



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 29 115 T2 2007.06.14**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 218 031 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 29 115.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/09657**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 969 387.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/024822**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.10.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **12.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **28.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

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

**A61P 31/00 (2006.01)**

**A61P 35/00 (2006.01)**

**A61P 37/00 (2006.01)**

**A61K 39/29 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**168099 01.10.1999 AT**

(73) Patentinhaber:

**Intercell AG, Vienna, AT**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 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:

**FLEITMANN, Julia-Kristina, A-2463 Gallbrunn, AT;  
MATTNER, Frank, A-1190 Vienna, AT; BUSCHLE,  
Michael, EH4 6LS Edinburgh, GB; MELLING, Jack,  
Salisbury Wiltshire SP2 8BU, GB**

(54) Bezeichnung: **ANTIGEN ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG**

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

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere zur Verwendung als Vakzin.

**[0002]** Vakzine sind eine sehr erfolgreiche und doch kostensparende medizinische Intervention. Viele katastrophale Krankheiten, einschließlich Pocken und Poliomyelitis, sind dank intensiver Impfprogramme vom Gesicht dieser Erde verschwunden oder sind nahe daran, ausgelöscht zu werden (Nossal, *Nat. Med.* 4 (1998), 475–476). Vakzine können in der Tat mehr Leben retten (und mehr Geld sparen) als jede andere medizinische Intervention. Obwohl dies für eine ganze Reihe von Krankheiten gilt, einschließlich Tuberkulose, Diphtherie, Keuchhusten, Masern und Tetanus, gibt es für viele Leiden, einschließlich die meisten Virusinfektionen, wie AIDS, und andere Erkrankungen, einschließlich Malaria, oder auch Krebs keine wirksamen Impfstoffe. Außerdem verlangt die rapide Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien und Mikroorganismen nach alternativen Behandlungen, wobei Impfstoffe eine logische Wahl darstellen. Schließlich wird der große Bedarf an Vakzinen auch durch die Tatsache verdeutlicht, dass Infektionskrankheiten und nicht Herz-Kreislauf-Störungen oder Krebs oder Verletzungen die Hauptursache für Tod und Behinderung auf der Welt bleiben (Bloom et al., *Nat. Med.* 4 (1998), 480–484).

**[0003]** Das Hauptproblem bei den Vakzinen besteht darin, dass traditionelle Impfstoffe (und/oder die immunmodulierenden Verbindungen, die in diesen Präparaten enthalten sind) darauf ausgelegt sind, hohe Antikörperwerte hervorzurufen (Harlow et al., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Leider sind Antikörper alleine nicht dahingehend wirksam, viele Krankheiten zu verhindern, einschließlich die meisten Krankheiten, die von Viren, intrazellulären Bakterien oder gewissen Parasiten verursacht werden. Beispiele dafür sind Pathogene, wie das oben genannte HIV-Virus oder Plasmodium spec, im Fall von Malaria. Außerdem sind diese Impfstoffe bei Krebs wahrscheinlich nicht wirksam. In zahlreichen experimentellen Systemen ist gezeigt worden, dass für diese Indikationen der zelluläre Arm des Immunsystems, einschließlich T-Zellen, wichtiger ist als der humorale Arm. Daher werden neue, innovative Technologien benötigt, um diese Einschränkungen herkömmlicher Impfstoffe zu überwinden. Das Hauptaugenmerk muss dabei auf Technologien liegen, die verlässlich das zelluläre Immunsystem anregen, einschließlich antigenspezifische T-Zellen, die auf pathogeninfizierten Zellen exprimierte Moleküle erkennen. Idealerweise werden Impfstoffe entwickelt, die sowohl T-Zellen, die erkrankte und/oder infizierte Zellen von normalen Zellen unterscheiden, als auch gleichzeitig Antikörper induzieren, die von B-Zellen sezerniert werden, die Pathogene in extrazellulären Kompartimenten erkennen.

