

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 721 B**

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1680/99  
(22) Anmeldetag: 01.10.1999  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.07.2001  
(45) Ausgabetag: 25.02.2002

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61K 39/39**  
A61K 38/00

(56) Entgegenhaltungen:  
GB 1290141A WO 97/30721A1 US 3725545A  
WO 91/04052A1 WO 94/15634A1  
WO 95/05195A1

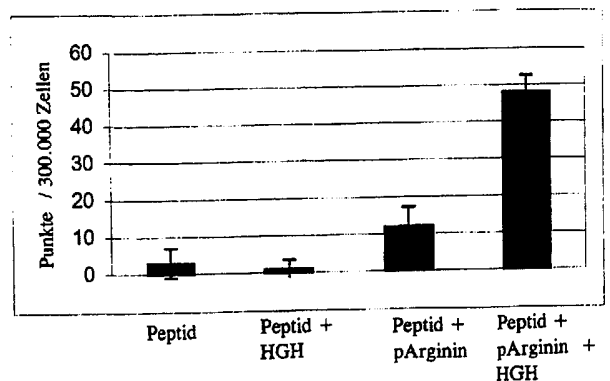
(73) Patentinhaber:  
CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH  
A-1030 WIEN (AT).  
(72) Erfinder:  
FLEITMANN JULIA-KRISTINA MAG.  
GALLBRUNN, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
MATTNER FRANK DR.  
WIEN (AT).  
BUSCHLE MICHAEL DR.  
BRUNN AM GEBIRGE, NIEDERÖSTERREICH  
(AT).  
MELLING JACK DR.  
SALISBURY (GB).

(54) PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND EIN ANTIGEN

AT 408 721 B

(57) Die Erfindung offenbart eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche  
- ein Antigen,  
- eine immunstimulierende Substanz, ausgewählt aus neuroaktiven Verbindungen, Hormonen, Verbindungen mit Wachstumshormonaktivität und Mischungen davon und  
- ein polykationisches Polymer umfasst.

FIG. 1



Die Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere zur Verwendung als Vakzine.

5 Impfungen sind eine sehr erfolgreiche und doch kostensparende medizinische Intervention. Viele katastrophale Krankheiten, einschließlich Pocken und Poliomyelitis, sind dank intensiver  
10 Impfprogramme vom Gesicht dieser Erde verschwunden oder sind nahe daran, ausgelöscht zu werden (Nossal, *Nat. Med.* 4 (1998), 475-476). Impfungen 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  
15 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, Krebs oder Verletzungen die Hauptursache für Tod und Behinderung auf der Welt bleiben (Bloom et al., *Nat. Med.* 4 (1998), 480-484).

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 sekretiert werden, die Pathogene in extrazellulären Bereichen erkennen.

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  
35 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  
45 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  
50 (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  
55 systemisch als Stimulans für das Immunsystem wirken.

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.

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 einer Vakzine für das Virus der Zeckenzephalitis (tick-borne encephalitis, TBE), einem endemischen Virus, das von Zecken übertragen wird. In Tierversuchen potenzierte HGH die Wirksamkeit der Vakzine und führte zum Schutz der Tiere nach nur einer Injektion des Impfstoffs. Der Mechanismus, wie HGH die Wirksamkeit der Vakzine 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 sogenannte Th1-Typ T-Helferzellenantwort entwickeln, was auf eine zelluläre Immunantwort hinweist (Mellado et al., *Vaccine* 16 (1998), 1111-1115). Zusammengefasst 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.

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 Belastung 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).

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

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.

