



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 27 719 T2 2007.04.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 189 611 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 27 719.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/NZ00/00098

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 942 571.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/076497

(86) PCT-Anmeldetag: 14.06.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 21.12.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.03.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.05.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.04.2007

(51) Int Cl.⁸: A61K 31/352 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

33625999 14.06.1999 NZ

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Cancer Research Technology Ltd., London, GB

(72) Erfinder:

KRISSANSEN, Geoffrey Wayne, St Johns Auckland, NZ; KANWAR, Rakesh, Jagat, Mount Roskill Auckland, NZ; CHING, Lai-Ming, West Harbour Auckland, NZ

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(54) Bezeichnung: KREBSTERAPIE

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 eingelebt, 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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die kombinierte Verwendung therapeutischer Mittel zur Krebsbekämpfung. Insbesondere bezieht sie sich auf Kombinationen therapeutischer Mittel, die bei fortgeschrittenen und großer Tumorbelastung wirksam sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Fortgeschritten Krebs und große Tumorbelastung sind gegen die Behandlung mit therapeutischen Mitteln resistent. Zwar können diese selben Mittel bei kleineren Tumoren wirksam sein, doch ihre Anwendung führt nicht zu einer vollständigen Eradikation großer Tumorbelastungen. Große Tumore können unkontrolliert weiterwachsen oder ihr erneutes Wachstum wird vom Immunsystem des Körpers nicht erkannt.

[0003] Darüber hinaus erwerben Tumore Abwehr- und Überlebensfunktionen, die die Wirksamkeit therapeutischer Mittel und/oder des körpereigenen Immunsystems begrenzen. Aus unbekannten Gründen scheint eine große Tumorbelastung die Entstehung von zytotoxischen T-Lymphozyt-Antitumor-Reaktionen entweder zu behindern oder zu verzögern. Bei der Immuntherapie ist ein Gentransfer von T-Zellen kostimulierenden Zelladhäsionsmolekülen nur bei sehr kleinen Tumoren wirksam und es wird nur eine schwache systemische Antitumor-Immunität erzeugt.

[0004] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine therapeutische Kombination bereitzustellen, die die Resistenz großer Tumorbelastungen gegen die Immuntherapie zumindest teilweise überwindet oder der Öffentlichkeit zumindest eine nützliche Wahl bei der Krebsbehandlung bietet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Dementsprechend stellt die Erfindung die Anwendung eines immuntherapeutischen Mittels zusammen mit einem Tumorwachstum begrenzenden Mittel zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Säugern mit fortgeschritten oder großer Tumorbelastung bereit, wobei das Tumorwachstum begrenzende Mittel die Wirksamkeit des immuntherapeutischen Mittels verstärkt und eines von 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure (DMXAA) und Flavonessigsäure (FAA) ist und wobei das immuntherapeutische Mittel ein T-Zellen kostimulierendes Zelladhäsionsmolekül (CAM) oder einen Säugerexpressionsvektor, der DNA enthält, welche ein T-Zellen kostimulierendes CAM codiert, umfasst, wobei das CAM B7.1 ist.

[0006] Der Begriff „immuntherapeutisches Mittel“, wie er hierin verwendet wird, bedeutet ein Präparat, das bei Verabreichung an den Patienten zu einer systemischen Antitumor-Immunreaktion führt.

[0007] Vorzugsweise enthält das Präparat DNA und typischerweise ist das immuntherapeutische Mittel eine pharmazeutisch akzeptable Formulierung der DNA, die an einer oder mehreren Stellen in den Tumor injiziert werden soll, um dem Tumorgewebe Eigenschaften zu verleihen, die eine systemische Antitumor-Immunreaktion erzeugen.

[0008] Der Begriff „Tumorwachstum begrenzendes Mittel“, wie er hierin verwendet wird, bedeutet ein Mittel, welches das Tumorwachstum bei einem Patienten durch Reduktion des Blutflusses zu den Tumoren z.B. durch Inhibition oder Verhinderung der Angiogenese begrenzt oder verhindert. Ein solches Mittel kann zusätzlich zur Reduktion des Blutflusses auch andere Antitumor-/immunregulatorische Wirkungen aufweisen.

[0009] Das immuntherapeutische Mittel enthält DNA, die ein T-Zellen kostimulierendes Zelladhäsionsmolekül (CAM) in einem geeigneten Expressionsvektor codiert. Das CAM ist B7.1.

[0010] Das Tumorwachstum begrenzende Mittel ist Flavonessigsäure (FAA) oder ein Analog von Xanthenon-4-essigsäure (XAA). Das XAA-Analog ist 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure (DMXAA).

[0011] Vorzugsweise wird das immuntherapeutische Mittel vor Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels verabreicht. Noch bevorzugter wird das immuntherapeutische Mittel 12 bis 48 Stunden vor Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels verabreicht. Ganz bevorzugt erfolgt die Verabreichung des immuntherapeutischen Mittels etwa 24 Stunden vor Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels.

[0012] In bevorzugten Ausführungsformen kann die Anwendung der vorliegenden Erfindung weiterhin die Verabreichung eines weiteren Tumorwachstum begrenzenden Mittels einschließen. Dieses Mittel kann ein Mittel sein, das die Expression oder Wirksamkeit des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1) stört. Dies kann zweckmäßigerweise in einer Antisense-Therapie erfolgen.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Zwar ist die Erfindung wie oben weit definiert, doch der Fachmann erkennt, dass sie nicht darauf beschränkt ist und auch Ausführungsformen einschließt, für die die nachfolgende Beschreibung Beispiele liefert. Darüber hinaus ist die vorliegende Erfindung bei Bezug auf die beigefügten Zeichnungen besser verständlich.

[0014] **Fig. 1.** Die Kombination der Medikamente DMXAA oder FAA mit dem Immunogen B7.1 erzeugt eine starke systemische Antitumor-Immunität, wohingegen Monotherapien unwirksam sind. (A) Ein CAM-Gentransfer kann keine Abstoßung großer Tumore bewirken. In gesicherte Tumore eines Durchmessers von 0,5 cm wurden 60 µg B7.1-, B7.2-, ICAM-1-, MAdCAM-1- und VCAM-1-cDNA enthaltende DOTAP-Liposome injiziert. Kontrolltiere erhielten 60 µg eines leeren pCDM8-Vektors oder Liposome. Der Gentransfer der einzelnen CAMs verlangsamte zwar das Tumorwachstum, doch die Tumore wuchsen letztendlich unkontrolliert und die Tiere mussten euthanasiert werden. (B) Die Kombination der Medikamente DMXAA oder FAA mit dem Immunogen B7.1 führt zur Eradikation großer Tumore. Tiere mit Tumoren einer Größe von 0,6 bis 0,8 cm erhielten i.p. eine Injektion mit DMXAA oder FAA (300 mg/kg bzw. 25 mg/kg Körpergewicht) in einer Menge von 0,01 ml/g Körpergewicht. Bei Tieren, die eine Kombinationsbehandlung erhielten, wurden 60 µg B7.1-cDNA enthaltende DOTAP-Liposome in den Tumor injiziert und 24 Stunden später DMXAA oder FAA. Kontrolltiere erhielten wie angegeben 60 µg eines leeren pCDM8-Vektors oder nur Liposome. Die Größe (cm) der Tumore wurde nach dem Gentransfer 42 Tage lang überwacht. Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten (durch kleine senkrechte Pfeile gekennzeichnet). Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Mäuse, die von ihren Tumoren geheilt wurden, erhielten nach 42 Tagen eine erneute Tumor-Challange mit 10^6 Stammtumorzellen (großer senkrechter Pfeil) und wurden bezüglich eines erneuerten Tumorwachstums weitere 22 Tage lang überwacht. (C) Photographie von Mäusen mit gesicherten und behandelten Tumoren. Dargestellt ist eine Maus mit einem großen (0,8 cm) gesicherten EL-4-Tumor sowie Mäuse mit ähnlich großen Tumoren 8 bzw. 29 Tage nach der Behandlung mit der Kombination aus B7.1 und DMXAA.

[0015] **Fig. 2.** Die Kombination der B7.1-Immuntherapie und der DMXAA-Therapie erzeugt eine stärkere CTL-Wirksamkeit, die zur Eradikation von Tumoren adoptiv übertragen werden kann. (A) Vergleich der durch die unterschiedlichen Behandlungen erzeugten Antitumor-CTL-Wirksamkeit. 21 Tage nach den unterschiedlichen Behandlungen wurden den Tieren Splenozyten entnommen und diese bezüglich ihrer zytologischen Wirksamkeit gegen EL-4-Tumorzellen untersucht. Die prozentuale Zytotoxizität ist gegen verschiedene Effektor/Target-Verhältnisse (E:T-Verhältnisse) aufgetragen. Kontrolltiere erhielten einen leeren pCDM8-Vektor oder nur Liposome. Das eingefügte Feld stellt die zytolytische Wirkung der Splenozyten dar, die den Tieren 42 Tage nach der Behandlung mit B7.1/DMXAA und weitere 22 Tage später (Tag 64) nach der erneuten Tumor-Challange mit EL-4-Stammtumorzellen entnommen worden waren. (B) Eradikation gesicherter Tumore durch adoptive Übertragung von Antitumor-CTL behandelter Mäuse. Splenozyten (2×10^8) wurden durch intratumorale und i.p. Injektion von behandelten und Kontrollmäusen adoptiv auf Empfängermausen mit gesicherten Tumoren (Durchmesser etwa 0,6 cm) übertragen. Die Balken stellen jeweils das Mittel + SD der Ergebnisse von 5 oder 6 Mäusen dar.

[0016] **Fig. 3.** Die Antitumor-Immunität wird hauptsächlich durch CD8+-T-Zellen und NK-Zellen vermittelt. Es wurden Tumore (Durchmesser etwa 0,6 cm) in Mäusen gesichert und der Beitrag der Leukozytenuntergruppen zur Kombinationstherapie durch Antikörperblockade untersucht. Vier Tage vor der Behandlung sowie jeden zweiten Tag während des Experimentzeitraumes wurden mAbs gegen (a) CD4 (GK1.5 mAb), (b) NK-Zellen (PK136 mAb), (c) CD8 (53-6.72 mAb), (d) CD8 und NK-Zellen, (e) CD4, CD8 und NK-Zellen und (f) CD4 und CD8 verabreicht. Jedes Feld (a-f) schließt ein Kontrollexperiment ein, bei dem die anti-Leukozyten blockierenden mAb(s) durch Ratten-IgG substituiert wurden. Die Mäuse wurden getötet, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten (durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet). Die Balken stellen jeweils das Mittel + SD der Ergebnisse von 5 oder 6 Mäusen dar.

[0017] **Fig. 4.** Die Kombinationstherapie umgeht den für eine wirksame Therapie erforderlichen engen Dosierungsbereich therapeutischer Reagenzien. Tumore (Durchmesser etwa 0,5 cm) wurden nach 17 Tagen gesichert und verschiedene Mengen B7.1-cDNA (90–180 µg) injiziert. 24 Stunden später wurde DMXAA intraperitoneal in einer Menge von 25 mg/kg Körpergewicht (oberes Feld) bzw. 18 mg/kg (unteres Feld) verabreicht.

Die Balken stellen jeweils das Mittel + SD der Ergebnisse von 5 oder 6 Mäusen dar.

[0018] [Fig. 5](#). Der Mechanismus des Tumorzelltods in Reaktion auf die B7.1- versus DMXAA-Therapie ist unterschiedlich. 7 und 21 Tage nach der Behandlung wurden Schnitte gesicherter Tumore präpariert, mittels TUNEL-Analyse auf apoptotische Zellen gefärbt (grün fluoreszierende Zellen mit kondensierten fragmentierten Zellkernen) und zur Darstellung nekrotischer Zellen mit Propidiumjodid (orange) gegenfärbt ($\times 100$). Dargestellt sind repräsentative Schnitte (a) 7 Tage nach der B7.1-Behandlung, (b) 21 Tage nach der B7.1-Behandlung, (c) 7 Tage nach der B7.1/DMXAA-Kombinationstherapie, (d) 7 Tage nach der DMXAA-Verabreichung und (e) 7 Tage nach der Injektion des leeren Kontrollvektors. Der Tumorzellapoptose als Reaktion auf die B7.1-Monotherapie folgte die Nekrose (f) (siehe Apoptose(AI)- und Nekrose(NI)-Indizes), wohingegen der DMXAA-Monotherapie keine Tumorzellapoptose an den Untersuchungszeitpunkten vorausging.

[0019] [Fig. 6](#). Gefäßangreifende und B7.1-Therapien induzieren die Heraufregulierung der Wärmeschockproteine des Tumors. Immunhistochemischer Nachweis der hsp70-Expression in Tumoren 7 Tage nach der Verabreichung von (a) DMXAA $\times 40$, (b) B7.1/DMXAA-Kombination $\times 40$, (c) B7.1-Monotherapie $\times 40$, (d) B7.1/DMXAA-Kombination $\times 60$, (e) leerem Vektor $\times 60$ und (f) Abschnitte wie in (b) waren auch mit Kontroll-Ratten-IgG als primärem Antikörper gefärbt.