**[0004]** Üblicherweise werden Impfstoffe als eine Kombination von Pathogen-derivierten Antigenen zusammen mit Verbindungen verabreicht, die Immunantworten gegen diese Antigene auslösen oder verstärken (diese Verbindungen werden üblicherweise als Hilfsstoffe bezeichnet). Beispiele für Antigene sind ganze Organismen, wie inaktivierte oder abgeschwächte Viren oder Bakterien, Pilze, Protozoen oder auch Krebszellen. Antigene können auch aus Subfraktionen dieser Organismen/Gewebe, Proteinen oder in ihrer einfachsten Form aus Peptiden bestehen. Antigene können vom Immunsystem auch in Form von glykosylierten Proteinen oder Peptiden erkannt werden und können auch Polysaccharide oder Lipide sein oder diese enthalten. Kurze Peptide können verwendet werden, da zum Beispiel zytotoxische T-Zellen Antigene in Form von kurzen, üblicherweise 8–11 Aminosäuren langen Peptiden in Verbindung mit Major Histocompatibility Complex (MHC) erkennen (Rammensee et al., *Immunogenetics* 41 (1995), 178–228). B-Zellen erkennen längere Peptide, beginnend bei etwa 15 Aminosäuren (Harlow et al., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Im Gegensatz zu den T-Zellen-Epitopen kann die dreidimensionale Struktur der B-Zellen-Antigene auch für das Erkennen durch Antikörper wichtig sein. Um länger anhaltende, antigenspezifische Immunantworten zu erhalten, müssen Hilfsstoffe Immunkaskaden auslösen, die alle notwendigen Zellen des Immunsystems einbinden. Primär wirken diese Hilfsstoffe auf sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs), sind jedoch in ihrem Wirkungsmodus nicht darauf beschränkt. Diese Zellen treffen üblicherweise zuerst auf das (die) Antigen(e), wonach Immuneffektorzellen prozessiertes oder nicht modifiziertes Antigen präsentiert wird. Intermediärzelltypen können ebenfalls beteiligt sein. Bei einer produktiven Immunantwort werden nur Effektorzellen mit der passenden Spezifität aktiviert. Der Hilfsstoff kann auch Antigene und andere gemeinsam injizierte Faktoren lokal zurückhalten. Außerdem kann der Hilfsstoff als chemischer Anziehungspunkt für andere Immunzellen fungieren oder lokal und/oder systemisch als Stimulans für das Immunsystem wirken.

**[0005]** Menschliches Wachstumshormon (human growth hormone, HGH) ist ein von der Hypophyse derivierter Faktor, von dem hauptsächlich die Fähigkeit beschrieben ist, die Wachstumsbeschleunigung voranzutreiben (Überblick in Neely et al., *Annu. Rev. Med.* 45 (1994), 407–420). Bereits im Jahre 1958 wurde der erste Patient mit Wachstumshormon behandelt, das aus Hypophysenextrakten erhalten wurde. Rekombinantes

HGH ist jetzt bereits seit etwa 15 Jahren erhältlich und ist in der Klinik extensiv eingesetzt worden. Nebenwirkungen von rekombinantem HGH sind selten. Die Wirksamkeit rekombinanter HGH-Präparate ist an einem breiten Spektrum von Krankheiten demonstriert worden, einschließlich Turner-Syndrom, idiopathischem Minderwuchs, Wachstumshormonmangel und Nierenversagen.

**[0006]** Während zahlreiche Studien die wachstumsfördernde Wirkung von HGH bestätigt haben, beschäftigen sich relativ wenige Berichte mit einer möglichen Interaktion dieses Moleküls mit Zellen des Immunsystems. Stephenson und Melling, die zeigten, dass HGH die Wirksamkeit eines viralen Impfstoffpräparats sehr stark erhöht, demonstrierten als erste die Verwendbarkeit von HGH in einem Vakzinkontext (Stephenson et al., *J. Infect. Dis.* 164 (1991), 188–191). Sie injizierten HGH gemeinsam mit einem Vakzin für das Virus der Zeckenenzephalitis (tick-borne encephalitis, TBE), einem endemischen Virus, das von Zecken übertragen wird. In Tierversuchen potenzierte HGH die Wirksamkeit des Vakzins und führte zum Schutz der Tiere nach nur einer Injektion des Impfstoffs. Der Mechanismus, wie HGH die Wirksamkeit des Vakzins verstärkte, ist unklar, es wurde jedoch spekuliert, dass zellvermittelte Immunität eine signifikante Rolle gespielt hat. Es gibt auch weitere, wenn auch nur Indizienbeweise dafür, dass HGH in der Tat zelluläre Immunreaktionen auslösen kann: Mellado et al. demonstrierten, dass Mäuse, wenn ihnen ein vom menschlichen Immunschwächevirus (HIV) abgeleitetes Antigen verabreicht wird, eine so genannte Th1-Typ T-Helferzellenantwort entwickeln, was auf eine zelluläre Immunantwort hinweist (Mellado et al., *Vaccine* 16 (1998), 1111–1115). Zusammengenommen gibt es Indizienbeweise dafür, dass HGH, das als beispielhaft für eine ganze Klasse von primär neuroaktiven Verbindungen angesehen wird (siehe z.B. Levite, *PNAS* 95 (1998), 12544–12549, Scholzen et al., *Exp. Dermatol.* 7 (1998), 81–96), eine positive Wirkung auf das Immunsystem haben kann, wobei die Mechanismen jedoch ungeklärt bleiben.

