



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 35 075 T2** 2009.02.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 689 551 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 35 075.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/02897**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 911 633.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/021680**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.03.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **29.09.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.01.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/11 (2006.01)**

**C12N 15/86 (2006.01)**

**A61K 39/00 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**32902 17.03.1993 US**

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America  
as represented by the Secretary, Department of  
Health and Human Services, Rockville, Md., US**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**RESTIFO, Nicholas P., Chevy Chase, MD 20815,  
US; ROSENBERG, Steven A., Ptomac, MD 20854,  
US; BENNINK, Jack R., Olney, MD 20832, US;  
BACIK, Igor, Rockville, MD 20851, US; YEWDELL,  
Jonathan W., Silver Spring, MD 20906, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNOGENE CHIMÄRE UMFASSEND NUCLEINSÄURESEQUENZEN, DIE SIGNALSEQUENZ-  
PEPTIDE DES ENDOPLASMATISCHEN RETICULUMS UND MINDESTENS EIN ANDERES PEPTID CODIEREN,  
DEREN VERWENDUNG IN IMPFSTOFFEN UND ZUR BEHANDLUNG VON KRANKHEITEN**

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 vorliegende Erfindung liegt im Bereich der Immuntherapie. Spezifischer betrifft die Erfindung die in vivo-Verwendung von immunogenen chimären Proteinen, umfassend ein Signalpeptid des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid, als Immunogene in Impfstoffen und deren Verwendungen für die Behandlung von Krebs, viralen Infektionen, bakteriellen Infektionen, parasitäre Infektionen oder Autoimmunerkrankungen in Säugern.

**[0002]** Die Etablierung von Immuntherapien basierend auf vom Thymus abstammenden Lymphocyten (T-Zellen) als eine Behandlungsmodalität für Krebs und anderen Krankheiten in Menschen ist ein Gebiet von beträchtlichem Forschungsinteresse (Oethgen, H. F. et al. (1991) in *Biologic Therapy of Cancer*: Hrsg.: DeVita, V. T. Jr., Hellman, S., Rosenberg, S. A. J. B. Lippincott, S. 87). Ein Haupthindernis für die Entwicklung von wirksamen T-Zell-basierenden Immuntherapien ist, dass die Antigen-Präsentierung auf der Oberfläche der Zellen oft nicht adäquat ist, um eine T-Zellantwort auf das Antigen hervorzurufen. Daher ist ein Hauptziel von Forschern in Gebieten wie Krebs-Biologie, Virologie und Immunologie die Entwicklung von Verfahren, die die Präsentation von Antigenen für T-Zellen erhöhen. Um die vorliegende Erfindung besser zu verstehen, wird nachstehend ein kurzer Überblick gegeben, wie T-Zellen Antigene erkennen oder sie nicht erkennen, (siehe auch Restifo, N. P. *Biologic Therapy of Cancer Updates* 2:1–10 (1992); Yewdell, J. W. *Adv. in Immunology* 52:1–123 (1992)).

**[0003]** Im Gegensatz zu B-Zellen, die Antigene erkennen können, die nicht zusammen mit anderen Molekülen präsentiert werden, können T-Zellen nur Antigene zusammen mit einem Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) auf der Oberfläche einer Zielzelle erkennen. Insbesondere gibt es zwei Typen von MHC-Molekülen, und jeder Typ, der nicht-kovalent mit den antigenen Peptiden verknüpft ist, stellt einen Liganden für andere Untergruppen von T-Zellen dar. Genauer werden Klasse I-MHC/Peptid-Komplexe durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt, während Klasse II-MHC/Peptid-Komplexe durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Für Forscher, die in die Entwicklung von T-Zell-basierenden Immuntherapien involviert sind, ist von Interesse, dass gezeigt worden ist, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die manchmal cytotoxische T-Lymphocyten oder CTLs genannt werden, zum direkten Abtöten von Zielzellen, die einen Klasse I/Peptid-Komplex auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, und zum Sezernieren von Cytokinen, die die Zerstörung dieser Zielzellen signalisieren können, in der Lage sind. Diese Eigenschaften von CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben zahlreiche Forscher angeregt, sich auf die Untersuchung der Vorgänge zu fokussieren, die zur Bildung von Klasse I/Peptid-Komplexen in Zielzellen und der folgenden Präsentation dieser Komplexe auf der Oberfläche der Zielzellen führen, um die molekularen Maschinerien, die in die Präsentation der Peptide für CD8<sup>+</sup> T-Zellen involviert sind, besser zu verstehen. Obwohl die Vorgänge, die in die Spaltung und den Transport von Peptiden involviert sind, die durch Klasse I-MHC-Moleküle gebunden werden, erst jetzt charakterisiert werden, sind bislang einige Details bekannt.

**[0004]** Kurz, die Erzeugung von antigenen Peptiden für Klasse I-Moleküle von cytosolischen Proteinen (Tevehia, S. S., et al. *Virology* 107:13–23 (1980); Bennink, J. R., et al. *Nature* 296:75–76 (1982); Yewdell, J. W., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1785–1789 (1985); Yewdell, J. W., et al. *Science* 239:637–640 (1988); Townsend, A. R. M., et al. *Cell* 39, 13–25 (1984)) wird durch unbekannte cytosolische Proteasen erreicht. Sobald sie im Cytosol gebildet sind, werden diese Peptide dann durch einen Vorgang, der das Vorliegen von zwei MHC-codierten Genprodukten, genannt TAP1 und TAP2, erfordert (Deverson, E., et al. *Nature* 348:738–741 (1990); Trowsdale, J., et al. 348:741–744 (1990); Spies, T., et al. *Nature* 348:744–747 (1990); Monaco, J. J., et al. *Science* 250:1723–1726 (1990)), an das endoplasmatische Retikulum (ER) abgegeben. Im ER assoziieren die Peptide nicht-kovalent mit Klasse I-MHC-Molekülen, um einen Klasse I-MHC/Peptid-Komplex zu bilden, der dann zur Zelloberfläche transportiert wird. Der Klasse I/Peptid-Komplex, der auf der Zelloberfläche präsentiert wird, ist jetzt in der Lage, als ein Ligand für Zelloberflächenrezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu dienen und so eine T-Zellantwort gegen das präsentierte Peptid hervorzurufen. Aufgrund der Komplexität der Prozessierungs-Signalwege, die schlussendlich in der Antigenpräsentation für CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultiert, könnte erwartet werden, dass Mängel in der Expression von einer der Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Signalwege, die vorstehend dargelegt sind, in einer reduzierten Präsentation von Antigen für CTLs resultieren.

**[0005]** Neue Untersuchungen sowohl von Eisenlohr et al. (*Cell* 71:963–972 (1992)) als auch Anderson et al. (*J. Exp. Med.* 174:489–492 (1991)) haben gezeigt, dass, obwohl die Präsentation von Antigenen für CTLs in einer Zelllinie, die Deletionen in den Genen aufweist, die TAP1 und TAP2 codieren, im Vergleich zu jener, die in Kontrollzellen beobachtet wird, dramatisch reduziert ist, eine wirksame Antigen-Präsentation in einer TAP-defizienten Zelllinie durch Transfektion dieser Zellen mit „Minigenen“, in denen das antigene Peptid unmittelbar carboxy-terminal von einer ER-Signalsequenz platziert wurde, erreicht werden konnte. Solche Signalsequenzen werden allgemein am NH<sub>2</sub>-Terminus von Proteinen gefunden, und ihre Funktion ist, solche Proteine

zur ER-Membran zu leiten. Es sollte jedoch bemerkt werden, dass der verstärkende Effekt der ER-Signalsequenz auf die Antigen-Präsentation, der in diesen Untersuchungen beobachtet wurde, nicht in Kontrollzellen beobachtet wurde und daher nur bei der in vitro-Transfektion oder Infektion einer TAP-defizienten Zelllinie beobachtet wurde. Dennoch wurde kürzlich durch die Beobachtung durch andere Forscher, dass die TAP1- und TAP2-Expression nach Aussetzen der Zellen gegenüber Gamma-Interferon verstärkt ist (Trowsdale, J., et al. Cell, 348:741–744 (1990), ein Hinweis geliefert, der die Idee unterstützt, dass die Präsentation von Antigenen, die vom Cytosol prozessiert wurden, in vivo limitierend sein könnten. EP 0356409 betrifft ein allgemeines Verfahren für die Produktion und Isolierung von rekombinanten Fusionsproteinen, umfassend eine Signalsequenz und ein Protein von Interesse. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine TAP-vermittelte Peptid-Abgabe in vivo sowie in vitro limitierend sein kann und dass daher Verfahren, die den Transport der Peptide in vivo verstärken oder die Transportaktivität gänzlich umgehen könnten, in einer verstärkten Präsentation von Peptiden für T-Zellen resultieren könnten.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Die vorliegende Erfindung schließt immunogene chimäre Proteine, umfassend ein Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid ein. Immunogene chimäre Proteine werden in vivo verwendet, um eine spezifische T-Zellantwort hervorzurufen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung

(1) Ein Verfahren zum Bereitstellen von Säuger-T-Zellen, die eine Antwort auf ein Tumorpeptid, virales Peptid, Peptid einer Autoimmunerkrankung, bakterielles Peptid oder parasitäres Peptid zeigen, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Züchten von T-Zellen, die von einem Spender isoliert wurden, in dem eine T-Zellantwort auf das Tumorpeptid, virale Peptid, Peptid einer Autoimmunerkrankung, bakterielle Peptid oder parasitäre Peptid unter Verwendung eines chimären Proteins, umfassend ein Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tumorpeptiden, viralen Peptiden, bakteriellen Peptiden, parasitären Peptiden und Peptiden einer Autoimmunerkrankung, hervorgerufen worden ist; und

(b) Bereitstellen der gezüchteten T-Zellen.

(2) Ein Verfahren zum Erhalten von Säuger-T-Zellen, die eine Antwort auf ein Tumorpeptid, virales Peptid, Peptid einer Autoimmunerkrankung, bakterielles Peptid oder parasitäres Peptid zeigen, wobei das Verfahren das Sensibilisieren der isolierten Säuger-T-Zellen mit Zielzellen umfasst, worin

(a) die Zielzellen einem chimären Protein ausgesetzt worden sind, umfassend ein Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tumorpeptiden, viralen Peptiden, bakteriellen Peptiden oder parasitären Peptiden und Peptiden einer Autoimmunerkrankung, und

(b) die Zielzellen in einer wirksamen Menge vorliegen, um eine T-Zellantwort auf das andere Peptid hervorzurufen.

(3) Das Verfahren gemäß (1) oder (2), worin das andere Peptid ein Tumorpeptid ist. (4) Das Verfahren gemäß (3), worin das Tumorpeptid die Sequenz SEQ ID NO: 6 hat.

(5) Das Verfahren gemäß (1) oder (2), worin das andere Peptid ein bakterielles Peptid ist.

(6) Das Verfahren gemäß (1) oder (2), worin das andere Peptid ein parasitäres Peptid ist.

(7) Das Verfahren gemäß (1) oder (2), worin das andere Peptid ein Peptid einer Autoimmunerkrankung ist.

(8) Das Verfahren gemäß (1) oder (2), worin das andere Peptid ein virales Peptid ist.

(9) Das Verfahren gemäß (8), worin das virale Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4 und der vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59.

(10) Das Verfahren gemäß (9), worin das virale Peptid die Sequenz von SEQ ID NO: 4 hat.

(11) Das Verfahren gemäß (9), worin das virale Peptid die vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59 ist.

(12) T-Zellen, hergestellt durch das Verfahren gemäß einem von (1)–(11), worin die T-Zellen eine erhöhte peptidspezifische Reaktivität gegenüber dem anderen Peptid haben, die mindestens dreimal größer als die Grundlinien-Reaktivität von T-Zellen ist, die nur dem anderen Peptid in der Abwesenheit eines Signalsequenzpeptids des endoplasmatischen Retikulums ausgesetzt wurden, worin die Reaktivität in einem <sup>51</sup>Cr-Cytotoxizitäts-Freisetzung-Assay bei einem Effektor: Zielzell-Verhältnis von mindestens 50:1 unter Verwendung von Zielzellen, die mit dem anderen Peptid gepulst sind, gemessen wird.

(13) Die Verwendung der T-Zellen von (12) in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung in einem Säuger.

(14) Die Verwendung der T-Zellen von (12) in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung ei-

ner Medikaments zur Behandlung von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung in einem Säuger, worin die T-Zellen von einem Säuger isoliert werden, der mit einem immunogenen chimären Protein immunisiert wurde, und worin das immunogene chimäre Protein:

- (a) ein Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid umfasst; und
  - (b) eine T-Zellantwort auf das andere Peptid in dem immunisierten Säuger hervorruft.
- (15) Die Verwendung gemäß (14), worin das immunogene chimäre Protein in einer injizierbaren Form vorliegt.
- (16) Die Verwendung gemäß (14) oder (15), worin das Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 hat.
- (17) Die Verwendung gemäß einem von (14)–(16), worin das andere Peptid ein Tumorpeptid ist.
- (18) Die Verwendung gemäß (17), worin das Tumorpeptid die Sequenz von SEQ ID NO: 6 hat.
- (19) Die Verwendung gemäß einem von (14)–(16), worin das andere Peptid ein bakterielles Peptid ist.
- (20) Die Verwendung gemäß einem von (14)–(16), worin das andere Peptid ein parasitäres Peptid ist.
- (21) Die Verwendung gemäß einem von (14)–(16), worin das andere Peptid ein Peptid einer Autoimmunerkrankung ist.
- (22) Die Verwendung gemäß einem von (14)–(16), worin das andere Peptid ein virales Peptid ist.
- (23) Die Verwendung gemäß (22), worin das virale Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 und der vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59.
- (24) Die Verwendung gemäß (23), worin das virale Peptid die Sequenz von SEQ ID NO: 4 hat.
- (25) Die Verwendung gemäß (23), worin das virale Peptid die vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59 ist.

