



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2005 028 271 A1 2006.12.28

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2005 028 271.7

(22) Anmeldetag: 14.06.2005

(43) Offenlegungstag: 28.12.2006

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/005 (2006.01)

(71) Anmelder:
 Ruhr-Universität Bochum, 44801 Bochum, DE

(74) Vertreter:
 Rothkopf Theobald Elbel, Patentanwälte,
 Partnerschaft, 10117 Berlin

(72) Erfinder:
 Überla, Klaus, Prof. Dr., 45529 Hattingen, DE;
 Kuate, Seraphin. Dr., 44803 Bochum, DE;
 Grunwald, Thomas, Dr., 44892 Bochum, DE

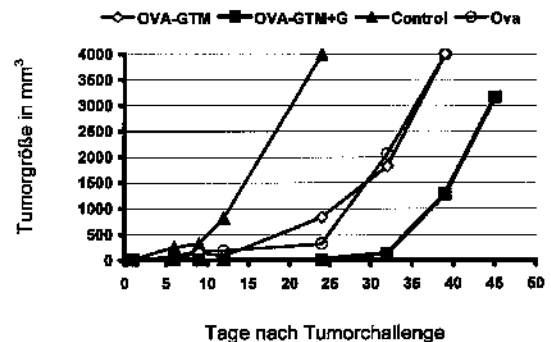
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
 MILLER, D.K., FEUER, B.I., [u.a.]: Reconstituted
 G Protein-Lipid vesicles from Vesicular Stomatitis
 Virus and their inhibition of VSV infection, 1980,
 In: J. Cell. Biology, Vol. 84, S. 421-429;
 BEMBRIDGE, G.P., RODRIGUEZ, N., [u.a.]: DNA
 encoding the attachment (G) or fusion (F) protein
 of Respiratory Syncytial Virus induces protection
 in the absence of pulmonary inflammation, 2000,
 In: Journal of General Virology, Vol. 81, S. 2519-
 2523;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Proteingemisch enthaltend VSV-G zur Verstärkung der Immunantwort**

(57) Zusammenfassung: Verwendung eines gereinigten Proteingemisches, umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und eines membranständigen Antigens, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen sowie ein gereinigtes Proteingemisch und einen Impfstoff.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines gereinigten Proteingemisches umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und eines membranständigen Antigens, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen. Ferner betrifft die Erfindung ein Proteingemisch und einen Impfstoff.

Stand der Technik

Hintergrund der Erfindung

Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)

[0002] VSV gehört zur Gruppe der Rhabdoviren, dessen Oberfläche mit Glycoproteinen (G-Protein) besetzt ist. Diese VSV-G-Proteine erlauben den Eintritt des Virus in ein breites Spektrum an Wirtszellen. Auf Grund des breiten Wirtszelltropismus wird VSV-G häufig zur Pseudotypisierung von Gentransfer-Vektoren auf der Basis umhüllter Viren verwendet. Antigen-Determinanten der VSV-G-Proteine sind Zielstruktur neutralisierender Antikörper gegen VSV.

Respiratory Syncytial Virus

[0003] Jeder Mensch einer Industrienation erkrankt, unabhängig vom Alter, im Durchschnitt rund sechsmal pro Jahr an einer Atemwegsinfektion. Patienten mit Atemwegsinfektionen stellen damit die größte Krankheitsgruppe dar. Mittlerweile werden mit molekularbiologischen Methoden die häufigsten Infektionserreger für die Atemwegserkrankungen identifiziert. Ganz oben auf der Liste der Infektionserreger steht das Respiratory Syncytial Virus (RSV), das je nach Studie in 10% bis 20% der untersuchten Proben nachgewiesen werden kann. RSV infiziert vor allem Kinder und zwar meist im ersten Lebensjahr. Mehr als 1 % aller Kinder müssen aufgrund einer RSV-Infektion stationär behandelt werden. In Deutschland müssen jährlich 7.500 Kinder mit einer schweren RSV-Infektion hospitalisiert werden. Zudem kommt, dass fortgeschrittene Atemwegsinfektionen im Kindesalter eine Behandlung mit Überwachung oder Gabe von Sauerstoff bis hin zur maschinellen Beatmung bedürfen. Die einzige Behandlungsmöglichkeit nach einer RSV-Infektion ist im Moment die Gabe von Synagis® (Palivizumab), einem humanisierten monoklonalen Antikörper, oder Ribavirin (Taylor et al., (1991) *Lancet* 337:1411–1412; Hall et al., (1983) *JAMA* 249:2666–2670; Groothuis et al., (1993) *N. Engl. J. Med.* 329:1524–1530). Ein RSV-Impfstoff ist derzeit noch nicht verfügbar.

[0004] In den 1960er Jahren wurden in einer

Impf-Studie in den USA ein Formalin-inaktiviertes RSV bei Kindern als Impfstoff getestet. Die RSV-Exposition der geimpften Probanden führte jedoch zu einer häufigeren Erkrankung und einem schweren Krankheitsverlauf mit einer größeren Inzidenz für eine stationäre Behandlung als bei der nicht immunisierten Kontrollgruppe (Kim et al., (1969) *Am. J. Epidemiol.* 89:422–434). Für diesen Effekt der Krankheitsverstärkung nach Immunisierung wurden verschiedene, auf tierexperimentelle Daten beruhende Hypothesen aufgestellt. So soll eine überschüssende TH₂-Immunantwort für den krankheitsverstärkenden Effekt verantwortlich sein (Hussell et al., (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* 2:410–414). Die Übertragung von Antikörpern und CD4+ T-Zellen immunisierter Mäuse in syngene nicht-immunisierte Mäuse führte in den Empfänger-Mäusen zu einer schwereren RSV-Infektion (Openshaw et al., (2001) *Vaccine* 20 Suppl 1:S27–S31). Auch das Komplement scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, da in C3-Knock-out-Mäusen die Immunisierung nicht zu einer Verschlimmerung der RSV-Infektion führt (Polack et al., (2002) *J. Exp. Med.* 196:859–865).

[0005] Ähnlich dem Formalin-inaktivierten RSV führt auch die Immunisierung mit dem F- oder G-Protein von RSV zu einer Krankheitsverstärkung. Trotzdem ist das RSV-F, das bei beiden RSV-Serotypen stark konserviert ist, das Hauptantigen für die RSV-Vakzinentwicklung (Pemberton et al., (1987) *J. Gen. Virol.* 68:2177–2182). Bisher sind lediglich vektor- bzw. DNA-basierte Impfansätze bekannt. Beispielsweise vermittelt im Maus-Tiermodell die Immunisierung mit einem rekombinanten Vaccina Virus oder einem Plasmid, das RSV-F exprimiert, Schutz vor einer RSV-Erkrankung (Bembridge et al., (2000) *J. Gen. Virol.* 81:2519–2523; Li et al., (1998) *J. Exp. Med.* 188:681–688). Diese Impfverfahren scheinen jedoch für eine breite Anwendung beim Menschen ungeeignet, weil die DNA-Immunisierung körperfremde, potenziell vermehrungsfähige Nukleinsäuren in den menschlichen Körper einführt, deren weiteres Schicksal im Körper völlig unklar ist. Diese Risiken sprechen gegen eine generelle Schutzimpfung bei Kindern. Zudem fehlen klinische Erfahrungen zur Verträglichkeit.

