bereit. Das Arzneimittel wird einem Patienten, der dessen bedarf (z. B. ein Patient mit einer latenten oder aktiven CMV-Infektion) verabreicht und das Peptid wird von den CTLs und/oder CTLps (CTL-Vorstufen) des Patienten erkannt.

[0028] Nicht-infizierten Personen kann es Immunität gegenüber zukünftigen Infektionen mit HCMV verleihen. Ein solches Peptid kann in Form eines Peptid- oder eines mit Lipidresten versehenen Peptid-Vakzins ggf. mit einem Adjuvans verabreicht werden.

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein zelluläres Vakzin gegen HCMV bereit, umfassend Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel autologe oder allogene Antigen-präsentierende Zellen oder dendritische Zellen, die in vitro mit einem wie oben definierten Peptid behandelt wurden. Die vorliegende Erfindung stellt auch eine Antigen-präsentierende Zelle bereit, die durch in Kontakt bringen eines Zelloberflächen-Antigen HLA Moleküls mit einem wie oben definierten Peptid hergestellt wurde.

[0030] Die Immunreaktion eines latent mit CMV infizierten, dem Risiko einer Reaktivierung ausgesetzten Individuums, kann durch ein Verfahren augmentiert werden, bei dem T-Zellen zur Reaktivierung der CMV-Infektion einer Person entnommen und in vitro mit einem wie oben definierten Peptid behandelt werden. Die resultierenden CMV-reaktiven CTL werden autolog dem Patienten oder allogon zum Beispiel einem KMT-Empfänger reinfundiert.

[0031] Immunität gegen eine HCMV-Infektion kann einer zuvor nicht infizierten Person durch ein Verfahren verliehen werden, dass die Schritte der Entnahme von T-Zellen bei dieser Person, das in vitro-Exponieren der T-Zellen gegenüber einem wie oben definierten Peptid und die anschließende Reinfusion der resultierenden HCMV-reaktiven CTL in diese Person beinhaltet.

[0032] Die oben definierten Peptide können ebenfalls einer zuvor infizierten oder einem nicht-infizierten Patienten verabreicht werden oder in vitro T-Zellen in Form eines Polynucleotids (auf DNA-basierenden) Vakzins, wobei ein geeigneter Gentransfer-Vektor wie zum Beispiel ein Plasmid oder ein gentechnologisch hergestellter viraler Vektor, der die für das Peptidfragment kodierende DNA unter der Kontrolle passender Expressionsregulation-Sequenzen enthält, entweder dem Patienten oder bei T-Zellen in Zellkultur verabreicht wird.

[0033] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen viralen Vektor bereit, der die für ein wie oben definiertes Peptid kodierende DNA-Sequenz enthält, wobei dieser virale Vektor in der Lage ist, dieses Peptid zu exprimieren. Der virale Vektor kann von Vakzinia, Kanarienvpocken oder anderen eukaryontischen Viren stammen. Der Vektor infiziert eine Antigen-präsentierende Zelle, die im Gegenzug Antigen präsentiert, das durch CTL von Patienten mit latenter (inaktiver) HCMV-Infektion erkannt wird.

[0034] Eine zusätzliche Ausführungsform der Erfindung betrifft diagnostische Reagenzien zum Nachweis des Vorliegens aktiver versus ruhender HCMV-Infektionen. Die erfindungsgemäßen Peptide können CTL in vitro direkt stimulieren und können daher in einem Assay zur Bestimmung des Grads der durch HCMV bewirkten Immunstimulation verwendet werden. Die Peptide können ebenfalls zur Unterscheidung zwischen seropositiven und nicht HCMV-exponierten Personen (seronegativen Personen) verwendet werden. T-Zellen eines Patienten können in vitro mit einem erfindungsgemäßen Peptid vorbehandelten Antigen-präsentierenden Zellen in Kontakt gebracht werden.