**[0007]** Weiterhin werden hierin eine synthetische Nucleinsäuresequenz, die zum Lenken der Produktion eines immunogenen chimären Proteins in der Lage ist, sowie äquivalente natürliche Nucleinsäuresequenzen beschrieben. Für die Zwecke dieser Anwendung bezieht sich Nucleinsäuresequenz auf RNA, DNA, cDNA oder jede synthetische Variante davon, die ein immunogenes chimäres Protein codiert.

**[0008]** Weiterhin beschrieben wird ein Impfstoff zum Immunisieren eines Säugers gegen Krebs, eine virale Infektion, bakterielle Infektion, parasitäre Infektion oder eine Autoimmunerkrankung, umfassend ein immunogenes chimäres Protein oder eine Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein codiert, in einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

**[0009]** Weiterhin beschrieben werden Arzneimittel für die Prävention oder Behandlung von Säugern, die von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung befallen sind, wobei die Arzneimittel das immunogene chimäre Protein oder die Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein codiert, in einem geeigneten Verdünnungsmittel oder Träger umfassen.

**[0010]** Weiterhin beschrieben wird ein Verfahren für das Behandeln von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung, umfassend:

- (a) Immunisieren der Säuger mit einer Menge des immunogenen chimären Proteins oder der Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein codiert, wobei die Menge wirksam ist, um eine spezifische T-Zellantwort hervorzurufen;
- (b) Isolieren der T-Zellen von den immunisierten Säugern; und
- (c) Verabreichen der T-Zellen an den immunisierten Säuger oder an einen nicht-immunisierten Säuger in einer therapeutisch wirksamen Menge.

#### Beschreibung der Figuren

**[0011]** [Fig. 1](#) zeigt die Konstruktion des Vacciniavirus (VV)-Konstrukts, das verwendet wurde, um ein immunogenes chimäres Protein zu exprimieren, umfassend das adenovirale E3/19K-Signalsequenzpeptid und ein anderes Peptid der Wahl.

**[0012]** [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse der <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen, die mit verschiedenen Vacciniaviren immunisiert wurden, abgeleitet wurden (rechte Seite der Figur), in verschiedenen Effektor: Ziel (E:T)-Verhältnissen mit P815-Zielzellen (linkes Feld), P815-Zellen, die mit dem synthetischen Peptid NP147–155 gepulst wurden (mittleres Feld), oder P815-Zellen, die mit Wildtyp-Vacciniavirus (VV) infiziert wurden (rechtes Feld), inkubiert wurden.

[0013] Die [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die sequenziell (um zu ermöglichen, dass die  $\text{CD8}^+$  T-Zellaktivität in einem einzigen Assay gemessen wird) mit Vacciniavirus VV-ESNP 147–155 ([Fig. 3A](#)) oder VV-NP ([Fig. 3B](#)) immunisiert wurden, in verschiedenen Effektor: Ziel (E:T)-Verhältnissen mit P815-Zielzellen, die mit dem synthetischen Peptid NP 147–155 gepulst wurden (offene Dreiecke), oder mit inkubiert wurden.

[0014] [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die mit variierenden Dosen von Vacciniavirus VV-NP (linke Felder) oder VV-ES NP 147–155 (rechte Felder) immunisiert wurden, in verschiedenen Effektor: Ziel (E:T)-Verhältnissen mit P815-Zellen, die mit VV-NP (obere Felder) oder mit Wildtyp-VV (untere Felder) infiziert wurden, inkubiert wurden.

[0015] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die mit Vacciniavirus VV-ESP1A (geschlossene Kreise), VV-P1A (offene Dreiecke) oder VV-ESNP (geschlossene Dreiecke) immunisiert wurden, in verschiedenen Effektor: Ziel (E:T)-Verhältnissen mit CT26-Zielzellen (linkes Feld), CT26-Zellen, die mit dem P1A-Peptid gepulst wurden (mittleres Feld), oder P815-Zellen (rechtes Feld) inkubiert wurden.

[0016] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die mit dem rekombinanten Vacciniavirus VV-ES NP 147–155 (geschlossene Kreise) oder VV-NP (offene Dreiecke) immunisiert wurden, danach mit autologen Zellen co-kultiviert wurden (Restifo, N. P. et al. J. of Immunol. 47:1453–1459 (1991)), die vor dem Inkubieren dieser Splenocyten in den angezeigten Verdünnungen mit P815-Zielzellen, die mit dem synthetischen Peptid NP 147–155 gepulst wurden, mit Influenzavirus infiziert wurden.

[0017] [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays, in denen Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die entweder mit Vacciniavirus VV-ES VSV 52–59 (obere Reihe), VV-ES OVA257–264 (mittlere Reihe) oder beiden Viren, die zusammen gemischt wurden (untere Reihe), immunisiert wurden, mit RMA-S-Zielzellen (linke Spalte), RMA-S-Zellen, die mit dem Peptid VSV 52–59 gepulst wurden (mittlere Spalte), oder RMA-S-Zellen, die mit dem Peptid OVA 257–264 gepulst wurden (rechte Spalte), inkubiert wurden.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von immunogenen chimären Proteinen, umfassend ein Signalsequenzpeptid des endoplasmatischen Retikulums (ER) und mindestens ein anderes Peptid. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bezieht sich „Signalsequenzpeptid“ auf Aminosäuresequenzen von etwa 15 bis etwa 25 Aminosäuren Länge, von denen auf dem Fachgebiet bekannt ist, dass sie im Allgemeinen am Aminoterminus der Proteine gelegen sind, und die zum Hinführen der Proteine zum endoplasmatischen Retikulum in der Lage sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das verwendete Signalsequenzpeptid vom Adenovirus Typ 5, E3/19 K-Genprodukt abgeleitet (Persson, H. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6349–6353 (1980)) und ist als SEQ ID NO: 1 gezeigt.

**Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val  
Cys Ser Ala**

[0019] Dennoch würden Fachleute leicht anerkennen, dass viele andere Signalsequenzpeptide bekannt sind (van Heijne, G., J. Mol. Biol. 184:99–105 (1985)) und dass diese Peptidsequenzen oder Analoge davon im immunogenen chimären Protein der vorliegenden Erfindung für die SEQ ID NO: 1 substituiert werden können.

[0020] Mit „anderes Peptid“, wie im Verlauf der Beschreibung und der Ansprüche verwendet, wird angezeigt, dass ein Peptid immunogen ist, wenn es als Teil eines immunogenen chimären Proteins, das ein ER-Signalsequenzpeptid enthält, verwendet wird; das „andere Peptid“ kann aber muss nicht selbst immunogen sein. In einer Ausführungsform kann das andere Peptid im Bereich von etwa 5 bis etwa 1000 Aminosäuren Länge sein und kann von einer Tumorzelle, einem Virus, Bakterien oder einem Parasiten abgeleitet sein, oder es kann mit einer Autoimmunerkrankung assoziiert sein.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das andere Peptid etwa 8 bis 10 Aminosäuren lang. Beispiele von solchen Peptiden schließen Tumorpeptide wie das Adenovirus E1A-Peptid (Kast et al. Cell, 59:603–614 (1989)), gezeigt als SEQ ID NO: 2

**Ser Gly Pro Ser Asn Thr Pro Pro Glu Ile;**

das SV40 T-Antigenpeptid (Gould et al. J. Virol., 65:5401–5409 (1991)), gezeigt als SEQ ID NO: 3

**Ser Glu Phe Leu Leu Glu Lys Arg Ile;**

und virale Peptide wie das Epstein Barr-Virus-Antigenpeptid (Burrows, S. R. et al. Eur J. Immunol. 22:191–195 (1992)), gezeigt als SEQ ID NO: 4

**Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Ile;**

und das Influenzavirus A/PR/8/34 Nucleoprotein-Peptid NP 147–153 (Rotzscke, O. et al. Nature 348:252–254 (1990)), gezeigt als SEQ ID NO: 5

**Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val**

ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0022]** Das beispielhafte Tumorpeptid ist P1A, abgeleitet von P815-Mastocytom-Zellen (Lethé, B., Eur J. Immunol., 22:2283–2288 (1992)). Die P1A-Sequenz ist als SEQ ID NO: 6 gezeigt

**Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe.**

**[0023]** In der vorliegenden Erfindung kann die Reihenfolge, in der das Signalsequenzpeptid und das andere Peptid im immunogenen chimären Protein angeordnet sind, variiert werden. In einer Ausführungsform geht das andere Peptid dem Signalsequenzpeptid voran oder ist aminoterminal davon. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Signalsequenzpeptid aminoterminal vom anderen Peptid. Unabhängig von der Reihenfolge, in der sie angeordnet sind, können das Signalsequenzpeptid und das andere Peptid durch null bis etwa 1000 Aminosäuren getrennt sein. In einer bevorzugten Ausführungsform sind das Signalsequenzpeptid und das andere Peptid direkt benachbart zueinander, d. h. durch null Aminosäuren getrennt.

**[0024]** In noch einer Ausführungsform können mehrere Kopien des anderen Peptids in einem immunogenen chimären Protein enthalten sein. Die Zahl der Kopien des anderen Peptids kann von 2 bis zu etwa 100 reichen. Eine bevorzugte Zahl von Kopien ist von etwa 2 bis etwa 10. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Signalsequenzpeptid aminoterminal von den mehrfachen Kopien des anderen Peptids, und diese mehrfachen Kopien sind in einer kontinuierlichen, ununterbrochenen Weise angeordnet.

**[0025]** In einer weiteren Ausführungsform können einige verschiedene andere Peptide in einem immunogenen chimären Protein enthalten sein, wobei die Zahl der verschiedenen anderen Peptide von zwei bis etwa zehn reicht. In einer bevorzugten Ausführungsform geht diesen anderen Peptiden ein Signalsequenzpeptid voran, und sie sind in einer kontinuierlichen, ununterbrochenen Weise angeordnet, wobei die Reihenfolge, in der die anderen Peptide angeordnet sind, variabel ist.

**[0026]** Immunogene chimäre Proteine der vorliegenden Erfindung können als ein synthetisches Polypeptid oder als ein Protein bereitgestellt werden, das von einer Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein codiert, synthetisiert wurde.

**[0027]** In einer Ausführungsform kann ein synthetisches immunogenes chimäres Protein basierend auf den bekannten Aminosäuresequenzen des Signalsequenzpeptids und des anderen Peptids, die im immunogenen chimären Protein enthalten sein sollen, synthetisiert werden. Die Aminosäuresequenz eines bevorzugten immunogenen chimären Proteins, umfassend eine ER-Signalsequenz aminoterminal zum P1A-Tumorpeptid, ist als SEQ ID NO: 7 gezeigt:

**Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val**

**Cys Ser Ala Ala Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe**

**[0028]** Fachleuten ist bewusst, dass immunogene chimäre Proteine, die im Bereich von etwa 25 bis etwa 100 Aminosäuren Länge sind, durch automatisierte Instrumente synthetisiert werden können, die von einer Vielfalt von Herstellern verkauft werden, oder sie können maßgeschneidert bestellt und hergestellt werden.

**[0029]** In einer anderen Ausführungsform kann das immunogene chimäre Protein von Nucleinsäuresequenzen exprimiert werden, wobei solche Sequenzen DNA, cDNA, RNA oder jede Variante davon sein können, die zum Lenken der Proteinsynthese in der Lage ist. In einer Ausführungsform können Restriktionsverdau-Fragmente, die eine codierende Sequenz für ein Signalsequenzpeptid beziehungsweise das andere Peptid enthal-

ten, zusammen ligiert und in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert werden, der in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen wirkt. Solche Restriktionsverdau-Fragmente können von Clonen erhalten werden, die von prokaryontischen oder eukaryontischen Quellen isoliert wurden, die entweder das Signalsequenzpeptid oder das andere Peptid codieren.

**[0030]** Mit einem geeigneten Expressionsvektor ist ein Vektor gemeint, der zum Tragen und Exprimieren einer vollständigen Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein codiert, in der Lage ist.

**[0031]** Solche Vektoren schließen alle Vektoren ein, in die eine Nucleinsäuresequenz, wie oben beschrieben, zusammen mit jeglichen bevorzugten oder benötigten funktionellen Elementen inseriert werden kann, und wobei dann der Vektor danach in einen Wirtsorganismus transferiert und in einem solchen Organismus repliziert werden kann. Bevorzugte Vektoren sind jene, deren Restriktionsstellen gut dokumentiert sind und die die funktionellen Elemente, die für die Transkription der Nucleinsäuresequenz bevorzugt oder benötigt werden, enthalten.