Weiterer Stand der Technik

[0006] Charan und Kollegen untersuchten das serologische Verhältnis zwischen zwei verschiedenen VSV Stämmen. Im ELISA Test, für den VSV-G Protein als ein Antigen verwendet wurde, war die Kreuzreaktivität der beiden Virusstämme asymmetrisch in Abhängigkeit von dem Verabreichungsweg der Immunisierung mit VSV (Charan et al., (1987) *J. Virol.* 61(8):2509–2514).

[0007] In einem weiteren Ansatz wurde ein Gemisch aus VSV Phospholipiden und Glycolipiden isoliert.

Diese Protein-Lipid-Gemisch war in der Lage, spezifische anti-G Antikörper hervorzurufen, welche die Infektiosität von VSV neutralisierten. Das VSV-G Protein wurde jedoch nicht zur Erzeugung einer Immunantwort gegen ein anderes Antigen verwendet (Miller et al., (1980) J. Cell Biology 84:421-429).

[0008] Außerdem wurden verschiedene Formen von VSV (infektiös, UV inaktiviert, Formalin inaktiviert) verwendet, um die Immunantwort in vivo zu untersuchen, wobei festgestellt wurde, dass die neutralisierende IgM Antwort gegenüber VSV in Mäusen weitestgehend T-Zell unabhängig, die IgG Antwort aber T-Zell abhängig ist (Freer et al., (1994) J. Virol. 68(6):3650-3655).

[0009] In der EP Patentanmeldung 03 028 826.0 der Erfinder ist die Verwendung eines virus like particles (VLP) beschrieben, das von verschiedenen viralen Komponenten abgeleitet ist und mindestens ein heterologes Protein aufweist. Das VLP ist vollständig replikationsdefizient, so dass es für einen Impfstoff geeignet ist. Allerdings nennt diese Patentanmeldung keine im Zytoplasma des Wirtes replizierenden Viren, sondern basiert auf dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), das einen komplexen Replikationszyklus im Kern der Wirtszelle durchläuft.

Aufgabenstellung

[0010] Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen einfachen immunologischen Ansatz vorzuschlagen, der die Immunisierung mit viralen Partikeln oder Nukleinsäure vermeidet, und dennoch eine starke Immunantwort gegen das gewählte Antigen hervorruft. Deshalb sollen wirksame Impfstoffe für die menschliche Immunisierung gegen verschiedene Antigene bereitgestellt werden. Weil im Stand der Technik vielfältige gentherapeutische Ansätze beschrieben sind, die jedoch alle entscheidende Nachteile aufweisen, sollen die erfindungsgemäßen Impfstoffe einem rein protein-(biochemischen) Ansatz folgen.

[0011] Die Erfinder haben überraschend festgestellt, dass eine reine Proteinkombination aus dem VSV-G Protein und einem membranständigen Antigen zur Auslösung oder Verstärkung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen führt. Dieser Ansatz ist selbst bei membranständigen Antigenen erfolgreich, die per se keine Immunantwort auslösen oder in vivo alleine sogar zu einer Verstärkung des Krankheitsverlaufs führen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Verwendung eines gereinigten Proteingemisches umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und eines membranständigen Antigens, das von zyto-

plasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen. Ferner betrifft die Erfindung ein gereinigtes Proteingemisch und einen Impfstoff.

Figurenbeschreibung

[0013] **Fig. 1** zeigt die Immunogenitätssteigerung durch VSV-G im Tumor-Challenge-Modell;

[0014] **Fig. 2** zeigt den RSV Nachweis mittels qRT-PCR im Maus-Tiermodell;

[0015] **Fig. 3** zeigt die Gewichtsreduktion immunisierter und nicht-immunisierter Mäuse nach Infektion mit RSV; und

[0016] **Fig. 4** zeigt die Reduktion der viralen RNA-Beladung in immunisierten und nicht-immunisierten Mäusen nach Infektion mit RSV.

[0017] **Fig. 5** zeigt ein verlangsamtes Tumorwachstum nach Immunisierung von Mäusen mit Membranvesikeln von VSV-G exprimierenden Tumorzellen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines gereinigten Proteingemisches umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und eines membranständigen Antigens, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen. Ferner betrifft die Erfindung ein Proteingemisch und einen Impfstoff.

[0019] Das Antigen kann natürlicherweise membranständig sein oder durch bekannte Verfahren membranständig gemacht werden. Beispielsweise kann ein natürlicherweise nicht membranständiges, sezerniertes Antigen durch die carboxy-terminale Kopplung an den Membrananker des G-Proteins von VSV membranständig gemacht werden. Gut geeignete Bereiche umfassen dabei den Membran-durchdringenden Bereich und den intrazytoplasmatischen Bereich von VSV-G, beispielsweise die AS-Sequenz FGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKS-SI-ASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLICIKLKHTKKRQIYT-DIEMNRLGK (SEQ ID NR: 1). Auf der Basis des Verständnisses intrazellulärer Transportwege von Proteinen können intrazellulär vorliegende Proteine durch Einbau von Signalpeptiden (z.B. MKCLLYLAF-LFIGVNCK SEQ ID NR: 2)) und eines Membranankers membranständig gemacht werden (Wolfe, S. L. (Hrsg): 1993. Molecular and Cellular Biology, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, Kapitel 20: Protein Sorting, Distribution, Secretion, and

Endocytosis. 825–875.) Die Fusion des Antigens an einen GPI-Anker (McHugh RS, Ahmed SN, Wang YC, Sell KW, Selvaraj. 1995 Construction, purification, and functional incorporation on tumor cells of glycolipid-anchored human B7-1 (CD80) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8059–8063) oder an ein Lipoprotein (Laukkanen ML, Alfthan K, Keinänen K. 1994. Functional immunoliposomes harboring a biosynthetically lipid-tagged single-chain antibody. Biochemistry 33: 11664–11670) stellen ebenfalls geeignete Verfahren dar.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der verwendete Teil des VSV-G Proteins mindestens 20 aufeinander folgende Aminosäuren von SEQ ID NR: 1.