[0035] Die vorliegende Erfindung stellt somit ein diagnostisches Reagenz zur Detektion von HCMV enthaltenden Antigen-präsentierenden, mit einem wie oben definierten Peptid als Primer vorbehandelten Zellen bereit. Die Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zur Diagnose der Immunstimulation durch HCMV oder von aktivem HCMV oder der HCMV-Exposition bei einer Person, wo dies erforderlich ist, bereit, umfassend das in Kontakt bringen der T-Lymphozyten dieser Person in vitro mit einem solchen diagnostischen Reagenz.

[0036] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von HCMV-infizierten T-Lymphozyten in einer T-Lymphozyten enthaltenden Probe bereit, umfassend das in Kontakt bringen von T-Lymphozyten in dieser Probe mit einer Antigen-präsentierenden Zelle, die mit einem wie oben definierten Peptid vorbehandelt wurde, worin die Aktivierung dieser T-Lymphozyten in dieser Probe ein Indiz für die Gegenwart von HCMV-infizierten T-Lymphozyten ist.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0037] **Fig. 1** zeigt die Wirkung des Versehens von Peptiden mit einem oder zwei Lipidresten in Gegenwart und Abwesenheit von Adjuvans auf die Fähigkeit der Peptide, eine zytotoxische Reaktion auszulösen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0038] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird ein zum Auslösen einer zellulären Immunantwort befähigtes immunologisch aktives Peptid der Sequenz
RPHERNGFTVL (SEQ ID Nr. 19)
bereitgestellt, das an HLA B*07XX einschließlich B*0702 und andere Subtypen davon mit kompatiblen Bindungsstellen bindet.

[0039] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein zur Auslösung einer zellulären Immunantwort auf eine Infektion mit menschlichem Cytomegalovirus befähigtes immunologisch aktives Peptid der Sequenz
SVLGPISGHVLK (SEQ ID Nr. 20)
bereit, das an HLA A*11XX einschließlich A*1101 und andere Subtypen davon mit kompatiblen Bindungsstellen bindet.

[0040] Es wird Bezug genommen auf die folgenden Beispiele der PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) zur Offenbarung von für die vorliegende Erfindung relevanten Techniken.

Beispiel 1 –	Herleitung von T-Zell-Klonen
Beispiel 2 –	Herleitung von LCL Antigen-präsentierenden Zellen
Beispiel 3 –	In vitro-Stimulation durch HCMV
Beispiel 4 –	Verfahren zur Identifizierung des CTL-Epitops
Beispiel 5 –	Verwendung des Peptids 495 zur Induktion von Zell-Lyse
Beispiel 6 –	Erzeugung von TNF- α durch T-Zell-Klone
Beispiel 7 –	Peptid 495 kann zytotoxische Lymphozyten aus peripherem Blut HCMV-seropositiver Personen induzieren
Beispiel 8 –	Menschliche Zell-Linen, die HLA A2 mit den von A*0201 verschiedenen molekularen Subtypen exprimieren, werden durch das Peptid 495 gegenüber Lyse sensibilisiert
Beispiel 9 –	Tierversuche unter Verwendung des Peptids 495 (SEQ ID Nr. 1)
Beispiel 10 –	Mit Lipidresten versehene Peptide mit eingebautem pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ (SEQ ID Nr. 1) als von unvollständigem Freundschens Adjuvans (IFA) unabhängigen Impfstoff bei Tieren
Beispiel 11 –	Formulierung von mit Lipidresten versehenen Impfstoffen
Beispiel 12 –	Verwendung eines kombinierten, am Amino-Terminus mit einem Lipidrest versehenen HTL- und CTL-Epitops als Einzelkomponenten-Impfstoff in Studien mit transgenen Mäusen

[0041] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht:

Beispiel 1

Zusätzliche, für HLA A- und B-Allele spezifische HCMV pp65 CTL-Epitope

[0042] Der zur Bestimmung der Sequenz des Peptids 495 und seiner Funktion verwendete experimentelle Ansatz ist in den Beispielen 1–13 der PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) beschrieben. Das Peptid 495 band spezifisch an HLA A*0201 und anderen in Beispiel 8 gezeigten Subtypen.

