



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 36 312 T2 2007.06.06

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 323 346 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 36 312.7

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 004 479.6

(96) Europäischer Anmeldetag: 17.01.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 02.07.2003

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 28.06.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.06.2007

(51) Int Cl.⁸: A01N 63/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

374159 17.01.1995 US
578171 29.12.1995 US

(73) Patentinhaber:

The Brigham and Women's Hospital Inc., Boston,
Mass., US; Brandeis University, Waltham, Mass.,
US

(74) Vertreter:

Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Blumberg, Richard S., Chestnut Hill,
Massachusetts 02167, US; Simister, Neil E.,
Wellesley, Massachusetts 02482, US; Lencer,
Wayne I., Jamaica Plain, Massachusetts 02130, US

(54) Bezeichnung: Rezeptorspezifischer Transepithelialer Transport von Immunogenen

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

[0001] Die Erfindung betrifft allgemein Verfahren und Produkte zur Initiierung einer Immunantwort gegen ein Antigen, und betrifft insbesondere die transepitheliale Zufuhr von Antigenen zur Hervorrufung von Toleranz und Immunität.

[0002] Das Immunsystem eines Säugetiers entwickelt sich im Laufe der Schwangerschaft und wird im späten Säugetierfötus aktiv. Obwohl aktiv, kann es weiterhin als "unreif" charakterisiert werden, da es Antigenen noch nicht in maßgeblichem Umfang ausgesetzt wurde; der Fötus wird vorwiegend durch die Mutter vor Antigenen geschützt. Dieses "unreife" Immunsystem wird jedoch durch den Transfer von erheblichem Immunglobulin zum Fötus (oder in einigen Fällen zum Neugeborenen) ergänzt, um während der ersten Wochen unabhängigen Lebens eine humorale Immunität zu bieten.

[0003] Ratten und Mäuse erhalten den Großteil mütterlichen Immunglobulins (IgG) als Säuglinge von Colostrum und Milch, obwohl ein Teil pränatal erworben wird. Rinder erhalten IgG ebenfalls vom Colostrum. Bei Kaninchen wird IgG über den Dottersack zum Fötus transportiert. Über den Transfer von IgG zum Fötus oder Neugeborenen beim Menschen ist wenig bekannt. Die meisten Hinweise deuten darauf hin, dass menschliche Mütter humorale Immunität nur vor der Geburt an Nachkommen übertragen, obwohl angenommen wird, dass über die Brustmilch an den Neugeborenen übertragenes IgA eine Rolle beim Schutz des Neugeborenen gegen Darminfektionen spielt.

[0004] Die Zufuhr von mütterlichem IgG an das Säugetier und/oder Neugeborene erfordert den Transport über eine Epithelbarriere, die für Makromoleküle im Wesentlichen undurchlässig ist. Der Transport von Makromolekülen über eine solche Epithelbarriere kann durch unspezifische und spezifische rezeptorvermittelte Mechanismen erfolgen. Rezeptorunspezifische Mechanismen werden von parazellulären Siebungsvorgängen gebildet, deren Effizienz im umgekehrten Verhältnis zum Molekulargewicht des transportierten Moleküls steht. Der Transport von Makromolekülen wie beispielsweise IgG über diesen parazellulären Weg ist höchst ineffizient. Beschreibungen des rezeptorvermittelten Transports von Immunglobulinen durch Darmepithelzellen sind bislang auf den polymeren Immunglobulin-Rezeptor und den Enterozyten-Rezeptor für IgG (ein Haupt-histokompatibilitätskomplex(MHC)-Klasse-I-verwandter Fc-Rezeptor) beschränkt. Diese beiden Rezeptorsysteme unterscheiden sich in ihrer Spezifität für den Immunglobulin-Isotyp, in der Richtung ihres Immunglobulin-Transports über die Epithelzelle und in ihrer gewebspezifischen Expression. Beide können bei der Bildung des unreifen Immunsystems eine Rolle spielen.

[0005] Der polymere Immunglobulin-Rezeptor wird auf den basolateralen Oberflächen von Enterozyten, Hepatozyten und/oder Epithelzellen der Gallenwege exprimiert. Er transportiert polymeres IgA und IgM zu den apikalen (luminalen) Oberflächen, wodurch diese Immunglobuline für die antimikrobielle Abwehr und den Ausschluss von Antigenen konzentriert werden.

[0006] Der Enterozyten-Rezeptor für IgG, der eine Homologie zur schweren Kette von MHC Klasse I aufweist und mit Beta2-Mikroglobulin ($\beta 2$) assoziiert ist, wird auf Neugeborenen-Enterozyten der Ratte und Maus exprimiert. IgG wird transzellulär in luminal-serosaler Richtung über das Darmepithel dieser Nagetier-Neugeborenen transportiert. Auf der apikalen Oberfläche der Enterozyte ist der Fc-Teil von IgG bei dem relativ sauren pH des Lumens (etwa pH 6,0) an den Enterozyten-Rezeptor gebunden. Im Anschluss an die Transzytose zur basolateralen Plasmamembran erfolgt die Freisetzung des Immunglobulins bei dem relativ neutralen pH der interstitiellen Flüssigkeiten (etwa pH 7,4). Der Fc-Rezeptor (Fc-Rn) von Nagetier-Neugeborenen könnte daher für die Zufuhr von mütterlichem IgG an das Neugeborene verantwortlich sein und somit für den passiven Erwerb von IgG während dieser Periode.