**[0007]** Es hat sich gezeigt, dass polykationische Polymere, zum Beispiel die polykationischen Aminosäurepolymere Poly-L-arginin und Poly-L-lysin, in vitro und in vivo eine sehr effiziente Beladung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) mit Antigenen gestatten (Buschle et al., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1 (1998), 309–321; Buschle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 3256–3261; Schmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 3262–3267). Es wird angenommen, dass dies das Schlüsselereignis für das Auslösen von Immunkaskaden ist, die schließlich zur Induktion antigenspezifischer Immuneffektorzellen führen, die in der Lage sind, Ziele zu zerstören oder zu neutralisieren. Es ist schon früher gezeigt worden, dass eine Reihe von polykationischen Verbindungen Wirkungen auf Immunzellen ausüben (Buschle et al., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1 (1998), 309–321; Buschle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 3256–3261).

**[0008]** Die Koinjektion einer Mischung von Poly-L-arginin oder Poly-L-lysin zusammen mit einem passenden Antigen als Vakzin schützt die Tiere in mehreren Tiermodellen vor Tumorwachstum (Buschle et al., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1 (1998), 309–321; Schmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 3262–3267). Ein Vakzin bestehend aus polykationischen Verbindungen und Antigen(en) wird daher auf diesem Fachgebiet als sehr wirkungsvolle Form der Behandlung akzeptiert.

**[0009]** Die GB 1 290 141 offenbart ein Vakzin enthaltend antigenes Material mit einem basenreichen Peptid als Adjuvans. Gemäß diesem Dokument kann das Vakzin (als antigenes Material) aus lebendigen oder toten, ganzen oder zerkleinerten Organismen oder aus Präparaten von natürlichen Toxinen oder Produkten des Organismus oder aus Präparaten oder Extrakten des Organismus, alleine oder in Kombination miteinander, bestehen. Das als Adjuvans verwendete basenreiche Peptid muss zumindest 50% Reste enthalten, die eine freie Aminogruppe haben, wie Polylysin, Polyornithin, Polyarginin und Polydiaminobuttersäuren. In der WO 97/30721 ist die Verwendung von basischer Polyaminosäure als bevorzugtes Adjuvans für Vakzine in Kombination mit einem immunmodulierenden Peptid oder Protein (Fragment) beschrieben. Die Verwendung einer weiteren immunstimulierenden Substanz, die gemeinsam mit einem Antigen und einem solchen polykationischen Polymer verwendet werden soll, wird durch diese beiden Dokumente weder geoffenbart, noch nahe gelegt.

**[0010]** Das US-Patent 3 725 545 beschreibt, dass es möglich ist, die Antikörperproduktionsfähigkeit nukleinsäurehaltiger Präparate zu potenzieren, indem kationisch beladene Polymere in Kombination mit einzelsträngigen oder mehrsträngigen Nukleinsäure-Polymeren zugesetzt werden. Beispiele für solche polykationische Polymere sind Polyornithin, Lysozym, DEAE-Dextran, Histon, Hexadimethrin-Bromid und Polylysin.

**[0011]** Die WO 91/04052 betrifft ebenfalls ein DEAE-Dextran als polykationisches Adjuvans in einer Vakzinzusammensetzung. Dieses polykationische Adjuvans ist in ein Vakzin inkorporiert, das weiters die antigene Substanz (das Antigen) und Saponin als weiteres Adjuvans umfasst. Selbstverständlich können weder die polykationischen Verbindungen, noch das Saponin als kombinierte Adjuvantien als eine immunstimulierende Sub-

stanz im Rahmen der vorliegenden Erfindung angesehen werden.

**[0012]** Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die eine wirksame Abgabe an eine Zielzelle, insbesondere an das zelluläre Immunsystem, gestattet.

**[0013]** Dieses Ziel wird durch eine pharmazeutische Zusammensetzung erreicht, welche umfasst:

- ein Antigen,
- eine neuroaktive Verbindung ausgewählt aus Wachstumshormonen, Neurokinin A, vasoaktivem Intestinalpeptid, Neuropeptid Y, Substanz P, Thyrotrophin (TSH), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-1), Prolaktin, Laktogen, luteinisierendem Hormon, follikelstimulierendem Hormon, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Thymosin, Thymulin, Kentsin, Melatonin, Semaphorinen und Mischungen davon, und
- ein polykationisches Polymer.

**[0014]** Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Kombination der ausgewählten neuroaktiven Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung und des polykationischen Polymers mit einem Antigen zu einer synergistischen immunmodulierenden Wirkung für ein definiertes Antigen-Präparat führt. Tatsächlich zeigte sich, dass die Wirkung einer neuroaktiven Verbindung ausgewählt gemäß der vorliegenden Erfindung alleine mit dem Antigen – für sich selbst – sogar geringer ist als die Verabreichung des Antigens mit dem polykationischen Polymer alleine.