[0043] Es gibt jedoch über 100 bekannte HLA-Klasse I-Allele der A- und B-Gene (J. G. Bodmer et al., Tissue Antigens 49: 297–321 (1997)). Unter Verwendung einer Kombination aus zuvor festgelegten Algorithmen und Verkürzungsanalyse wurden zusätzliche Peptide von pp65 identifiziert, die sowohl autologe als auch allogene Zellen gegenüber der Lyse durch MHC-restringierte menschliche CTL sensibilisierten. Wie in Beispiel 1 der PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) diskutiert, stammt die CTL von HCMV-seropositiven Menschen, deshalb

waren die definierten Epitope von pp65 diejenigen, die Menschen zur Überbrückung der endogenen HCMV-Reaktivierung oder -Virämie verwenden. Um gegenüber HCMV pp65 in Kombination mit spezifischen HLA-Allelen reaktive CTL zu definieren, wurden einzeln geklonte CTL-Linien auf Erkennung von mit pp65vac infizierten EBVLCL getestet, das eines der im Blut der Personen, von denen die CTL stammte, gefundenen HLA A- oder B-Allele enthielt. In Fällen, wo sich die EBVLCL-Zielsequenzen und die CTL mindestens ein HLA-Allel teilten, wurde eine Sensibilisierung gegenüber der Erkennung und Lyse beobachtet. Dieses Experiment wurde mit mindestens drei unabhängigen, das restringierte Allel enthaltenden Zell-Linien wiederholt. Tabelle 1 zeigt die pp65-Epitope, ihre HLA-Restriktion, die Anzahl der unabhängigen ebenfalls sensibilisierten Zell-Linien mit der gleichen Restriktion und das/die Verfahren zur Darstellung der Epitope. Die Epitope von SEQ ID Nr. 3, 5, 7 und 9 sind in Beispiel 14 der PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) offenbart.

Tabelle 1

HLA A- oder B-Allel-Spezifität	Anzahl der getesteten Zell-Linien	Bestimmungsverfahren	Minimale zytotoxische Epitop-Sequenz
HLA A*0101 und Subtypen	3	A, B, C, D, E	YSEHPTFTSQY (SEQ ID Nr. 3)
HLA A*6801 und Subtypen	3	A, B, D, E	FVFPTKDVALR (SEQ ID Nr. 5)
HLA B7 und Subtypen	5	A, B, D, E	TPRVTGGGAM (SEQ ID Nr. 7)
HLA B*3502,04, 06 und Subtypen	3	A, B, C, D, E	FPTKDVAL (SEQ ID Nr. 9)
HLA B7 und Subtypen	5	A, B, C, E	RIPHERNGFTVL (SEQ ID Nr. 19)
HLA A*1101 und Subtypen	5	A, B, C, E	SVLGPISGHVLC (SEQ ID Nr. 20)

[0044] Bestimmungsverfahren: (A) HLA-Restriktion unter Verwendung von Einzel-HLA-Allel angepassten Zell-Linien, (B) pp65-Verkürzungen in Vakzinaviiren, (C) pp65-Verkürzungen bei Plasmiden mit Detektion von Aktivität unter Verwendung des TNF- α -Assays, (D) Anpassung der Aminosäurereste unter Verwendung veröffentlichter Motive, (E) Funktionsanalyse unter Verwendung geordneter überlappender Peptide.

Beispiel 2

Vakzin-Moleküle, die mehr als ein CTL-Epitop umfassen

[0045] In Übereinstimmung mit hier beschriebenen Verfahren wurde eine Kombination von pp150- und/oder pp65-Epitopen mit Spezifität für dieselbe oder verschiedene HLA-Klasse I-Restriktionselemente hergestellt. Bei der Impfung von Menschen besteht keine Notwendigkeit dieselbe MHC-Restriktion zu haben. Ein auf zwei oder mehr MHC-Restriktionselemente gerichtetes Impfstoff-Molekül kann bevorzugt sein, weil es die Herstellung von weniger Impfstoff-Molekülen in einer polymorphen Population gestattet.