**[0032]** Die „funktionellen Elemente“, wie hierin diskutiert, schließen mindestens einen Promotor, mindestens einen Operator, mindestens eine Leadersequenz, mindestens eine Determinante, mindestens ein Stopp-Codon und jegliche andere DNA-Sequenzen ein, die für eine geeignete Transkription und nachfolgende Translation der Vektor-Nucleinsäure notwendig oder bevorzugt sind. Insbesondere wird in Betracht gezogen, dass solche Vektoren mindestens einen Replikationsursprung, der durch den Wirtsorganismus erkannt wird, zusammen mit mindestens einem selektierbaren Marker und mindestens einer Promotorsequenz, die zum Initiieren der Transkription der Nucleinsäuresequenz in der Lage ist, enthalten werden.

**[0033]** Um den Clonierungsvektor der vorliegenden Erfindung zu konstruieren, sollte zusätzlich bemerkt werden, dass mehrere Kopien der Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein und seine dazugehörigen funktionellen Elemente codiert, in jeden Vektor inseriert werden können. In solch einer Ausführungsform würde der Wirtsorganismus größere Mengen pro Vektor des erwünschten immunogenen chimären Proteins produzieren. In einer ähnlichen Weise können mehrere verschiedene immunogene chimäre Proteine von einem einzelnen Vektor durch Inserieren einer Kopie (oder von Kopien) der Nucleinsäuresequenz, die jedes immunogene chimäre Protein und seine dazugehörigen funktionellen Elemente codiert, in den Vektor exprimiert werden. In noch einer anderen Ausführungsform wird ein polycistronischer Vektor, in dem mehrere immunogene chimäre Proteine (entweder mit identischer oder verschiedener Sequenz) von einem einzelnen Vektor exprimiert werden können, durch Platzieren der Expression von jedem immunogenen chimären Protein unter die Kontrolle einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) kreiert (Molla A. et al. Nature 356:255–257 (1992); Jang S. K. et al. J. of Virol. 263:1651–1660 (1989)). Die Anzahl der mehrfachen Kopien der DNA-Sequenz, die das immunogene chimäre Protein, das in den Vektor inseriert werden kann, codiert, ist nur durch die Fähigkeit des resultierenden Vektors limitiert, aufgrund seiner Größe in einen geeigneten Wirtsorganismus transferiert und darin repliziert und transkribiert zu werden.

**[0034]** Bevorzugte Expressionsvektoren sind jene, die in einer eukaryontischen Zelle wirken. Beispiele von solchen Vektoren schließen Vacciniavirus, Adenovirus oder Herpesviren ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Die am meisten bevorzugten Vektoren sind Vacciniaviren. Beispiel 1 beschreibt die Konstruktion des Vacciniavirus-Konstrukts VV-ESNP147–155, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird.

**[0035]** In noch einer anderen Ausführungsform kann ein synthetisches Oligonucleotid, das ein ER-chimäres Protein codiert, synthetisiert und in einen geeigneten Expressionsvektor subcloniert werden. Eine bevorzugte Oligonucleotidsequenz ist als SEQ ID NO: 8 gezeigt.

**ACC ACC ATG TAC ATG ATT TTA GGC TTG CTC GCC CTT GCG GCA**  
**GTC TGC AGC GCG GCC CTG CCT TAT CTA GGG TGG CTG GTC TTC**  
**TGA TAG**

**[0036]** Fachleute ist klar, dass Oligonucleotide durch automatisierte Vorrichtungen, die von einer Vielzahl von Herstellern verkauft werden, synthetisiert werden können, oder sie können maßgeschneidert bestellt und hergestellt werden.

**[0037]** Sobald eine Nucleinsäuresequenz, die ein immunogenes chimäres Protein codiert, in einem geeigneten Expressionsvektor vorhanden ist, kann der Expressionsvektor dann zu Zwecken des Exprimierens des immunogenen chimären Proteins in einem geeigneten eukaryontischen Zellsystem verwendet werden. Solche

eukaryontischen Zellsysteme schließen Zelllinien wie HeLa, 1929, T2 oder RMA-S ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Bevorzugte eukaryontische Zellsysteme sind T2 und RMA-S. Ein bevorzugtes Verfahren umfasst die Verwendung von Vacciniavirus-Konstrukten, um T2- oder RMA-S-Zelllinien zu transfizieren. Das exprimierte immunogene chimäre Protein kann durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, wie metabolisches radioaktives Markieren, nachgewiesen werden.

**[0038]** In einer weiteren Ausführungsform kann das immunogene chimäre Protein, das durch die Zellen exprimiert wird, als ein Roh-Lysat erhalten werden, oder es kann durch Standard-Proteinreinigungs-Vorgehensweisen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, gereinigt werden, was Differenzial-Präzipitation, Molekularsieb-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie, isoelektrisches Fokussieren, Gelelektrophorese, Affinitäts- und Immunaффinitäts-Chromatographie und dergleichen einschließen kann. Im Fall der Immunaффinitäts-Chromatographie kann das immunogene chimäre Protein durch Passage durch eine ein Harz enthaltende Säule, das für das immunogene chimäre Protein spezifische Antikörper, daran gebunden hat, gereinigt werden.

**[0039]** Die vorliegende Erfindung offenbart auch ein Verfahren der Immunisierung, umfassend das Verabreichen einer Menge des immunogenen chimären Proteins, die wirksam ist, um eine T-Zellantwort auf das andere Peptid hervorzurufen. Solch eine T-Zellantwort kann durch eine Vielfalt von Assays, einschließlich der <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Assays (Restifo, N. P. J of Exp. Med., 177:265–272 (1993)), gemessen werden. Die T-Zellen, die zum Produzieren einer solchen cytotoxischen Antwort in der Lage sind, können CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL<sub>8</sub>), CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder beide sein.

**[0040]** Das immunogene chimäre Protein kann in einer reinen oder im Wesentlichen reinen Form verabreicht werden, aber es wird bevorzugt, es als ein Arzneimittel, eine Formulierung oder ein Präparat zu präsentieren. Solch eine Formulierung umfasst ein immunogenes chimäres Protein zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Träger(n) und gegebenenfalls anderen therapeutischen Bestandteilen. Die Formulierungen können bequem in Einheits-Dosierungsform präsentiert werden und können durch ein Verfahren, das auf dem pharmazeutischen Fachgebiet wohlbekannt ist, hergestellt werden.

**[0041]** All die Verfahren schließen den Schritt des Assoziierens des aktiven Bestandteils mit dem Träger, der einen oder mehrere Hilfsbestandteil(e) darstellt, ein. Im Allgemeinen werden die Formulierungen durch einheitliches und enges Assoziieren des aktiven Bestandteils mit flüssigen Trägern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden und dann, wenn nötig, Formen des Produkts in die erwünschte Formulierung hergestellt.

**[0042]** Formulierungen, die für eine intravenöse, intramuskuläre, subcutane oder intraperitoneale Verabreichung geeignet sind, umfassen praktischerweise sterile wässrige Lösungen des aktiven Bestandteils mit Lösungen, die vorzugsweise isoton mit dem Blut des Empfängers sind. Solche Formulierungen können praktischerweise durch Lösen des festen aktiven Bestandteils in Wasser, das physiologisch kompatible Substanzen wie Natriumchlorid (z. B. 0,1–2,0 M), Glycin und der gleichen enthält und einen gepufferten pH-Wert aufweist, der mit physiologischen Bedingungen kompatibel ist, um eine wässrige Lösung zu produzieren, und Steril-Machen der Lösung hergestellt werden. Diese können in Einzel- oder Mehrfach-Dosis-Behältnissen, zum Beispiel versiegelten Ampullen oder Röhrrchen vorhanden sein.

**[0043]** Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Formulierungen können einen Stabilisator inkorporieren. Illustrative Stabilisatoren sind Polyethylenglycol, Proteine, Saccharide, Aminosäuren, anorganische Säuren und organische Säuren, die entweder alleine oder als Zusätze verwendet werden können. Diese Stabilisatoren werden vorzugsweise in einer Menge von 0,11–10000 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil Antikörper inkorporiert. Wenn zwei oder mehrere Stabilisatoren in wässrigen Lösungen in der/dem geeigneten Konzentration und pH-Wert verwendet werden. Der spezifische osmotische Druck einer solchen wässrigen Lösung ist im Allgemeinen im Bereich von 0,1–3,0 Osmosen, vorzugsweise im Bereich von 0,80–1,2. Der pH-Wert der wässrigen Lösung wird so eingestellt, dass er im Bereich von 5,0–9,0, vorzugsweise im Bereich von 6–8 ist. Beim Formulieren des immunogenen chimären Proteins der vorliegenden Erfindung kann ein Anti-Adsorptionsmittel verwendet werden.

**[0044]** Zusätzliche pharmazeutische Verfahren können angewendet werden, um die Dauer der Wirkung zu kontrollieren. Präparate mit kontrollierter Freisetzung können durch die Verwendung von Polymer, um die Proteine oder ihre Derivate zu komplexieren oder zu absorbieren, erreicht werden. Die kontrollierte Abgabe kann durch Auswählen von geeigneten Makromolekülen (zum Beispiel Polyester, Polyaminsäuren, Polyvinylpyrrolidon, Ethylvinylacetat, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose oder Protaminsulfat) und der Konzentration der Makromoleküle sowie der Verfahren der Inkorporation, um die Freisetzung zu kontrollieren, ausgeführt



werden. Ein anderes mögliches Verfahren, um die Dauer der Wirkung durch Präparate mit kontrollierter Freisetzung zu kontrollieren, ist es, die Proteine, Proteinanaloge oder ihre funktionellen Derivate in Partikel aus einem polymeren Material wie Polyester, Polyaminsäuren, Hydrogelen, Poly-(Milchsäure) oder Ethylenvinylacetat-Copolymeren zu inkorporieren.

**[0045]** Alternativ ist es anstelle des Inkorporierens dieser Mittel in Polymerpartikel möglich, diese Materialien in Mikrokapseln einzuschließen, die zum Beispiel durch Koazervierungstechniken oder durch Grenzflächen-Polymerisation hergestellt werden, zum Beispiel Hydroxymethylcellulose oder Gelatin-Mikrokapseln beziehungsweise Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, oder in kolloidalen Arzneistoff-Abgabesystemen, zum Beispiel Liposomen, Albumin-Mikrosphären, Mikroemulsionen, Nanopartikel und Nanokapseln oder in Makroemulsionen.

**[0046]** Wenn orale Präparate erwünscht sind, können die Zusammensetzungen mit typischen Trägern wie Lactose, Saccharose, Stärke, Talkum-Magnesiumstearat, kristalliner Cellulose, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Glycerin, Natriumalginat oder Gummi arabicum unter anderen kombiniert werden.

**[0047]** Das Verfahren der Immunisierung kann das Verabreichen einer Nucleinsäuresequenz umfassen, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese des immunogenen chimären Proteins in einer Menge, die wirksam ist, um eine T-Zellantwort hervorzurufen, in der Lage ist. Eine solche Nucleinsäuresequenz kann in einen geeigneten Expressionsvektor durch Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, inseriert werden ([Fig. 1](#)). Expressionsvektoren, die für das Produzieren eines hochwirksamen Gentransfers in vivo geeignet sind, schließen retrovirale, adenovirale und Vaccinia-virale Vektoren ein. Funktionelle Elemente eines solchen Expressionsvektors werden früher in der vorliegenden Beschreibung offenbart und sind einem Fachmann bekannt. Ein bevorzugter Vektor ist Vacciniavirus. Ein Expressionsvektor, der eine Nucleinsäuresequenz enthält, die zum Lenken der Wirtszell-Synthese des immunogenen chimären Proteins in der Lage ist, kann in einer reinen oder im Wesentlichen reinen Form oder als ein Komplex mit einer Substanz, die eine Affinität für eine Nucleinsäure aufweist, und einem internalisierenden Faktor, der an die Substanz gebunden ist, die die Affinität für die Nucleinsäure aufweist, verabreicht werden. (Wu G. et al. *J. Biol. Chem* 262:4429–4432 (1987); Wagner E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3655–3659 (1990)). Eine bevorzugte Substanz, die eine Affinität für eine Nucleinsäure aufweist, ist ein Polykation wie Polylysin. Internalisierende Faktoren schließen Liganden ein, die eine Spezifität für Rezeptoren haben, die auf der Oberfläche von Immunogenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Lymphocyten, B-Zellen, dendritischen Zellen oder Langerhans-Zellen vorhanden sind. Bevorzugte internalisierende Faktoren schließen Transferrin und Antikörper, die spezifisch für Immunogenpräsentierende Zellen sind, ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0048]** Expressionsvektoren, die eine Nucleinsäuresequenz enthalten, die ein immunogenes chimäres Protein codiert, können intravenös, intramuskulär, subcutan, intraperitoneal oder oral verabreicht werden. Ein bevorzugter Verabreichungsweg ist intravenös.