**[0015]** Die immunstimulierende Wirkung von Substanzen, wie menschlichem Wachstumshormon (HGH) ist berichtet worden (siehe auch: EP 0 434 749 B1, US 4,837,202, US 5,830,877 und US 5,583,109). In der Tat weisen viele der neuroaktiven Substanzen, wie Hypophysen-Wachstumshormone, ebenfalls T-Zellen induzierende Wirkung oder die Zytokinsekretion verändernde Wirkungen auf. Diese Verbindungen können auch auf APCs wirken.

**[0016]** Die immunstimulierende Wirkung ist insbesondere dadurch gegeben, dass diese Substanzen z.B. T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen oder APCs induzieren oder die Zytokinsekretion von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen oder APCs verändern.

**[0017]** Es stellte sich jedoch heraus, dass die Verabreichung eines Antigens zusammen mit solchen neuroaktiven Substanzen alleine nicht zu einer effizienten zellulären Immunantwort führt, obwohl solche Substanzen – wie oben ausgeführt ist – T-Zellen induzierende Wirkung haben können und in der Lage sind, die Zytokinsekretion von T-Zellen zu verändern (s. Levite (1998) und Scholzen et al. (1998)) oder allgemeiner das Immunsystem aktivieren.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung basiert auf der sorgfältigen Selektion von immunstimulierenden Substanzen, die in Verbindung mit dem polykationischen Polymer zu verwenden sind. In der vorliegenden Erfindung dient das polykationische Polymer als Adjuvans. Deswegen ist klar, dass andere, im Stand der Technik beschriebene Adjuvantien im Rahmen der vorliegenden Erfindung selbstverständlich nicht als immunstimulierende Substanzen anzusehen sind. Obwohl solche zusätzlichen Hilfsstoffe auch dem vorliegenden Vakzin zugesetzt werden können, können sie die gemäß der vorliegenden Erfindung selektierte immunstimulierende, neuroaktive Substanz nicht ersetzen.

**[0019]** Für die vorliegende Erfindung ist HGH als neuroaktive Substanz besonders bevorzugt. Es sind mehrere Isoformen für dieses Protein bekannt, wobei rekombinante Formen solcher Isoformen in der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt sind. HGH wird vorzugsweise in einer stabilisierten Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung verabreicht, insbesondere mit Stabilisatoren, wie Glycin, Tenside, Mannit oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere, und mit Puffern, wie Natriumphosphat oder Natriumzitat (WO 89/09614, EP 0 211 601 A, EP 0 587 958 A).

**[0020]** Die in den vorliegenden Zusammensetzungen zu verwendenden Antigene sind nicht kritisch. Vorzugsweise werden als solche Antigene Proteine oder Peptide, abgeleitet von einem viralen oder bakteriellen Pathogen oder von Pilzen oder Parasiten verwendet (einschließlich derivatisierte Antigene wie glykosylierte, lipidierte, glykolipidierte oder hydroxilierte Antigene). Weiters können auch Kohlehydrate, Lipide oder Glykolipide selbst als Antigene verwendet werden. Bevorzugte Pathogene sind ausgewählt aus HIV, HBV, HCV, Influenzavirus, Rotavirus, Staphylococcus aureus, Chlamydia pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Vibrio cholerae, Plasmodium sp. (Pl. falciparum, Pl. vivax etc.), Aspergillus sp. oder Candida albicans. Das Derivationsverfahren kann die Reinigung eines spezifischen Proteins vom

Pathogen, die Inaktivierung des Pathogens sowie die proteolytische oder chemische Derivatisierung oder Stabilisierung eines solchen Proteins beinhalten. Ebenso können auch Tumorantigene (Krebsvakzine) oder Autoimmunantigene in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden. Mit solchen Zusammensetzungen kann eine Tumorrmpfung oder eine Behandlung für Autoimmunerkrankungen durchgeführt werden.

**[0021]** Vorzugsweise werden Antigene verwendet, die eine Antigen-spezifische, Typ1-ähnliche tumorale und zellvermittelte Immunantwort in vivo induzieren. CD4- und CD8-Epitope sind bevorzugt, insbesondere in Verbindung mit Vakzinen gegen Pathogene und Tumore.

**[0022]** Bevorzugte immunstimulierende neuroaktive Substanzen schließen Hypophysen-Wachstumshormone oder Derivate davon ein, insbesondere proteolytisch oder rekombinant hergestellte Derivate, die die funktionellen Eigenschaften des Wachstumshormons aufweisen (beschrieben z.B. in den US-Patenten 5,854,026 oder 5,849,535, 5,424,199 oder 5,580,723). Es ist gezeigt worden, dass solche Substanzen auch in der Lage sind, die Zytokinsekretion von T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen zu verändern, sie können jedoch auch Wirkungen auf APCs, B-Zellen oder NK-Zellen ausüben. Ihre immunstimulierende Wirkung wurde in der Literatur mit spezifischen Rezeptoren an T-Zellen in Verbindung gebracht (s. Levite (1998)).