[0021] Der Replikationszyklus, insbesondere der Ort der Replikation entweder im Kern oder im Zytoplasma der Wirtszelle, stellt in der Virologie eine häufig verwendete Möglichkeit dar, Viren in Gruppen und Familien einzuteilen. Auch neu identifizierte Viren werden auf der Basis ihrer Genomstruktur und ihres Replikationszyklus bekannten Viren zugeordnet. Die zytoplasmatisch replizierenden Viren der vorliegenden Erfindung sind bevorzugt aus der Gruppe der Plusstrang-RNA Viren, der Minusstrang-RNA Viren und der doppelsträngigen RNA Viren ausgewählt, wobei sich die Bezeichnung der Orientierung der Nukleinsäure aus der Orientierung messenger RNA (mRNA) als Plusstrang-RNA ergibt.

[0022] Zu den Viren mit RNA Genom in Plusstrangorientierung [(+)RNA] zählen die Familien der Picornaviren (z.B. Polio), der Flaviviren (z.B. Gelbfiebervirus, Denguevirus, West-Nile Virus, Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME) und Hepatitis C), der Togaviren (z.B. Rötelnvirus), der Coronaviren und der Caliciviren. Das Hepatitis C Virus (HCV) ist aufgrund seiner großen klinischen Relevanz und seinem hohen Potenzial zur Ausprägung einer chronischen Leberentzündung im infizierten Patienten besonders bevorzugt. Hier sind insbesondere die E-Glycoproteinen-Proteine von HCV und die S-Proteine der Coronaviren bevorzugt.

[0023] Zu den Viren mit RNA Genom in Minusstrangorientierung [(-) RNA] zählen die Familien der Rhabdoviren (z.B. Tollwutvirus), der Paramyxoviren [z.B. Mumpsvirus, Masernvirus, humanes Parainfluenzavirus 1–4, humanes Metapneumovirus und das Respiratorische Syncytialvirus (RSV)], der Filoviren (z.B. Marburg Virus, Ebolavirus), der Bornaviren, der Orthomyxoviren (z.B. Influenzavirus), der Bunyaviren, der Arenaviren und der Reoviren (z.B. Rotavirus). Bevorzugt sind dabei vor allem die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase der Influenzaviren A, B und C.

[0024] Ebenfalls im Zytoplasma replizierende Viren

sind die Pockenviren (z.B. Vacciniavirus), die jedoch eine komplexere Struktur aufweisen.

[0025] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die zytoplasmatisch replizierenden Viren umhüllte Viren. Die Hülle (envelope) der Viren leitet sich von der Membran der Wirtszelle ab. In sie sind membranständige Antigene besonders günstig eingelagert.

[0026] Insbesondere wird verstanden, dass auch natürlicherweise nicht membranständige virale Proteine nach Konversion in membranständige Proteine insbesondere dann geeignet sind, wenn sie Domänen aufweisen, die bei unterschiedlichen Virusvarianten stark konserviert sind.

[0027] Zur Immunisierung gegen Tumore sind insbesondere Tumor-Antigene in membranständiger Form geeignet.

[0028] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen das F-Protein und/oder das G-Protein des Respiratorischen Syncytial Virus (RSV-F und/oder RSV-G).

[0029] Das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) ist eine der häufigsten Ursachen für schwere Atemwegsinfektionen bei Kindern. Mehr als 1 % der Kinder müssen stationär behandelt werden. Zurzeit steht kein Impfstoff gegen das RSV zur Verfügung. Bei der Entwicklung von RSV-Impfstoffen wurde in den 60er Jahren bereits ein Formalin-inaktiviertes Virus bei Kindern verwendet, das aber den Effekt einer Erkrankungsverstärkung nach RSV-Infektion bis hin zum Tod zweier Probanden hatte. Ein ähnlicher Effekt der Erkrankungsverstärkung konnte im Tiermodell gezeigt werden. Die Erfinder konnten diesen Effekt im Maus-Tiermodell mit einer Immunisierung mit dem F-Protein (RSV-F), einem Oberflächenprotein von RSV, beobachten. Dabei wurden Membranvesikel verwendet, die RSV-F enthielten (Virosome). Nach Immunisierung mit Virosomen, die gleichzeitig das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) enthielten, konnten die Erfinder erstmals überraschend einen Schutz gegen die Erkrankung nach Infektion mit RSV beobachten.

[0030] Ohne auf einen bestimmten Wirkmechanismus beschränkt zu sein, nehmen die Erfinder deshalb an, dass die Vermittlung des Impfschutzes durch die Immunisierung mit beiden Proteinen hervorgerufen wird. Durch den Vergleich der zellulären und humoralen Immunantworten, die durch diese beiden Proteine induziert werden, werden Unterschiede identifiziert und deren Relevanz für Krankheitsverstärkung und Impfschutz bestimmt. Daraus ergibt sich die Einsatzmöglichkeit von VSV-G als Adjuvanz zur Verstärkung einer Immunantwort gegen ein Antigen.

[0031] In einer weiteren Ausführungsform sind das VSV-G und das Antigen in einem Membranvesikel enthalten, die insbesondere Virosomen sein können.

[0032] In einer weiteren Ausführungsform ist neben dem membranständigen Antigen auch zusätzlich das VSV-G membranständig.

[0033] Ein besonders vorteilhaftes System zur Produktion des Impfstoffes ist es, wenn das VSV-G und das Antigen in einer Wirtszelle koexprimiert werden. Das VSV-G und das Antigen können insbesondere im Verhältnis von 50:1 bis 1:50 exprimiert werden.

[0034] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein gereinigtes Proteingemisch enthaltend mindestens einen Teil des VSV-G und mindestens ein membranständiges Antigen, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist.

[0035] In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Impfstoff, der das erfindungsgemäße Proteingemisch enthält.

[0036] In einer weiteren Ausführungsform kann der Impfstoff pharmazeutisch verträgliche Zusatz- und/oder Hilfsstoffe aufweisen.

[0037] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein gereinigtes Proteingemisch enthaltend mindestens einen Teil des VSV-G und mindestens ein membranständiges Tumorantigen zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Tumorantigen. Außerdem kann VSV-G auch ohne genaue Kenntnis des Tumorantigens alleine verwendet werden, um eine Reduktion des Tumorstadiums zu erreichen. VSV-G kann daher entweder alleine oder in Kombination mit einem Tumorantigen als Tumorstoff verwendet werden.

[0038] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand der Beispiele und unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher beschrieben.