**[0049]** Die immunogenen chimären Proteine und Expressionsvektoren, die eine Nucleinsäuresequenz enthalten, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese von immunogenen chimären Proteinen in der Lage ist, können in der Form eines Kits, alleine oder in der Form eines Arzneimittels, wie vorstehend beschrieben, bereitgestellt werden.

**[0050]** Hierin ist weiterhin ein Impfstoff zum Immunisieren eines Säugers gegen Krebs, eine virale Infektion, bakterielle Infektion, parasitäre Infektion oder Autoimmunerkrankung beschrieben, umfassend ein immunogenes chimäres Protein oder einen Expressionsvektor, der eine Nucleinsäuresequenz enthält, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese des immunogenen chimären Proteins in der Lage ist, in einem pharmazeutisch verträglichen Träger. In einer alternativen Ausführungsform können mehrere Expressionsvektoren, jeder enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese von anderen immunogenen chimären Proteinen in der Lage ist, als ein polyvalenter Impfstoff verabreicht werden.

**[0051]** Die Impfung kann durch konventionelle Verfahren durchgeführt werden. Zum Beispiel kann ein immunogenes chimäres Protein in einem geeigneten Verdünnungsmittel wie Kochsalzlösung oder Wasser oder kompletten oder inkompletten Adjuvanzen verwendet werden. Weiterhin kann das immunogene chimäre Protein an einen Träger gebunden sein oder nicht, um das Protein immunogener zu machen. Beispiele von solchen Trägermolekülen schließen Rinderserumalbumin (BSA), Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH), Tetanustoxoid und dergleichen ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Das immunogene chimäre Protein kann auf jedem Weg verabreicht werden, der zum Hervorrufen einer T-Zellantwort geeignet ist, wie intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subcutan und dergleichen. Das immunogene chimäre Protein kann einmal oder in periodischen

Intervallen verabreicht werden, bis eine T-Zellantwort hervorgerufen wird. Dosen des immunogenen chimären Proteins, die wirksam sind, um eine T-Zellantwort hervorzurufen, reichen von etwa 0,00001 bis etwa 10 mg/kg. Dosen des immunogenes chimäres Protein-codierenden Expressionsvektors, die wirksam sind, um eine T-Zellantwort hervorzurufen, reichen von etwa  $10^5$  bis etwa  $10^7$  Plaquebildende Einheiten. Die T-Zellantwort kann durch eine Vielfalt von Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, nachgewiesen werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf Cytotoxizitäts-Assay, Proliferations-Assay und Cytokin-Freisetzungs-Assays.

**[0052]** Die vorliegende Erfindung schließt auch die Verwendung eines immunogenen chimären Proteins oder eines Expressionsvektors, der eine Nucleinsäuresequenz enthält, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese eines immunogenen chimären Proteins in der Lage ist, in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder Autoimmunerkrankung ein. Wie bei Impfstoffen können auch wieder mehrere Expressionsvektoren gleichzeitig verabreicht werden. Wenn therapeutisch bereitgestellt, wird das immunogene chimäre Protein oder der immunogenes chimäres Protein-codierende Expressionsvektor zum (oder kurz nach dem) Beginn der Infektion oder beim Beginn eines Symptoms der Infektion oder der Krankheit, die/das durch Krebs, Virus, Bakterien, Parasiten oder eine Autoimmunerkrankung verursacht wird, geliefert. Die therapeutische Verabreichung des immunogenen chimären Proteins oder des immunogenes chimäres Protein-codierenden Expressionsvektors dient dazu, die Infektion oder Krankheit abzuschwächen.

**[0053]** Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung eines Vacciniavirus, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, die ein immunogenes chimäres Protein codiert, an einen Säuger in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments. Da bereits gezeigt worden ist, dass Vacciniavirus-Vektoren, die zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese des immunogenen chimären Proteins, enthaltend ein Tumorpeptid oder virales Peptid, in der Lage sind, T-Zellantworten gegen diese Peptide hervorrufen (siehe Beispiele 2–5), ist ihre Brauchbarkeit im Behandeln einer Krankheit angezeigt.

**[0054]** Hierin ist weiterhin ein Verfahren zum Behandeln von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung beschrieben, umfassend:

- (a) Immunisieren von Säugern mit einer Menge des immunogenen chimären Proteins oder eines Expressionsvektors, der zum Lenken der Wirtsorganismus-Synthese des immunogenen chimären Proteins in der Lage ist, die wirksam ist, um eine spezifische T-Zellantwort hervorzurufen;
- (b) Isolieren der T-Zellen vom immunisierten Säuger; und
- (c) Verabreichen der T-Zellen an den immunisierten Säuger oder an einen nicht-immunisierten Säuger in einer therapeutisch wirksamen Menge.

**[0055]** T-Zellpopulationen, die gegen das andere Peptid (z. B. Tumorpeptid) reaktiv sind, das in einem immunogenen chimären Protein enthalten ist, können etwa 3 bis etwa 30 Tage nach der Immunisierung von einer peripheren Blutprobe oder Milzzellen eines Spenders isoliert werden, der mit dem immunogenen chimären Protein immunisiert wurde. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann verwendet werden, um menschliche Lymphocyten zu immortalisieren, oder ein menschlicher Fusionspartner kann verwendet werden, um Mensch-Mensch-Hybridome zu produzieren. Eine primäre in vitro-Immunisierung mit dem immunogenen chimären Protein kann auch in der Herstellung von T-Zellen verwendet werden, die reaktiv auf das immunogene Peptid sind.

**[0056]** Die T-Zellen werden für etwa 7 bis etwa 90 Tage gezüchtet (Yanelli, J. R. J. Immunol. Methods 139:1–16 (1991)) und dann gescreent, um unter Verwendung von bekannten Verfahren des Testens der T-Zell-Reaktivität die Clone mit der erwünschten Reaktivität gegen das andere Peptid, das im immunogenen chimären Protein enthalten ist, zu bestimmen; T-Zellen, die die erwünschte Reaktivität produzieren, werden so ausgewählt.

**[0057]** Die vorstehend beschriebenen T-Zellen können für eine in vivo-Verwendung als Behandlung für Individuen, die von Krebs, einer viralen Infektion, bakteriellen Infektion, parasitären Infektion oder einer Autoimmunerkrankung betroffen sind, durch intravenöses, intraperitoneales, intramuskuläres oder subcutanes Verabreichen von etwa  $10^7$  bis etwa  $10^{11}$  T-Zellen an einen Säuger verwendet werden. Bevorzugte Wege der Verabreichung sind intravenös oder intraperitoneal.

**[0058]** Die folgenden Beispiele erläutern verschiedenen Aspekte der Erfindung, aber sollen in keiner Weise den Schutzbereich davon einschränken.

## MATERIAL UND VERFAHREN

**[0059]** Die Materialien und Verfahren, die in den folgenden Beispielen verwendet werden, waren wie folgt: Verfahren: Die Vacciniavirus (VV)-Konstrukte, die in den folgenden Beispielen verwendet wurden, sind wie folgt: VV-NP codiert das Volllängen-Nucleoprotein (NP)-Gen des Influenzavirus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (Yewdell, J. W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:1785–1789 (1985)); VV-NP 147–155 codiert die neun Aminosäuren-„Minimaldeterminante“ des NP-Gens (Röttschke, O. et al Nature 348:252–254 (1990)); VV-ES NP147–155 verwendet die neun Aminosäuren lange „Minimaldeterminante“ des NP-Gens von PR8, aber es geht ihm die ER-Signalsequenz des Adenovirus Typ 5 E3/19K voraus; VV-NP147–155 ES, in dem die ER-Signalsequenz stromabwärts der Minimaldeterminante platziert ist; VV-ES OVA 257–264, das aus derselben ER-Signalsequenz besteht, aber gefolgt von der Minimaldeterminante von Ovalbumin; VV-ES VSV 52–59, das aus derselben ER-Signalsequenz besteht, aber gefolgt von der Minimaldeterminante des Nucleoprotein-Gens des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) (Van Bleek et al Nature 348:213–215 (1990) und VV-ESP1A, das aus derselben ER-Signalsequenz besteht, aber gefolgt vom P1A-Tumorantigen (Lethé, B., EwJ. Immunol., 22:2283–2288 (1992)). Die Konstruktion der Vacciniavirus-Konstrukte, die NP, ES NP147–155 und NP147–155 codieren, sind beschrieben worden (Yewdell, J. W. et al (1985); Eisenlohr, L. C. et al (1992); und Wei M. L. et al (1992)). VV-ES OVA 257–264 wurde konstruiert, wie für VV-ES NP147–155 beschrieben, mit der Ausnahme, dass ein doppelsträngiges synthetisches Oligonucleotid, das dem OVA 257–264-Peptid entspricht (Carbone, F. R. et al. J. Exp. Med. 169:603–610 (1989)), unmittelbar stromabwärts der Nucleotide in das Plasmid inseriert wurde, die die E3/19K-Leadersequenz mit einem zusätzlichen Ala-Codon codieren. Um VV-NP147–155 ES zu konstruieren, wurde ein doppelsträngiges Oligonucleotid, entsprechend der E3/19K-ER-Signalsequenz, die modifiziert wurde, um eine NdeI-Stelle an ihrem 5'-codierenden Ende und ein doppeltes Stopp-Codon am 3'-codierenden Ende zu codieren, in die Sall- und NotI-Stellen des modifizierten pSC11 inseriert (Eisenlohr et al (1992)). Dieses dazwischenliegende Plasmid (pSC11-ES) wurde dann mit Sall und NdeI verdaut und mit einem doppelsträngigen Oligonucleotid ligiert, das die geeigneten Überhänge, ein initiiertes Met und Reste, die dem NP 147–155 entsprechen, codiert. VV-ES VSV 52–59 und VV-ESP1A wurden dem Protokoll folgend, wie im Beispiel 1 dargestellt, konstruiert. Fremde Gene wurden in das VV-Thymidinkinase (TK)-Gen durch homologe Rekombination in CV-1-Zellen inseriert (Chakrabarti, S. et al Mol. Cell-Biol. 5:3403–3409 (1985)), und wurden nach 3 Runden von 3 Plaque-Reinigungen in der menschlichen TK<sup>-</sup> 143B-Osteosarkom-Zelllinie (American Type Culture Collection oder ATCC) in der Anwesenheit von Bromdesoxyuridin in denselben Zellen gezüchtet. VV-NP wurde unter Verwendung eines Plasmids, dem das  $\beta$ -Galactosidase-Reportergen fehlt (verwendet, um rVVs (rekombinante Vacciniaviren) mit den Plasmid-Insertionen nach der homologen Rekombination zu identifizieren) produziert.

<sup>51</sup>Cr-FREISETZUNGS-ASSAY AUF T-ZELLAKTIVITÄT

**[0060]** Acht bis 10 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse wurden intravenös (i. v.) mit  $5 \times 10^6$  Plaque-bildenden Einheiten (PFU) rVVs injiziert. Sechs Tage später wurden die Milzen entfernt und in Iscove-modifiziertem DMEM (IDMEM)-Medium mit 7,5% fötalem bovinem Serum (FBS) (Biofluids, Rockville, MD) unter Verwendung eines Dounce-Homogenisierers zu Einzelzell-Suspensionen dispergiert. Die Zielzellen, die verwendet wurden, um auf die Cytotoxizität der Splenocyten-T-Zellen zu testen, waren P815-Masotcytom-Zellen (American Type Culture Collection oder ATCC), CT26-Fibrosarkom-Zellen oder RMA-S-Tumorzellen (Ljunggren, H. G. et al. J. Exp. Med. 162:1745–1759 (1985)). Die Zielzellen wurden durch Co-Inkubieren der Zielzellen für 1 h bei 37°C mit Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> und mit 1  $\mu$ M der Peptide, die in den geeigneten Beispielen angezeigt sind, für die Lyse durch Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sensibilisiert. Die HPLC-gereinigten Peptide NP 147–155, OVA 257–264, VSV 52–59 und P1A wurden vom Biological Resources Branch, NIAID, Bethesda, MD, zur Verfügung gestellt. In den Beispielen 2–4 wurden P815-Zellen bei einer Multiplizität von 10 PFU/Zelle mit Wildtyp-VV für eine Stunde vor dem Markieren mit Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (<sup>51</sup>Cr) für eine Stunde bei 37°C (Restifo, N. P. (1993)) infiziert. Zielzellen (entweder gepulst mit dem geeigneten Peptid oder infiziert mit Vacciniavirus) wurden für 6 Stunden bei 37°C mit Splenocyten in verschiedenen Effektor: Ziel-Verhältnissen (E:T) inkubiert (siehe Beispiele für spezifische Verhältnisse). Die Menge des freigesetzten <sup>51</sup>Cr wurde durch Gamma-Zählen bestimmt, und der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet: [(experimentelle cpm – spontane cpm)/(maximale cpm – spontane cpm)]  $\times$  100.