[0046] Peptide mit CTL-Epitopen, die durch häufig exprimierte HLA-Allele restringiert sind (vgl. Tabelle 1) sind bevorzugt, und die die Epitope sowohl von den pp65- und pp150-Proteinen sowie auch ein HTL-Epitop enthaltenden Polypeptid-Impfstoffe sind bei der Impfung von Menschen gegen HCMV besonders bevorzugt. Die in Tabelle 1 gezeigten HLA-Allele sind ein Untersatz möglicher, potentiell in ein multiples CTL-Epitop-Impfstoff-molekül einzuschließender HLA A-, B- und C-CTL-Epitope. Der Einschluss von multiplen CTL-Epitopen und

eines HTL-Epitops wird die Peptide verlängern (im Bereich von 40–50 Aminosäuren). Daher ist die Hydrophobizität der Sequenz ein wichtiger Faktor. Alternativ können HCMV-Polypeptide-Vakzine ohne ein kovalent angehängtes HTL-Epitop durch Verwendung multipler CTL-Epitope mit einem Abstandhalter (spacer) von drei Alanin-Resten oder anderen Kombinationen von Aminosäuren zwischen jedem Epitop und zwei Palmitinsäurelysylamiden am N-Terminus hergestellt werden, wie in Tabelle 3 der PCT/US 97/20236 (WO 98/21233) gezeigt.

Beispiel 3

Immunisierung von KMT-Patienten

[0047] Eine therapeutisch aktive Form eines erfindungsgemäßen Antigen-Peptids kann einem HCMV-seropositivem Knochenmarkspender zu einem zur Sicherstellung einer anti-HCM zellulären Immunantwort ausreichend frühen Zeit (z. B. sechs bis acht Wochen) in Einzel- oder Mehrfachdosen an einer definierten Anzahl von Tagen oder Wochen vor der Knochenmarktransplantation verabreicht werden. Das Antigen-Peptid kann in per se bekannten Weisen zubereitet werden (z. B. als mit Lipidresten versehenes Peptid, ggf. in Kombination mit einem Helfer-Peptid und/oder einem Adjuvans) und wird verzugsweise in mehrfachen Dosen verabreicht. Falls einem Knochenmarkempfänger ein unbehandeltes Transplantat gegeben wird, enthält ein solches Transplantat 25% oder mehr reife T-Zellen. Die T-Zellen verleihen dem Knochenmarkempfänger aktive Immunität. Alternativ kann, falls eine T-Zelle depletiertes Knochenmarktransplantat eingesetzt wird, kann dem Patienten ein Aliquot an T-Zellen von einem immunisierten Spender nach (z. B. etwa 21 bis 35 Tage) der KMT verabreicht werden, um dem Empfänger HCMV-Immunität zu verleihen.

Beispiel 4

In Vitro-Assay für HCMV-infizierte Zellen

[0048] Die erfindungsgemäßen Peptide können in einem in vitro-Assay zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von HCMV-infizierten Zellen, die z. B. von einem Patienten erhalten werden, dessen HCMV-Status (infiziert oder nicht-infiziert) unbekannt ist, verwendet werden. Von dem Patienten erhaltene T-Lymphozyten werden mit einem erfindungsgemäßen Peptid als Primer vorbehandelten Antigen-präsentierenden Zellen inkubiert. Die Aktivierung von CTLs oder CTL-Vorläufern wird zeigen, dass der Patient mit HCMV infiziert war.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: DON JEFFREY DIAMOND und JOANNE YORK
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: IMMUNREAKTIVE PEPTID CTL-EPITOPE
VOM MENSCHLICHEN CYTOMEGALOVIRUS
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSATEN: Bart G. New-Land, Rothwell, Figg, Ernst & Kurz
 - (B) STRASSE: 555 13th Street, NW, Suite 701E
 - (C) STADT: Washington
 - (D) STAAT: DC
 - (E) COUNTRY: USA
 - (F) ZIP: 20004
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe 1.0, Version 1.30
- (vi) GEGENWÄRTIGE DATEN DER ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER:
 - (B) ANMELDETAG: zeitgleich zu dieser Anmeldung
 - (C) KLASSIFIKATION:

(vii) DATEN DER VORHERIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 09/021,098