[0007] Bei Menschen wird mütterliches IgG aktiv über die Plazenta transportiert. Der für diesen Transport verantwortliche Rezeptor ist lange Zeit gesucht worden. Etliche IgG-bindende Proteine sind aus der Plazenta isoliert worden. Fc γ RII wurde in Plazenta-Endothel und Fc γ RIII in Syncytiotrophoblasten detektiert. Beide Rezeptoren zeigten jedoch eine relativ geringe Affinität für monomeres IgG. Kürzlich wurde über die Isolierung einer cDNA aus der Plazenta berichtet, die für ein menschliches Homologon des Ratten- und Maus-Enterozyten-Rezeptors für IgG kodiert. (Story, C. M. et al., J. Exp. Med., Bd. 180: 2377–2381, Dezember 1994). Die vollständige Nukleotid- sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz wurden verlautbart. Dieser Fc-Rezeptor für IgG ist möglicherweise verantwortlich für den Transport von mütterlichem IgG zum menschlichen Fötus (und möglicherweise selbst zum Neugeborenen), da das Molekül über seinen offenen Leserahmen mit der Ratten-FcRn-Sequenz hochgradig homolog ist (69% Nukleotididentität und 65% vorausgesagte Aminosäureidentität). Die so genannte passive Immunisierung beim menschlichen Fötus (und möglicherweise dem menschlichen Neugeborenen) könnte nunmehr besser verstanden werden.

[0008] Im Gegensatz zur passiven Immunisierung, die die Ergänzung des Immunsystems eines Wirts mit Antikörpern, die von einem anderen erhalten werden, beinhaltet, beinhaltet die aktive Immunisierung die Stimulierung des wirtseigenen Immunsystems, um die gewünschte Immunantwort *in vivo* hervorzu-

rufen. Das häufigste Verfahren zur aktiven Immunisierung bei Kindern und Erwachsenen beinhaltet Injektionen eines Immunogens, einmal als initiale Dosis und mindestens ein weiteres Mal als "Booster"-Dosis. Diese Verfahren haben viele gravierende Nachteile, einschließlich der Risiken, die mit der Benutzung von Nadeln, die Krankheiten wie AIDS und Hepatitis übertragen können, verbunden sind. (Bei der Tolerisierung eines Patienten gegenüber einem Allergen werden die Probleme dadurch verstärkt, dass oftmals wiederholte Injektionen über eine lange Zeitdauer erforderlich sind). Diese Verfahren leiten auch nicht unbedingt in adäquater Weise die erste Verteidigungslinie gegen viele Pathogene ein, das heißt die mukosale Immunität. Schleimhäute säumen die Luftwege, das Reproduktionssystem und den Magendarmtrakt, und diese mukosale Oberfläche bildet die erste Eingangspforte für viele Krankheiten. Ein oraler Impfstoff, der leicht zuführbar ist und die mukosale Immunität einleitet, wäre daher sehr wünschenswert.

[0009] Die Immunisierung unter Verwendung oraler Impfstoffe ist problematisch. Oftmals wird nur eine geringe oder gar keine Immunantwort erhalten. Um die Immunantwort zu verstärken, sind interessierende Antigene an Träger gekoppelt worden, die bekanntmaßen stark immunogen sind. Zum Beispiel haben Forscher Antigene unter Verwendung von *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) als Träger zugeführt; BCG ist ein Bakterium, das ursprünglich als ein oraler Impfstoff gegen Tuberkulose verwendet wurde. Ein Problem mit solch einem Träger besteht darin, dass der Patient Antikörper gegen den Träger selbst entwickelt, was störend sein kann, wenn der Träger erneut für die Zuführung eines anderen Antigens an denselben Patienten verwendet wird. Bis auf den heutigen Tag hat sich keine allgemeine Strategie für orale Impfstoffe als erfolgreich erwiesen.

[0010] Immunglobuline und Teile davon sind in der Vergangenheit an Arzneimittel und Bildgebungsmittel gebunden worden, um Zellpopulationen gezielt anzusteuern und zu zerstören, und um die Halbwertzeit bestimmter Mittel zu verlängern. Immuntoxine sind ein Beispiel für solche Konjugate. Solche Konjugate sind jedoch niemals als nützlich für die Initiierung einer Immunantwort vorgeschlagen worden.

[0011] Wenige Arbeiten haben sich auf die tolerogene Fähigkeit von Immunglobulinen, die an Oligonukleotide oder Proteine gekoppelt sind, die für Autoimmunkrankheiten kennzeichnend sind, konzentriert. (Siehe PCT WO 91/08773 und Borel & Borel, *Journal of Immunological Methods*, 126 (1990) 159–168). Diese Arbeiten beruhen auf der Annahme, dass die Induktion von Toleranz stark durch Träger-Reste beeinflusst sein kann und dass Immunglobulin-Träger stark tolerogen zu sein scheinen. Isologes IgG ist der bevorzugte Träger, und intravenöse Verabreichung

wurde eingesetzt, um die IgG-Konjugate zuzuführen. Obwohl sich dieses Arbeitswerk über mehr als eine Dekade erstreckt, wurde die orale Verabreichung lediglich einmal erwähnt und nur für Konjugate, bei denen IgA der Immunglobulin-Träger ist. Obwohl tolerogene Immunglobulin-Konjugate im Stand der Technik bekannt sind, wurden solche Konjugate somit niemals als Mittel zur Induzierung einer robusten Antwort gegen ein Antigen, das für ein Pathogen kennzeichnend ist, vorgeschlagen. (Im Gegensatz dazu legt der Stand der Technik nahe, dass solche Konjugate einen Probanden eher gegen ein Pathogen tolerieren würden, was höchst unerwünscht wäre). Darüber hinaus ist niemals angeregt worden, dass solche Konjugate wirksame Tolerogene sein würden, wenn das Immunglobulin IgG ist und die Zuführungsart orale Zufuhr ist.