[0020] [Fig. 7](#). Die Behandlung eines einzelnen Tumorknotens führt zur Eradikation multipler entfernter Tumorknoten. An einer Flanke wurde ein großer Einzeltumor (Durchmesser etwa 0,5 cm), an der anderen Flanke vier kleinere Tumore eines Durchmessers von etwa 0,2 cm gesichert. Der Gentransfer des B7.1-cDNA-Expressionsplasmids auf den größeren Tumor und die anschließende systemische DMXAA-Therapie führten zur Abstoßung aller fünf Tumore. Die Mäuse blieben 35 Tage lang tumorfrei. Waren die injizierten Tumore nicht größer als die nicht injizierten Tumorknoten, wurde das Tumorwachstum jedoch aus irgend einem Grund nur verzögert.

[0021] [Fig. 8](#). Intratumorale (IT) Injektion von B7.1 und anschließende intratumorale Injektion von DMXAA. Es wurde die normale DMXAA-Dosis (25 mg/kg) injiziert. Die intraperitoneale (IP) Verabreichung von DMXAA erfolgte als Kontrolle. Helle Pfeile kennzeichnen eradierte Tumore, dunkle Pfeile euthanasierte Tiere.

[0022] [Fig. 9](#). Die Antisense-HIF-1-Therapie reguliert die Expression von HIF-1 und VEGF herunter und inhibiert die Bildung von Tumorblutgefäßen. (A) Herunterregulierung von HIF-1 und VEGF durch Antisense-HIF-1a-Therapie. In Tumoren eines Durchmessers von 0,1 cm wurden DOTAP-Liposome injiziert, die entweder einen leeren Vektor (a, c) oder Antisense-HIF-1a-cDNA (b, d) enthielten. Dargestellt sind repräsentative Tumorschnitte, die 4 Tage nach dem Gentransfer hergestellt und mit mAbs gegen HIF-1a (a, b) und VEGF (c, d) braun gefärbt wurden. (B) Die Antisense-HIF-1a-Therapie blockiert die Bildung neuer Tumorblutgefäße. (a) Dargestellt sind Schnitte, die aus 4 cm großen Tumoren präpariert wurden, in die 4 Tage zuvor entweder ein leerer Vektor (pcDNA3) oder Antisense-HIF-1a injiziert worden war. Die Endothelzellen in den Schnitten wurden mit dem Anti-CD31-mAb gefärbt, so dass Tumorblutgefäße erkennbar waren (Beispiele durch Pfeile gekennzeichnet). (C) Messung der Blutgefäßdichte. Die mit dem Anti-CD31-mAb gefärbten Blutgefäße wurden zur Aufzeichnung der mittleren Gefäßdichte in Tumoren in blind ausgewählten Zufallsfeldern gezählt.

[0023] [Fig. 10](#). Monotherapien mittels anti-angiogener Antisense-HIF-1a-Therapie und B7.1-vermittelter Immuntherapie sind nur bei kleinen Tumoren wirksam. In gesicherte Tumore eines Durchmessers von etwa 0,1 (a) und 0,4 (b) cm wurden am Tag 0 B7.1-cDNA oder Antisense-HIF-1a-cDNA enthaltende DOTAP-Liposome oder im Fall der Kontrolltiere ein leerer Vektor injiziert. Die Größe (cm) der Tumore wurde nach dem Gentransfer aufgezeichnet. Die vollständige Tumorregression ist durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten (durch Sterne gekennzeichnet).

[0024] [Fig. 11](#). Die Kombination aus Antisense-HIF-1a-Therapie und B7.1-Immuntherapie bewirkt die rasche Abstoßung großer Tumore. In Tumoren eines Durchmessers von 0,4 cm wurden B7.1-cDNA enthaltende DOTAP-Liposome injiziert und 48 Stunden später entweder Antisense(aHF)- oder Sense(sHF)-HIF-1a-cDNA. Die Kontrolltiere erhielten einen leeren Vektor. Die Größe (cm) der Tumore wurde nach dem Gentransfer aufgezeichnet. Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten (durch Sterne gekennzeichnet). Die vollständige Tumorregression ist durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. Die geheilten Mäuse erhielten eine erneute Tumor-Challenge mit 1×10^6 Stammumorzellen, doch es entwickelten sich während der 2-monatigen Überwachung keine Tumore (Daten nicht dargestellt).

[0025] [Fig. 12](#). Ergebnisse der Dreifachtherapie (Therapie mit DMXAA + B7.1 + Antisense-HIF-1) versus Er-

gebnisse der anderen Behandlungen. Die Dreifachbehandlung bewirkte die raschste Tumor eradikation. Allein oder miteinander verabreichte antiangiogene Reagenzien waren nicht wirksam.

IT = intratumoral, IP = intraperitoneal

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0026] Wie zuvor im weiteren Sinne dargelegt, stellt die vorliegende Erfindung eine Anwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittener oder starker Tumorbelastung bereit.

[0027] Es wurde festgestellt, dass fortgeschrittenes Tumorwachstum von der Fähigkeit der Tumore begleitet ist, unbekannte Mechanismen zu erwerben, mit deren Hilfe sie der systemischen Antitumor-Immunkontrolle des Körpers widerstehen können. Zwar kann die Verabreichung chemotherapeutischer Mittel oder anderer Krebstherapiemittel anfänglich eine Regression des Tumorwachstums bewirken, doch die Immunreaktion des Körpers kann das erneute Wachstum von nicht eradiertem Tumorgewebe im Körper nicht verhindern oder begrenzen.

[0028] Die Anmelder haben nun nachgewiesen, dass durch Kombination immuntherapeutischer Verfahren und chemotherapeutischer Verfahren, die bewiesenermaßen bei der Langzeitbehandlung einer fortgeschrittenen oder großen Tumorbelastung unwirksam sind, eine Regression der Tumore mit der Stimulation einer starken systemischen Antitumor-Immunkontrolle kombiniert wird.

[0029] Die beiden eingesetzten therapeutischen Mittel funktionieren synergistisch und liefern eine Kombinationswirkung, die die anhand der bekannten Eigenschaften der Einzelsubstanzen voraussagbare Wirkung übersteigt.

[0030] Es hat sich herausgestellt, dass ein optimaler Gentransfer T-Zellen kostimulierender Zelladhäsionsmoleküle (CAM) wie B7.1, B7.2 und xenogener (humaner) Formen der Integrinliganden VCAM-1, MAdCAM-1 und ICAM-1 eine rasche und vollständige Abstoßung gesicherter kleiner Tumore bewirkt. Es wird eine länger anhaltende systemische Antitumor-Immunität erzeugt, wohingegen andere Zelladhäsionsmoleküle wie humanes E-Cadherin das Tumorwachstum nur wenig verlangsamen können. Die CAM-vermittelte Immuntherapie ist jedoch insofern problematisch, da sie nur bei kleinen Tumoren wirksam ist und nur eine schwache systemische Antitumor-Immunität erzeugt. Eine größere Tumorbelastung kann die Erzeugung zytotoxischer Antitumor-T-Lymphozyten (CTL), die die Tumore gegen die Immuntherapie resistent machen, behindern oder verzögern.

[0031] Die Antikrebsmittel Flavonessigsäure (FAA) und 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure (DMXAA) bewirken bei Verabreichung anfänglich eine Reduktion der Tumogröße, doch die Tumore wachsen anschließend unkontrolliert und beide Reagenzien erzeugen nur eine schwache und unwirksame Antitumor-CTL-Reaktion. DMXAA und FAA scheinen ihre Antitumor-Wirksamkeit auf unterschiedlichem Wege auszuüben, z.B. durch Reduktion des Tumorblutflusses, was zur hemorragischen Nekrose führt, oder durch Induktion multipler immunmodulatorischer Faktoren wie Zytokine, Stickoxid und aktiver natürlicher Killerzellen. Keines der Mittel ist jedoch in der Lage, die gewünschte systemische Antitumor-Immunität zu erzeugen; beide sind sie bei einer großen Tumorbelastung unwirksam.

[0032] Die Entdeckung der Anmelder, dass die kombinierte Verabreichung dieser Mittel sowohl bei der Eradikation fortgeschrittener oder großer Tumore als auch bei der Erzeugung einer systemischen Antitumor-Immunität wirksam ist, ist daher überraschend und stellt einen signifikanten Fortschritt in der Krebsbehandlung dar.

[0033] Das immuntherapeutische Mittel kann z.B. DNA (für gewöhnlich cDNA) sein. Solche DNA kann synthetisiert oder aus kommerziellen oder anderen Quellen bezogen werden. B7.1 kann von Dr. P. Linsley, Bristol-Meyers-Squibb, Seattle, Washington, USA bezogen werden.

[0034] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird das immuntherapeutische Mittel in Form eines Säugerexpressionsvektors verabreicht. Zwar kann jeder für den Fachmann verfügbare Vektor ausgewählt werden, typische Vektoren sind jedoch z.B. Expressionsplasmide wie pcCDNA3 und pCDM8 sowie Vektoren auf Adenovirus- und Retrovirusbasis (z.B. pLXSN und pLNCX).

[0035] Alternativ kann das immuntherapeutische Mittel in einer anderen Form als einem Säugerexpressions-

vektor direkt verabreicht werden, d.h. es ist nicht ausschlaggebend, dass das immuntherapeutische Mittel mittels Gentherapie verabreicht wird. T-Zellen kostimulierende CAM-Proteine, die an der Zelloberfläche befestigt werden können, könnten beispielsweise systemisch verabreicht werden.

[0036] Das Tumorwachstum begrenzende Mittel ist FAA oder ein funktionelles Analog von XAA (DMXAA).

[0037] HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der für das Hypoxie-Sensing und Einschalten hypoxie-induzierbarer Gene, die die Erzeugung von Tumorblutgefäßen stimulieren, verantwortlich ist. Daher umfasst die Anwendung in einer bevorzugten Ausführungsform die Verabreichung des immuntherapeutischen Mittels B7.1 oder eines dieses Mittel codierenden Expressionsvektors in Kombination mit einem eine Antisense-Version von HIF-1 codierenden Expressionsvektor.

[0038] Das immuntherapeutische Mittel und das Tumorwachstum begrenzende Mittel können in jeder geeigneten Form unter Verwendung von im Stand der Technik bereits bekannten Formulierungen für die einzelnen Substanzen verabreicht werden. Die erforderliche Verabreichungsform und -dosierung hängt von dem für die erfindungsgemäße Anwendung gewählten speziellen immuntherapeutischen Mittel und Tumorwachstum begrenzenden Mittel ab.

[0039] Ist das Tumorwachstum begrenzende Mittel beispielsweise DMXAA, wird das DMXAA vorzugsweise in der niedrigsten wirksamen Dosis verabreicht. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das DMXAA direkt in das Tumorgewebe injiziert. Die Anmelder haben außerdem diesbezüglich entdeckt, dass die Injektion von DMXAA direkt in den Tumor die erforderliche Wirkdosis reduzieren kann.

[0040] Die Anmelder haben weiterhin entdeckt, dass zusätzlich zu dem immuntherapeutischen Mittel und dem ersten Tumorwachstum begrenzenden Mittel vorteilhafterweise ein weiteres Tumorwachstum begrenzendes Mittel (insbesondere ein antiangiogenes Mittel) verabreicht werden kann, um eine zusätzliche therapeutische Wirkung zu erzielen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird z.B. die Verabreichung eines Expressionsvektors, der das immuntherapeutische Mittel B7.1 und das Tumorwachstum begrenzende Mittel DMXAA codiert, mit einer Antisense-Therapie gegen HIF-1 kombiniert.

[0041] Auch wenn das Tumorwachstum begrenzende Mittel DMXAA ist und direkt in den Tumor injiziert wird, wird vorzugsweise gleichzeitig systemisch ein weiteres, weniger toxisches antiangiogenes Reagenz verabreicht.

[0042] Nachfolgend werden mit Bezug auf den folgenden Experimentalteil, der lediglich exemplarisch ist, Aspekte der Erfindung beschrieben.

EXPERIMENTALTEIL

Materialien und Verfahren

[0043] Mäuse und Zelllinien Von der Animal Resource Unit der School of Medicine and Health Science der Universität Auckland, Auckland wurden 6–9 Wochen alte C57BL/6-Mäuseweibchen bezogen. Die EL-4-Thymuslymphom- und Mäuse-Lewis-Lungenkarzinomzellen (LLC) (H-2b) wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) bezogen. Diese Zelllinien wurden *in vitro* bei 37°C in mit 10% fötalem Kälberserum; 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat ergänztem DMEM-Medium (Gibco BRL) kultiviert.

[0044] Experimentelles Tumormodell. Tumore wurden durch subkutane Injektion von 2×10^5 EL-4- und LLC-Zellen in die linke Flanke von Mäusen gesichert und das Wachstum durch Messen zweier senkrechter Durchmesser bestimmt. Die Tiere wurden gemäß der Animals Ethics Approval (Universität Auckland) euthanasiert, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten. Die EL-4- und LLC-Tumore erreichten nach etwa 21 bzw. 14 Tagen einen Durchmesser von 0,6 bis 0,9 cm. Alle Experimente schlossen 5 oder 6 Mäuse pro Behandlungsgruppe ein und wurden mindestens einmal wiederholt.