Dieses Ziel wird mittels einer pharmazeutischen Zusammensetzung erreicht, die umfasst:

- ein Antigen,
- eine immunstimulierende Substanz oder eine Substanz, die ein chemotaktischer Faktor oder ein Differenzierung auslösender Faktor für Immunzellen ist, ausgewählt aus neuroaktiven Verbindungen, Hormonen, Verbindungen mit Wachstumshormonaktivität und Mischungen davon, und
- ein polykationisches Polymer.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Kombination der immunstimulierenden Substanz oder des chemotaktischen oder die Differenzierung auslösenden Faktors (im Folgenden als "immunstimulierende Substanzen" zusammengefasst) gemäß der vorliegenden Erfindung und

des polykationischen Polymers mit einem Antigen zu einem synergistischen, immunmodulierenden Effekt für ein bestimmtes Antigenpräparat führt. In der Tat stellte sich heraus, dass die Wirkung einer erfindungsgemäßen immunstimulierenden Substanz alleine mit dem Antigen - für sich selbst - sogar eine geringere Wirkung hat als die Verabreichung des Antigens nur mit dem polykationischen Polymer.

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 APC wirken.

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.

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

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 oder glykosylierte oder lipidierte Antigene oder Polysaccharide oder Lipide). 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 Tumorigmpfung oder eine Behandlung für Autoimmunerkrankungen durchgeführt werden.

Bevorzugte immunstimulierende 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)).

Andere bevorzugte neue aktive Verbindungen werden 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 (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) oder Mischungen davon ausgewählt. 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 geoffenbart.

Die erfindungsgemäß zu verwendende polykationische Verbindung kann jegliche polykationische Verbindung sein, die eine charakteristische Wirkung gemäß WO 97/30721 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% basischen Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten aufweisen, oder Mischungen davon.

5 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.

10 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 Substanz mit dem Antigen zu erwarten gewesen wäre. Weiters stellte sich heraus, dass selbst die Wirkung der erfindungsgemäß ausgewählten immunstimulierenden 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.

15 Gemäß einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Vakzinen, die eine Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen.

20 Weiters wird die vorliegende Erfindung auch zur Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zur Herstellung einer Vakzine ausgedehnt.

25 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/immunstimulierende Verbindung/Polykation im Bereich von 1-10000 µg Antigen pro Impfung, 0,001 bis 1000 Einheiten immunstimulierende Verbindung pro Dosis, insbesondere bei Hormonen, wie HGH, und 0,1 bis 1000 µg Polykation.

30 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.

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

40 Es ist auch möglich, die vorliegende Zusammensetzung separat zu verabreichen, z.B. durch Injektion der immunstimulierenden 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 Substanz enthält, als zweite Komponente umfasst.

45 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.

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

50 Fig. 1 zeigt die synergistische Wirkung von Poly-L-arginin und menschlichem Wachstumshormon auf die Induzierung von antigenspezifischen T-Zellen.

#### BEISPIELE

55 **Beispiel 1:** Induzierung von antigenspezifischen T-Zellen wird durch die gemeinsame Injektion einer Kombination von Poly-L-arginin und menschlichem Wachstumshormon sehr verstärkt.

Mäuse	C57BL/6 (Harlan/Olac)
Peptid	VYDFFVWL, abgeleitet von mit Maus-Tyrosinase verwandtem Protein-2. Restriktion auf H-2Kb (Bloom et al., 1997). Dosis: 100 µg/Maus
Kontrollpeptid	SIINFEKL, abgeleitet von Ovalbumin. Restriktion auf H-2Kb (Carbone und Bevan, 1989).
Poly-L-arginin 60 (pR60)	Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals. Dosis: 100 µg/Maus
Menschliches Wachstumshormon (HGH)	0,02 IE/Injektion (SAIZEN, Laboratoires Serono)

Die Peptide wurden durch standardmäßige Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, durch HPLC gereinigt und mittels Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert.

Versuchsgruppen (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

An Tag 0 wurde den Mäusen subcutan ein Gesamtvolumen von 100 µl injiziert, das die oben genannten Verbindungen enthielt. Die Tiere wurden 10 Tage nach Injektion der Vakzine getötet, und die mesenterialen und inguinalen Lymphknoten wurden gesammelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt.