[0012] Die Erfindung beinhaltet die Entdeckung, dass Antigene an Moleküle gebunden werden können, die an den FcRn-Rezeptor binden, wie beispielsweise Immunglobuline, oder Teile davon, und durch aktiven Transport durch die Enterozyte via FcRn-Rezeptoren über Epithelbarrieren zugeführt werden können. Das Immunglobulin oder der Teil davon bindet an den FcRn-Rezeptor und fungiert als Träger für das Antigen, während das Immunglobulin oder der Teil davon durch FcRn-vermittelten Transport über die Epithelbarriere transportiert wird. Der FcRn-Rezeptor ist in menschlichem Epithelgewebe von Kindern und Erwachsenen vorhanden und die Erfindung ermöglicht daher wirksame Strategien für die Immunisierung von Menschen.

[0013] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Modulierung des Immunsystems eines Säugetiers bereit. Eine wirksame Menge eines Konjugats aus einem Antigen und einem FcRn-Bindungspartner wird an die Epithelbarriere eines Säugetiers verabreicht, das einer solchen Immunmodulierung bedarf. Das Antigen ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: einem für ein Pathogen kennzeichnenden Antigen, einem für eine Autoimmunkrankheit kennzeichnenden Antigen, einem für ein Allergen kennzeichnenden Antigen und einem für einen Tumor kennzeichnenden Antigen. In bevorzugten Ausführungsformen ist der FcRn-Bindungspartner nichtspezifisches IgG oder ein FcRn bindendes Fragment von IgG. Am meisten bevorzugt ist der FcRn-Bindungspartner ein Fc-Fragment von IgG. Es ist auch bevorzugt, dass das Antigen kovalent an den FcRn-Bindungspartner gekoppelt ist. Vorzugsweise wird das Konjugat dem Darmepithel oral, den Lungen in einem Aerosol oder intranasal zugeführt. Solche Zubereitungen können nicht-aseptisch sein. Ergänzende Verstärkungsmittel, wie unten beschrieben, können darüber hinaus verabreicht werden.

[0014] In einem ersten Aspekt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zubereitung zur Verabrei-

chung an eine Epithelbarriere eines Patienten bereitgestellt, um ein Molekül über die Epithelbarriere zuzuführen, umfassend ein Konjugat eines an das Molekül gekoppelten FcRn-Bindungspartners, wobei der FcRn-Bindungspartner in dem Konjugat menschlichen FcRn bindet und wobei die Zubereitung als Kapsel, Tablette, Elixier oder Sirup zur Zuführung an eine menschliche Epithelbarriere formuliert ist.

[0015] In einem zweiten Aspekt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zubereitung zur Verabreichung an die Epithelbarriere eines Patienten bereitgestellt, um ein Molekül über die Epithelbarriere zuzuführen, umfassend ein Konjugat eines an das Molekül gekoppelten FcRn-Bindungspartners, wobei der FcRn-Bindungspartner in dem Konjugat menschlichen FcRn bindet, und wobei die Zubereitung als Aerosol zur Zuführung an eine menschliche Epithelbarriere formuliert ist.

[0016] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können ein Konjugat aus einem Antigen und einem FcRn-Bindungspartner beinhalten, wobei das Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: einem für ein Pathogen kennzeichnenden Antigen, einem für eine Autoimmunkrankheit kennzeichnenden Antigen, einem für ein Allergen kennzeichnenden Antigen und einem für einen Tumor kennzeichnenden Antigen. Die bevorzugten FcRn-Bindungspartner sind wie oben beschrieben. Das Konjugat ist in einer Menge zugegen, die zur Modulierung der Immunantwort eines Säugetiers wirksam ist. Die pharmazeutische Zusammensetzung beinhaltet auch einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können in Einheitsdosierform formuliert sein, die zur Zuführung an einen epithelialen Träger wie beispielsweise für die orale Zuführung an das Darmepithel, die Aerosol-Zuführung an das Lungenepithel und die intranasale Zuführung an das Nasenepithel ausgebildet und hergerichtet ist. Somit sind Tabletten, die IgG (oder einen FcRn bindenden Teil davon) beinhalten, das an irgendeines der wie oben gekennzeichneten Antigene gekoppelt ist, von der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0017] Die vorstehenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können zusammen mit ergänzenden Verstärkungsmitteln einschließlich Adjuvanzien, Zytokinen, Bioadhäsiva und dergleichen zugeführt werden. Die ergänzenden Verstärkungsmittel selbst können an einen FcRn-Bindungspartner gekoppelt sein, um die Zuführung solcher Mittel über die Epithelbarriere zu erleichtern. Bevorzugte Verabreichungsarten beinhalten im Allgemeinen orale Dosierungen an das Darmepithel, Aerosole an die Lungen und intranasale Dosierungen.

[0018] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind unten beschrieben oder in den Unteran-

sprüchen angegeben.