Ausführungsbeispiel

1. Immunogenitätssteigerung durch VSV-G im Tumor-Challenge-Modell;

[0039] Die Erfinder konnten im Rahmen von Studien zur Immunogenität und Wirksamkeit von HIV-Impfstoffen im Affen- und Mausmodell zeigen, dass der Einbau des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) in die Membran Virus-ähnlicher Immundefizienzvirus-Partikel (virus like particle = VLP) zur einer deutlichen Verstärkung der zellulären und humoralen Immunantwort gegen Bestandteile der VLPs führen. Da VLPs auf Grund ihrer dreidimensionalen Struktur besondere immunogene Eigenschaften auf-

weisen (Doan LX, Li M, Chen C, Yao Q. 2005. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev. Med. Virol.* 15:75-88.) hängt die Immunantwort gegen die VLPs auch wesentlich von der Struktur der VLPs ab. Um den Einfluss von VSV-G auf ein nicht-strukturiertes membranständiges Proteinantigen zu untersuchen, wurde das Modellantigen Ovalbumin (OVA) mit dem Membrananker von VSV-G versehen, das dabei entstehende Fusionsprotein wird als OVA-GTM bezeichnet. Die Koexpression von OVA-GTM und VSV-G in einer Zelle führt zur Bildung von sezernierten Membranvesikeln, die OVA-GTM und VSV-G enthalten. Nach Immunisierung von Mäusen mit diesen OVA-GTM/VSV-G Vesikeln wird das Wachstum von Tumoren, die Ovalbumin exprimieren, besser unterdrückt als durch Immunisierung mit OVA-GTM oder Ovalbumin alleine (**Fig. 1**). Dies zeigt, dass der immunogenitätssteigernde Effekt von VSV-G nicht auf VLPs beschränkt ist. Damit eignet sich der Ansatz überraschend zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung.

[0040] **Fig. 1** zeigt die Immunogenitätssteigerung durch VSV-G im Tumor-Challenge-Modell. Mit OVA-GTM+ VSV-G Membranvesikeln immunisierte Mäuse können nach Tumor-Challenge das Tumorstadium besser kontrollieren (OVA-GTM+G). Das Tumorstadium von 1.000 mm³ wird erst am Tag 37 nach Challenge erreicht. Im Gegensatz dazu erlangt der Tumor bei nicht immunisierten Mäusen schon nach Tag 12 das Tumorstadium von 1.000 mm³ (Control). Die übrigen Tiere, immunisiert mit Membranvesikeln mit membranständigen Ovalbumin (OVA-GTM) oder Ovalbumin alleine (OVA), erreichen ein Tumorstadium von 1.000 mm³ am Tag 25 bzw. Tag 26 nach Challenge.

2. RSV Nachweis mittels qRT-PCR im Maus-Tiermodell

[0041] Um den Einfluss von VSV-G auf die Wirksamkeit einer Impfung zu untersuchen, die auf dem F-Protein des RSV beruht, wurde ein RSV-Challenge-Modell etabliert. BALB/c-Mäuse wurden mit unterschiedlichen Dosen von RSV intranasal infiziert. Nach 2, 5, 7 und 14 Tagen wurde die Virusbelastung in der Lunge durch eine quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich die Mäuse mit allen verwendeten RSV-Dosen von 10⁶ bis 10⁸ infektiösen Einheiten (iE) infizieren ließen. Die Virus RNA stieg in den Lungen der Mäuse nach Infektion bis Tag 5 nach Infektion an und nahm dann sukzessive ab. Am Tag 14 nach Infektion waren im Mittel weniger als 10 RSV-Kopien bei der Gruppe mit 10⁶ iE und etwa 200 RSV-Kopien bei der Gruppe mit 10⁷ iE nachweisbar.

[0042] Zur Expression des Oberflächenproteins RSV-F in Zellkultur wurde ein Plasmid hergestellt, das einen für Säugetierzellen Codon-optimierten offenen Leserahmen enthält. Nach Transfektion des

Expressionsplasmids wurden Membranvesikel in den Überstand sezerniert, die RSV-F enthalten und mittels Ultrazentrifugation durch ein 20 % Sucrose-Kissen pelletiert wurden. Bei Kotransfektion von RSV-F und VSV-G bilden sich Membranvesikel, die RSV-F und VSV-G tragen.

[0043] Fig. 2 zeigt den RSV-Nachweis mittels qRT-PCR im Maus-Tiermodell. Zur Untersuchung des Infektionsverlaufes von RSV in Mäusen wurden jeweils 3 Mäuse mit den angegebenen infektiösen Einheiten (iE) infiziert. Zur Standardisierung wurde die Menge an mRNA mit einer qRT-PCR gegen das β -Aktin Gen durchgeführt. Dabei wurde die Kopienzahl von RSV mit der Kopienzahl von β -Aktin verrechnet. Am Tag 2 wurden 7 Kopien in einer Maus der nicht infizierten Gruppe nachgewiesen. In allen anderen nicht infizierten Mäusen war RSV nicht nachzuweisen. Am Tag 7 wurden keine nicht infizierten Mäuse untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte aller Mäuse einer Gruppe mit den jeweiligen Standardabweichungen.

3. Gewichtsreduktion der Mäuse nach Infektion mit RSV

[0044] Im Rahmen einer erster Immunisierungstudie zur Analyse der Vesikel im Tiermodell wurden jeweils vier Mäuse pro Gruppe in Woche 0 und 4 mit RSV-F Membranvesikel (V-F) bzw. RSV-F + VSV-G tragenden Membranvesikel (V-F/G) immunisiert. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse intranasal mit 10^6 iE von RSV infiziert. Als klinischer Parameter für den Infektionsverlauf wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt. Bei einer nicht immunisierten Kontroll-Gruppe wurde eine Gewichtsreduktion von bis zu 10 % festgestellt. Bei der Gruppe, die mit V-F immunisiert wurde, lag die mittlere Gewichtsreduktion am Tag 3 nach Infektion über 15 %. Die Gruppe, die mit V-F/G immunisiert wurde, zeigte dagegen kaum eine Gewichtsreduktion (Fig. 3).

[0045] Fig. 3 zeigt die Gewichtsreduktion nach Infektion mit RSV. Zwei Wochen nach Immunisierung wurden die Mäuse mit 10^6 iE RSV infiziert. Am Tag der Infektion und bis zum Tag 4 nach Infektion täglich das Gewicht bestimmt. Der Gewichtverlauf jeder Maus ist dargestellt. A: Nicht immunisierte Mäuse; B: Mit V-F Virosome immunisierte Mäuse (Tier 2 verstarb am Tag 1); C: Mit V-F/G Virosome immunisierte Mäuse.

4. RSV-qRT-PCR aus unterschiedlichen RNA-Isolaten

[0046] Am Tag 4 nach Infektion wurden die Mäuse nach Betäubung getötet und eine Bronchoalveolär Lavage (BAL) gewonnen. Danach wurden die Mäuselungen entnommen und homogenisiert. Aus dem

Homogenat wurde die Ribonukleinsäure und aus der BAL die virale Ribonukleinsäure extrahiert und der RNA-Gehalt bestimmt. Durch die RSV-qRT-PCR wurde eine niedrigere virale Kopienzahl bei den mit V-F immunisierten Mäusen gezeigt, jedoch war die Reduktion bei den mit V-F/G immunisierten Mäusen 10-fach höher bei dem Lungenhomogenat, sogar 100-fach höher bei der BAL. Während die Immunisierung mit V-F die klinische Symptomatik zu verstärken scheint, reduziert überraschend die Immunisierung mit V-F/G die Virusbeladung drastisch (Fig. 4).