## BEISPIEL 1

Konstruktion eines Vacciniavirus-Konstrukts, das verwendet wird, um ein immunogenes chimäres Protein zu exprimieren

**[0061]** Das Plasmid pSC11 (ein Geschenk von Dr. Bernard Moss, NIAID, Bethesda, Maryland), gezeigt in

**Fig. 1**, war das Ausgangsmaterial für die Konstruktion eines Plasmids, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, die ein immunogenes chimäres Protein codiert, das durch homologe Rekombination in Vacciniavirus inseriert werden kann (Chakrabarti et al., 1985). Dieses Beispiel beschreibt ein Protokoll für die Produktion eines Plasmids, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, die das immunogene chimäre Protein ESNP147–155 codiert, aber dieses Protokoll könnte leicht verwendet werden, um Plasmide zu produzieren, die andere immunogene chimäre Proteine codieren. Komplementäre Oligonucleotide, gezeigt als SEQ ID NO: 9

**AGT CGA CGA TCG CGG CCG CT**

und SEQ ID NO: 10

**AGC GGC CGC GAT CGT CGA CT**

wurden synthetisiert (Surgery Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD), kinasiert und zusammen angelagert, um einen doppelsträngigen DNA-Polylinker zu bilden, der Sall- und NotI-Restriktionsstellen enthält. Diese Polylinker-DNA wurde dann in Smal-verdautes pSC11 durch Ligierung stumpfer Enden inseriert, um ein pSC11-Plasmid mit einem Sall- und NotI-Polylinker-Plasmid zu bilden (pSC11-Linkerplasmid). Komplementäre Oligonucleotide, gezeigt als SEQ ID NO: 11

**TCG ACC ACC ATG AGG TAC ATG ATT TTA GGC TTG CTC  
GCC CTT GCG GCA GTC TGC AGC GCG GCC GCC GCC AA**

und SEQ ID NO: 12

**GGC CTT GGC GGC CGC CGC GCT GCA GAC TGC CGC AAG  
GGC GAG CAA GCC TAA AAT CAT GTA CCT CAT GGT GG**

wurden synthetisiert, kinasiert und zusammen angelagert, um eine doppelsträngige DNA zu bilden, die die adenovirale E3/19K-Signalsequenz plus NotI- und Styl-Restriktionsstellen codiert. Diese E3/19K-Signalsequenz-DNA wurde dann in das vorher erwähnte pSC11-Linkerplasmid sub-cloniert, das mit Sall und NotI gespalten wurde, um ein Plasmid, bezeichnet E3/19K-Signalplasmid, zu bilden. Komplementäre Oligonucleotide, gezeigt als SEQ ID NO: 13

**GGC CAC GTA CCA GCG GAC GCG GGC CCT GGT GTG ATA  
GGT ACC**

und SEQ ID NO: 14

**CTT GGG TAC CTA TCA CAC CAG GGC CCG CGT CCG CTG  
GTA CGT**

wurden synthetisiert, kinasiert und zusammen angelagert, um eine doppelsträngige DNA-Sequenz zu bilden, die das NP147–155-Peptid plus doppelte Stopp-Codons und NotI- und Styl-Restriktionsstellen codiert. Die NP147–155-DNA wurde dann in das E3/19K-Signalsequenz sub-cloniert, das mit NotI und Sall gespalten wurde. Das resultierende Plasmid codierte ESNP147–155 und wurde in das Vacciniavirus inseriert, wie beschrieben, um das Vacciniavirus-Konstrukt VV-ESNP147–155 zu produzieren.

## BEISPIEL 2

Wirksamkeit des Vacciniavirus-Konstrukts VV-ES NP 147–155 in der Herstellung einer T-Zellantwort

**[0062]** Um die Idee zu testen, dass die Wirksamkeit der Antigen-Präsentation durch die Verwendung eines immunogenen chimären Proteins, umfassend ein Peptid, dem eine ER-Signalsequenz vorangeht, optimiert werden könnte, wurden  $5 \times 10^6$  Plaquebildende Einheiten (pfu) von einem der vorstehend beschriebenen Vacciniavirus-Konstrukte: VV-NP, VV-ES NP 147–155, VV-NP 147–155 ES oder VV-ES OVA 257–264 intravenös an Mäuse verabreicht.

**[0063]** Sechs Tage nach der intravenösen Injektion wurden die Mäuse getötet und ihre Milzen wurden geerntet. Die Splenocyten wurden in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Assay auf die Cytotoxizität gegen P815-Zielzellen alleine (linke Felder), P815-Zellen, die mit einem synthetischen Peptid, das den NP (Influenzavirus-Nucleoprotein)-Aminosäureresten 147–155 entspricht, gepulst wurden (mittleres Feld), oder P815-Zellen, die mit Vacci-

niavirus infiziert wurden (rechtes Feld), getestet. Die Splenocyten (d. h. die Effektorzellen), die von den immunisierten Mäusen abgeleitet wurden, wurden bei variierenden Verhältnissen, wie auf der horizontalen (x) Achse von [Fig. 2](#) angezeigt, mit einer konstanten Zahl von P815-Zielzellen inkubiert. Die Cytotoxizität der Splenocyten gegen die  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Zielzellen wurde als die spezifische  $\%^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung gemessen, wie auf der y-Achse gezeigt. Wie erwartet zeigten alle getesteten Vacciniavirus-Konstrukte eine ähnliche Fähigkeit, eine  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort gegen Vacciniavirus-infizierte P815-Zellen hervorzurufen (rechtes Feld), und eine ähnliche Unfähigkeit, eine  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort gegen nicht-infizierte P815-Kontrollzellen hervorzurufen (linkes Feld). Dennoch zeigten nur Splenocyten, die von Mäusen stammten, die mit VV-ES NP147–155 immunisiert wurden, eine NP-spezifische Aktivität (mittleres Feld), wie durch ihre Fähigkeit gezeigt, P815-Zielzellen zu lysieren, die mit einem synthetischen Peptid, das den NP-Resten 147–155 entspricht, vorinkubiert wurden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass nur Splenocyten, die von Mäusen stammten, die mit VV-ES NP 147–155 immunisiert wurden, spezifisch Influenzavirus-infizierte P815-Zellen lysieren (Daten nicht gezeigt), in Spiegeln, die ungefähr ähnlich zu jenen waren, die mit dem Peptid NP 147–155-gepulsten P815-Zellen beobachtet wurden (mittleres Feld, [Fig. 2](#)). Darüber hinaus wies die Unfähigkeit der Splenocyten, die von Mäusen stammen, die mit VV-ES OVA 257–264 immunisiert wurden, Peptid NP 147–155-gepulste Zellen spezifisch zu lysieren (mittleres Feld), darauf hin, dass die verstärkte Immunogenität von VV-ES NP147–155 keinen nicht-spezifischen Wirkungen der E3/19K-Signalsequenz zugeschrieben werden kann. Schließlich wies der große Unterschied zwischen der cytotoxischen Aktivität der Splenocyten, die von Mäusen, die mit entweder VV-ES NP147–155 oder VV-NP147–155 ES gegen Peptid NP 147–155-gepulste P815-Zellen (mittleres Feld) immunisiert wurden, stammen, darauf hin, dass die E3/19K-Signalsequenz nicht alleine durch Erhöhen der Hydrophobie des Peptids wirkte.

### BEISPIEL 3

Kinetik der Antwort von Splenocyten, die von Mäusen stammen, die mit Vacciniavirus-Konstrukten immunisiert wurden

**[0064]** Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass die offensichtlich verstärkte Immunogenität von VV-ES NP147–155 im Vergleich zu anderen VV-Konstrukten aufgrund eines Unterschieds in der Kinetik der  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort vorliegt, wurden Mäuse mit  $5 \times 10^6$  pfu VV-ES NP147–155 ([Fig. 3A](#)) oder VV-NP ([Fig. 3B](#)) injiziert und ihre Splenocyten auf eine NP-spezifische  $\text{CD8}^+$  T-Zellaktivität zwischen 1 und 19 Tage später ([Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#)) unter Verwendung von Peptid-gepulsten P815 (Peptid NP147–155)-Zielzellen getestet. Das verwendete Effektor zu Ziel-Verhältnis war 200:1. Eine NP-Peptid-spezifische Peak-Aktivität (d. h. P815-Zellen, die mit NP147–155-Peptid gepulst wurden, bezeichnet durch offene Dreiecke) wurde mit Splenocyten, die von Mäusen zwischen 5 und 9 Tage nach der Immunisierung mit VV-ES NP147–155 erhalten wurden, beobachtet. Diese NP-spezifische Aktivität war parallel zur VV-spezifischen Peak-Aktivität (geschlossene Kreise, P815-Zellen, die mit Vacciniavirus infiziert wurden). Splenocyten von VV-NP-immunisierten Mäusen zeigten eine vernachlässigbare NP-spezifische lytische Aktivität über den gesamten Verlauf des Experiments. Dieses Ergebnis beruhte nicht auf der Unfähigkeit dieses Vacciniavirus-Konstrukts, eine  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort hervorzurufen, da eine VV-spezifische Antwort von ähnlicher Größe zu jener, die durch VV-ES NP147–155 hervorgerufen wurde, beobachtet wurde.

### BEISPIEL 4

$\text{CD8}^+$  T-Zellantwort, die in Mäusen, die mit variierenden Dosen von Vacciniavirus-Konstrukten immunisiert wurden, hervorgerufen wurde

**[0065]** Die primäre  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort von Mäusen auf steigende Dosen von VV-Konstrukten wurde verglichen ([Fig. 4](#); die gegebenen Dosen werden durch die Symbole am unteren Ende der Figur angezeigt) (die oberen Felder verwenden P815-Zielzellen, die mit dem Peptid NP147–155 gepulst wurden, und die unteren Felder verwenden P815-Zielzellen, die mit Vacciniavirus infiziert wurden). Die Mäuse wurden getötet und ihre Milzen wurden sechs Tage nach der Immunisierung geerntet. Die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Assays zeigen, dass während die Mäuse keine signifikante NP-spezifische Antwort nach der Injektion mit  $5 \times 10^6$  pfu von VV-NP zeigten (linke Felder), die Immunisierung mit  $5 \times 10^4$  pfu von VV-ES NP147–155 (rechte Felder) eine leicht nachweisbare NP-spezifische  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort induzierte. Die getesteten Effektor zu Ziel-Verhältnisse sind am unteren Ende der Figur gezeigt. Daher ist VV-ES NP147–155 mindestens 100-fach wirksamer im Induzieren einer primären NP-spezifischen  $\text{CD8}^+$  Zellantwort als das andere VV-Konstrukt. Die Anti-VV  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort (untere Felder, P815-Zielzellen, die mit Vacciniavirus infiziert wurden) wurde bei jeder Dosis des getesteten konstruierten Vacciniavirus untersucht. Die Ergebnisse, die in den unteren Feldern gezeigt sind, bestätigten, dass alle VV-Konstrukte in der Lage waren, vergleichbare Antworten zu induzieren und dass daher

die Unterschiede in der Immunogenität mit den Resten, die die NP-Determinante flankieren (d. h. der ES-Signalsequenz) in Beziehung stehen.

**[0066]** beobachtet für das virale Peptid NP147–155 in [Fig. 2](#), wurden  $5 \times 10^6$  pfu von entweder VV-ESP1A, VV-P1A oder VV-ESNP an Mäuse verabreicht. Sechs Tage nach der intravenösen Injektion wurden die Milzen geerntet, und die Splenocyten wurden mit dem P1A-Peptid durch intravenöse Injektion für sechs Tage kultiviert und wurden dann in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay auf die Cytotoxizität gegen CT26-Tumorzellen (linkes Feld), CT26-Zellen, die mit dem P1A-Peptid gepulst wurden (mittleres Feld), oder P815-Zellen (rechtes Feld) getestet. Die Quelle der Effektor-Splenocyten wird am unteren Ende der [Fig. 5](#) angezeigt, und der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay wurde in einem Effektor- zu Ziel-Verhältnis von 200:1, gefolgt von zweifachen Reihenverdünnungen durchgeführt. Wie erwartet konnte keines der drei getesteten VV-Konstrukte, eine  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort gegen die CT26-Zielzellen (linkes Feld) hervorrufen. Zusätzlich zeigten Splenocyten, die von Mäusen, die mit VV-ESP1A immunisiert wurden, abgeleitet wurden, eine viel größere P1A-spezifische Aktivität als jene, die für Splenocyten beobachtet wurde, die von Mäusen abstammten, die mit VV-P1A immunisiert wurden (mittlere gegenüber rechte Felder). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Verwendung von ER-chimären Proteinen, umfassend eine ER-Signalsequenz aminoterminal zu einem immunogenen Peptid, von allgemeiner Nützlichkeit im Verstärken der Antigen-Präsentation jenes Peptids sein kann, das durch die Interaktion mit Klasse I-MHC-Molekülen verarbeitet wird.