[0045] Verabreichung von FAA- und DMXAA-Analogen. FAA wurde uns vom Department of Health & Human Services, Drug Synthesis & Chemistry Laboratory, National Cancer Institute, Bethesda, USA überlassen. Das Natriumsalz von DMXAA wurde im Auckland Cancer Society Research Centre, School of Medicine and Health Science, Universität Auckland synthetisiert. Für jedes Experiment wurden frische Lösungen von FAA und DMXAA in 5% (w/v) Natriumbicarbonat bzw. Wasser hergestellt und vor Licht geschützt. FAA und DMXAA (300

mg/kg bzw. 25 mg/kg Körpergewicht) wurden in einer Menge von 0,01 ml/g Körpergewicht i.p. injiziert.

[0046] Gentransfer von B7.1. Komplementäre, humanes VCAM-1 voller Länge codierende DNA wurde von R & D Systems, Abingdon, England bezogen, humanes B7.1 (Freeman et al., 1993) von Dr. G. Freeman, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MD zur Verfügung gestellt, humanes ICAM-1 von Dr. J. Ni, Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD gespendet und Mäuse-B7.1 (Chen et al., 1992) von Dr. P. Linsley, Bristol-Meyers-Squibb, Seattle, WA zur Verfügung gestellt. Wir haben bereits über die Klonierung und Charakterisierung von humaner MAdCAM-1-cDNA (Leung et al., 1996) berichtet. Die CAM-pCDM8-Expressionsvektoren wurden durch Zentrifugieren mit einem Cäsiumchloridgradienten hergestellt und in einer Lösung von 5% Glucose in 0,01% Triton X-100 auf 600 µg/ml verdünnt. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:3 (w/w) mit kationischen DOTAP-Liposomen (Boehringer Mannheim, Deutschland) gemischt. Sofern nicht anders angegeben, wurden in die Tumore 100 µl DNA (60 µg)/Liposomenkomplexe injiziert.

[0047] Kombination von B7.1-vermittelter Immuntherapie und FAA/DMXAA-vermittelter gefäßangreifender Therapie. In Tumore eines Durchmessers von 0,6 bis 0,9 cm wurden an mehreren Stellen 100 µl DNA (60 µg)/Liposomenkomplexe injiziert. 24 Stunden später wurde DMXAA oder FAA wie zuvor beschrieben i.p. verabreicht. Den behandelten Mäusen, die tumorfrei blieben, wurden 6 Wochen nach der Verabreichung von FAA oder DMXAA und B7.1 EL-4-Zellen und LLC-Zellen (0,1 ml) subkutan in die gegenüber liegende Flanke (rechte Flanke) injiziert.

[0048] Messung der Antitumor-CTL-Erzeugung. 21 und 42 Tage nach dem ursprünglichen Gentransfer sowie 22 Tage nach der erneuten Tumor-Challenge mit Stammtumorzellen wurden Splenozyten entnommen. Sie wurden bei 37°C mit EL-4-Targetzellen in abgestuften E:T-Verhältnissen in Rundbodenplatten mit 96 Vertiefungen inkubiert. Nach 4-stündiger Inkubation wurden 50 µl Überstand gesammelt und die Lyse mittels des Cyto Tox 96 Testkits (Promega, Madison, WI, USA) gemessen. Es erfolgten Hintergrundkontrollen auf eine unspezifische Target- und Effektorzellyse. Nach der Hintergrundsubtraktion wurde der Prozentsatz der Zellyse nach folgender Formel berechnet: $100 \times (\text{experimentell-spontanes Effektor-Target spontanes Target} / \text{maximales Target-spontanes Target})$.

[0049] Adoptive Übertragung von Antitumor-CTL. Die adoptive Übertragung von Antitumor-Splenozyten erfolgte wie zuvor beschrieben (Kanwar et al., 1999). Kurz gesagt wurden die 21 Tage nach der Therapie aus Mäusen gewonnenen Splenozyten erneut in Hanks ausgewogener, 1% fötales Kälberserum enthaltender Salzlösung suspendiert und mit 5 µg/ml PHA und 100 U/ml rekombinantem Mäuse-IL-2 4 bis 5 Tage lang stimuliert. Tiere mit Tumoren eines Durchmessers von 0,6 cm erhielten sowohl intratumoral als auch i.p. Injektionen von 2×10^8 kultivierten Splenozyten.

[0050] Reduktion von Leukozytenuntergruppen. Bei Mäusen wurde durch i.p. und i.v. Injektion von 300 µg (0,1 ml) 53-6.72(anti-CD8)-Gk1.5(anti-CD4)- und PK136(anti-NK)-mAbs 4 Tage vor dem Gentransfer und anschließend jeden zweiten Tag die Zahl der CD8+- und CD4+-T-Zellen und NK-Zellen reduziert. Als Kontrollantikörper wurde Ratten-IgG (Sigma, USA) eingesetzt. Die Antikörper bestanden aus einer Aszites-Ammoniumsulphatfraktion mit einem Titer von mindestens 1:2.000 (bestimmt mittels FACS, Becton Dickinson & Co., CA, USA), die Splenozyten einfärbten. Es hat sich herausgestellt, dass die Reduktion einzelner Leukozytenuntergruppen gemäß Bestimmung durch FACScan-Analyse zu mehr als 90% wirksam war. mAbs gegen CD8(53-6.72 mAb), CD4(Gk1.5 mAb) und NK-Zellen (PK136 mAb) von Mäusen sezernierende Rattenhybride wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA bezogen.

[0051] In situ-Nachweis apoptotischer Zellen. Die Tumore wurden exzisert, sofort in Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Es wurden Serienschnitte einer Dicke von 6 µm präpariert. Es erfolgte eine TUNEL-Färbung mit Hilfe eines in situ-Apoptosenachweis-Kits von Boehringer Mannheim, Deutschland. Kurz gesagt wurden die gefrorenen Schnitte mit einer Paraformaldehydlösung (4% in PBS, pH 7,4) fixiert und mit einer 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat enthaltenden Lösung permeabilisiert. Nach dem Waschen wurden sie mit 20 µl TUNEL-Reagenz 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Einige Objektträger wurden mit Propidiumjodid (PI, Sigma, CA, USA) gegengefärbt, um nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Angrenzende Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegegenfärbt und montiert. Die Gesamtzahl der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen wurde gezählt. Der Apoptoseindex (AI) bzw. Nekroseindex (NI) wurde wie folgt berechnet: AI oder NI = Anzahl der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen × 100/Gesamtzahl der Zellen mit Zellkern.

[0052] Immunhistologie. Die Tumore wurden 7 Tage nach Verabreichung der therapeutischen Mittel und Kontrollen exzisert, sofort in Trockeneis eingefroren und bei -70°C in Isopentan gelagert. Es wurden Schnitte einer

Dicke von 10 µm präpariert. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern montiert und die endogenen Peroxidasen durch 30-minütige Inkubation der Objektträger in 0,3% H₂O₂ in Methanol blockiert. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Maus/Maus-Immunnachweis-ABC-Elite-Peroxidase-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit Mäuse-anti-Hsp70-mAb (SPA-810-Antikörper, StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Kanada) gefärbt. Sie wurden mit SIGMA FAST DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) mit CoCl₂-Metallenhancer-Tabletten entwickelt und mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Als Kontrolle wurde der primäre Antikörper durch Ratten-IgG (Sigma, USA) substituiert.

[0053] Statistische Analyse. Sämtliche in vivo durchgeführten Experimente wurden mindestens einmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte + Standardabweichung (SD) ausgedrückt; die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests von Student bewertet. Ein Wert von $p < 0,05$ bezeichnet eine statistische Signifikanz, wohingegen $p < 0,001$ hochsignifikante Ergebnisse kennzeichnet.

ERGEBNISSE

[0054] Die CAM-Gen-Monotherapie eignet sich nicht zur Kontrolle des Wachstums großer Tumore. In Mäuse subkutan implantierte EL-4-Zellen (2×10^5) wachsen rasch und bilden innerhalb von 4 Wochen einen festen Tumor eines Durchmessers von 1 cm. Wir haben bereits belegt, dass *in situ* mit B7.1-, B7.2-, VCAM-1- und ICAM-1-cDNA transfizierte kleine EL-4-Tumore (Durchmesser von 0,1 bis 0,3 cm) nicht wuchsen und die Mäuse mindestens zwei Monate lang tumorfrei blieben (Kanwar et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind größere Tumore ($> 0,5$ cm), wie in [Fig. 1a](#) dargestellt, gegen die Behandlung als Reaktion auf B7.1 und mehrere andere kostimulierende CAMs resistent. Das Tumorwachstum wird zwar verlangsamt, doch letztendlich wächst der Tumor unkontrolliert.

[0055] DMXAA und FAA können das Wachstum großer Tumore nicht kontrollieren. Die systemische Verabreichung optimaler DMXAA- und FAA-Dosen an Mäuse mit großen EL-4-Tumoren (Durchmesser von 0,6 bis 0,8 cm) führte zu einer unmittelbaren Größenreduktion der Tumore ([Fig. 1b](#)), begleitet von einer ausgeprägten Tumornekrose (siehe unten). DMXAA war das wirksamere der beiden Reagenzien und bewirkte, dass die Tumore über einen Zeitraum von 3 Wochen auf 0,1 bis 0,2 cm schrumpften, wohingegen die Tumore der mit FAA behandelten Tiere auf einen Durchmesser von 4,2 bis 0,4 cm reduziert wurden. Die Tumore begannen jedoch ab Tag 28 unkontrolliert zu wachsen und die Tiere mussten in der sechsten Woche getötet werden.

[0056] Kombinierte Therapie durch zeitlich gestufte Verabreichung von B7.1 und DMXAA/FAA eradiert grobe Tumore. Wir stellten die Hypothese auf, dass die gleichzeitige Verabreichung des B7.1-pCDM8-Expressionsvektors und DMXAA/FAA die CAM-vermittelte Antitumor-Immunität behindern könnte, da sterbende und nekrotische Tumorzellen B7.1 nicht adäquat exprimieren können.

[0057] Diese Annahme erwies sich als richtig; daher wurden die gesicherten Tumore (Durchmesser von 0,6 bis 0,8 cm) zunächst zur Stimulation der Antitumor-Immunität mit B7.1 und einen Tag später zur Verzögerung des Tumorwachstums mit DMXAA und FAA behandelt. Bemerkenswerterweise wurden die Tumore als Reaktion auf die Kombination aus B7.1 und DMXAA rasch kleiner; begleitet wurde dies von einer massiven Nekrose, so dass die Tumore in der dritten Behandlungswoche vollständig verschwunden waren ([Fig. 1b](#)). Die großen Tumore der mit DMXAA/B7.1 behandelten Tiere nahmen das Aussehen einer rasch heilenden Wunde an, die Schorf bildete, der schließlich abblätterte und eine perfekt verheilte Haut hinterließ. Anders als bei der B7.1-Behandlung, bei der etwas, das wie ein tastbarer fibrotischer Kern zu sein scheint, zurückbleibt, waren die Tumorstellen der mit DMXAA/B7.1 behandelten Tiere vollständig verheilt ([Fig. 1c](#)). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Kombination aus FAA und B7.1 erzielt, wobei die Tumore jedoch erst in der sechsten Woche vollständig verschwanden.

[0058] Die Kombinationstherapie erzeugt eine wirksame und lang anhaltende tumorspezifische zytolytische T-Zellen-Wirksamkeit. Die Antitumor-CTL-Wirksamkeit von Splenozyten, die 21 Tage nach dem Gentransfer aus behandelten Mäusen gewonnen wurden, war bei Tieren, die mit der Kombination aus B7.1 und DMXAA behandelt worden waren, im Vergleich zu Tieren, die eine B7.1-Monotherapie erhalten hatten, signifikant ($p < 0,001$) verbessert und im Falle der Kombination von B7.1 und FAA leicht verbessert ([Fig. 2a](#)). Im Gegensatz dazu waren DMXAA und FAA alleine sehr schlechte Effektoren, auch wenn sie die CTL-Produktion im Vergleich zu leeren Vektoren und Liposomkontrollen erhöhten.

[0059] Zuvor durch die Kombinationstherapie geheilte Tiere stießen die erhebliche Tumor-Challenge mit 1×10^7 Stammzellen während der 40-tägigen Überwachungszeit vollständig ab ([Fig. 1b](#), Tabelle 1). Sowohl die DMXAA/B7.1- als auch die FAA/B7.1-Therapie führte zu einem vollständigen Schutz, was darauf deutet,

dass eine wirksame systemische Antitumor-Immunität erzielt worden war. Die Antitumor-CTL-Wirksamkeit war 42 Tage nach der ursprünglichen Behandlung mit DMXAA/B7.1 noch immer sehr stark und wurde nach der erneuten Tumor-Challenge mit Stammtumorzellen weiter stimuliert ([Fig. 2a](#)).