[0019] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung überquert das das Antigen beinhaltende Konjugat die Epithelbarriere in einer Menge von mindestens dem doppelten Umfang, in dem das Antigen die Epithelbarriere in unkonjugierter Form überquert. Es ist daher eine Aufgabe der Erfindung, einen Mechanismus zur Erhöhung der Fähigkeit eines Antigens zu entwickeln, eine Epithelbarriere zu überwinden.

[0020] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine neue Klasse von oral wirksamen Immuno- genen und Toleragenen zu entwickeln.

[0021] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, verbesserte Verfahren zur Stimulierung der mukosalen Immunität zu entwickeln.

[0022] Die Erfindung beinhaltet die Entdeckung, dass der menschliche FcRn-Rezeptor in Epithelgewebe von Erwachsenen aktiv ist und die Entdeckung, dass FcRn-Bindungspartner wie beispielsweise IgG oder Fc-Fragmente verwendet werden können, um andere Moleküle, einschließlich Antigene, über Epithelbarrieren zu transportieren. Auf diese Weise können FcRn-Bindungspartner wie IgG oder ein FcRn bindender Teil davon verwendet werden, um ein Antigen über eine Epithelbarriere dem Immunsystem eines Probanden zuzuführen, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird.

[0023] Die Erfindung ist nützlich, wann immer es wünschenswert ist, die Zuführung eines Antigens über eine Epithelbarriere zum Immunsystem zu verbessern. Die Erfindung kann daher dazu verwendet werden, Antigene über Darmepithelgewebe, Lungenepithelgewebe und andere Schleimhautoberflächen, einschließlich nasaler Oberflächen, vaginaler Oberflächen, Dickdarmoberflächen und Oberflächen der Gallenwege, zuzuführen. Die Erfindung kann verwendet werden, um das Immunsystem eines Probanden zu modulieren, beispielsweise durch Stimulierung einer humoralen Antikörperreaktion gegen ein Antigen, durch Stimulierung der T-Zell-Aktivität oder durch Stimulierung von Toleranz gegenüber einem Antigen. Der hier verwendete Begriff Proband bedeutet: Menschen, Primaten, Pferde, Kühe, Schafe, Schweine, Ziegen, Hunde, Katzen, Hühner und Nagetiere.

[0024] Bei Zuführung von Tumorantigenen kann die Erfindung verwendet werden, um Probanden zu behandeln, die eine Krankheit haben, die einer immunitätsvermittelten Unterdrückung zugänglich ist, wie beispielsweise nicht-solide Tumoren oder solide Tumoren kleiner Größe. Die Zuführung von Tumorantigenen durch die hier beschriebenen Verfahren wird auch für die Behandlung im Anschluss an die Entfer-

nung großer solider Tumoren nützlich sein. Die Erfindung kann auch verwendet werden, um Probanden zu behandeln, die im Verdacht stehen, Krebs zu haben.

[0025] Die Erfindung beinhaltet die Bildung eines Konjugates aus einem FcRn-Bindungspartner und einem Antigen. Unter Konjugat sind zwei Einheiten gemeint, die durch irgendein physikalisch-chemisches Mittel, einschließlich hydrophober Wechselwirkung zwischen einem Antigen und den nichtspezifischen hydrophoben Bereichen eines Antikörpermoleküls, spezifischer Antikörper-Antigen-Bindung und kovalenter Kopplung aneinander gebunden sind. Die Art der bevorzugten Bindung hängt unter anderem von der Verabreichungsart und den pharmazeutischen Trägern ab, die zur Zuführung des Konjugates zu der ausgewählten Epithelbarriere verwendet werden. Beispielsweise sind einige Bindungen nicht so gut wie andere geeignet, bestimmten Umgebungen wie beispielsweise dem Magen zu widerstehen, können jedoch durch Zuführsysteme, die den Magen umgehen, davor geschützt werden. Es ist selbstverständlich wichtig, dass die Bindung zwischen dem FcRn-Bindungspartner und dem Antigen von einer solchen Art ist, dass sie die Fähigkeit des FcRn-Bindungspartners nicht zerstört, an den FcRn-Rezeptor zu binden. Solche Bindungen sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Beispiele werden unten in größerer Ausführlichkeit angegeben. Das Konjugat kann darüber hinaus auch als Fusionsprotein ausgebildet sein, wie unten ausführlicher dargestellt wird.

[0026] Ein FcRn-Bindungspartner meint jede Einheit, die spezifisch durch den FcRn-Rezeptor gebunden werden kann, mit folgendem aktiven Transport des FcRn-Bindungspartners durch den FcRn-Rezeptor. Wie oben angegeben, ist der FcRn-Rezeptor aus etlichen Säugetierarten, einschließlich des Menschen, isoliert worden. Die Sequenz des menschlichen FcRn, Ratten FcRn und Maus-FcRn ist in Story, C. M. et al., J. Exp. Med., Bd. 180: 2377-2381, Dezember 1994, zu finden. Das FcRn-Rezeptor-Molekül ist nunmehr gut charakterisiert. Der FcRn-Rezeptor bindet IgG (nicht jedoch andere Immunglobulin-Klassen wie IgA, IgD, IgM und IgE) bei relativ niedrigerem pH, transportiert das IgG aktiv transzellulär in luminal-serosaler Richtung und setzt das IgG bei einem relativ höheren pH, wie er in interstitiellen Flüssigkeiten gefunden wird, frei. Wie der Durchschnittsfachmann erkennen wird, können FcRn-Rezeptoren durch Klonierung oder durch Affinitätsreinigung unter Verwendung von beispielsweise monoklonalen Antikörpern isoliert werden. Solche isolierten FcRn-Rezeptoren können dann verwendet werden, um FcRn-Bindungspartner zu identifizieren und zu isolieren, wie unten beschrieben.