#### BEISPIEL 6

Sekundäre NP-spezifische Antwort von Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die entweder mit VV-ES NP147–155 oder VV-NP immunisiert wurden

**[0067]** Um festzustellen, ob das „ES“-Konstrukt (VV-ES NP147–155) sekundäre Antworten von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wirksamer primt als dies VV-NP tat, wurden Mäuse mit entweder VV-ES NP 147–155 (Kreise) oder VV-NP (Dreiecke) in den folgenden Dosierungen (in pfu) immunisiert:  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ . Den Mäusen wurde dann erlaubt, für dreißig Tage eine „Gedächtnis“-Antwort zu erzeugen, zu welcher Zeit die Mäuse getötet wurden und die Splenocyten entfernt und in vitro für 7 Tage mit Influenzavirus stimuliert wurden. Die sekundär stimulierten Splenocyten-Populationen wurden dann bei verschiedenen Verdünnungen (von links nach rechts in jedem Feld: 1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 und 1:243) gegen P815-Zellen, die mit dem Peptid NP 147–155 gepulst wurden, in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei den niedrigeren getesteten Dosen einen geringen Unterschied zwischen der Fähigkeit der zwei VV-Konstrukte gab, sekundäre NP-Peptid-spezifische Antworten zu primen (ein gewisses Primen wurde mit nur 500 pfu beobachtet). Dennoch resultierte das Primen mit VV-ES NP147–155 bei Dosen von  $5 \times 10^4$  pfu oder mehr in der Gewinnung von Splenocyten, die ungefähr 10-mal aktiver waren als Splenocyten von VV-NP-geprimten Mäusen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Zufügen einer Signalsequenz zu der minimalen antigenen Determinante oder dem Peptid sowohl die sekundären als auch primären NP-spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellantworten verstärkt.

#### BEISPIEL 7

Verabreichung von mehr als einem rekombinanten Vacciniavirus-Konstrukt in einer einzelnen Dosis ruft eine T-Zellantwort hervor, die spezifisch für jedes Konstrukt ist

**[0068]** Um zu bestimmen, ob zwei verschiedenen Vacciniavirus-Konstrukte eine  $\text{CD8}^+$  Zellantwort hervorrufen könnten, wenn sie gleichzeitig verabreicht werden, wurden Mäuse intravenös mit  $2 \times 10^6$  pfu von VV-ES VSV52–59 alleine (obere Felder),  $5 \times 10^6$  pfu von VV-ES OVA257–264 alleine (mittlere Felder) oder  $2 \times 10^6$  pfu von jedem Konstrukt zusammen (untere Felder) injiziert, und ihre Milzzellen wurden isoliert. Sechs Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet, und ihre Milzen wurden geerntet. Die Splenocyten wurden dann in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay ([Fig. 7](#)) auf ihre Fähigkeit getestet, RMA-S-Kontrollzellen (linke Spalten), RMA-S-Zellen, die mit dem Peptid VSV52–59 gepulst wurden (mittlere Spalte), oder RMA-S-Zellen, die mit dem Peptid OVA257–264 gepulst wurden (rechte Spalten), zu lysieren.

**[0069]** Die Assays wurden unter Verwendung eines 50:1 E: T-Verhältnisses (am weitesten rechts gelegener Punkt in jedem Feld), gefolgt von nachfolgenden 2-fachen Verdünnungen (d. h. 100:1, 200:1 usw.) durchgeführt. Wie erwartet lysierten keine der getesteten Splenocyten RMA-S-Kontrollzellen (linke Felder), während Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die mit VV-ES OVA257–264 immunisiert wurden, spezifisch RNA-s-Zellen, die mit dem Peptid OVA257–264 gepulst wurden (mittlere Reihe, rechtes Feld), lysierten, und Splenocyten, die von Mäusen abgeleitet wurden, die mit VV-ES VSV52–59 immunisiert wurden, lysierten spezifisch RNA-S-Zellen, die mit dem Peptid VSV52–59 gepulst wurden (obere Reihe, mittleres Feld). Zusätzlich

zeigten Splenocyten, die von Mäusen stammten, die mit sowohl VV-ES OVA257–264 als auch VV-ES VSV52–59 immunisiert wurden, sowohl VSV-spezifische Lyse (untere Reihe, mittleres Feld) als auch OVA-spezifische Lyse (untere Reihe, rechtes Feld) in Spiegeln, die mit jenen vergleichbar waren, die für Splenocyten beobachtet wurden, die von Mäusen stammten, die mit entweder VV-ES VSV52–59 (obere Reihe, mittleres Feld) oder VV-ESOVA 257–264 immunisiert wurden (mittlere Reihe, rechtes Feld). So zeigten diese Ergebnisse, dass mehr als ein Vacciniavirus-Konstrukt ohne jeglichen Verlust in ihrer Fähigkeit, spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten auf jedes Konstrukt zu stimulieren, zusammen verabreicht werden konnte.

## BEISPIEL 8

## Impfstoff gegen eine Infektion durch P815-Tumorzellen

**[0070]** Immunogene chimäre Proteine oder Vacciniavirus-Konstrukte, die immunogene chimäre Proteine codieren, können verwendet werden, um Krebs, eine infektiöse Krankheit oder Autoimmunkrankheit sowohl in Menschen als auch Tieren zu verhindern. Zum Beispiel wird weiblichen DBA/2-Mäusen  $10^4$ – $10^8$  pfu von Vacciniavirus VV-ES P1A oder 0,1 µg bis 1,0 mg des entsprechenden ER-chimären Peptids intravenös gegeben. Drei Tage bis sechs Monate nach der Immunisierung (um die Entstehung einer Immunantwort zu ermöglichen) werden die Mäuse intravenös oder intraperitoneal oder subcutan mit  $10^2$  bis  $10^6$  P815-Tumorzellen herausgefordert. Die Mäuse werden dann, startend unmittelbar nach der Verabreichung der P815-Herausforderungsdosis auf eine Tumorentwicklung entweder durch Messung des subcutanen Tumors oder durch Tod der Maus oder durch Überwachen der Mäuse auf Lungen- und/oder Leber- und/oder Milz-Metastasen durch visuelle und mikroskopische Betrachtung überwacht.

## BEISPIEL 9

## Verfahren der Behandlung für Säuger, die den Tumor P815 haben

**[0071]** Immunogene chimäre Proteine oder Vacciniavirus-Konstrukte, die immunogene chimäre Proteine codieren, können im Behandeln von Säugern, die Krebs, eine infektiöse Krankheit oder eine Autoimmunerkrankung haben, wirksam sein. Zum Beispiel werden weiblichen DBA-2-Mäusen  $10^2$ – $10^6$  P815-Tumorzellen intravenös, intraperitoneal oder subcutan gegeben. Nachdem ein bis 21 Tag(e) vergangen sind, um dem Tumor zu erlauben, sich zu etablieren, wird den Mäusen  $10^4$  bis  $10^8$  pfu Vacciniavirus VV-ES P1A oder 0,1 µg bis 1,0 mg des entsprechenden ER-chimären Proteins gegeben. Die Mäuse werden dann auf ein Abnehmen der Tumorgöße oder auf ein gänzlich Verschwinden des Tumors entweder durch Tod der Maus oder durch Überwachen der Lungen- und/oder Leber- und/oder Milz-Metastasen durch visuelle oder mikroskopische Betrachtung überwacht.

## BEISPIEL 10

## Behandlung von Säugern, die einen P815-Tumor haben, durch adoptive Immuntherapie

**[0072]**  $10^4$ – $10^8$  pfu des Vacciniavirus VV-ESP1A oder 0,1 µg bis 0,1 mg des entsprechenden immunogenen chimären Proteins werden intravenös an weibliche DBA/2-Mäuse gegeben. Von etwa 3 Tage bis sechs Monate nach der Immunisierung (um die Entstehung einer Immunantwort zu ermöglichen) wird die Milz oder der Tumor der Maus geerntet, und die Lymphocyten, die in der Milz oder dem Tumor enthalten sind, werden unter Verwendung von Dounce-Homogenisierern isoliert. Diese Lymphocyten werden dann zu  $10^7$ – $10^{11}$  Zellen intravenös oder intraperitoneal an eine Maus verabreicht, die einen P815-induzierten Tumor aufweist. Die Behandlung kann in Mäusen ein bis 21 Tage nach der Induktion eines P815-Tumors durch intravenöses, intraperitoneales oder subcutanes Verabreichen von  $10^2$  bis  $10^6$  P815-Tumorzellen an Mäuse erfolgen. Die behandelten Mäuse werden dann auf ein Abnehmen der Tumorgöße oder auf ein völliges Verschwinden des Tumors entweder durch Tod der Maus oder durch Überwachen der Lungen- und/oder Leber- und/oder Milz-Metastasen durch visuelle oder mikroskopische Betrachtung überwacht.

SEQUENZPROTOKOLL

**(1) Allgemeine Information:**

(i) Anmelder:

(A) Name: The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services

(B) Straße: National Institute of Health, Office of Technology Transfer, Box OTT

(C) Stadt: Bethesda

(D) Bundesstaat: Maryland

(E) Land: Vereinigte Staaten von Amerika

(F) Postleitzahl: 20892

(ii) Titel der Erfindung: Chimäre Immunogene, umfassend Nucleinsäuresequenzen, die Signalsequenzpeptide des endoplasmatischen Retikulums und mindestens ein anderes Peptid codieren, deren Verwendung in Impfstoffen und zur Behandlung von Krankheiten

(iii) Anzahl der Sequenzen: 14

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Morgan & Finnegan

(B) Straße: 345 Park Avenue

(C) Stadt: New York

(D) Land: U.S.A.

(E) Postleitzahl: 10154

(v) Computerlesbare Form:

(A) Mediumtyp: Diskette

(B) Computer: IBM PC-kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: Word Perfect 5.1

(vi) Daten zur vorliegenden Anmeldung:

(A) Anmeldenummer:

(B) Anmeldedatum: 17. März 1994



(vii) Daten zu der früheren Anmeldung:

(A) Anmeldenummer: US 08/032,902

(B) Anmeldedatum: 17. März 1993

(viii) Informationen zum Anwalt/Agenten:

(A) Name: William S. Feiler

(B) Registrierungsnummer: 26,728

(C) Referenz-/Vorgangs-Nr.: 2026-4069 PCT

(ix) Information zur Fernmeldeverbindung:

(A) Telefon: 212-758-4800

(B) Telefax: 212-751-6849

(C) Telex: 421792

**(2) Information zur SEQ ID NO: 1:**

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 17 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(C) Strangaufbau: unbekannt

(D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:1:

Met	Arg	Tyr	Met	Ile	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Val
1				5					10				
Cys	Ser	Ala											
15													

**(2) Information zur SEQ ID NO: 2:**

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 10 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(C) Strangaufbau: unbekannt

(D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:2:

Ser Gly Pro Ser Asn Thr Pro Pro Glu Ile  
1 5 10

**(2) Information zur SEQ ID NO: 3:**

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 9 Aminosäurereste
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) Strangaufbau: unbekannt
  - (D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:3:

Ser Glu Phe Leu Leu Glu Lys Arg Ile  
1 5

**(2) Information zur SEQ ID NO: 4:**

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 9 Aminosäurereste
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) Strangaufbau: unbekannt
  - (D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:4:

Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Ile  
1 5

**(2) Information zur SEQ ID NO: 5:**

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 9 Aminosäurereste
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) Strangaufbau: unbekannt
  - (D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:5:

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val  
 1 5

**(2) Information zur SEQ ID NO: 6:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 9 Aminosäurereste
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) Strangaufbau: unbekannt
  - (D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:6:

Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe  
 1 5

**(2) Information zur SEQ ID NO: 7:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 27 Aminosäurereste
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) Strangaufbau: unbekannt
  - (D) Topologie: unbekannt

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:7:

Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val  
 1 5 10  
 Cys Ser Ala Ala Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe  
 15 20 25

**(2) Information zur SEQ ID NO: 8:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 90 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:8:

ACCACCATGT ACATGATTTT AGGCTTGCTC GCCCTTGCGG	40
CAGTCTGCAG CGCGGCCCTG CCTTATCTAG GGTGGCTGGT	80
CTTCTGATAG	90

**(2) Information zur SEQ ID NO: 9:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 20 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:9:

AGTCGACGAT CGCGGCCGCT 20

**(2) Information zur SEQ ID NO: 10:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 20 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:10:

AGCGGCCGCG ATCGTCGACT 20

**(2) Information zur SEQ ID NO: 11:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 71 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:11:

TCGACCACCA TGAGGTACAT GATTTTAGGC TTGCTCGCCC	40
TTGCGGCAGT CTGCAGCGCG GCCGCCGCCA A	71

**(2) Information zur SEQ ID NO: 12:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 71 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:12:

GGCCTTGGCG GCCGCCGCGC TGCAGACTGC CGCAAGGGCG	40
AGCAAGCCTA AAATCATGTA CCTCATGGTG G	71

**(2) Information zur SEQ ID NO: 13:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 42 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:13:

GGCCACGTAC CAGCGGACGC GGGCCCTGGT GTGATAGGTA	40
CC	42

**(2) Information zur SEQ ID NO: 14:**

- (i) Sequenzmerkmale:
  - (A) Länge: 42 Basenpaare
  - (B) Typ: Nucleinsäure
  - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
  - (D) Topologie: linear

## (xi) Sequenzbeschreibung für SEQ ID NO:14:

<b>CTTGGGTACC TATCACACCA GGGCCCGCGT CCGCTGGTAC</b>	<b>40</b>
<b>GT</b>	<b>42</b>

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Bereitstellung von Säuger-T-Zellen, die eine Antwort auf ein Tumorpeptid, virales Peptid, Peptid einer Autoimmunerkrankung, bakterielles Peptid oder Parasitenpeptid zeigen, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Züchten von T-Zellen, die von einem Spender isoliert wurden, bei dem eine T-Zellantwort auf das Tumorpeptid, das virale Peptid, das Peptid einer Autoimmunerkrankung, das bakterielle Peptid oder Parasitenpeptid hervorgebracht worden ist, unter Verwendung eines chimären Proteins, das ein Signalsequenzpeptid für das endoplasmatische Retikulum und mindestens ein anderes Peptid umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Tumorpeptiden, viralen Peptiden, bakteriellen Peptiden, Parasitenpeptiden und Peptiden einer Autoimmunerkrankung; und
- (b) Bereitstellen der gezüchteten T-Zellen.