**[0023]** Die neuroaktiven Verbindungen sind ausgewählt aus der Gruppe von Wachstumshormonen, insbesondere menschlichem Wachstumshormon, Neurokinin A, vasoaktivem Intestinalpeptid, Neuropeptid Y, Substanz P, Thyrotrophin (TSH), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-1), Prolaktin, Laktogen, luteinisierendem Mormon, follikelstimulierendem Mormon, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Thymosin, Thymulin, Kentsin, Melatonin, Semaphorinen (s. Levite (1998); Scholzen et al. (1998); Aronin et al., *Ann. Rev. Physiol.* 48 (1986), 537–549; Berczi, *Acta Paediatr. Suppl.* 423 (1997), 70–75; Chappel, *J. Acq. Imm. Def. Synd.* 20 (5) (1999), 423–431; Goldman et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 419 (1983), 143–155; Spriggs, *Curr. Op. Immunol.* 11 (1999), 387–391; Delneste et al., *J. Immunol.* 163 (1999), 3071–3075). Auch funktionelle Derivate solcher Verbindungen können vorzugsweise in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Ein geeignetes Verfahren für das Zur-Verfügung-Stellen solcher Derivate von natürlich vorkommenden Substanzen ist in US 5,580,723 offenbart.

**[0024]** Es ist für den Fachmann klar, dass sich die Begriffe „neuroaktive Verbindungen“, „Hormone“, „Verbindungen mit Wachstumshormonaktivität“ überschneiden und viele bekannte Substanzen unter zwei oder sogar alle drei Gruppen fallen. Diese Begriffe sind in ihrer Bedeutung jedoch so zu verstehen, wie sie allgemein in der wissenschaftlichen Literatur, insbesondere in jener Literatur, die sich mit der immunologischen Forschung dieser Substanzklassen befasst, verwendet werden.

**[0025]** Die erfindungsgemäß zu verwendende polykationische Verbindung kann jegliche polykationische Verbindung sein, die eine charakteristische Wirkung gemäß WO 97130721 zeigt. Bevorzugte polykationische Verbindungen sind ausgewählt aus basischen Polypeptiden, organischen Polykationen, basischen Polyaminosäuren oder Mischungen davon. Diese Polyaminosäuren sollten eine Kettenlänge von mindestens 4 Aminosäureresten haben (siehe Tufts, wie beschrieben in Goldman et al. (1983)). Besonders bevorzugt sind Substanzen wie Polylysin, Polyarginin und Polypeptide, die mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten aufweisen, oder Mischungen davon.

**[0026]** Diese polykationischen Verbindungen können chemisch oder rekombinant hergestellt oder von natürlichen Quellen abgeleitet werden. Bevorzugte polykationische Verbindungen, die von natürlichen Quellen abgeleitet werden, schließen von HIV-REV oder HIV-TAT abgeleitete kationische Peptide, Antennapedia-Peptide, Chitosan (oder andere Derivate von Chitin) und andere Peptide ein, die von diesen Peptiden oder Proteinen durch biochemische oder rekombinante Herstellung abgeleitet sind.

**[0027]** Es war äußerst überraschend, dass mit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung die immunstimulierende Wirkung signifikant höher war als von der Addition der Wirkungen jeder einzelnen Komponente oder auch der Addition der Wirkungen des Polykations mit dem Antigen und der erfindungsgemäß ausgewählten immunstimulierenden neuroaktiven Substanz mit dem Antigen zu erwarten gewesen wäre. Weiters stellte sich heraus, dass selbst die Wirkung der ausgewählten neuroaktiven Substanzen alleine nicht sehr groß ist, wenn ein Antigen direkt mit dieser Substanz angewendet wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Verbindungen nicht wiederholt verabreicht werden.

**[0028]** Gemäß einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Vakzine, die eine Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen.

**[0029]** Weiters wird die vorliegende Erfindung auch zur Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zur Herstellung eines Vakzins ausgedehnt.

**[0030]** Die relativen Mengen der Inhaltsstoffe der vorliegenden Zusammensetzung hängen sehr stark von den Erfordernissen der einzelnen Zusammensetzung ab, z.B. dem zu verwendenden polykationischen Polymer. Bei Poly-L-arginin und Poly-L-lysin liegen die bevorzugten Mengen von Antigen/neuroaktive Verbindung/Polykation im Bereich von 1–10000 µg Antigen pro Impfung, 0,001 bis 1000 Einheiten immunstimulierende neuroaktive Verbindung pro Dosis, insbesondere bei Hormonen, wie HGH, und 0,1 bis 1000 µg Polykation.