[0047] Fig. 4 zeigt eine RSV-qRT-PCR aus unterschiedlichen RNA-Isolaten. Die Kopienzahl von RSV nach qRT-PCR wurde durch RNA-Quantifizierung standardisiert. Die RSV-Kopienzahl ist für die Isolate aus Lungenhomogenat (A) und für die Isolate aus der BAL dargestellt (B). Die mit RSV-F + VSV-G Virosome immunisierten Mäuse zeigten eine starke Reduktion in der Viruskopienzahl nach RSV-Challenge im Vergleich zu den mit RSV-F Virosome immunisierten oder nicht immunisierten Mäusen (ohne).

[0048] Damit konnten die Erfinder durch Einbau von VSV-G in RSV-F-Vesikel erstmals die nach Immunisierung mit RSV-F im Mausmodell beobachtete Krankheits-verstärkende Immunreaktion überraschend in eine protektive Immunantwort umwandeln.

[0049] Durch den Vergleich der zellulären und humoralen Immunantworten, die durch diese beiden Impfstoffe induziert werden, werden Unterschiede identifiziert und deren Relevanz für Krankheitsverstärkung und Impfschutz durch Depletion bestimmter Zellpopulationen und Transferexperimente bestimmt.

5. Charakterisierung des Infektionsverlaufs

[0050] Der Infektionsverlauf in den, mit V-F und V-F/G immunisierten und mit RSV infizierten Mäusen wird bestätigt und auch hinsichtlich der klinischen Symptomatik weiter charakterisiert. Es werden weitere Immunisierungsversuche bei Mäusen durchgeführt. Hierzu werden BALB/c-Mäuse mit V-F und V-F/G Virosomen immunisiert. Während in den oben dargestellten Versuchen die Virusbeladung in der Lunge nur am Tag 4 nach Challenge bestimmt wurde, wird der Verlauf der Virusbeladung und die Persistenz des Virus untersucht. Am Tag 2, 4 und 7 nach Challenge wird außerdem eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Zur Lungenfunktionsmessung werden die Mäuse in einen Ganzkörper-Plethysmograph gesetzt und der PenH (Verstärkung der Atempause) mit ansteigenden Metacholinkonzentrationen als Inhalationsprovokation bestimmt. Damit wird zusätzlich zum Gewichtsverlust ein weiterer klinischer Parameter zum Infektionsverlauf bestimmt.

6. Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunantwort

[0051] RSV-F-spezifische Antikörper der Klassen IgG1, IgG2A und IgE werden in ELISA-Verfahren nach der Immunisierung und nach dem RSV-Challenge bestimmt. Neutralisierende Antikörpertiter werden durch RSV-Infektion von Hep2-Zellen mittels immunhistochemischer Färbung für das P-Protein von RSV bestimmt. Dies zeigt, dass VSV-G auch die Antikörperbildung gegen RSV-F verstärkt. Da insbesondere die Induktion von zytotoxischen T-Zellen für die Kontrolle viraler Infektionen relevant ist, werden diese Zellen der unterschiedlich immunisierten Tiere untersucht. Für das intrazelluläre Anfärben von Zytokinen der zytotoxischen T-Zellen werden die Milzzellen der immunisierten Mäuse isoliert und anschließend mit einem MHC-I-restringierten RSV-F-Peptid (F85-93: KYKNAVTEL – SEQ ID NR: 3) und einem irrelevanten Kontroll-Peptid bzw. gar nicht stimuliert. Mit einem markierten Antikörper gegen IFN- γ wird in FACS-Analysen der Prozentsatz der CD8⁺-Zellen bestimmt, die stimuliert wurden. Milzzellen werden außerdem mit RSV-F-Protein stimuliert und die Proliferation mittels H³-Thymidin-Einbau bestimmt. In den stimulierten Kulturen werden zusätzlich mittels ELISA die sezernierten IFN- γ und IL-4 Mengen bestimmt. Die Ergebnisse des Zytokin-Assays geben gemeinsam mit dem Verhältnis zwischen IgG1 und IgG2a Antikörpertitern Hinweise auf die Polarisierung der Immunantwort (T_H1 bzw. T_H2).

7. Untersuchung des Einflusses von Komplement C3 an der Induktion der Erkrankungsverstärkung

[0052] Die Immunisierung von Komplement C3 knock-out Mäusen mit Formalin-inaktiviertem RSV führte im Gegensatz zu den Parental-Mäusen nicht zu einer Krankheitsverstärkung. Es blieb jedoch bisher unklar, ob Komplement in der Immunisierungsphase oder während des Challenge für die Ausbildung des krankheitsverstärkenden Effektes benötigt wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mäuse, die durch eine vorangegangene RSV-Infektion vor einer Zweit-Infektion geschützt waren, im Gegensatz zu Mäusen, die mit dem inaktivierten Virus immunisiert wurden, keine Komplement-Deposition in der Lunge nach RSV-Challenge entwickelten. Da die geschützten Tiere jedoch eine über 2.000-fach geringe Virusbeladung aufwiesen, könnte die fehlende Komplement-Deposition eher auf fehlendes Antigen zurückzuführen sein, als auf eine qualitativ unterschiedliche Immunantwort. Da die Virusbeladung in RSV-F und RSV-F/G immunisierten Mäusen in der Lunge nur um den Faktor 10 differierte, wird die Komplement-Deposition in Kryostat-Schnitten nach Challenge mittels immunhistochemischer Verfahren verglichen. Eine wichtige Rolle des Komplementes wird durch Experimente mit C3 knock-out Mäusen bestätigt.

8. Depletions- und Transferexperimente

[0053] Um die Relevanz nachgewiesener Immunreaktionen für die Krankheitsverstärkung bzw. den Impfschutz zu bestimmen, werden Depletions- und Transferexperimente durchgeführt. Hierzu werden Mäuse, wie oben beschrieben, mit V-F oder V-F/G immunisiert. Vor dem Challenge werden intraperitoneal hohe Dosen eines depletierenden anti-CD4-Antikörpers bzw. anti-CD8-Antikörpers verabreicht. Die erfolgreiche Depletion wird durch FACS-Färbungen von Milzzellen parallel depletierter Mäuse überprüft. Der Krankheitsverlauf in depletierten und nicht-depletierten Mäusen wird anschließend wie beschrieben untersucht. Die Depletionsversuche können zeigen, welche Subpopulationen für die untersuchten Infektionsverläufe notwendig sind. Durch Transferexperimente wird untersucht, ob diese Subpopulationen hinreichend sind. Hierzu werden Milzzellen immunisierter Mäuse mittels MACS in CD4 positive und CD8 positive Populationen getrennt und anschließend nicht immunisierten Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach Challenge der Empfänger-Mäuse wird untersucht, welchen Einfluss die transferierten Zellen auf den Infektionsverlauf haben. Um die Bedeutung von Antikörpern in Transferexperimenten zu bestimmen, werden Seren von immunisierten Mäusen gruppenweise gepoolt und konzentriert. Die Antikörperpräparationen werden alleine, bzw. in Kombination mit CD4 oder CD8 positiven Zellen übertragen.