[0060] Wir haben bereits berichtet, dass die adoptive Übertragung von Splenozyten aus Mäusen, deren Tumore mit B7.1 behandelt worden waren, zu einer Eradikation der Tumore in den Empfängern führt (Kanwar et al., 1999). Dementsprechend führte die adoptive Übertragung von 2×10^8 Splenozyten aus mit B7.1/DMXAA und B7.1/FAA behandelten Mäusen auf Empfänger mit gesicherten EL-4-Tumoren (Durchmesser von bis zu 0,8 cm) zu einer raschen und vollständigen Tumorregression ([Fig. 2b](#)). Tumore eines Durchmessers von mehr als 0,8 cm waren gegen eine solche Behandlung resistent. Im Gegensatz dazu zeigten die Splenozyten von mit DMXAA oder einem leeren Vektor behandelten Mäusen keine nachweisbare Antitumor-Wirksamkeit.

[0061] Zusammensetzung der Leukozyten-Effektor-Population. Studien zur in vivo-Antikörperblockade zeigten, dass die primäre Abstoßung von Tumoren als Reaktion auf die kombinierte DMXAA/B7.1- oder FAA/B7.1-Therapie stark vom Vorliegen von CD8+-T-Zellen und NK-Zellen abhängt, jedoch nur teilweise vom Vorliegen von CD4+-T-Zellen. Die gleichzeitige Reduktion der CD8+-T-Zellen und NK-Zellen, CD4+- und CD8+-T-Zellen bzw. CD4+/CD8+-T-Zellen und NK-Zellen behinderte die Antitumor-Immunität erheblich, was zu einem raschen Tumorwachstum führte ([Fig. 3](#)).

[0062] Die Antitumor-Immunität ist tumorspezifisch. Ähnliche Ergebnisse wie oben wurden bei dem schwach immunogenen LLC erzielt. Daher heilte die kombinierte B7.1/DMXAA-Therapie Mäuse vollständig von subkutanem LLC und erzeugte eine systemische Antitumor-Immunität, die alle Mäuse bei einer Tumor-Challenge mit 1×10^5 Stammtumorzellen und 80% der Mäuse bei einer Tumor-Challenge mit 1×10^7 Stammtumorzellen schützte (Tabelle 1). Die von EL-4-Tumoren geheilten Mäuse waren jedoch gegen eine Tumor-Challenge mit 1×10^4 LLC-Zellen nicht resistent; umgekehrt waren die von LLC geheilten Mäuse bei einer Tumor-Challenge mit 1×10^4 EL-4-Zellen nicht geschützt, was belegt, dass die Antitumor-Immunität tumorspezifisch ist.

[0063] Gendosiswirkung. FAA und DMXAA zeigen beide ein ungewöhnliches "Schwellen" Verhalten, bei dem nur ein sehr enger Hochdosisbereich (22,5 bis 25 mg/kg Körpergewicht) wirksam und bezüglich der Toxizität akzeptabel ist (Baguley et al., 1993; Pedley et al., 1996). Weiterhin haben wir bereits berichtet, dass B7.1 und andere kostimulierende CMAs eine restriktive Gendosiswirkung aufweisen, so dass der Gentransfer von 60 µg B7.1/pCDM8-Expressionsplasmid optimal ist, wohingegen kleinere oder größere Mengen weit weniger wirksam sind (Kanwar et al., 1999). Um zu untersuchen, ob eine hohe Gendosis die Kombinationstherapie behindert, wurden variierende Mengen (90–180 µg) des B7.1/pCDM8-Plasmids in die Tumore injiziert und anschließend eine optimale Dosis DMXAA (25 mg/kg) verabreicht ([Fig. 4a](#)). Sämtliche Mäuse stießen die Tumore sowie eine erneute Tumor-Challenge mit 2×10^5 EL-4-Stammzellen rasch ab. Daher wird mit einem breiten Hochdosisbereich des therapeutischen Gens und einer optimalen DMXAA-Dosis ein identisches Ergebnis erzielt. Im Gegensatz dazu ist eine Gendosiswirkung bei suboptimaler DMXAA-Konzentration deutlich sichtbar, so dass nur große Menge (180 µg) B7.1/pCDM8-Expressionsplasmid eine wirksame Antitumor-Immunität erzeugen können ([Fig. 4b](#)).

[0064] Mechanismen der B7.1- und DMXAA-vermittelten Tumorregression. Wir haben bereits berichtet, dass eine CAM-vermittelte Antitumor-Immunität von einer verbesserten CTL-Wirksamkeit über den Perforin- und Fas-Liganden-Weg begleitet ist, was darauf deutet, dass EL-4-Zellen Ziele für den immunvermittelten programmierten Zelltod sind (Kanwar et al., 1999). Diese Annahme wurde durch das TUNEL-Färben der 7, 14 bzw. 21 Tage nach dem B7.1-Gentransfer präparierten Tumorschnitte bestätigt. Die Schnitte wurden mit PI, das nur die DNA nekrotischer Zellen färbt, gegengefärbt, was eine Unterscheidung nekrotischer und apoptotischer Zellen erlaubt. Die B7.1-Immuntherapie wurde an Tag 7 von einer ausgeprägten Tumorzellapoptose (grüne Fluoreszenz) begleitet, die 14 Tage nach dem Gentransfer ihren Höhepunkt erreichte und an Tag 21 durch eine ausgeprägte Nekrose (orange-farbene Fluoreszenz) ersetzt wurde ([Fig. 5a, b und f](#)). Im Gegensatz dazu herrschten in Tumorschnitten von DMXAA-behandelten Mäusen nekrotische Zellen vor, wohingegen nur wenige apoptotische Zellen vorhanden waren ([Fig. 5d](#)). Überraschenderweise erhöhte die Kombinationstherapie die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur B7.1-Monotherapie ([Fig. 5c](#)), wohingegen der bei der DMXAA-Monotherapie beobachtete Nekrosegrad gleich war. Unbehandelte Tumore zeigten kein Zeichen von Nekrose und wiesen keine apoptotischen Zellen auf ([Fig. 5e](#)).

[0065] Wir stellten die Hypothese auf, dass die leicht erhöhte Erzeugung von CTL als Reaktion auf DMXAA eine indirekte Wirkung sein könnte, die durch die CTL-Erzeugung als Reaktion auf die herauf geregelten Wärmeschockproteine auf belasteten und sterbenden Tumorzellen bewirkt wird. In der Tat stellte sich heraus, dass das Wärmeschockprotein 70 auf den Tumorzellen um Blutgefäße herum oder in ihrer Nähe konsistent herauf-

geregelt war (**Fig. 6**). In ähnlicher Weise war hsp70 bei B7.1-behandelten Tumoren heraufgeregelt, jedoch nicht notwendigerweise in der Nähe von Blutgefäßen. Im Gegensatz dazu wiesen nur mit einem leeren Vektor behandelte Tumore kein Zeichen einer erhöhten hsp70-Expression auf.

Tabelle 1. Kombinationstherapie induziert tumorspezifische Immunität^a

Injiziert rte Tumor- zellen	Mäuse mit Tumor- Challeng e	Tumor- Challeng e- Dosis	Tumor- häufigk eit	Beginn des Tumor- wachstums (Tage) Tumogröße < 0,2 cm	Zeitpunkt der Tötung (Tage) ^b (Tumogröße < 1,0 cm)
EL-4	EL-4	1×10^4	0/6	-	-
		1×10^5	0/6	-	-
		1×10^7	0/6	-	-
EL-4	LLC	1×10^4	5/5	16-24	$35 \pm 4,2$
		1×10^5	5/5	14-20	$30 \pm 5,1$
LLC	LLC	1×10^7	5/5	14-19	$29 \pm 4,3$
		1×10^4	0/6	-	-
		1×10^5	0/6	-	-
LLC	EL-4	1×10^7	1/6	-	29
		1×10^4	5/5	18-26	$38 \pm 6,1$
		1×10^5	5/5	16-22	$36 \pm 6,1$
		1×10^7	5/5	16-24	$33 \pm 4,5$

^aDie Tumore wurden mit EL-4- oder LLC-Tumorzellen gesichert und B7.1-DNA intratumoral injiziert. 24 Stunden später wurde DMXAA i.p. verabreicht. Nach 21 Tagen erhielten die Tiere eine Tumor-Challenge.

^bDie Werte stellen das Mittel + SD (berechnet aus 5 oder 6 Mäusen pro Gruppe) dar.

[0066] Der Gentransfer eines Antisense-HIF-1a codierenden Expressionsplasmids induziert die Abstoßung gesicherter Tumore. In C57BL/6-Mäusen wurden EL-4-Tumore eines Durchmessers von 0,1 cm gesichert und ein 100 µg Antisense-HIF-1a-pcDNA3B-Plasmid-DNA enthaltendes DNA/Liposom-Transfektionsvehikel injiziert. Die immunhistochemische Analyse der 2 Tage nach dem Gentransfer präparierten Tumorschnitte zeigte, dass die Antisense-Therapie zu einer fast vollständigen Inhibition des in wachsenden Tumoren endogen exprimierten HIF-1 führte (**Fig. 9a**). Das Tumorwachstum wurde nach dem Gentransfer 4 Wochen lang überwacht (**Fig. 10a**). Das Wachstumsmuster wurde mit Kontrollmäusen verglichen, die mit 100 µg eines leeren Vektors behandelt worden waren. Die Tumore in der Kontrollgruppe wuchsen rasch und erreichten 14 bis 17 Tage nach dem Gentransfer eine Größe von 1 cm, wohingegen die mit dem Antisense-HIF-1a-Plasmid behandelten Tumore innerhalb einer Woche nach dem Gentransfer vollständig und rasch verheilten. Die Mäuse blieben weitere 21 Tage lang, während derer sie überwacht wurden, tumorfrei.

[0067] Die Antisense-HIF-1a-Therapie führt nicht zur Eradikation großer Tumore, verlangsamt aber deren Wachstum. Wir haben bereits belegt, dass Tumore, sobald sie einen Durchmesser von 0,3 cm erreichen, gegen die Immuntherapie resistent werden.¹ Um zu bestimmen, ob die Antisense-HIF-1a-Therapie bei großen Tumoren ähnlich unwirksam ist, wurden EL-4-Tumore eines Durchmessers von 0,4 cm gesichert und mit 100 µg Antisense-HIF-1a-Expressionsplasmid behandelt. Wie in **Fig. 10b** dargestellt, stieß keine der Mäuse die Tumore ab, auch wenn es zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Inhibition des Tumorwachstums kam. Alle Tumore erreichten schließlich innerhalb von 2 Wochen einen Durchmesser von 1 cm, so dass die Mäuse euthanasiert werden mussten.

[0068] Gefäßangreifende Therapie durch synergistische Wirkung von Antisense-HIF-1a-Therapie und B7.1-Immuntherapie zur Eradikation großer Tumore. Hier erwägen wir die Möglichkeit, dass ein An-

ti-HIF-1a-Reagenz ein geeignetes anti-angiogenes Substitut für DMXAA bei der Kombinationstherapie sein könnte. Wie zuvor berichtet¹, führte der Gentransfer eines B7.1-Expressionsplasmids in kleine Tumore (Durchmesser von 0,1 cm) (**Fig. 10a**) innerhalb einer Woche nach dem Gentransfer zu einer vollständigen Tumorentfernung. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wachstumsmuster der mit B7.1 und Antisense-HIF-1a behandelten Tumore ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu waren große Tumore (Durchmesser von 0,4 cm) der Behandlung nicht zugänglich (**Fig. 10b**), wie z.B. im Fall der Antisense-HIF-1a-Therapie. Wie in früheren Arbeiten berichtet¹, ist das Nichtanschlagen der B7.1-Therapie nicht das Ergebnis einer schlechten Transfektionswirksamkeit, da der B7.1-Gentransfer in 90% der Tumorzellen zur Expression von B7.1 führte. Bei der Kombinationstherapie wurden zunächst 100 µg B7.1 enthaltende DNA/Liposom-Komplexe und 48 Stunden später 100 µg Antisense-HIF-1a-Plasmide in Tumore eines Durchmessers von 0,4 cm injiziert. Die kombinierte Gentherapie führte innerhalb von 10 Tagen zu einer vollständigen Tumorregression und die Mäuse blieben 3 Wochen lang tumorfrei (**Fig. 11**). Um zu bestimmen, ob eine systemische Antitumor-Immunität erzeugt worden war, erhielten die geheilten Mäuse eine Tumor-Challenge mit 1×10^6 Stammtumorzellen. Diese Mäuse waren gegen die Tumor-Challenge resistent und blieben mindestens 2 Monate lang tumorfrei.

[0069] Als Kontrolle wurde die Immuntherapie mit einem Expressionsplasmid kombiniert, welches das in pcDNA3 in Sense-Richtung eingefügte HIF-1a-cDNA-Fragment codiert. Im ausgeprägten Kontrast zu den obigen Ergebnissen konnte Sense-HIF-1a die therapeutische Wirksamkeit von B7.1 nicht verstärken (**Fig. 11**) und führte zu Ergebnissen, die sich statistisch nicht von den mit einem leeren Vektor behandelten Kontrollmäusen unterschieden ($p > 0,05$).