[0027] FcRn-Bindungspartner beinhalten vollständi-

ges IgG, das Fc-Fragment von IgG und andere Fragmente von IgG, die die vollständige Bindungsregion für den FcRn-Rezeptor beinhalten. Die Region des Fc-Teils von IgG, die an den FcRn-Rezeptor bindet, ist auf Grundlage von Röntgenstrahlkristallographie beschrieben worden (Burmeister, W. P. et al., Nature, 1994, 372: 379-378). Der Hauptkontaktbereich von Fc mit dem FcRn-Rezeptor befindet sich in der Nähe der Verbindungsstelle der C_H2 und C_H3-Domänen. Mögliche Kontakte sind die Reste 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 und 314 in C_H2 und 385-387, 428 und 433-436 in C_H3. (Diese Stellen unterscheiden sich von jenen, die durch Unterklassen-Vergleich oder durch ortsgerichtete Mutagenese als wichtig für die Fc-Bindung an FcγRI und FcγRII bei Leukozyten identifiziert wurden). Die vorstehenden Fc-FcRn-Kontakte liegen alle innerhalb einer einzelnen schweren Ig-Kette. Es ist vorher erwähnt worden, dass zwei FcRn-Rezeptoren ein einzelnes Fc-Molekül binden können. Die kristallographischen Daten deuten darauf hin, dass jedes FcRn-Molekül in einem solchen Komplex ein einzelnes Polypeptid des Fc-Homodimers bindet.

[0028] Die vorstehenden Informationen vorausgesetzt, wird der Durchschnittsfachmann leicht erkennen, dass die Fc-Region von IgG mittels gut etablierter Verfahren wie beispielsweise der ortsgerichteten Mutagenese und dergleichen modifiziert werden kann, um modifiziertes IgG oder modifizierte Fc-Fragmente oder Teile davon zu erhalten, die von dem FcRn-Rezeptor gebunden werden. Solche Modifikationen beinhalten Modifikationen, die von den FcRn-Kontaktstellen entfernt liegen sowie Modifikationen innerhalb der Kontaktstellen, die die Bindung erhalten oder sogar fördern. Darüber hinaus können andere Bindungspartner identifiziert und isoliert werden. Antikörper oder Teile davon, die für den FcRn-Rezeptor spezifisch sind und in der Lage sind, bei einmal erfolgter Bindung durch FcRn transportiert zu werden, können unter Anwendung gut etablierter Techniken identifiziert und isoliert werden. Gleichermassen können zufallserzeugte molekular diverse Bibliotheken gescreent werden und Moleküle, die durch FcRn-Rezeptoren gebunden und transportiert werden, können unter Einsatz konventioneller Techniken isoliert werden. Es ist nicht beabsichtigt, die Erfindung durch die Auswahl irgendeines bestimmten FcRn-Bindungspartners zu beschränken. Wenn der Bindungspartner IgG ist oder ein FcRn bindender Teil davon, kann das IgG oder der Teil davon nach konventionellen Verfahren hergestellt werden, wie unten in größerer Ausführlichkeit beschrieben ist.

[0029] Der FcRn-Bindungspartner ist mit einem Antigen konjugiert. Ein Antigen, wie hier verwendet, fällt in vier Klassen: 1) Antigene, die für ein Pathogen kennzeichnend sind; 2) Antigene, die für eine Autoimmunkrankheit kennzeichnend sind; 3) Antigene, die für ein Allergen kennzeichnend sind; und 4) Antigene,

die für einen Tumor kennzeichnend sind. Antigene beinhalten im Allgemeinen Polysaccharide, Glykolipide, Glykoproteine, Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide von Zelloberflächen, Zytoplasma, Zellkernen, Mitochondrien und dergleichen.

[0030] Antigene, die für Pathogene kennzeichnend sind, beinhalten Antigene, die von Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen erhalten werden. Beispiele für wichtige Pathogene beinhalten *Vibrio cholerae*, enteroxinogenes *Escherichia coli*, Rotavirus, *Clostridium difficile*, *Shigella*-Arten, *Salmonella typhi*, Parainfluenza-Virus, Influenza-Virus, *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, HIV, *Streptococcus mutans*, *Plasmodium falciparum*, *Staphylococcus aureus*, Tollwut-Virus und Epstein-Barr-Virus.

[0031] Viren beinhalten im Allgemeinen, sind aber nicht beschränkt auf die in den folgenden Familien: Picornaviridae; Caliciviridae; Togaviridae; Flaviviridae; Coronaviridae; Rhabdoviridae; Filoviridae; Paramyxoviridae; Orthomyxoviridae; Bunyaviridae; Arenaviridae; Reoviridae; Retroviridae; Hepadnaviridae; Parvoviridae; Papovaviridae; Adenoviridae; Herpesviridae; und Poxviridae.