9. Immunisierung mit VSV-G enthaltenden Membranvesikel-Präparationen von Tumoren

[0054] Da einige Proteine selektiv in Tumoren exprimiert werden und eine Immunantwort gegen diese Tumorantigene einen viel versprechenden Therapieansatz darstellt, wurde VSV-G mittels adenoviraler Vektoren in der Maus-Tumorzelllinie B16 exprimiert und Membranvesikel aus dem Überstand dieser Tumore mittels Zentrifugation durch ein 20%iges Sucrose-Kissen gewonnen. Zur Kontrolle wurden Membranvesikel von B16-Zellen präpariert, die mit einem adenoviralen Vektor transduziert wurden, der anstelle von VSV-G das Green-fluorescent Protein (GFP) exprimiert. Zum Tumor syngene Mäuse wurden im Abstand von 5 Wochen mit VSV-G-haltigen Membranvesikel-Präparationen (B-VSV-G in Fig. 5) bzw. mit Membranvesikel-Präparationen ohne VSV-G (B-GFP in Fig. 5) immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden den Mäusen 2×10^6 B16-Zellen subkutan injiziert und anschließend das Tumorstadium verfolgt (Fig. 5). Nicht immunisierten Tieren (Control in Fig. 5) wurde dieselbe Menge an B16-Zellen injiziert. Mit VSV-G war das Tumorstadium sehr viel stärker gehemmt als ohne. Dies zeigt, dass die Immunogenität von in Tumoren exprimierten Membranproteinen durch Zugabe von VSV-G gesteigert werden kann. Dies eröffnet die Möglichkeit ohne genaue Kenntnis der Tumorantige-

ne, Tumorimpfstoffe durch Expression von VSV-G in den Tumoren sowohl ex vivo als auch in vivo herzustellen.

Referenzliste

- Bembridge, G. P., N. Rodriguez, R. Garcia-Beato, C. Nicolson, J. A. Melero, and G. Taylor. 2000. DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J. Gen. Virol.* 81:2519–2523.
- Charan S., H. Hengartner and R. M. Zinkernagel. 1987. Antibodies against the Two Serotypes of Vesicular Stomatitis Virus Measures by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Immunodominance of Serotype-Specific Determinants and Induction of Asymmetrically Cross-Reactive Antibodies. *J. Virol.* 61(8):2509–2514.
- Doan LX, Li M, Chen C, Yao Q. 2005. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev. Med. Virol.* 15:75–88.
- Freer G., C. Burkhardt, I. Ciernik, M. F. Bachmann, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel. 1994. Vesicular Stomatitis Virus Indiana Glycoprotein as a T-Cell-Dependent and – Independent Antigen. *J. Virol.* 68(6):3650–3655.
- Groothuis, J. R., E. A. Simoes, M. J. Levin, C. B. Hall, C. E. Long, W. J. Rodriguez, J. Arrobio, H. C. Meissner, D. R. Fulton, R. C. Welliver, and . 1993. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *N. Engl. J. Med.* 329:1524–1530.
- Hall, C. B., E. E. Walsh, J. F. Hruska, R. F. Betts, and W. J. Hall. 1983. Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection. A controlled double-blind study in young adults. *JAMA* 249:2666–2670.
- Hussell, T. and P. Openshaw. 1999. Recent developments in the biology of respiratory syncytial virus: are vaccines and new treatments just round the corner? *Curr. Opin. Microbiol.* 2:410–414.
- Kim, H. W., J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, R. M. Chanock, K. Jensen, and R. H. Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89:422–434.
- Laukkanen ML, Alfthan K, Keinänen K. 1994. Functional immunoliposomes harboring a biosynthetically lipid-tagged single-chain antibody. *Biochemistry* 33: 11664–11670.
- Li, X., S. Sambhara, C. X. Li, M. Ewasyshyn, M. Partridge, J. Caterini, O. James, G. Cates, R. P. Du, and M. Klein. 1998. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J. Exp. Med.* 188:681–688.
- McHugh RS, Ahmed SN, Wang YC, Sell KW, Selvaraj. 1995 Construction, purification, and functional incorporation on tumor cells of glycolipid-anchored human B7-1 (CD80) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8059–8063.
- Miller, D. K., B. I. Feuer, R. Vanderoef and J. Lenard. 1980. Reconstituted G Protein-Lipid Vesicles from Vesicular Stomatitis Virus and Their Inhibition of VSV Infection. *J. Cell Biology* 84:421–429.
- Openshaw, P. J., F. J. Culley, and W. Olszewska. 2001. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 20 Suppl 1:S27–S31.
- Pemberton, R. M., M. J. Cannon, P. J. Openshaw, L. A. Ball, G. W. Wertz, and B. A. Askonas. 1987. Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 8):2177–2182.
- Polack, F. P., M. N. Teng, P. L. Collins, G. A. Prince, M. Exner, H. Regele, D. D. Lirman, R. Rabold, S. J. Hoffman, C. L. Karp, S. R. Kleeberger, M. Wills-Karp, and R. A. Karron. 2002. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J. Exp. Med.* 196:859–865.
- Taylor, G., J. Furze, P. R. Tempest, P. Bremner, F. J. Carr, and W. J. Harris. 1991. Humanised monoclonal antibody to respiratory syncytial virus. *Lancet* 337:1411–1412.
- Wolfe, S. L. (Hrsg): 1993. *Molecular and Cellular Biology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, Kapitel 20: Protein Sorting, Distribution, Secretion, and Endocytosis. 825–875.) oder an ein Lipoprotein (Laukkanen, M-L et al., *Biochemistry* 33: 11664–11670.
- EP-Patentanmeldung 03 028 826.0 von Klaus Überla et al.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verwendung eines gereinigten Proteingemisches umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und eines membranständigen Antigens, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Teil von VSV-G mindestens 20 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID NR: 1, vorzugsweise SEQ ID NR: 1 umfasst.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zytoplasmatisch replizierenden Viren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Plusstrang-RNA Viren, Minusstrang-RNA Viren und doppelsträngigen RNA Viren.

4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zytoplasmatisch replizierenden Viren umhüllte Viren sind.

5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Antigen das F-Protein und/oder das G-Protein des Respiratorischen Syncytial Virus (RSV-F und/oder RSV-G) ist.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das VSV-G und das Antigen in einem Membranvesikel enthalten sind.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich das VSV-G membranständig ist.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das VSV-G und das Antigen in einer Wirtszelle koexprimiert werden, vorzugsweise im Verhältnis von 50:1 bis 1:50 exprimiert werden.