[0070] Die Antisense-HIF-1a-Therapie inhibiert die VEGF-Expression und reduziert die Dichte der Tumorblutgefäße. Unter der Annahme, dass Antisense-HIF-1a die Expression von HIF-1a in EL-4-Tumorzellen herunterreguliert, versuchten wir zu bestimmen, ob die Expression der nachgeschalteten Effektoren wie VEGF entfiel. Die VEGF-Expression war in Reaktion auf Antisense-HIF-1a spezifisch reduziert (**Fig. 9a**, vergleiche c und d), was zu einer statistisch signifikanten ($p < 0,01$) 30-prozentigen Reduktion der Tumorgefäßdichte (**Fig. 9b** und **9c**) im Vergleich zu einer Placebobehandlung mit einem leeren Vektor führte. Darüber hinaus waren die nach der Antisense-HIF-1a-Therapie vorhandenen Tumorblutgefäße klein und schlecht ausgebildet.

MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0071] Mäuse und Zelllinien Von der Animal Resource Unit der Faculty of Medicine and Health Science der Universität Auckland, Auckland, Neuseeland wurden 6–8 Wochen alte C57BL/6-Mäusemännchen bezogen. Die EL-4-Thymuslymphomzellen (C57BL/6(H-2b)-Ursprung) wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen. Sie wurden bei 37°C in mit 10% fötalem Kälberserum, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat ergänztem DMEM-Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) kultiviert.

[0072] Expressionsplasmide. Mittels PCR unter Verwendung des IMAGE-Klons 851237 als Vorlage und zwei Primern (5' GGG GAT CCT CTG GAC TTG TCT CTT TC 3' und 5' GGG CTC GAG TAA CTG ATG GTG AGC CTC 3') wurde ein 320 bp großes, das 5'-Ende von HIF-1a codierendes cDNA-Fragment (Nukleotide 152 bis 454, GenBank AF003698) hergestellt. Das Fragment wurde in pGEMT (Promega Corporation) kloniert und anschließend in pcDNA3 (Invitrogen Company) an den BamHI- und Xhol-Stellen in Sense-Richtung und in pcDNA3B an den Xhol- und BamHI-Stellen in Antisense-Richtung subkloniert. Der pcDNA3B-Expressionsvektor ist mit pcDNA3 identisch, mit Ausnahme eines umgekehrten Polylinkers (Lehnert et al., unveröffentlicht). Das Expressionsplasmid B7.1-pCDM8, das ein 1,2 kb großes, Mäuse-B7.1 voller Länge codierendes cDNA-Fragment enthält, wurde aus einem von Dr. P. Linsley, Bristol-Meyers-Squibb, Seattle, WA, USA bereitgestellten cDNA-Klon konstruiert.

[0073] Gentransfer der Expressionsplasmide und Messung der Antitumor-Wirksamkeit. Gereinigte Plasmide wurden in einer Lösung von 5% Glucose in 0,01% Triton X-100 verdünnt und in einem Verhältnis von 1:3 (w/w) mit kationischen DOTAP-Liposomen (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), einem wirksamen Transfektionsvehikel gemischt.¹ Die endgültige Plasmidkonzentration betrug 1 mg/ml. Die Tumore wurden durch Injektion von 2×10^5 EL-4-Tumorzellen in die rechte Flanke von Mäusen gesichert und das Wachstum durch Messen zweiter senkrechter Durchmesser bestimmt. Die Tiere wurden gemäß der Animal Ethics Approval (Universität Auckland) getötet, wenn die Tumore einen Durchmesser von mehr als 1 cm erreichten. Die Tumore erreichten nach etwa 14 bis 18 Tagen einen Durchmesser von 0,1 cm bzw. 0,4 cm und es wurden 100 µl Expressionsplasmid (100 µg) injiziert. Bei der Kombinationsbehandlung wurden die Reagenzien, wie zuvor bei der B7.1/DMXAA-Kombinationstherapie beschrieben, zeitlich abgestuft verabreicht. Daher wurde zunächst B7.1-cDNA und 48 Stunden später Antisense-HIF-cDNA injiziert. Leere Vektoren dienten als Kontrollreagen-

zien. Die geheilten Mäuse erhielten 3 Wochen nach dem Verschwinden der Tumore eine Tumor-Challenge in Form einer Injektion von 1×10^6 EL-4-Zellen subkutan in die gegenüber liegende Flanke (linke Flanke). Alle Experimente schlossen 6 Mäuse pro Gruppe ein und wurden mindestens einmal wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte + Standardabweichung (SD) ausgedrückt; die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests von Student bewertet. Ein Wert von weniger als 0,05 ($p < 0,05$) bezeichnet eine statistische Signifikanz.

[0074] Immunhistochemie. 2 Tage nach dem Gentransfer wurden Tumorkryoschnitte (10 μm) präpariert, mit Aceton behandelt, mit PBS gespült und 2 Stunden lang mit 2% BSA blockiert. Die Schnitte wurden über Nacht entweder mit Hamster-anti-B7.1-mAb (1G10, Pharmingen, San Diego, CA, USA), Mäuse-anti-Maus-HIF-1a-mAb (H1a67, Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, USA) oder polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen VEGF (Ab-1, Lab Vision, Corporation, CA, USA) inkubiert. Anschließend wurden sie 30 Minuten lang mit Hilfe des VECSTAIN Universal Quick-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit geeigneten sekundären Antikörpern inkubiert und mit Sigma FAST DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) und CoCl₂-Enhancer-Tabletten (Sigma) entwickelt. Die Schnitte wurde mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt, montiert und mikroskopisch untersucht.

[0075] Bewertung der Vaskularität. Das Verfahren zur Bewertung der Vaskularität war wie beschrieben.³³ Kurz gesagt wurden 4 Tage nach dem Gentransfer aus frisch eingefrorenen Tumoren 10 μm dicke Schnitte präpariert. Die Objekträger wurden mit dem Anti-CD31-Antikörper MEC13.3 (Pharmingen, CA, USA) wie oben immungefärbt. Die mit dem Anti-CD31-mAb gefärbten Blutgefäße wurden in blind ausgewählten Zufallsfeldern gezählt.

INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0076] Daher haben die Anmelder erfindungsgemäß ein Medikament zur Krebstherapie bereitgestellt, das bezüglich der Eradikation fortgeschritten oder großer Tumore einen signifikanten Fortschritte gegenüber früheren Ansätzen darstellt. Der durch die vorliegende Erfindung dargestellte Fortschritt ist besonders bemerkenswert, wenn das immuntherapeutische Mittel innerhalb eines geeigneten Zeitraumes vor Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels verabreicht wird. Dies führt zu einer vollständigen Eradikation einer großen Tumorbelastung und der Erzeugung einer wirksamen systemischen Antitumor-Immunität.

LITERATUR

1. Kanwar, J. R., Berg, R. W., Lehnert, K. und Krissansen, G. W. Taking lessons from dendritic cells: Multiple xenogeneic ligands for leukocyte integrins have the potential to stimulate anti-tumour immunity. *Gene Therapy*, 6: 1835–1844, 1999.
2. Hersey, P. Impediments to successful immunotherapy. *Pharmacol. Ther.*, 81: 11–119, 1999.
3. Griffioen, A. W., Damen, C. A., Mayo, K. H., Barendsz-Janson, A. F., Martinotti, S., Blijham, G. H. und Grueneegen, G. Angiogenesis inhibitors overcome tumour induced endothelial cell energy. *Int. J. Cancer*, 80: 315–319, 1999.
4. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. und Folkman, J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell*, 88: 277–285, 1997.
5. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. und Folkman, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315–328, 1994.
6. Corbett, T. H., Bissery, M. C., Wozniak, A., Polin, J., Tapazoglou, E., Dieckman, J. und Valeriote, F. Activity of flavone acetic acid (NSC-347512) against solid tumours of mice. *Investigational New Drugs*, 4: 207–220, 1986.
7. Shoemaker, R., Wolpert-DeFilipps, M., Plowman, J., Abbott, B., Venditti, J., Trader, M., Griswold, D., Gerlach, J. und Ling, V. Pleiotropic resistance and drug development. *Progress Clin. Biol. Res.*, 223: 143–149, 1986.
8. Zaharko, D. S., Grieshaber, C. K., Plowman, J. und Cradock, J. C. Therapeutic and pharmacokinetic relationships of flavone acetic acid: an agent with activity against solid tumours. *Cancer Treatment Reports*, 70: 1415–1421, 1986.
9. Plowman, J., Narayanan, V. L., Dykes, D., Szarvasi, E., Briet, P., Yoder, O. C. und Paull, K. D. Flavone acetic acid a novel agent with preclinical antitumour activity against colon adenocarcinoma 38 in mice. *Cancer Treatment Reports*, 70: 631–635, 1986.
10. Bibby, M. C. und Double, J. A. Flavone acetic acid – from laboratory to clinic and back. *Anti-Cancer Drugs*,

- 4: 3–17, 1993.
11. Baguley, B. C. und Ching, L. M. Immunomodulatory actions of xanthenone anticancer agents. *BioDrugs*, 8: 119–127, 1997.
12. Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, Jr. V. A., Lombard, L. A., Gray, G. S. und Nadler, L. M. Cloning of B7.2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 262: 909–911, 1993.
13. Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Ledbetter, J. A., McGowan, P. und Linsley, P. S. Costimulation of anti-tumour immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 71: 1093–1102, 1992.
14. Leung, E., Greene, J., Ni, J., Raymond, L. G., Lehnert, K., Langley, R. und Krissansen, G. W. Cloning of the mucosal addressin MAdCAM-1 from human brain: identification of novel alternatively spliced transcripts. *Immunol. Cell Biol.*, 74: 490–496, 1996.
15. Baguley, B. C., Cole, G., Thomsen, L. L. und Zhuang, L. Serotonin involvement in the antitumour and host effects of flavone-8-acetic acid and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33: 77–81, 1993.
16. Pedley, R. B., Boden, J. A., Boden, R., Boxer, G. M., Flynn, A. A., Keep, P. A. und Begent, R. H. Ablation of colorectal xenografts with combined radioimmunotherapy and tumour blood flow-modifying agents. *Cancer Res.*, 56: 3293–3300, 1996.
17. Finlay, G. J., Ching, L. M., Wilson, W. R. und Baguley, B. C. Resistance of cultured Lewis lung carcinoma cell lines to tiazofurin. *J. Nat. Cancer Inst.*, 79: 291–296, 1987.
18. Ching, L. M. und Baguley, B. C. Induction of natural killer cell activity by the antitumour compound flavone acetic acid (NSC 347 512). *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23: 1047–1050, 1987.
19. Ching, L. M. und Baguley, B. C. Effect of flavone acetic acid (NSC 347 512) on splenic cytotoxic effector cells and their role in tumour necrosis. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 25: 821–828, 1989.
20. Baguley, B. C., Zhuang, L. und Kestell, P. Increased plasma serotonin following treatment with flavone-8-acetic acid, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, vinblastine, and colchicine: relation to vascular effects. *Oncol. Res.*, 9: 55–60, 1997.
21. Thomsen, L. L., Ching, L. M. und Baguley, B. C. Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumour agents flavone-8-acetic acid and xanthenone-4-acetic acid. *Cancer Res.*, 50: 6966–6970, 1990.
22. Ching, L. M. und Baguley, B. C. Enhancement of in vitro cytotoxicity of mouse peritoneal exudate cells by flavone acetic acid (NSC 347512). *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24: 1521–1525, 1988.
23. Mahadevan, V., Malik, S. T., Meager, A., Fiers, W., Lewis, G. P. und Hart, I. R. Role of tumour necrosis factor in flavone acetic acid-induced tumour vasculature shutdown. *Cancer Res.*, 50: 5537–5542, 1990.
24. Ching, L. M., Joseph, W. R., Crosier, K. E. und Baguley, B. C. Induction of tumour necrosis factor-alpha messenger RNA in human and murine cells by the flavone acetic acid analogue 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (NSC 640488). *Cancer Res.*, 54: 870–872, 1994.
25. Ching, L. M., Goldsmith, D., Joseph, W. R., Körner, H., Sedgwick, J. D. und Baguley, B. C. Induction of intratumoral tumour necrosis factor (TNF) synthesis and hemorrhagic necrosis by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF knockout mice. *Cancer Res.*, 59: 3304–3307, 1999.
26. Ruegg, C., Yilmaz, A., Bieler, G., Bamat, J., Chaubert, P. und Lejeune, F. J. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumour vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nature Med.*, 4: 408–414, 1998.
27. Ching, L. M., Joseph, W. R. und Baguley, B. C. Antitumour responses to flavone-8-acetic acid and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid in immune deficient mice. *Br. J. Cancer*, 66: 128–130, 1992.
28. Bibby, M. C., Phillips, R. M., Double, J. A. und Pratesi, G. Anti-tumour activity of flavone acetic acid (NSC 347512) in mice – influence of immune status. *Br. J. Cancer*, 63: 57–62, 1991.
29. Pratesi, G., Rodolfo, M., Rovetta, G. und Parmiani, G. Role of T cells and tumour necrosis factor in antitumour activity and toxicity of flavone acetic acid. *Eur. J. Cancer*, 26: 1079–1083, 1990.
30. Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M. und Vile, R. G. Tumour immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nature Med.*, 4: 581–586, 1998.
31. Todryk, S., Melcher, A. A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M. P., Stoppacciaro, A. und Vile, R. G. Heat shock protein 70 induced during tumour cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J. Immunol.*, 163: 1398–1408, 1999.
32. Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J. Immunol.*, 149: 1115–1123, 1992.
33. Ryan, H. E., Lo, J. und Johnson, R. S. HIF-1a is required for solid tumour formation and embryonic vascularization. *EMBO J.*, 17: 3005–3015, 1998.