[0032] Bakterien beinhalten im Allgemeinen, sind aber nicht beschränkt auf: *P. aeruginosa*; *E. coli*; *Klebsiella* sp.; *Serratia* sp.; *Pseudomonas* sp.; *P. cepacia*; *Acinetobacter* sp.; *S. epidermidis*; *E. faecalis*; *S. pneumoniae*; *S. aureus*; *Haemophilus* sp.; *Neisseria* sp.; *N. meningitidis*; *Bacteroides* sp.; *Citrobacter* sp.; *Branhamella* sp.; *Salmonella* sp.; *Shigella* sp.; *S. pyogenes*; *Proteus* sp.; *Clostridium* sp.; *Erysipelothrix* sp.; *Listeria* sp.; *Pasteurella multocida*; *Streptobacillus* sp.; *Spirillum* sp.; *Fusospirocheta* sp.; *Treponema pallidum*; *Borrelia* sp.; *Actinomycetes*; *Mycoplasma* sp.; *Chlamydia* sp.; *Rickettsia* sp.; *Spirochacta*; *Legionella* sp.; *Mycobacteria* sp.; *Ureaplasma* sp.; *Streptomyces* sp.; *Trichomonas* sp.; und *P. mirabilis*.

[0033] Parasiten beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: *Plasmodium falciparum*. *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria*; *Toxoplasma gondii*; *Leishmania mexicana*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. donovani*; *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*; *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*; *Trichinella spiralis*; *Wuchereria bancrofti*; *Brugia malayi*; *Entamoeba histolytica*; *Enterobius vermicularis*; *Taenia solium*, *T. saginata*; *Trichomonas vaginalis*, *T. hominis*, *T. tenax*; *Giardia lamblia*; *Cryptosporidium parvum*; *Pneumocytis carinii*; *Babesia bovis*, *B. divergens*, *B. microti*; *Isospora belli*, *I. hominis*; *Dientamoeba fragilis*; *Onchocerca volvulus*; *Ascaris lumbricoides*; *Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale*; *Strongyloides stercoralis*; *Capillaria philippinensis*; *Angiostrongylus cantonensis*; *Hymenolepis nana*; *Diphyllobothrium latum*; *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*; *Paragonimus westermani*, *P. caliensis*; *Chlonorchis sinensis*; *Opisthorchis felineus*, *O. viver-*

ini; *Fasciola hepatica*; *Sarcoptes scabiei*; *Pediculus humanus*; *Phthirus pubis*; und *Dermatobia hominis*.

[0034] Pilze beinhalten im Allgemeinen, sind aber nicht beschränkt auf: *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces dermatitidis*; *Ajellomyces dermatitidis*; *Histoplasma capsulatum*; *Coccidioides immitis*; *Candida*-Arten, einschließlich *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* und *C. krusei*; *Aspergillus*-Arten, einschließlich *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger*; *Rhizopus*-Arten; *Rhizomucor*-Arten; *Cunninghamella*-Arten; *Apophysomyces*-Arten, einschließlich *A. saksenaea*, *A. mucor* und *A. absidia*; *Sporothrix schenckii*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Torulopsis glabrata*; und *Dermatophytes*-Arten.

[0035] Antigene, die für Autoimmunkrankheiten kennzeichnend sind, werden typischerweise von der Zelloberfläche, dem Zytoplasma, Zellkern, Mitochondrien und dergleichen aus Säugetiergeweben erhalten. Beispiele beinhalten Antigene, die kennzeichnend sind für Uveitis (z.B. S-Antigen), Diabetes mellitus, multiple Sklerose, systemischen Lupus erythematoses, Hashimoto-Thyroiditis, Myasthenia gravis, primäres Myxödem, Thyrotoxikose, rheumatoide Arthritis, perniziöse Anämie, Addison-Krankheit, Skleroderma, autoimmune atrophe Gastritis, vorzeitige Menopause (wenige Fälle), männliche Unfruchtbarkeit (wenige Fälle), Jugenddiabetes, Goodpasture-Syndrom, *Pemphigus vulgaris*, *Pemphigoid*, sympathische Ophthalmie, phakogene Uveitis, autoimmun-hämolytische Anämie, idiopathische thrombozytopenische Purpura, idiopathische Leukopenie, primäre biliäre Zirrhose (wenige Fälle), ulzerative Kolitis, Sjögren-Syndrom, Wegener-Granulomatose, Poly-/Dermatomyositis und discoiden Lupus erythematoses.

[0036] Antigen, die Allergene sind, sind im Allgemeinen Proteine oder Glykoproteine, obwohl Allergene auch allergene Haptene mit niedrigem Molekulargewicht sein können, die Allergie nach kovalenter Kombination mit einem Proteinträger auslösen (Remington's Pharmaceutical Sciences). Allergene beinhalten die Urushiole (Pentadecylcatechol oder Heptadecylcatechol) von Toxicodendron-Arten wie *Giftefeu*, *Gifteiche* und *Giftsumach*, und die Sesquiterpenoid-Laktone der Ambrosie und verwandter Pflanzen.