(B) ANMELDETAG: 10. Februar 1998

(vii) DATEN DER VORHERIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 08/950,064

(B) ANMELDETAG: 14. Oktober 1997

(vii) DATEN DER VORHERIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 08/747,488

(B) ANMELDETAG: 12. November 1996

(viii) ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Anwalt, Bart G. Newand

(B) EINTRAGUNGSNUMMER: 31 282

(C) REFERENZ/NOTIERUNG: 1954-112 CP3

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 202-783-6040

(B) TELEFAX: 202-783-6031

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr.1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant

(D) TOPOLOGIE: irrelevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.1:

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant

(D) TOPOLOGIE: irrelevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(ix) EIGENSCHAFT:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: DOMÄNE

(B) LAGE: 2

(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Leu, Ile, Met, Thr
oder Val"

(ix) EIGENSCHAFT:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne

(B) LAGE: 9

(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Val, Ala, Cys, Ile,
Leu oder Thr"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 2:

Asn Xaa Val Pro Met Val Ala Thr Xaa

1

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:
Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 4:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (ix) EIGENSCHAFT:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
 - (B) LAGE: 2
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung= "Xaa = Ser, Thr oder
Leu"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:
Tyr Xaa Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 5:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
(D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 5:
Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 6:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
(D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid.
- (v) FRAGMENTTYP: intern

- (ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
(B) LAGE: 2
(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Val oder Thr"

- (ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
(B) LAGE: 10
(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Leu, Arg oder Lys"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 6:
Phe Xaa Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Xaa
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 7:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: not relevant
(D) TOPOLOGY: irrelevant

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (v) FRAGMENTTYP: intern

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 7:
Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (ix) EIGENSCHAFT:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
 - (B) LÄNGE: 10
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung= "Xaa = Leu, Phe oder Met"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 8:
Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Xaa
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 9:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 9:
Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
(D) TOPOLOGIE: irrelevant

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (v) FRAGMENTTYP: intern

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 10:
Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 11:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
(D) TOPOLOGIE: irrelevant

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (v) FRAGMENTTYP: intern

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 11:
Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln Pro Ala
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 12:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 12:
 Arg Ile Phe Ala Glu Leu Gly Val
 1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr.13:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID Nr. 13:
 Lys Ser Ser Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
 20 25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 14:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 14:

Cys	Ser	Ser	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr
1				5				10					15		
	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Val	Ala	Thr	Val		
				20				25							

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 15:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 28 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (ix) EIGENSCHAFT:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
 - (B) LÄNGE: 6

(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung= "Xaa = Cyclohexylalanin
oder -phenylalanin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 15:

Lys Ser Ser Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Gly Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
20 25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 28 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant

(D) TOPOLOGIE: irrelevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(ix) EIGENSCHAFT:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne

(B) LAGE: 6

(D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Cyclohexylalanin
oder -phenylalanin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 16:

Cys Ser Ser Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Gly Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
20 25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 17:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 25 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (ix) EIGENSCHAFT:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Domäne
 - (B) LAGE: 6
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung = "Xaa = Cyclohexylalanin
oder -phenylalanin"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 17:

Lys	Ser	Ser	Ala	Lys	Xaa	Val	Ala	Ala	Trp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	
1				5					10					15		
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val																
								20								25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 18:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant
 - (D) TOPOLOGIE: irrelevant
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 18:

Lys Ser Ser Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

20 25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant

(D) TOPOLOGIE: irrelevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 19:

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu

1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) EINZEL/DOPPELSTRANG: irrelevant

(D) TOPOLOGIE: irrelevant

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 20:

Ser Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys

1 5 10

Patentansprüche

1. Ein aus der Gruppe bestehend aus RIPHERNGFTVL (SEQ ID Nr. 19) und SVLGPISGHVLK (SEQ ID Nr. 20) ausgewähltes Peptid, das eine MHC-Klasse I Immunantwort auf das menschliche Cytomegalovirus auslöst.
2. Peptid nach Anspruch 1, worin die Sequenz des Peptids RIPHERNGFTVL (SEQ ID Nr. 19) ist.
3. Peptid nach Anspruch 1, worin die Sequenz des Peptids SVLGPISGHVLK (SEQ ID Nr. 20) ist.
4. Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Peptid mit (einem) Lipidrest(en) versehen ist.
5. Peptid nach Anspruch 4, worin das Peptid mit einem Lipidrest versehen ist.
6. Peptid nach Anspruch 4, worin das Peptid mit zwei Lipidresten versehen ist.
7. Impfstoff gegen das humane Cytomegalovirus, umfassend ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Antigen-präsentierende Zelle, die durch in Kontakt bringen mit einer ein HLA-Zelloberflächen-Antigenmolekül exprimierenden Zelle mit einem Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 hergestellt wurde.
9. Antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 8, worin das HLA-Zelloberflächen-Antigenmolekül B*0702 ist.
10. Antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 8, worin das HLA-Zelloberflächen-Antigenmolekül A*1101 ist.
11. Zellulärer Impfstoff gegen menschliches Cytomegalovirus, umfassend die Antigen-präsentierende Zelle nach Anspruch 8.
12. Zellulärer Impfstoff gegen menschliches Cytomegalovirus nach Anspruch 11, worin die Antigen-präsentierenden Zellen autolog sind.
13. Zellulärer Impfstoff gegen menschliches Cytomegalovirus nach Anspruch 11, worin die Antigen-präsentierenden Zellen allogene sind.
14. Viraler Vektor, enthaltend eine für ein Peptid nach Anspruch 1 kodierende DNA-Sequenz, worin der virale Vektor zur Expression des Peptids in der Lage ist.
15. Viraler Vektor nach Anspruch 14, worin der virale Vektor von einem eukaryontischen Virus stammt.
16. Viraler Vektor nach Anspruch 15, worin der virale Vektor vom Vakziniavirus stammt.
17. Viraler Vektor nach Anspruch 15, worin der virale Vektor von Kanarienvakzine stammt.
18. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einem zellulären Impfstoff nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung als Augmentation der Antwort des Immunsystems auf Infektion mit dem menschlichen Cytomegalovirus.
19. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einem zellulären Impfstoff nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verleihung von Immunität gegenüber dem humanen Cytomegalovirus.
20. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder eines zellulären Impfstoffs nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung zum Schutz eines Individuums, das an einer latenten Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus leidet, vor Reaktivierung der Infektion.
21. Verfahren zur Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit menschlicher, Cytomegalovirus-infizierter T-Lymphozyten in einer T-Lymphozyten enthaltenden Probe, umfassend das in Kontakt bringen der T-Lymphozyten in der Probe mit einer Antigen-präsentierenden Zelle, die mit einem als Primer verwendeten Peptid

nach einem der Ansprüche 1 bis 6 vorhandelt wurde, worin die Aktivierung der T-Lymphozyten in der Probe ein Indiz für die Gegenwart von mit menschlichem Cytomegalovirus infizierten T-Lymphozyten ist.

22. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung bei der Immunisierung eines Individuums gegen das menschliche Cytomegalovirus durch ein Verfahren umfassend die Entnahme von T-Lymphozyten bei diesem Individuum, in vitro-Exposition der T-Lymphozyten gegenüber dem Arzneimittel und anschließende Reinfusion der resultierenden, bezüglich des humanen Cytomegalovirus reaktiven T-Lymphozyten in das Individuum.

23. Verwendung einer für ein Peptid nach Anspruch 1 kodierenden DNA zur Herstellung eines Arzneimittels, das zur Verleihung von Immunität gegenüber dem humanen Cytomegalovirus durch ein Verfahren verwendet wird, umfassend die Verabreichung eines das Arzneimittel enthaltenden Gentransfervektors an das Individuum.

24. In vitro-Verfahren zur Herstellung humancytomegalovirusreaktiver, humanzytotoxischer T-Lymphozyten, umfassend das in Kontakt bringen menschlicher T-Lymphozyten mit einem Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

25. Diagnostisches Reagenz zur Detektion von Immunstimulation durch humanes Cytomegalovirus, umfassend Antigen-präsentierende Zellen, die mit einem Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als Primer vorbehandelt wurden.