Patentansprüche

1. Verwendung eines immuntherapeutischen Mittels zusammen mit einem Tumorwachstum begrenzenden Mittel zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Säugern mit fortgeschrittener oder großer Tumorbelastung, wobei das Tumorwachstum begrenzende Mittel die Wirksamkeit des immuntherapeutischen Mittels verstärkt und eines von 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure (DXMAA) und Flavonessigsäure (FAA) ist und wobei das immuntherapeutische Mittel ein T-Zellen kostimulierendes Zelladhäsionsmolekül (CAM) oder einen Säugerexpressionsvektor, der DNA enthält, welche ein T-Zellen kostimulierendes CAM codiert, umfaßt, wobei das CAM B7.1 ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Tumorwachstum begrenzende Mittel 5,6-Dimethylxanthenon-4-essigsäure (DXMAA) ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Tumorwachstum begrenzende Mittel Flavonessigsäure (FAA) ist.
4. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Säuger ein Mensch ist.
5. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Medikament für die Verabreichung des immuntherapeutischen Mittels vor der Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels formuliert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Medikament für die Verabreichung des immuntherapeutischen Mittels 12 bis 24 Stunden vor der Verabreichung des Tumorwachstum begrenzenden Mittels formuliert ist.
7. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Medikament weiterhin ein zusätzliches Tumorwachstum begrenzendes Mittel enthält.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Fig. 1a

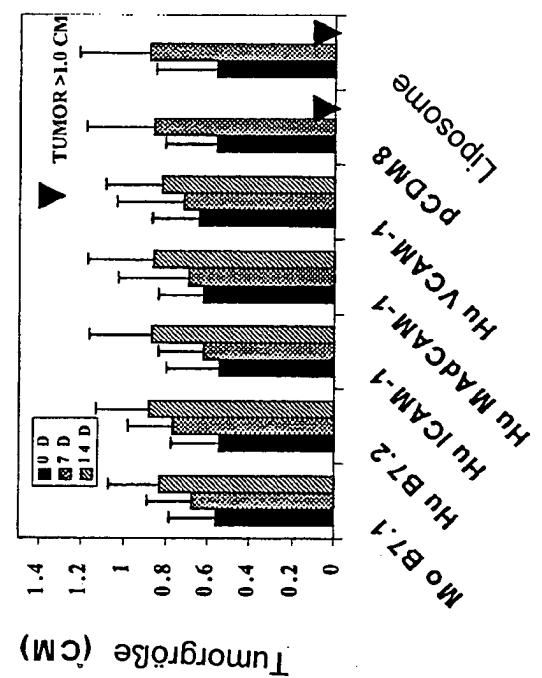


Fig. 1b

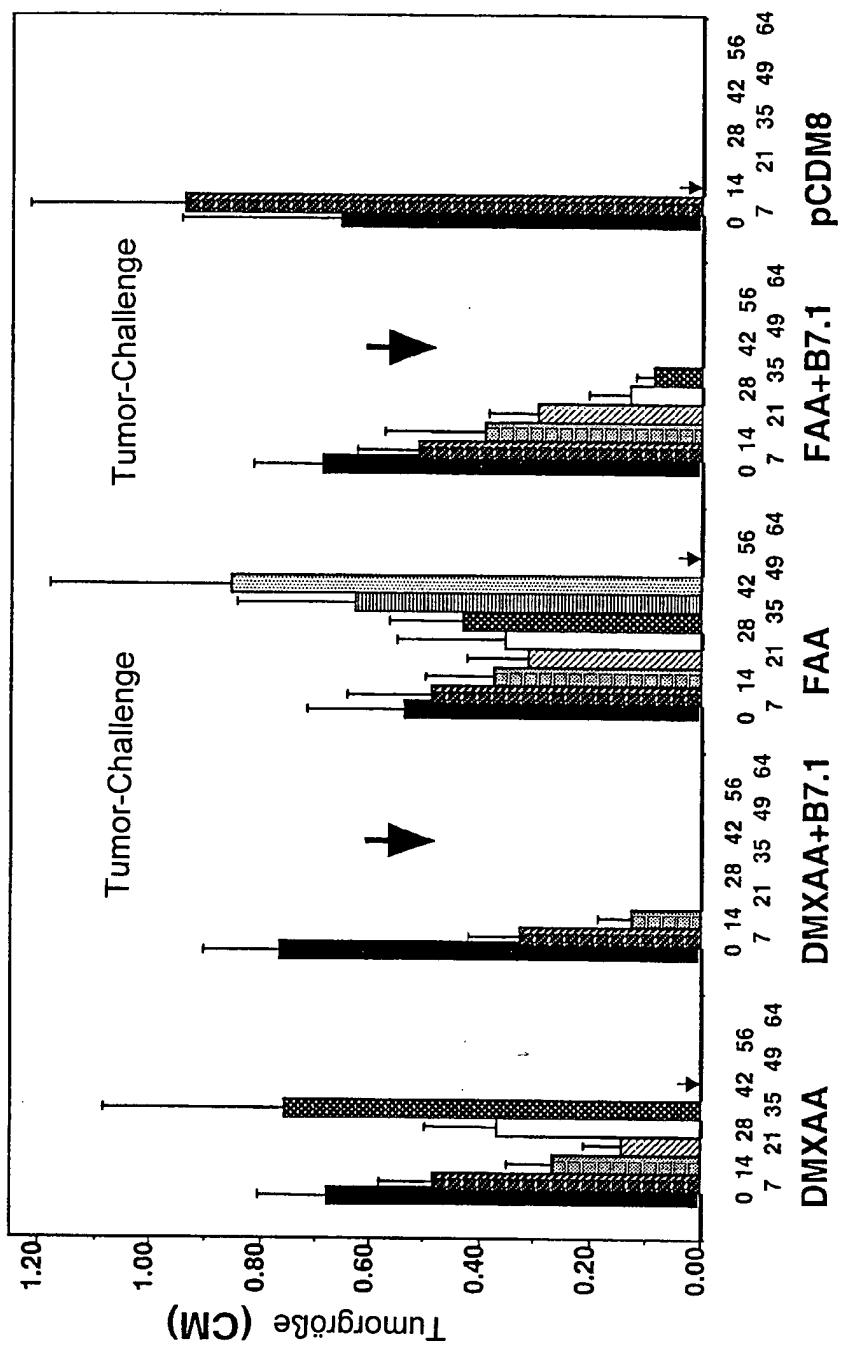


Fig 1c



Nach 21 Tagen gesicherter
EL-4-Tumor (0,8 cm) 8 Tage nach Behand-
lung mit B 7.1 + DMXAA 29 Tage nach Behand-
lung mit B 7.1 + DMXAA