**[0031]** Die vorliegenden Zusammensetzungen können einem Patienten, z.B. einem Impfkandidaten, in wirksamen Mengen z.B. in wöchentlichen, 2-wöchigen oder monatlichen Intervallen verabreicht werden. Mit den vorliegenden Zusammensetzungen zu behandelnde Patienten können auch wiederholt oder nur einmal geimpft werden. Eine bevorzugte Verwendung der vorliegenden Erfindung ist die aktive Immunisierung, insbesondere von Menschen oder Tieren ohne Schutz gegen das spezifische Antigen.

**[0032]** Der Verabreichungsweg für die vorliegende Zusammensetzung ist nicht kritisch; subcutane, intramuskuläre, intradermale oder transdermale Injektion z.B. sind genauso geeignet wie die orale Einnahme.

**[0033]** Es ist auch möglich, die vorliegende Zusammensetzung separat zu verabreichen, z.B. durch Injektion der immunstimulierenden neuroaktiven Substanz getrennt von der Antigen/Polykation-Zusammensetzung. Die vorliegende Erfindung richtet sich daher auch an ein Kit, das eine Zusammensetzung, die das Antigen und das polykationische Polymer enthält, als eine Komponente und eine Zusammensetzung, die die immunstimulierende oder chemotaktische neuroaktive Substanz enthält, als zweite Komponente umfasst.

**[0034]** Die Komponenten können auf die selbe Stelle oder zur selben Zeit aufgebracht werden, eine Verabreichung an verschiedene Stellen, zu verschiedenen Zeiten oder für unterschiedliche Zeitspannen ist jedoch ebenfalls möglich. Es ist weiters auch möglich, die systemischen oder lokalen Verabreichungen der Zusammensetzung bzw. der Komponenten zu variieren.

**[0035]** Details der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Beispielen und der Zeichnung beschrieben, die Erfindung ist jedoch natürlich nicht darauf beschränkt.

**[0036]** [Fig. 1](#) zeigt die synergistische Wirkung von Poly-L-arginin und menschlichem Wachstumshormon auf die Induzierung von antigenspezifischen T-Zellen.

**[0037]** [Fig. 2](#) zeigt die synergistische Wirkung von Poly-L-Arginin und Substanz P bei der Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen.

## Beispiele:

Beispiel 1: Die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen wird durch die Co-Injektion einer Kombination von Poly-L-Arginin und humanem Wachstumshormon stark gesteigert.

Mäuse	C57BL/6 (Harlan/Olac)
Peptid	VYDFFVWL abgeleitet vom Maus-Tyrosinase-verwandtes Protein-2. Beschränkt auf H-2Kb (Bloom et al., 1997) Dosis: 100 µg/Maus
Kontrollpeptid	SIINFEKL abgeleitet von Ovalbumin Beschränkt auf H-2Kb (Carbone und Bevan, 1989)
Poly-L-Arginin 60 (pR60)	Poly-L-Arginin mit einem Durchschnittsgrad der Polymerisation von 60 Arginin-Resten; SIGMA Chemicals Dosis: 100 µg/Maus
Humanes Wachstumshormon (HGH)	0,02 IE/Injektion (SAIZEN, Laboratoires Serono)

**[0038]** Die Peptide wurden mit der Standard-Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, HPLC gereinigt und mit Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert.

## Experimentelle Gruppen (jeweils 5 Mäuse)

- 1) TRP-2 Peptid
- 2) TRP-2 Peptid + HGH
- 3) TRP-2 Peptid + pR 60
- 4) TRP-2 Peptid + pR 60 + HGH

**[0039]** Am Tag 0 wurde den Mäusen subkutan ein Gesamtvolumen von 100 µl enthaltend die oben genannten Verbindungen injiziert. Die Tiere wurden 10 Tage nach der Injektion des Vakzins getötet und mesenteriale und inguinale Lymphknoten wurden geerntet. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) dargestellt.

**[0040]** Lymphozyten wurden aus Lymphknoten wie folgt hergestellt: Zellen wurden durch ein 70 µm Sieb durchgeleitet und zweimal mit DMEM-Medium (GIBCO BRL), enthaltend 2,5% fötales Kälberserum, gewaschen (FCS; SIGMA Chemicals). Zellen wurden auf 10<sup>7</sup> Zellen/ml im vollständigen Medium (DMEM + 10% FCS) eingestellt. IFN-γ-ELISPOT-Assays wurden im Triplikate wie beschrieben durchgeführt (Miyahira et al., 1995). Diese Methode ist ein weitläufig gebräuchliches Verfahren, das die Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ermöglicht. Lymphozyten wurden mit TRP-2 Peptid oder mit einem Ovalbumin-abgeleiteten Peptid (SIINFEKL) restimuliert, wobei die selbe MHC-Beschränkung als Negativkontrolle dient.