Die Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten wie folgt hergestellt: Die Zellen wurden durch ein 70 µm Sieb geleitet und zweimal mit DMEM Medium (GIBCO BRL) gewaschen, das 2,5% Kälberfetals Serum (FCS; SIGMA Chemicals) enthielt. Die Zellen wurden auf  $10^7$  Zellen/ml in komplettem Medium eingestellt (DMEM + 10% FCS). IFN- $\gamma$ -ELISPOT Assays wurden dreimal durchgeführt, wie beschrieben (Miyahira et al., 1995). Diese Methode ist ein verbreitet verwendetes Verfahren, das die Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen ermöglicht. Lymphozyten wurden mit TRP-2 Peptid oder mit einem von Ovalbumin abgeleiteten Peptid (SIINFEKL) restimuliert, wobei die gleiche MHC-Restriktion als Negativkontrolle diente.

Es wurden die Spots gezählt, die einzelne T-Zellen repräsentierten, die für das zur Restimulierung (und Immunisierung) verwendete Peptid spezifisch waren. Die Anzahl der Hintergrundspots, die bei den Zellen beobachtet wurden, die ohne Peptid(e) inkubiert worden waren, wurde von allen Proben abgezogen. Wenn das von Ovalbumin abgeleitete Peptid verwendet wurde, wurden keine Spots beobachtet. Die Anzahl der Spots, die sich aus der Restimulierung mit dem von TRP-2 abgeleiteten Peptid ergab, ist unten für jede Gruppe von Mäusen angegeben.

**Beispiel 2:** Bevorzugte Antigene zur Verwendung zur Zur-Verfügung-Stellung einer Vakzinzusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung:

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

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

Hepatitis C-Peptide

**Tabelle 1**

CD4 Epitope	Sequenz	Referenzen	CD8 Epitope	Sequenz	Referenzen
Core 23 - 44	KFPGGGQVGGVYLLPRRGPRL	(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	GYKVLVLPNSVAAT	Diepolder et al., 1997	NS3 1073 - 1081	CINGVCWTV	(He et al., 1999; Rehermann et al., 1996)
Core 131 - 150	ADLMGYIPLVGAPLGAARA	(Hoffmann et al., 1995)			

Anmerkungen:

- Core 23 - 44 enthält zwei CD8 Epitope: Core 31 - 40 (VGGVYLLPRR) und Core 35 - 44 (YLLPRRGPRL) (Battagay et al., 1995; Rehermann et al., 1996)

2. HIV: Antigene gemäß

Tabelle 2

5	Peptid	Sequenz
	Gag 77 - 85	SLYNTVATL
	Hülle 77 - 85	DPNPQEVVL
	POL 476 - 484	ILKEPVHGV

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

15 **PATENTANSPRÜCHE:**

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche umfasst:
  - ein Antigen,
  - eine immunstimulierende Substanz, ausgewählt aus neuroaktiven Verbindungen, Hormonen, Verbindungen mit Wachstumshormonaktivität und Mischungen davon und
  - ein polykationisches Polymer.
2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Protein ist, das von einem viralen, parasitären oder bakteriellen Pathogen abgeleitet ist.
3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Tumorantigen ist.
4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Autoimmunantigen ist.
5. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung ein basisches Polypeptid, ein organisches Polykation, eine basische Polyaminosäure oder eine Mischung davon ist.
6. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung Polylysine, Polyarginin, ein Polypeptid, das mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten enthält, oder eine Mischung davon ist.
7. Zusammensetzung gemäß 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 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die neuroaktiven Verbindungen 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 ausgewählt sind.
9. Vakzine, die eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 umfasst.
10. Verwendung einer Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung einer Vakzine.
11. Kit, welches umfasst:
  - eine Komponente, die eine immunstimulierende Substanz enthält, ausgewählt aus neuroaktiven Verbindungen, Hormonen, Verbindungen mit Wachstumshormonaktivität und Mischungen davon, und
  - eine Komponente, die ein polykationisches Polymer und ein Antigen enthält.

55 **HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN**



FIG. 1