26. Verfahren zur Diagnose von:

- (a) Immunstimulation durch humanes Cytomegalovirus bei einem Individuum, oder
 - (b) aktiver Infektion mit humanem Cytomegalovirus, oder
 - (c) Exposition eines Individuums gegenüber dem humanen Cytomegalovirus,
- umfassend das in vitro-in Kontakt bringen der T-Lymphozyten des Individuums mit einem diagnostischen Reagenz nach Anspruch 25, worin das Ausmaß der HCMV-spezifischen Erkennung durch die T-Lymphozyten ein Indiz für das Ausmaß der
- (a) Immunstimulation durch humanes Cytomegalovirus oder
 - (b) aktiven Human-Cytomegalovirus-Infektion, oder
 - (c) Exposition des Individuums gegenüber dem humanen Cytomegalovirus
- ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

FIG. 1A

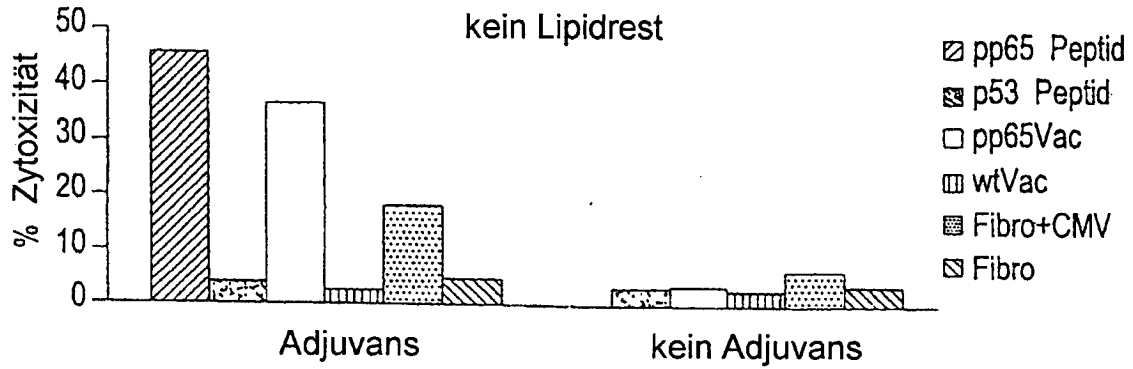


FIG. 1B

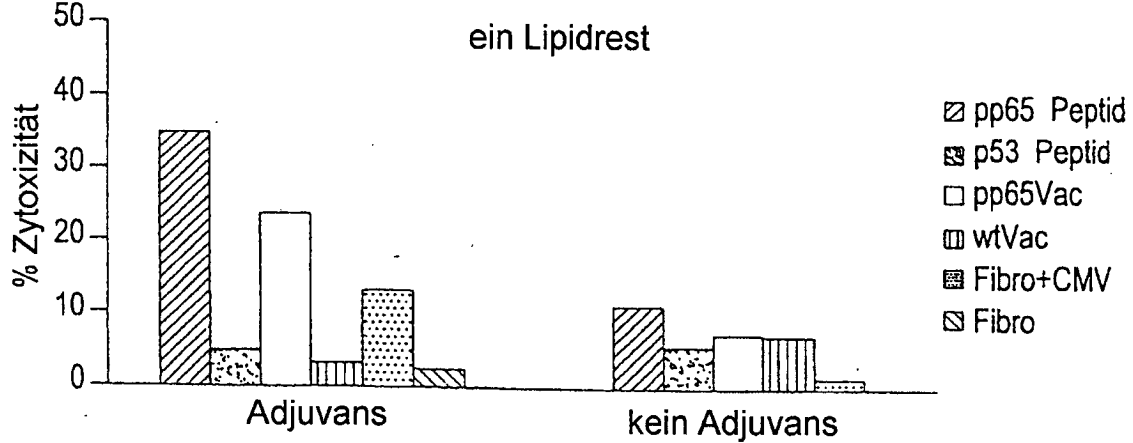


FIG. 1C