[0037] Antigene, die für Tumorantigene kennzeichnend sind, werden typischerweise von der Zelloberfläche, dem Zytoplasma, Zellkern, Organellen und dergleichen von Zellen aus Tumorgewebe erhalten. Beispiele beinhalten Antigene, die kennzeichnend sind für Tumorproteine, einschließlich Proteine, die durch mutierte Onkogene kodiert werden; virale Proteine, die mit Tumoren assoziiert sind; und Tumormukine und -glykolipide. Tumore beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf jene von den folgenden Krebsarten und Krebsarten: Lippe, Nasopharynx, Pharynx

und Mundhöhle, Speiseröhre, Dickdarm, Rektum, Leber, Gallenblase, Gallenwege, Pankreas, Kehlkopf, Lunge und Bronchien, Melanom der Haut, Brust, Gebärmutterhals, Uterus, Ovar, Blase, Niere, Hirn und andere Teile des Nervensystems, Schilddrüse, Prostata, Hoden, Hodgkin-Krankheit, Non-Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom und Leukämie. Virale Proteine, die mit Tumoren assoziiert sind, wären solche aus den oben angegebenen Virenklassen. Antigene, die für Tumore kennzeichnend sind, können Proteine sein, die nicht gewöhnlich von Tumvorläuferzellen exprimiert werden, oder können ein Protein sein, dass normalerweise in einer Tumvorläuferzelle exprimiert wird, jedoch eine Mutation aufweist, die für einen Tumor kennzeichnend ist. Ein für einen Tumor kennzeichnendes Antigen kann eine Mutantenvariante des normalen Proteins sein, das eine veränderte Aktivität oder subzelluläre Verteilung aufweist. Über die oben angegebenen hinaus können Mutationen von Genen, die zu Tumorantigenen führen, in der kodierenden Region, den nichtkodierenden 5'-3'-Regionen oder Introns eines Gens vorliegen, oder können das Ergebnis von Punktmutationen, Rasterverschiebungen, Deletionen, Additionen, Duplikationen, chromosomalen Rearrangements und dergleichen sein. Der Durchschnittsfachmann ist vertraut mit der großen Vielfalt von Veränderungen an der normalen Genstruktur und -expression, die zu Tumorantigenen führen. Spezifische Beispiele von Tumorantigenen beinhalten: Proteine wie der Ig-Idiotyp von B-Zell-Lymphom, mutierte Zyklin-abhängige Kinase 4 von Melanom, Pmel-17 (gp100) von Melanom, MART-1 (Melan-A) von Melanom, p15-Protein von Melanom, Tyrosinase von Melanom, MAGE 1, 2 und 3 von Melanom, medullärem Schilddrüsenkrebs, kleinzelligem Lungenkrebs, Dickdarm- und/oder Plattenepithelkrebs der Bronchien, BAGE von Blasen-, Melanom, Brust- und Plattenepithelkarzinom, gp75 von Melanom, onkofetales Antigen von Melanom; Kohlenhydrate/Lipide wie muc1-Mucin von Brust-, Pankreas- und Ovarkrebs, GM2- und GD2-Ganglioside von Melanom; Onkogene wie mutiertes p53 von Karzinom, mutiertes ras von Dickdarmkrebs und HER-2/neu-Protoonkogen von Brustkarzinom; virale Produkte wie menschliche Papillomavirus-Proteine von Plattenepithelkrebsen von Zervix und Ösophagus. Es ist auch vorgesehen, dass proteinartige Tumorantigene durch HLA-Moleküle präsentiert werden können als vom vollständigen Protein abgeleitete spezifische Peptide. Die metabolische Verarbeitung von Proteinen zur Erhaltung von antigenischen Peptiden ist im Stand der Technik gut bekannt: siehe zum Beispiel US-Patent 5.342.774 (Boon et al.). Das vorliegende Verfahren umfasst daher die Zuführung von antigenischen Peptiden und solchen Peptiden in einem größeren Polypeptid oder vollständigen Protein, die zu antigenischen Peptiden führen. Die Zuführung antigenischer Peptide oder Proteine kann zu humoraler oder zellulärer Immunität führen.

[0038] Im Allgemeinen können Probanden eine wirksame Menge des Tumorantigens und/oder davon erhaltenen Peptids durch eine oder mehrere der unten näher beschriebenen Verfahren erhalten. Anfangsdosen können von "Booster"-Dosen gefolgt werden, gefolgt von Immunisierungsprotokollen, die im Stand der Technik Standard sind. Die Zuführung von Tumorantigenen kann daher die Proliferation von zytolytischen T-Lymphozyten stimulieren.

[0039] In Fällen von Protein- und Peptidantigenen soll die kovalente Bindung an den FcRn-Partner die Verknüpfung durch Peptidbindungen in einer einzelnen Polypeptidkette beinhalten. Etablierte Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press; Cold Spring Harbor, NY 1989) würden verwendet, um eine DNA zu konstruieren, die ein Fusionsprotein kodiert, das aus dem antigenischen Peptid oder Protein und einem FcRn-Partner besteht. Diese DNA würde in einen Expressionsvektor eingebracht und mittels etablierter Verfahren in eine Bakterien- oder Eukaryotenzelle eingeführt. Das Fusionsprotein würde aus den Zellen oder aus dem Zellkulturmedium durch etablierte Verfahren auf gereinigt werden.

[0040] Bei der Verabreichung werden die Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung in pharmazeutisch annehmbaren Zubereitungen verabreicht. Solche Zubereitungen können routinemäßig pharmazeutisch annehmbare Konzentrationen von Salzen, Puffermitteln, Konservierungsmitteln, kompatiblen Trägern, zusätzliche immunverstärkende Mittel wie Adjuvanzien und Zytokine und optional andere therapeutische Mittel enthalten. Auf diese Weise sind "Cocktails", die die Konjugate und die Mittel beinhalten, vorgesehen. Die Mittel selbst können an FcRn-Bindungspartner konjugiert sein, um die Zuführung der Mittel über die Epithelbarrieren zu verbessern.