Fig. 2a

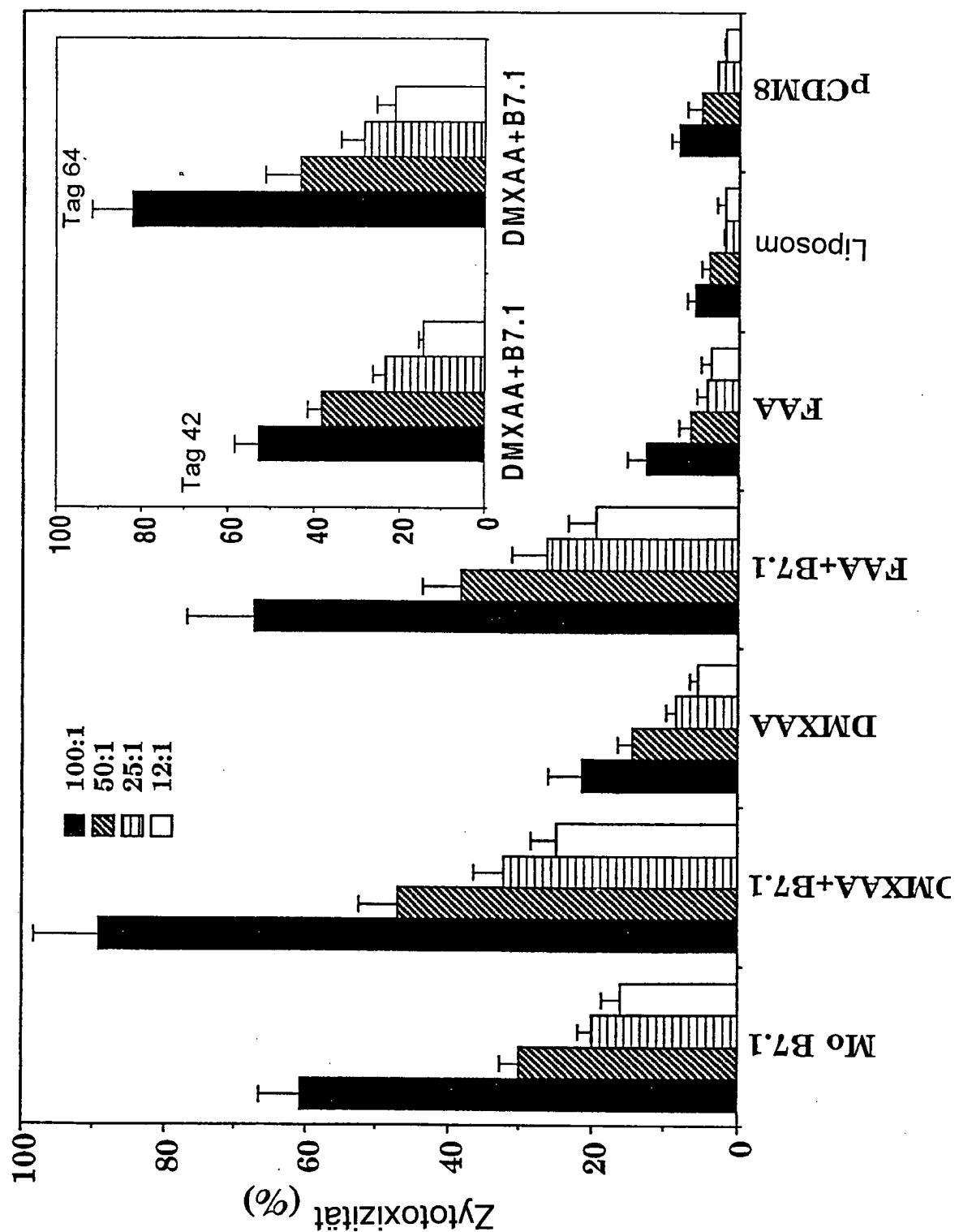


Fig. 2b

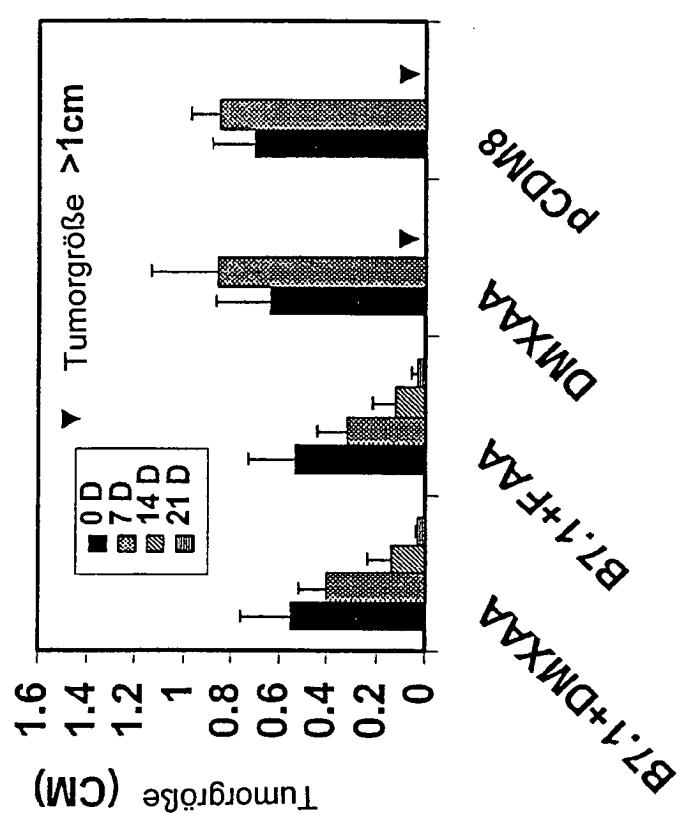
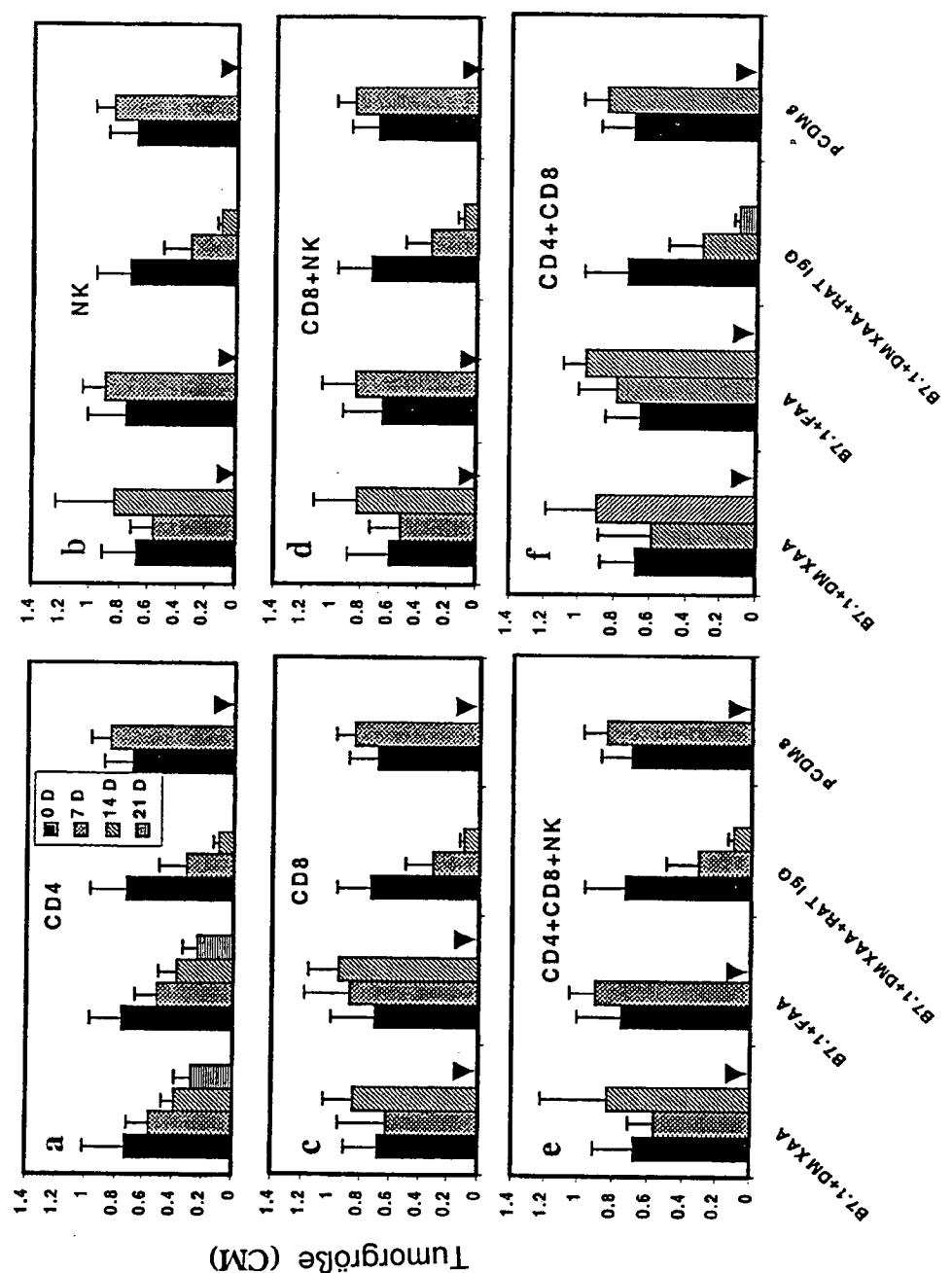