2. Verfahren zum Erhalt von Säuger-T-Zellen, die eine Antwort auf ein Tumorpeptid, virales Peptid, Peptid einer Autoimmunerkrankung, bakterielles Peptid oder Parasitenpeptid zeigen, wobei das Verfahren das Sensibilisieren isolierter Säuger-T-Zellen mit Zielzellen umfasst, wobei

- (a) die Zielzellen einem chimären Protein ausgesetzt worden sind, das ein Signalsequenzpeptid für das endoplasmatische Retikulum und mindestens ein anderes Peptid umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Tumorpeptiden, viralen Peptiden, bakteriellen Peptiden, Parasitenpeptiden und Peptiden von Autoimmunerkrankungen, und
- (b) die Zielzellen in einer Menge vorhanden sind, die wirksam ist, um eine T-Zellantwort gegen das andere Peptid hervorzubringen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das andere Peptid ein Tumorpeptid ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Tumorpeptid die Sequenz von SEQ ID NO: 6 aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das andere Peptid ein bakterielles Peptid ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das andere Peptid ein Parasitenpeptid ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das andere Peptid ein Peptid einer Autoimmunerkrankung ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das andere Peptid ein virales Peptid ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das virale Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 und der vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das virale Peptid die Sequenz von SEQ ID NO: 4 aufweist.

11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das virale Peptid die vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59 ist.

12. T-Zellen hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die T-Zellen eine erhöhte peptidspezifische Reaktivität gegenüber dem anderen Peptid aufweisen, die mindestens dreimal größer ist als die Grundreaktivität von T-Zellen, die nur dem anderen Peptid ausgesetzt sind in Abwesenheit eines Signalsequenzpeptids für das endoplasmatische Retikulum, wobei die Reaktivität in einem <sup>51</sup>Cr-Cytotoxizitäts-Freisetzung-Assay gemessen wird bei einem Effektor: Zielzell-Verhältnis von mindestens 50:1 unter Verwendung von Zielzellen, die mit dem anderen Peptid gepulst sind.

13. Verwendung der T-Zellen nach Anspruch 12 in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, viralen Infektionen, bakteriellen Infektionen, parasitären Infektionen und Autoimmunerkrankungen eines Säugers.

14. Verwendung der T-Zellen nach Anspruch 12 in einer therapeutisch wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, viralen Infektionen, bakteriellen Infektionen, parasitären Infektionen oder Autoimmunerkrankungen eines Säugers, wobei die T-Zellen von einem Säuger isoliert wurden, der mit einem immunogenen chimären Protein immunisiert ist, und wobei das immunogene chimäre Protein

(a) ein Signalsequenzpeptid für das endoplasmatische Retikulum und mindestens ein anderes Peptid umfasst; und

(b) eine T-Zellantwort gegenüber dem anderen Peptid in dem immunisierten Säuger hervorbringt.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das immunogene chimäre Protein in injizierbarer Form vorliegt.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei das Signalsequenzpeptid für das endoplasmatische Retikulum die Sequenz von SEQ ID NO: 1 aufweist.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das andere Peptid ein Tumorpeptid ist.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei das Tumorpeptid die Sequenz von SEQ ID NO: 6 aufweist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das andere Peptid ein bakterielles Peptid ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das andere Peptid ein Parasitenpeptid ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das andere Peptid ein Peptid einer Autoimmunerkrankung ist.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das andere Peptid ein virales Peptid ist.

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das virale Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 und der vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei das virale Peptid die Sequenz von SEQ ID NO: 4 aufweist.

25. Verwendung nach Anspruch 23, wobei das virale Peptid die vesikuläre Stomatitisvirus-Nucleoprotein-Minimaldeterminante 52–59 ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

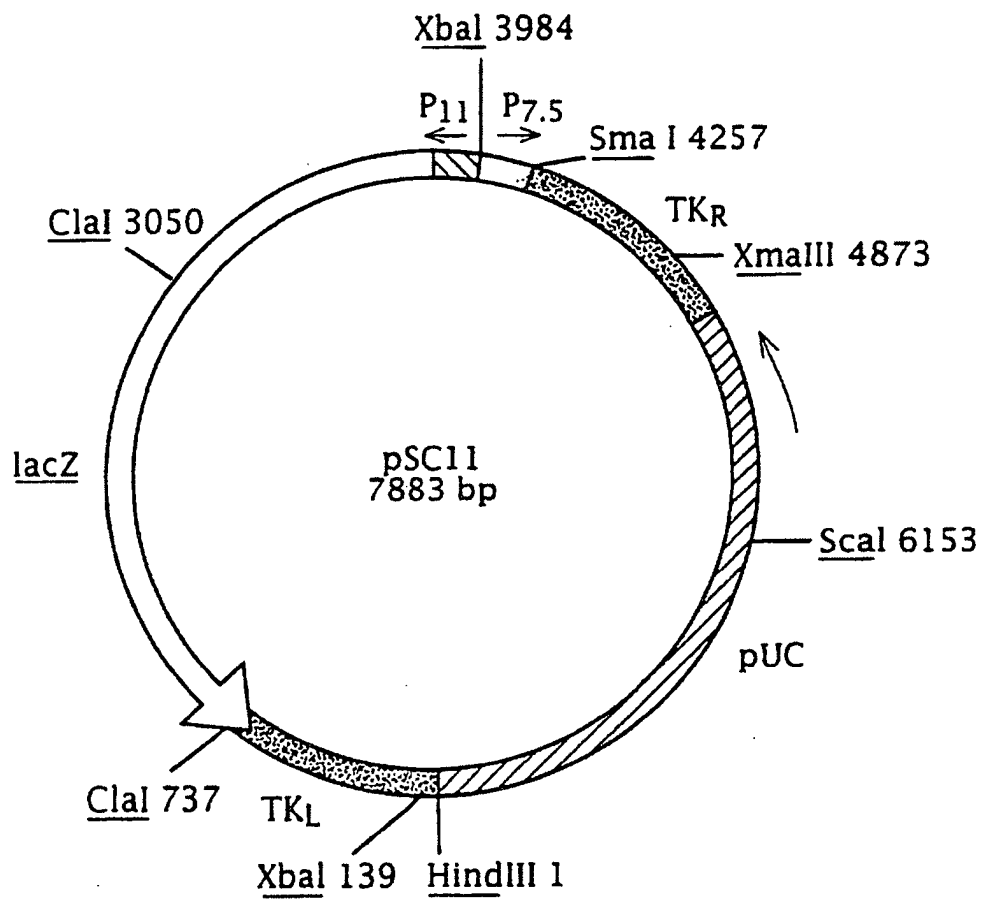
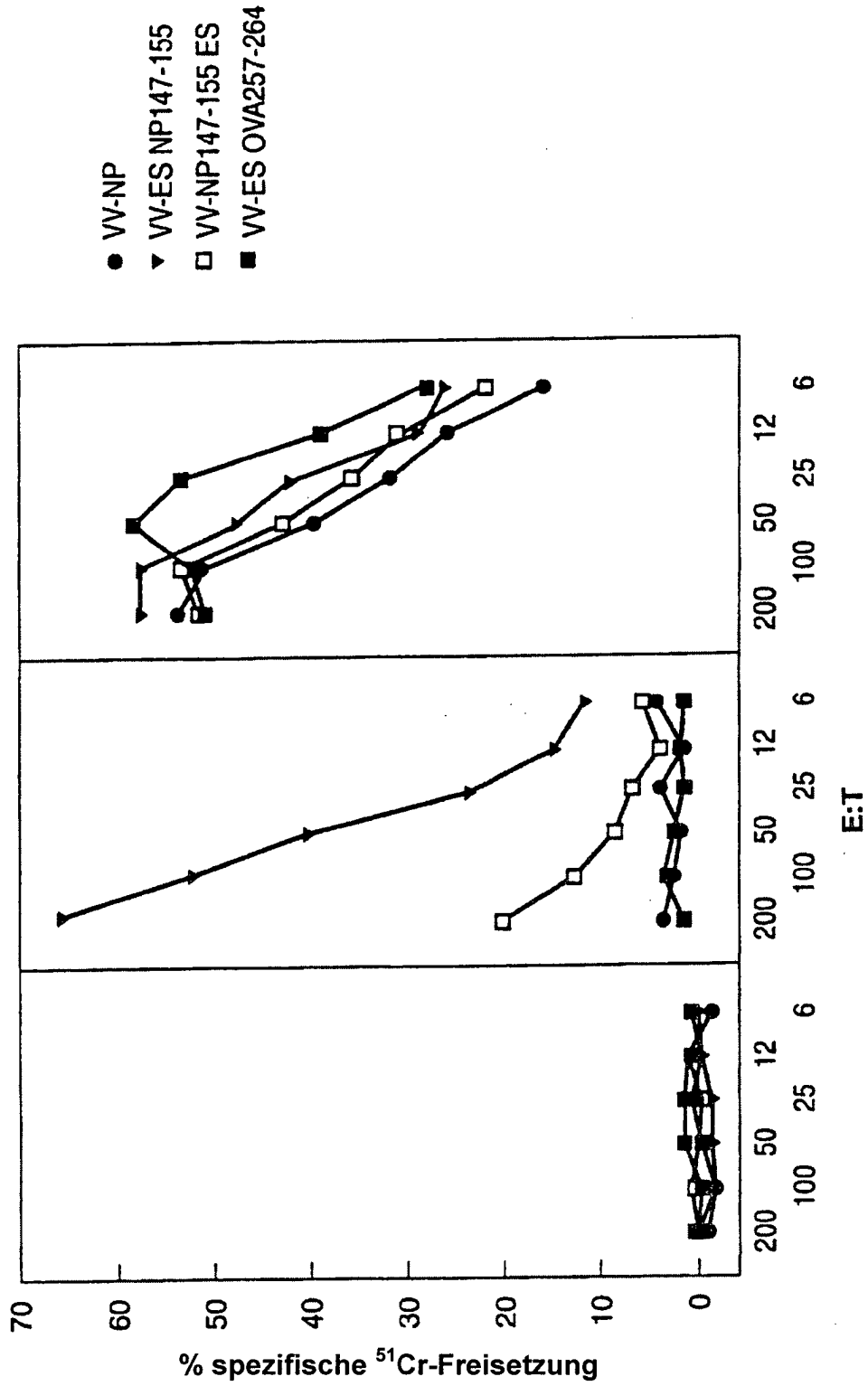
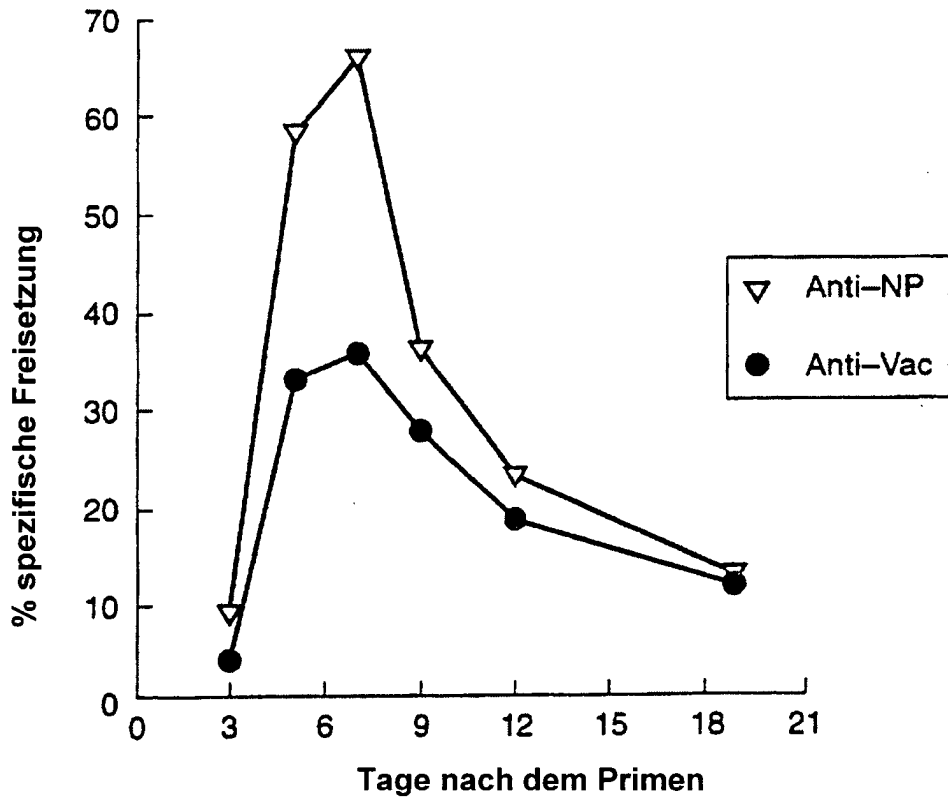