9. Gereinigtes Proteingemisch enthaltend mindestens einen Teil des VSV-G und mindestens ein membranständiges Antigen, das von zytoplasmatisch replizierenden Viren abgeleitet ist.

10. Impfstoff enthaltend das Proteingemisch nach Anspruch 9.

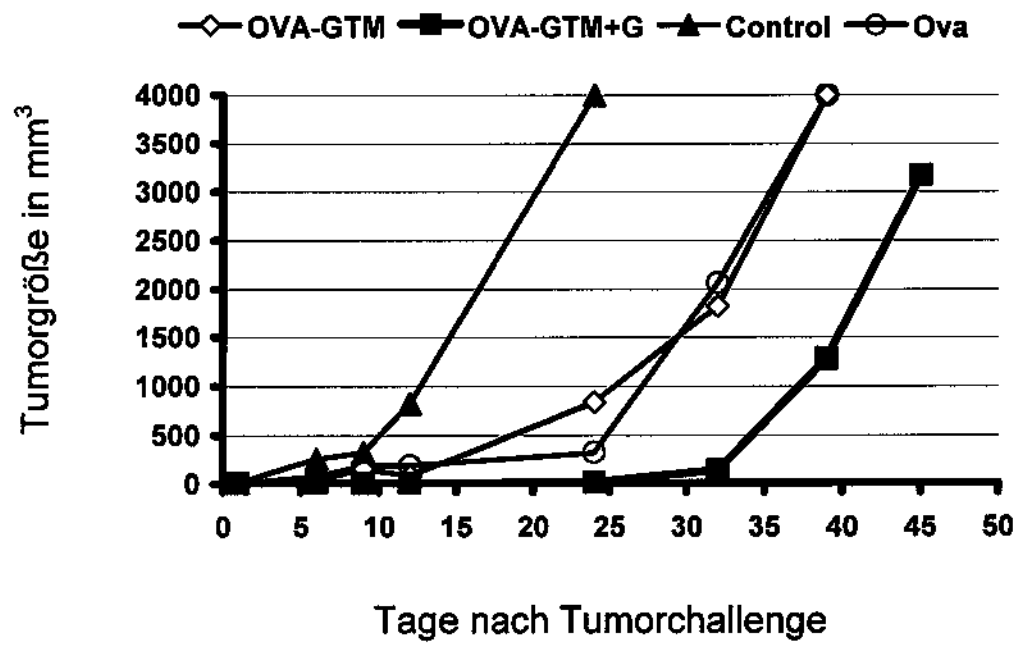
11. Impfstoff nach Anspruch 10, wobei der Impfstoff pharmazeutisch verträgliche Zusatz- und/oder Hilfsstoffe aufweist.

12. Verwendung eines gereinigten Proteingemisches umfassend mindestens einen Teil des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und mindestens ein membranständiges Tumorantigen, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Induktion oder Steigerung der Immunantwort gegen das membranständige Antigen.

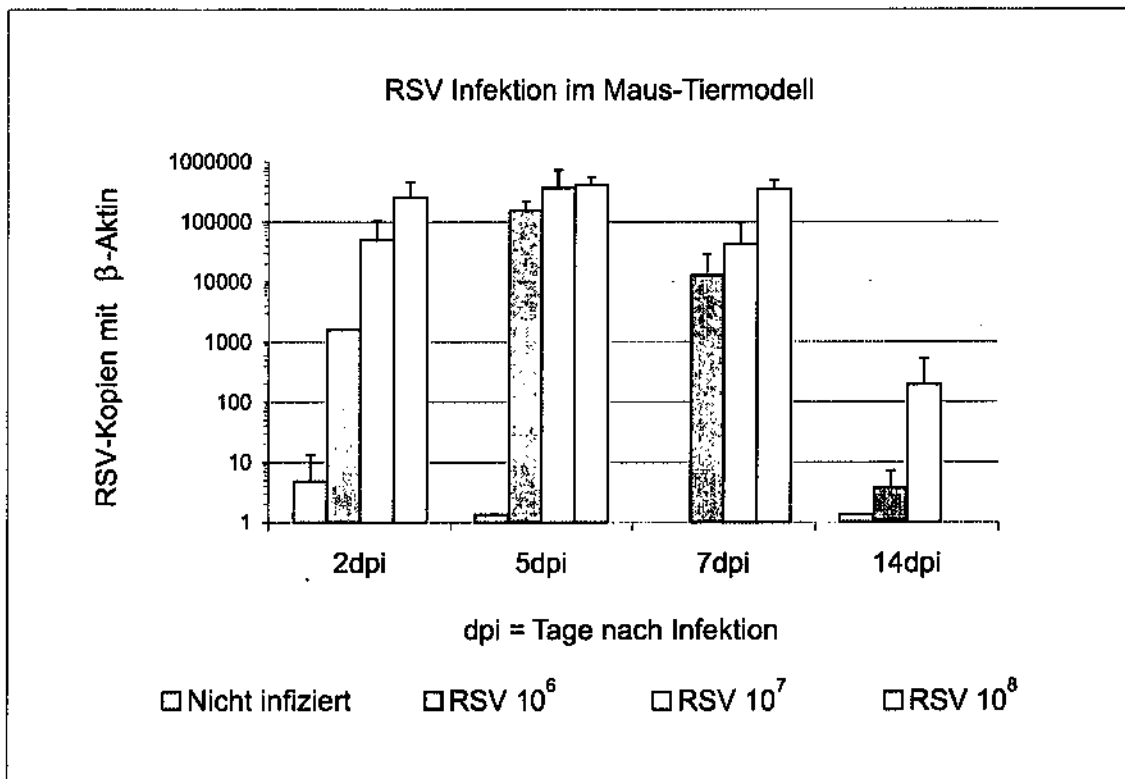
13. Verwendung mindestens eines Teils des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Reduktion von Tumorwachstum.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