**[0041]** Die Spots, die einzelne T-Zellen repräsentieren, die für das für die Restimulierung (und Immunisierung) verwendete Peptid spezifisch sind, wurden gezählt. Die Anzahl der Hintergrund-Spots, die bei Zellen beobachtet wurden, welche ohne Peptid(e) inkubiert worden waren, wurde von allen Proben subtrahiert. Bei der Verwendung vom Ovalbumin-abgeleiteten Peptid wurden keine Spots detektiert. Die Anzahl der Spots, die sich aus der Restimulierung mit dem TRP-2-abgeleiteten Peptid ergibt, ist unten für jede einzelne Mäusegruppe angegeben.

Beispiel 2: bevorzugte Antigene, die für die Zurverfügungstellung einer Vakzinzusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwenden sind:

1. HCV: Antigene gemäß Tabelle 1 und die in Lamonaca et al., Hepatology 30 (4) (1999), 1088–1098, geoffenbarten Antigene



## Hepatitis C Peptide

Tabelle 1

CD4-Epitope	Sequenz	Literaturstellen	CD8-Epitope	Sequenz	Literaturstellen
Core 23-44	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRRL	(Hoffmann et al., 1995)	Core 132-140	DLMGYIPAV	(Sarobe et al., 1998)
E2/NS1	-	-	E2/NS1 723-731	FLLADARV	(Wentworth et al., 1996)
NS3 1248-1261	GKVLVLPNSVAAT	(Diepolder et al., 1997)	NS3 1073-1081	CINGVCWTV	(He et al., 1999; Rehermann et al., 1996)
Core 131-151	ADLMGYIPLVGFPLGGAARA	(Hoffmann et al., 1995)			

## Anmerkungen:

- Core 23-44 enthält zwei CD8-Epitope: Core 31-40 (VGGVYLLPRR) und Core 35-44 (YLLPRRGPRL) (Battegay et al., 1995; Rehermann et al., 1996)
- Core 131-150 enthält das CD8-Epitop-Core 132-140 (DLMGYIPLV) (Wentworth et al., 1996)

## 2. HIV: Antigene gemäß Tabelle 2

Tabelle 2

<u>Peptid</u>	<u>Sequenz</u>
Gag 77-85	SLYNTVATL
Hülle 77-85	DPNPQEVVL
POL 476-484	ILKEPVHGV

3. Epstein-Barr-Virus: die Antigene gemäß Tabelle 1 aus Rickinson et al. Ann. Rev. Immunol. 15 (1997), 405-431.

## Beispiel 3: Co-Injektion von Substanz P und pArg

**[0042]** Substanz P wurde als ein weiteres Beispiel für ein neuroaktives Peptid getestet (Marx, Science 205 (1979), 886). Substanz P (RPKPQQFFGLM-NH<sub>2</sub>; SP) wurde gemäß den Standardverfahren synthetisiert und gereinigt. Experimente wurden gemäß Beispiel 1 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstatt Lymphknoten Milzen verwendet wurden.

**[0043]** Splenozyten wurden aus den Milzen wie folgt hergestellt: Die Zellen wurden durch eine 70 µm Sieb gesiebt und einmal mit DMEM-Medium (GIBCO BRL) gewaschen. Rote Blutzellen wurden mit „Lysepuffer für rote Blutzellen“ („red blood cells lysis buffer“) (Sigma) 1 Minute lang lysiert und zweimal mit DMEM-Medium (GIBCO BRL) gewaschen. Die Zellen wurden auf 3·10<sup>6</sup> Zellen/ml in vollständigem Medium (DMEM + 5% FCS) eingestellt. IFN-γ-ELISPOT wurde wie beschrieben durchgeführt (Miyahira et al., 1995).

## Versuchsgruppen (jeweils 2 Mäuse)

- 1) TRP-2 Peptid
- 2) TRP-2 Peptid + pR 60
- 3) TRP-2 Peptid + pR 60 + Substanz P

**[0044]** Pro Injektion wurden den Mäusen 10 nMol SP verabreicht.

**[0045]** Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) veranschaulicht. Es wird mit dem vorliegenden Beispiel demonstriert, dass die Ko-Injektion von SP und Poly-L-Arginin in einer stark erhöhten Erzeugung von T-Zellen in einem IFN-γ-ELISPOT-Essay führt.

## Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche umfasst:

- ein Antigen,
- eine neuroaktive Verbindung ausgewählt aus Wachstumshormonen, Neurokinin A, vasoaktivem Intestinalpeptid, Neuropeptid Y, Substanz P, Thyrotrophin (TSH), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-1), Prolaktin, Laktogen, luteinisierendem Hormon, follikelstimulierendem Hormon, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Thy-mosin, Thymulin, Kentsin, Melatonin, Semaphorinen und Mischungen davon, und
- ein polykationisches Polymer.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Protein ist, das von einem viralen, parasitären oder bakteriellen Pathogen abgeleitet ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Tumorantigen ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Autoimmunantigen ist.