FIG. 2



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

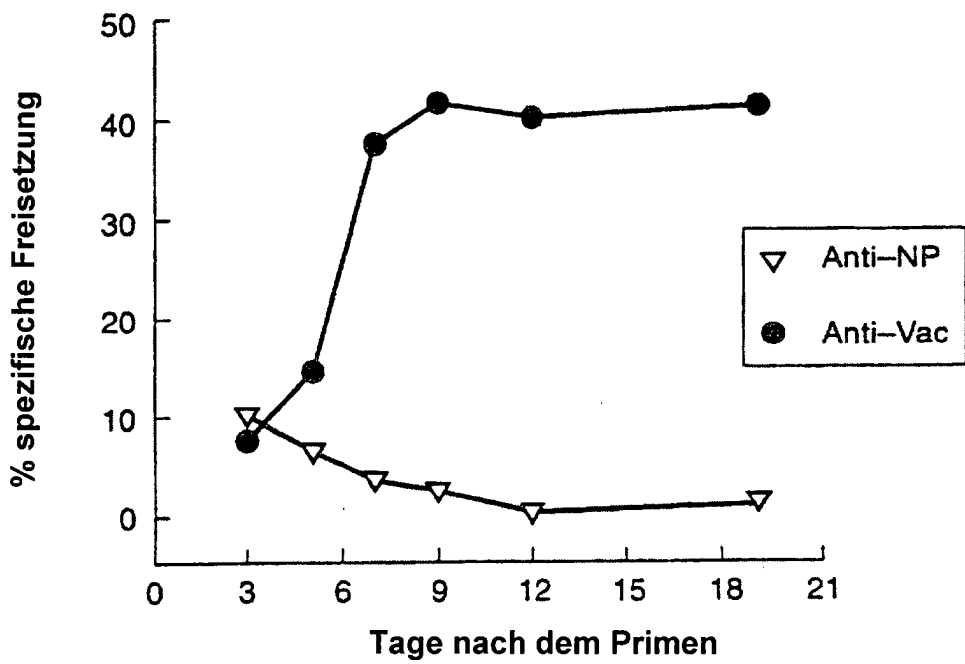


FIG. 4

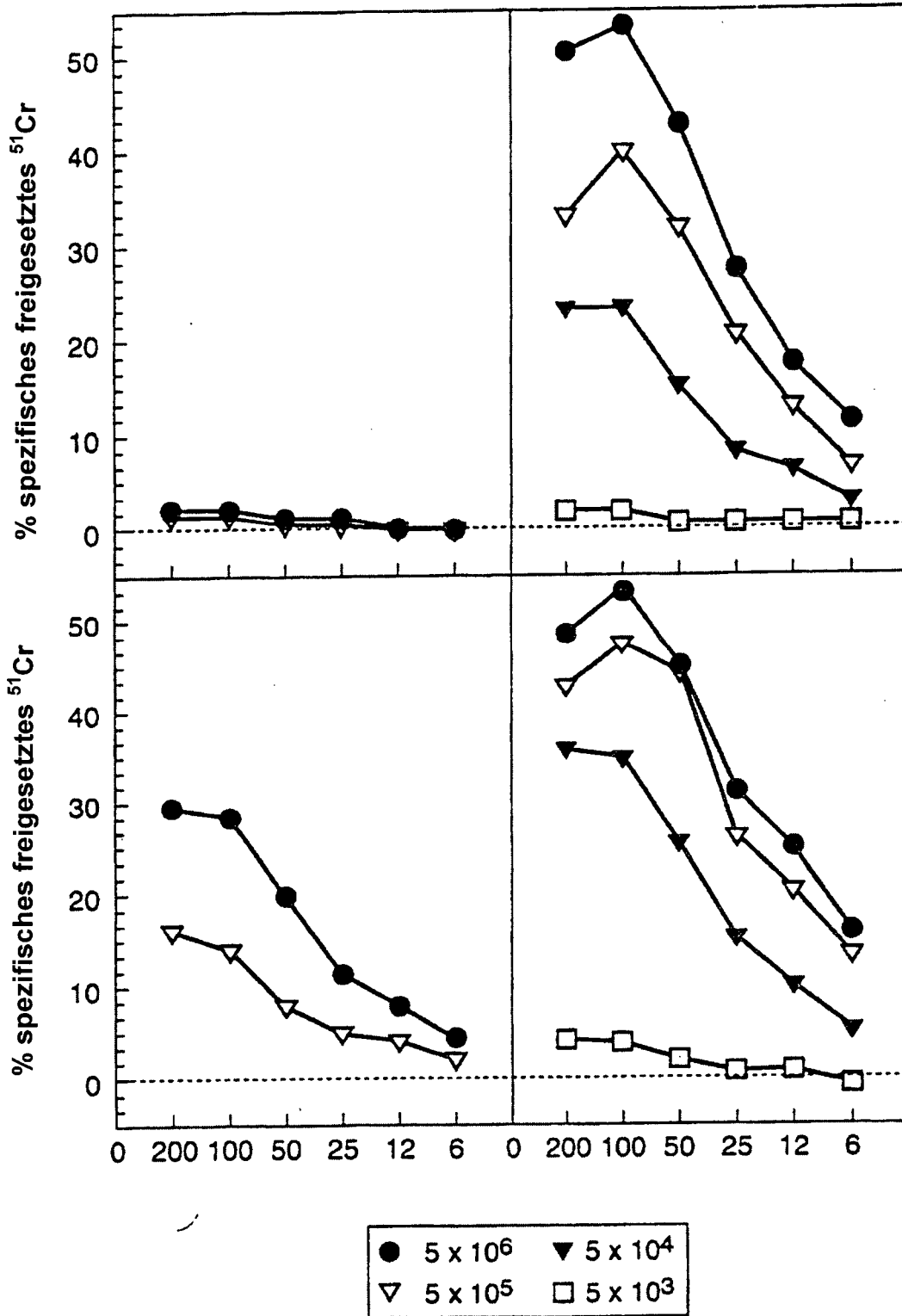
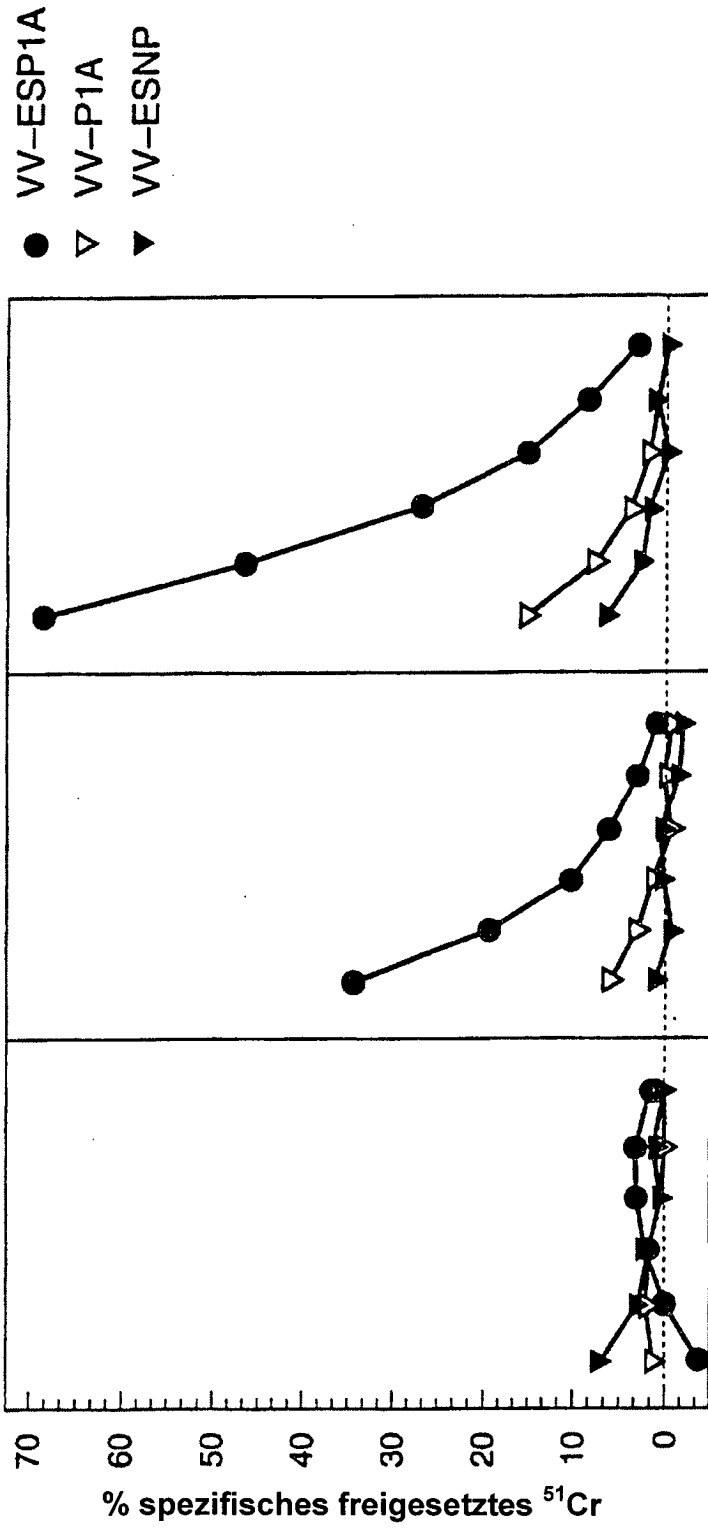
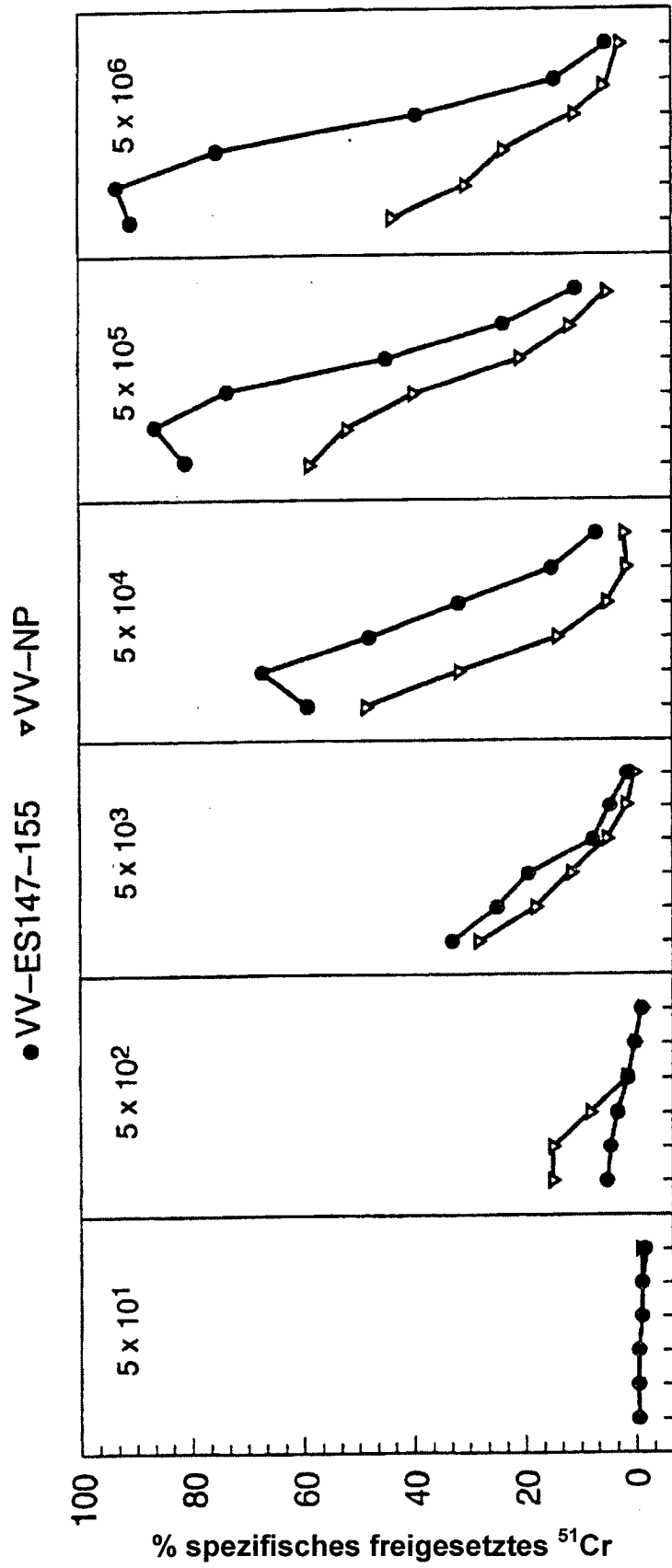


FIG. 5



E : T - Verhältnis (200:1, dann 2-fache Verdünnung)

**FIG. 6**



Log<sub>3</sub> - Verdünnung der sekundären Kultur

(1:1, 1:3, 1:9 1:27, 1:81, 1:243)

**FIG. 7**