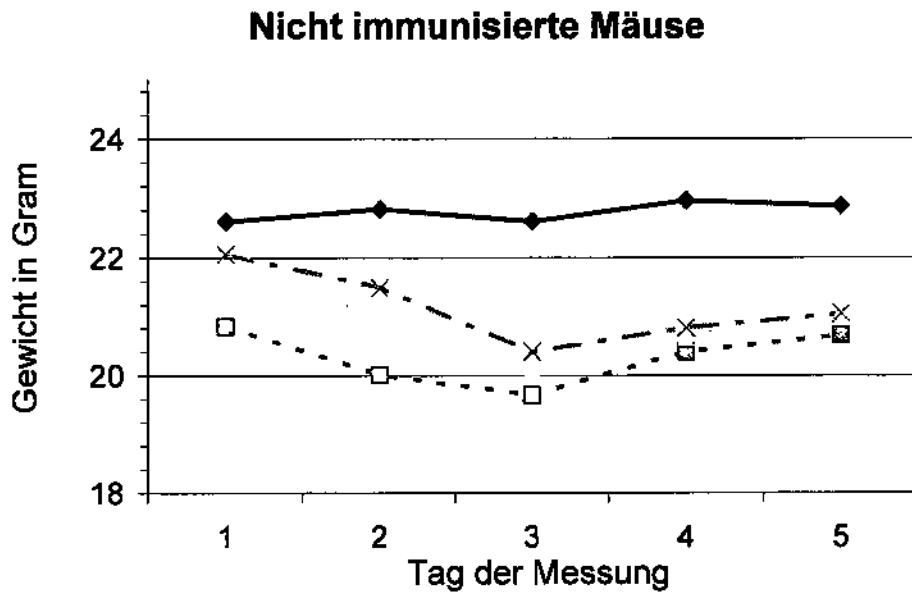


Figur 1

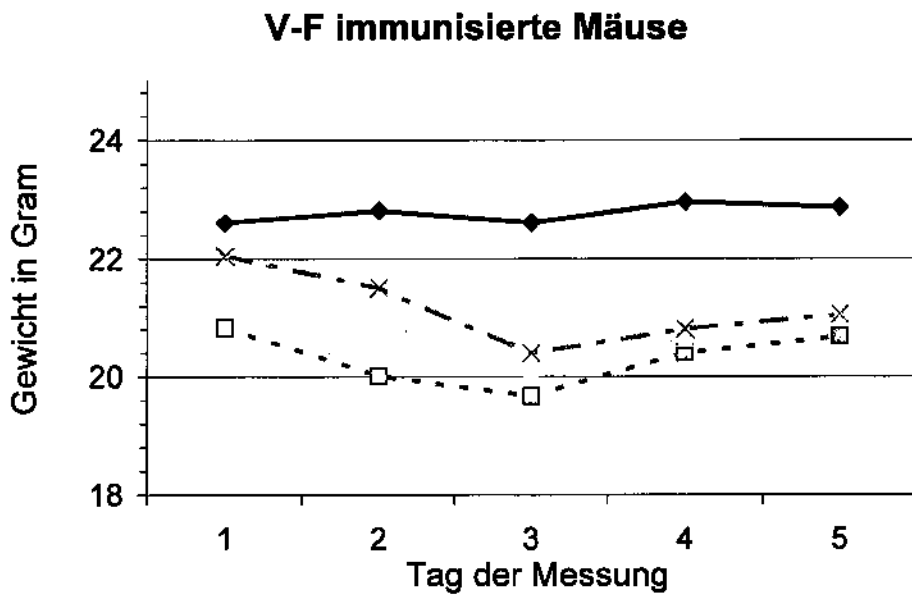


Figur 2

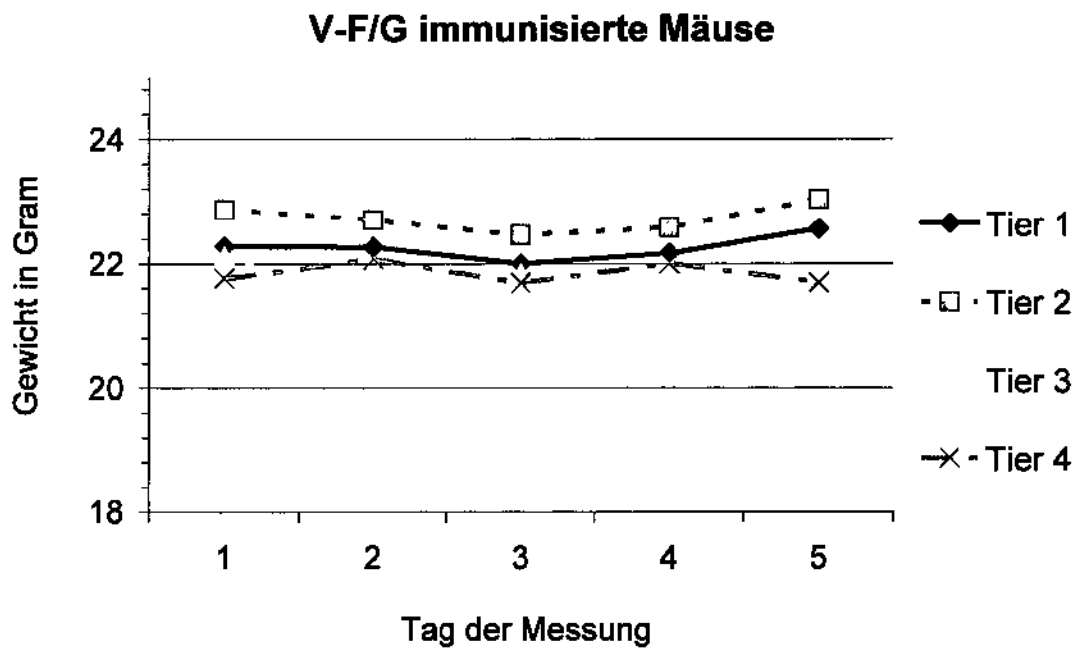
Figur 3A



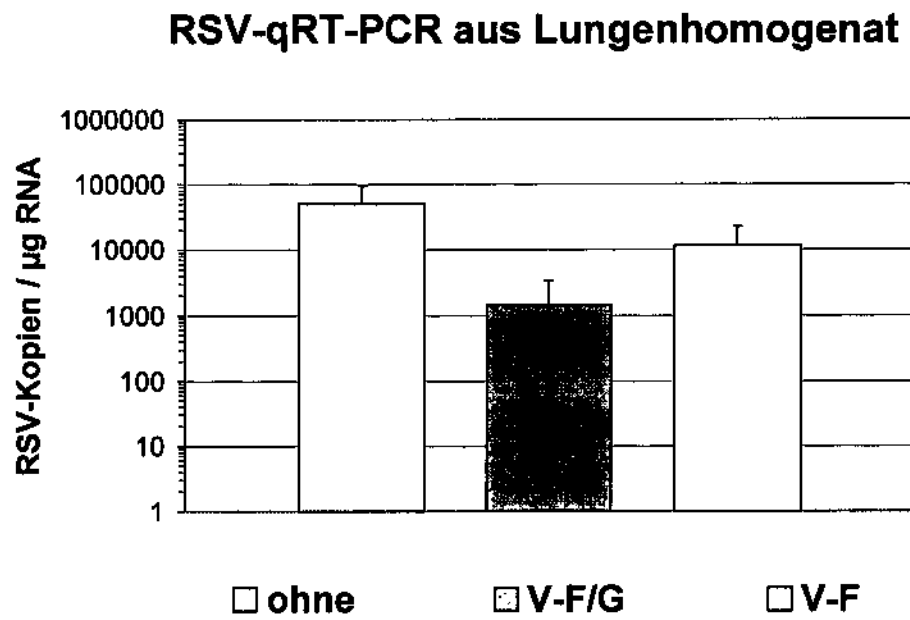
Figur 3B



Figur 3C



Figur 4A



Figur 4B