5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung ein basisches Polypeptid, ein organisches Polykation, eine basische Polyaminosäure oder Mischungen davon sind.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung Polylysin, Polyarginin, ein Polypeptid, das mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten enthält, oder Mischungen davon sind.

7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung vom REV-Protein oder dem TAT-Protein von HIV, Chitosan oder anderen Chitinderivaten abgeleitet ist.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die neuroaktiven Verbindungen aus menschlichen Wachstumshormonen, TSH, Prolaktin, Laktogen und Mischungen davon ausgewählt sind.

9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie menschliches Wachstumshormon als neuroaktive Verbindung umfasst.

10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie Substanz P als neuroaktive Verbindung umfasst.

11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie Prolaktin als neuroaktive Verbindung umfasst.

12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie IGF-1 als neuroaktive Verbindung umfasst.

13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die neuroaktiven Verbindungen aus Neurokinin A, Neuropeptid Y oder Mischungen davon ausgewählt sind.

14. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die neuroaktiven Verbindungen aus luteinisierendem Hormon, follikelstimulierendem Hormon, DHEA, Thymosin, Thymulin, Kentsin, oder Mischungen davon ausgewählt sind.

15. Vakzin, umfassend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

16. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Vazins.

17. Kit, welches umfasst:

– eine Komponente, die eine neuroaktive Verbindung enthält, ausgewählt aus Wachstumshormonen, insbesondere menschlichem Wachstumshormon, Neurokinin A, vasoaktivem Intestinalpeptid, Neuropeptid Y, Substanz P, Thyrotrophin (TSH), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-1), Prolaktin, Laktogen, luteinisierendem Hormon, follikelstimulierendem Hormon, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Thymosin, Thymulin, Kentsin, Melatonin, Semaphorinen und Mischungen davon, und  
eine Komponente, die ein polykationisches Polymer und ein Antigen enthält.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

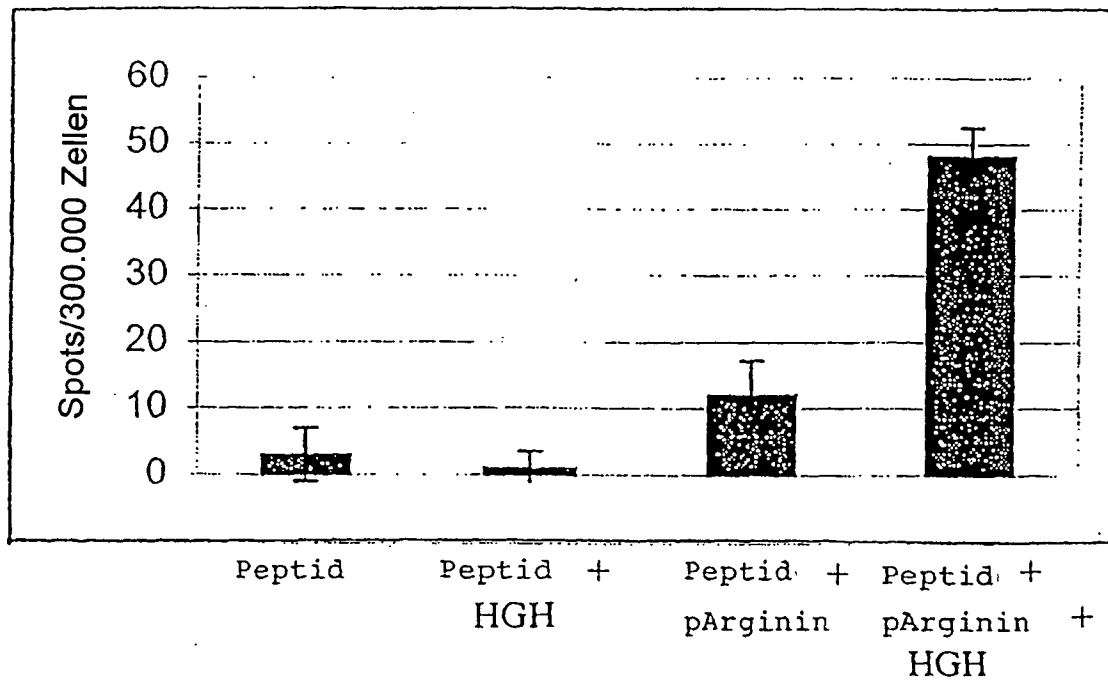


FIG. 1

FIG. 2