Fig. 3



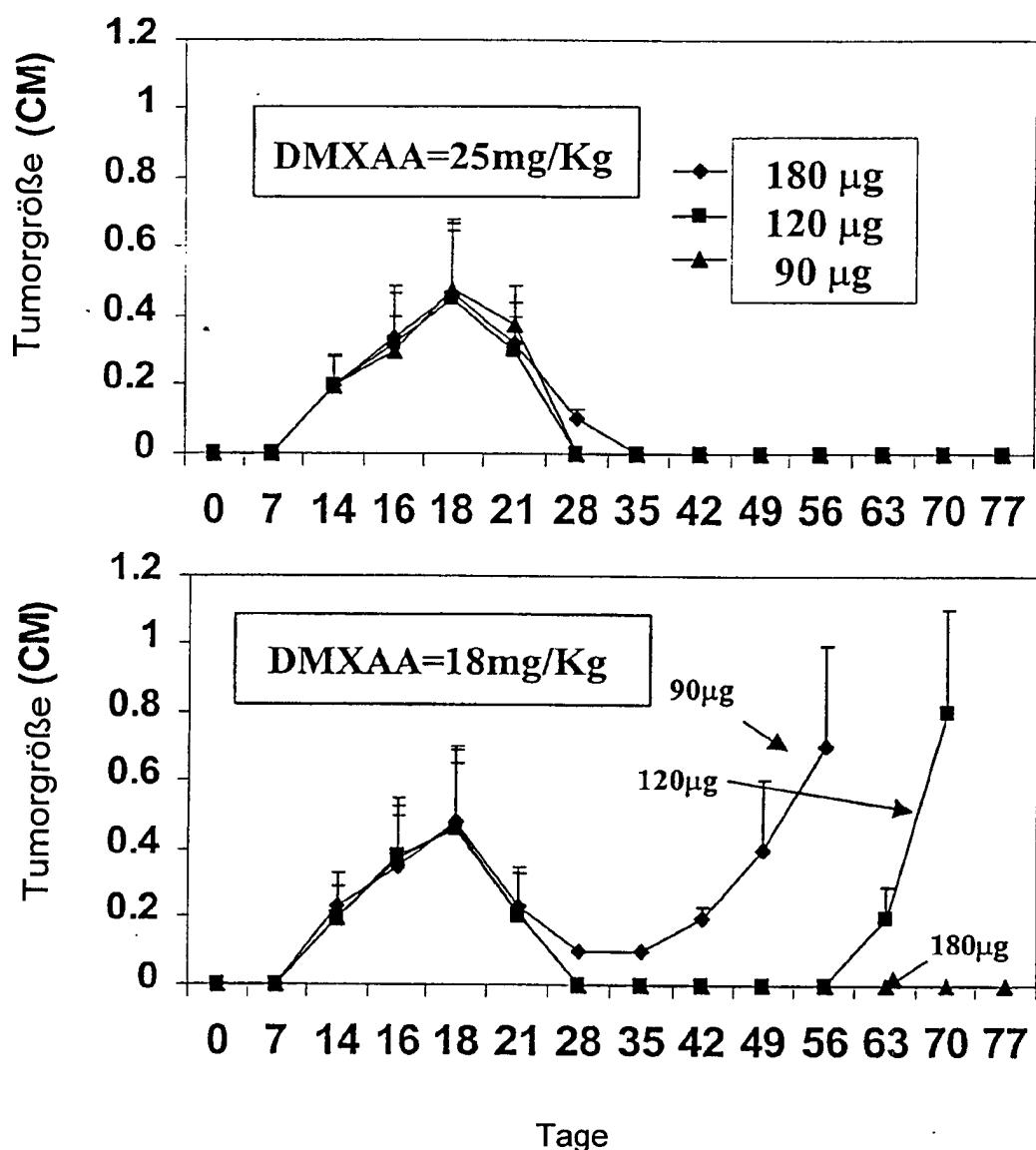


Fig. 4

Fig 5

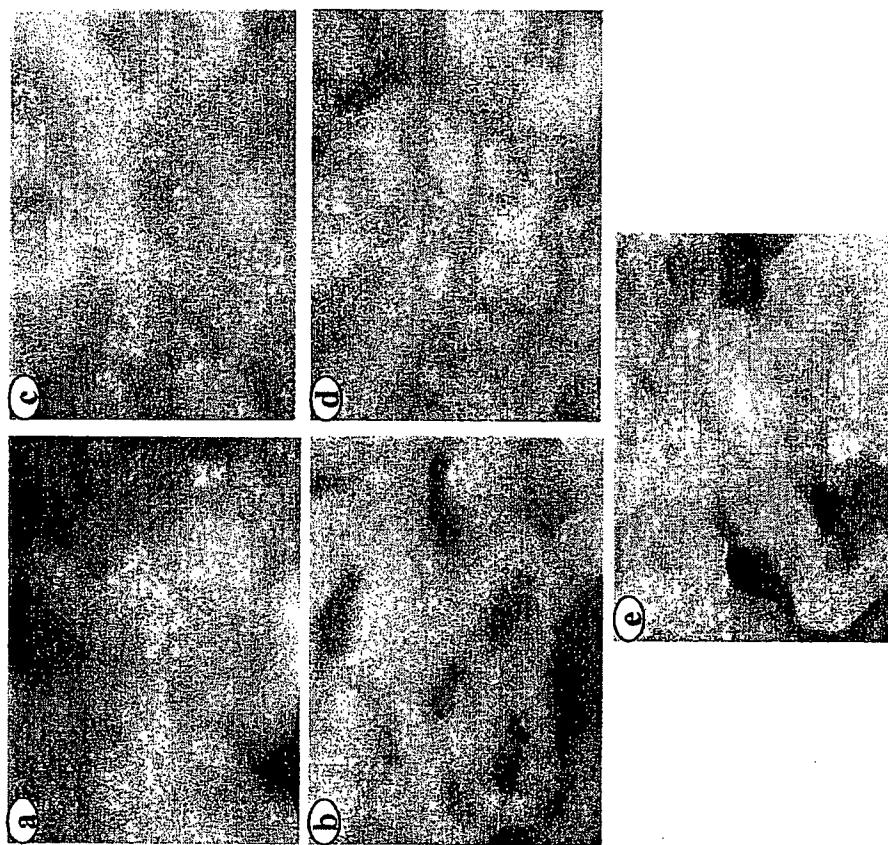


Fig. 5f

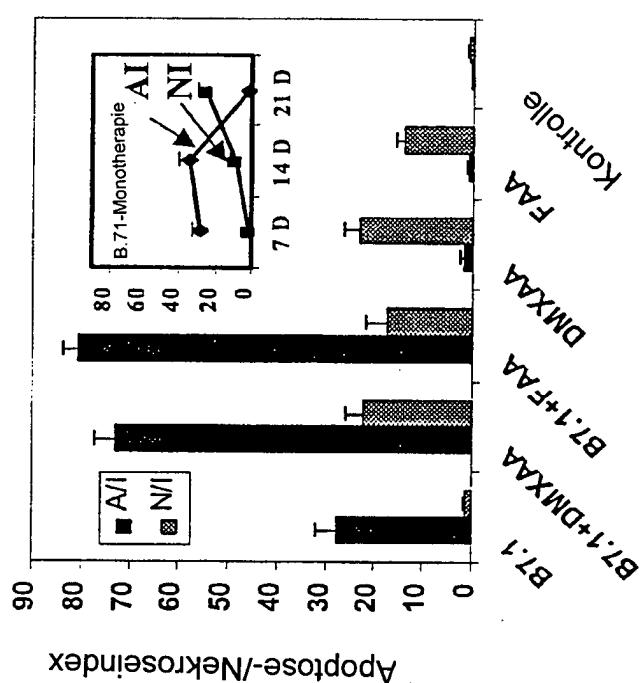


Fig 6

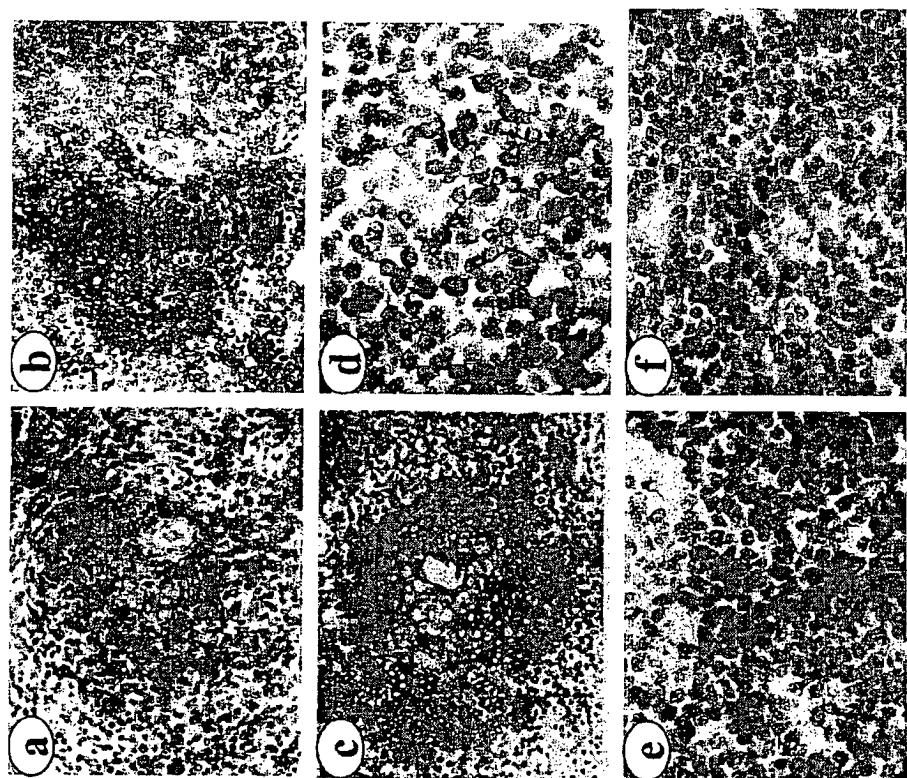


Fig. 7

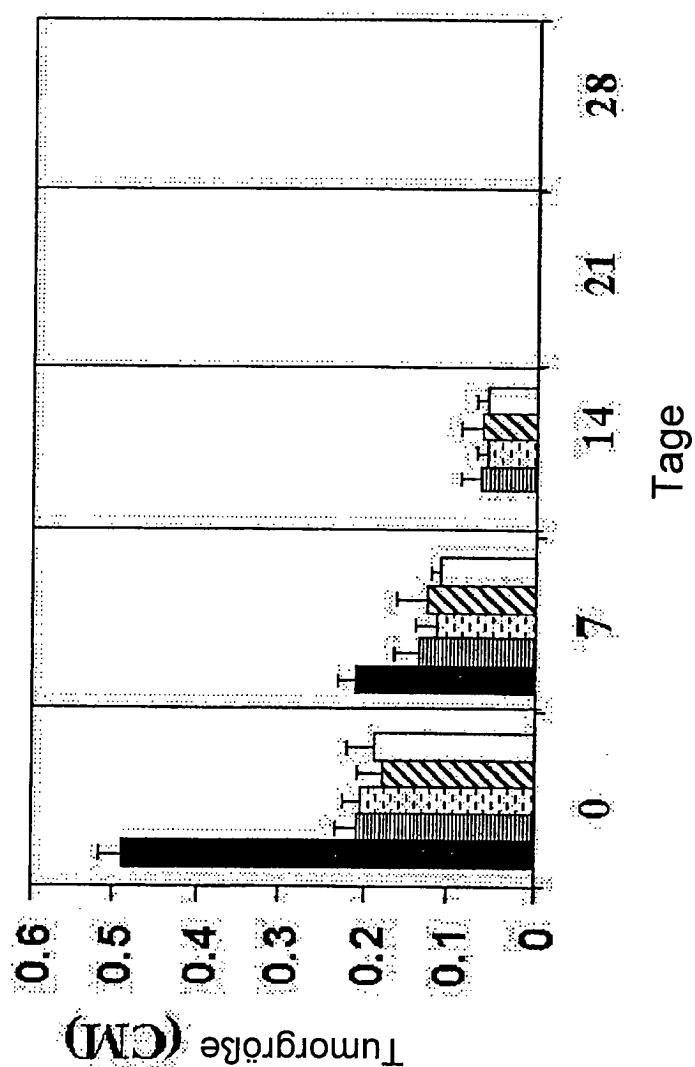


Fig. 8

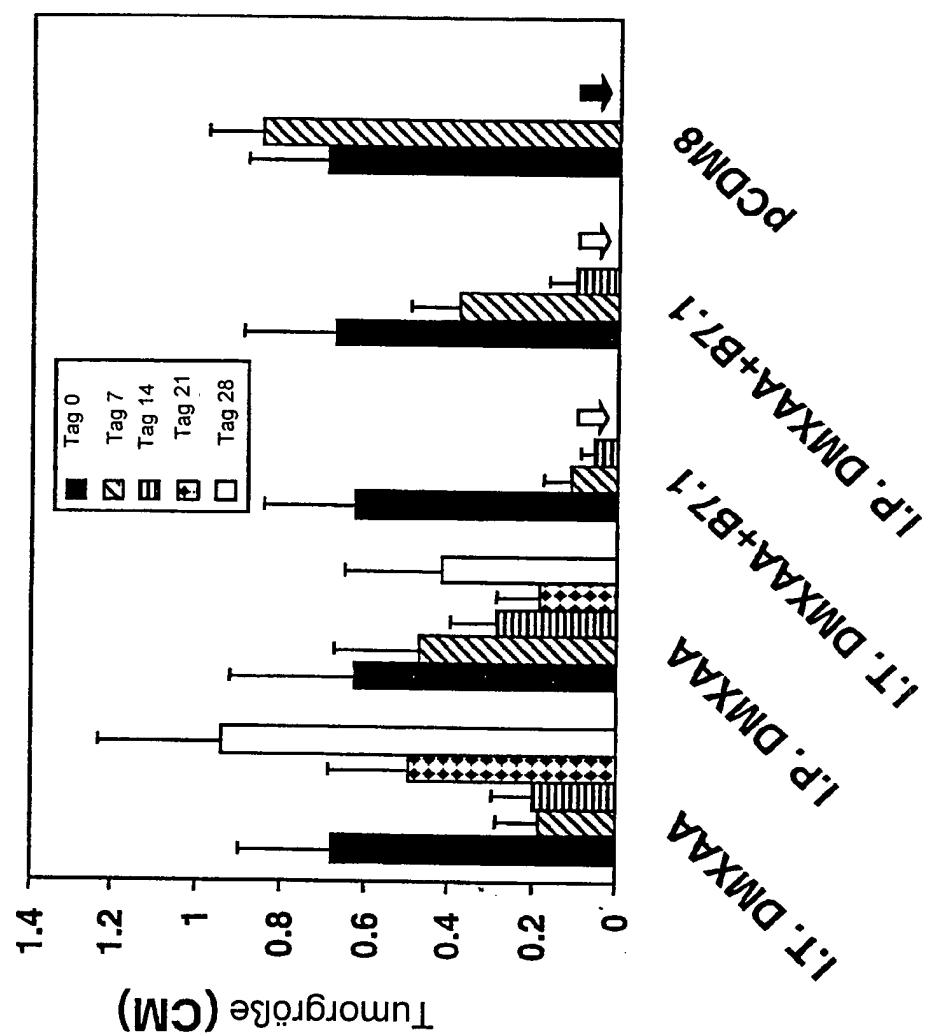


Fig. 9

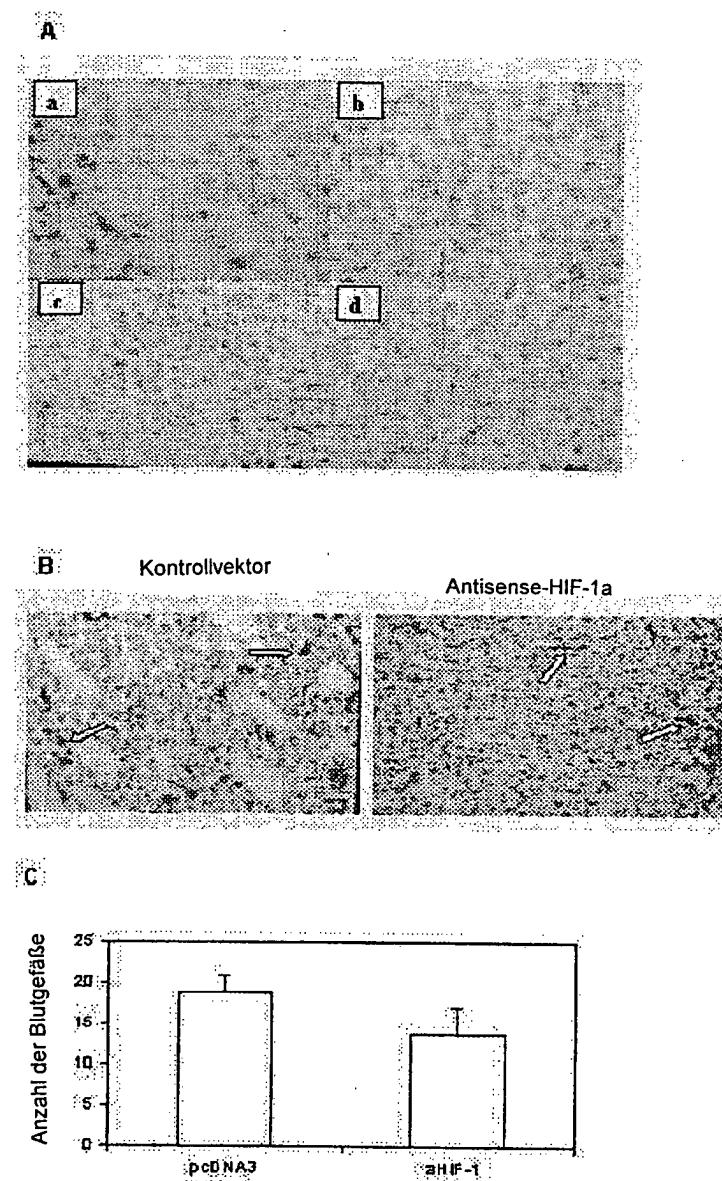


Fig. 10

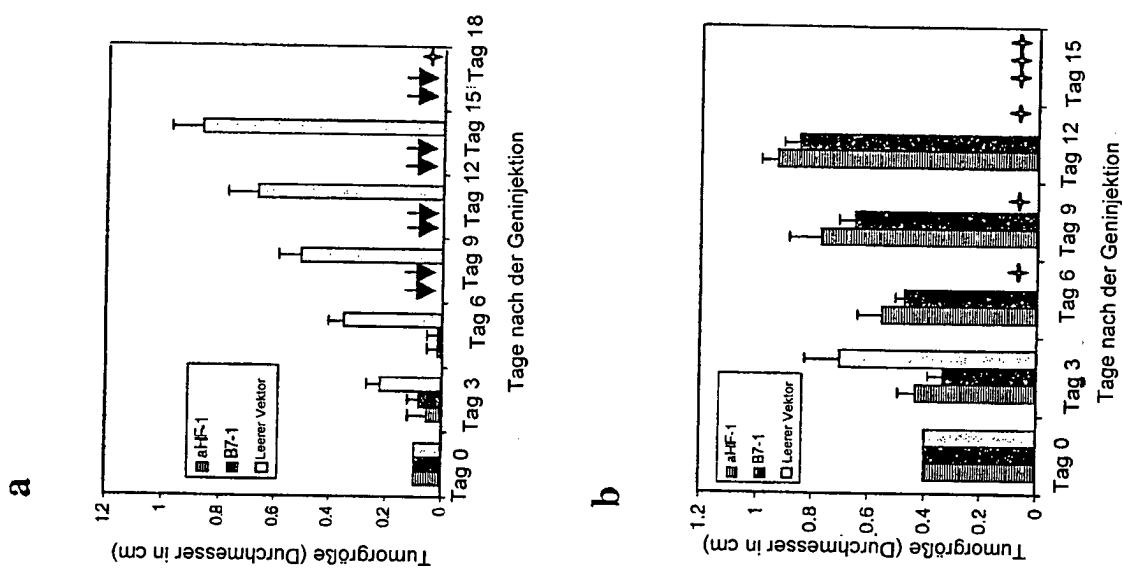


Fig. 11

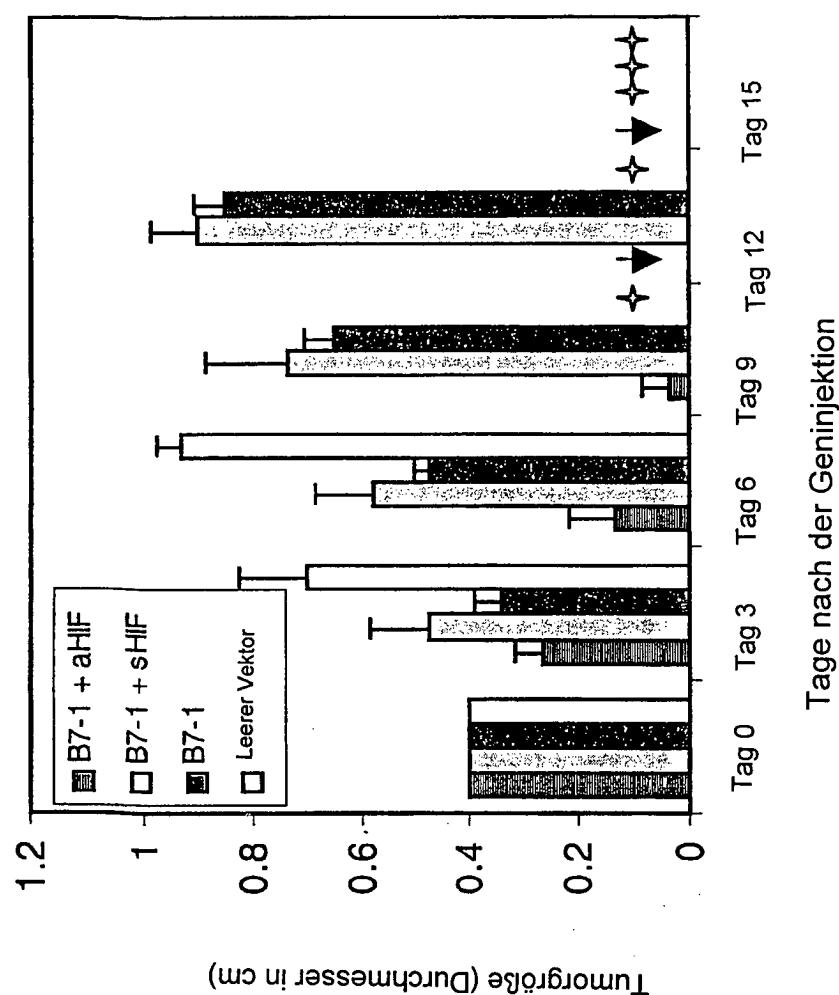


Fig. 12