[0041] Die erfindungsgemäßen Konjugate können als solche (pur) oder in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes verabreicht werden. Bei Verwendung in der Medizin sollten die Salze pharmazeutisch annehmbar sein, nicht pharmazeutisch annehmbare Salze können jedoch in geeigneter Weise verwendet werden, um pharmazeutisch annehmbare Salze daraus herzustellen, und sind nicht aus dem Bereich der Erfindung ausgenommen. Solche pharmazeutisch annehmbaren Salze beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf die, die aus den folgenden Säuren hergestellt werden: Salz-, Hydrobrom-, Schwefel-, Salpeter-, Phosphor-, Malein-, Essig-, Salicyl-, p-Toluolsulfon-, Wein-, Zitronen-, Methansulfon-, Ameisen-, Malon-, Succin-, Naphthalen-2-sulfon- und Benzolsulfinsäure. Pharmazeutisch annehmbare Salze können auch als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalze hergestellt werden, beispielsweise Natrium-, Kalium- oder Kalziumsalze der Car-

bonsäuregruppe.

[0042] Geeignete Puffermittel beinhalten: Essigsäure und ein Salz (1–2% Gew./Vol.); Zitronensäure und ein Salz (1–3% Gew./Vol.); Borsäure und ein Salz (0,5–2,5% Gew./Vol.); Natriumbikarbonat (0,5–1,0% Gew./Vol.); und Phosphorsäure und ein Salz (0,8–2% Gew./Vol.). Geeignete Konservierungsmittel beinhalten Benzalkoniumchlorid (0,003–0,03 Gew./Vol.); Chlorbutanol (0,3–0,9% Gew./Vol.); Parabene (0,01–0,25% Gew./Vol.) und Thimerosal (0,004–0,02% Gew./Vol.).

[0043] Der hier verwendete Begriff "Träger", der unten ausführlicher beschrieben wird, bedeutet ein oder mehrere feste oder flüssige Füllmittel, Verdünnungsmittel oder einkapselnde Substanzen, die für die Verabreichung an einen Menschen oder ein anderes Säugetier geeignet sind. Der "Träger" kann ein organischer oder anorganischer Bestandteil sein, natürlich oder synthetisch, mit dem der wirksame Bestandteil kombiniert wird, um die Verabreichung zu erleichtern.

[0044] Die Komponenten der pharmazeutischen Zusammensetzungen sind in der Lage, mit den Konjugaten der vorliegenden Erfindung und miteinander in einer Weise vermengt zu werden, dass keine Wechselwirkung stattfindet, die die gewünschte pharmazeutische Wirksamkeit beeinträchtigt. Die Komponenten oraler Arzneimittelformulierungen beinhalten Diluentien, Bindemittel, Schmiermittel, Gleitmittel, Sprengmittel, Färbungsmittel und Geschmacksstoffe. Einkapselnde Substanzen für die Herstellung magensaftresistent überzogener oraler Formulierungen beinhalten Celluloseacetatphthalat, Polyvinylacetatphthalat, Hydroxypropylmethylcellulosephthalat und Methacrylsäureester-Kopolymere. Feste orale Formulierungen wie Kapseln oder Tabletten sind bevorzugt. Elixiere und Sirupe sind ebenfalls gut bekannte orale Formulierungen. Die Komponenten von Aerosolformulierungen beinhalten solubilisierte wirksame Bestandteile, Antioxidantien, Lösungsmittelgemischungen und Treibmittel für Lösungsmittelgemischungen sowie mikronisierte und suspendierte wirksame Bestandteile, Dispergierungsmittel und Treibmittel für Suspensionsformulierungen. Die erfindungsgemäßen oralen, Aerosol- und nasalen Formulierungen können von injizierbaren Zubereitungen aus dem Stand der Technik unterschieden werden, da solche Formulierungen nicht-aseptisch sein können, wohingegen injizierbare Zubereitungen aseptisch sein müssen.

[0045] Der Begriff "Adjuvans" soll jede Substanz beinhalten, die in die erfindungsgemäßen Konjugate aufgenommen ist oder gleichzeitig mit diesen verabreicht wird, und die die Immunantwort bei dem Probanden unspezifisch verbessert. Adjuvanzien beinhalten Aluminiumverbindungen, z.B. Gele, Aluminiumhydroxid und Aluminiumphosphat, und das kom-

plette oder inkomplette Freund-Adjuvans (bei dem das Konjugat in die wässrige Phase einer stabilisierten Wasser-in-Paraffinöl-Emulsion aufgenommen ist). Das Paraffinöl kann ersetzt werden durch verschiedene Arten von Ölen, z.B. Squalen- oder Erdnussöl. Andere Materialien mit adjuvanten Eigenschaften beinhalten BCG (abgeschwächtes *Mycobacterium tuberculosis*), Kalziumphosphat, Levamisol, Isoprinosin, Polyanionen (z.B. Poly-A:U) Leutinan, Pertussistoxin, Choleratoxin, Lipid A, Saponine und Peptide, z.B. Muramylpeptid. Seltenerdsalze, z.B. Lanthan und Cerium können ebenfalls als Adjuvans eingesetzt werden. Die Menge von Adjuvans hängt von dem Probanden und dem jeweils verwendeten Konjugat ab und kann vom Fachmann leicht ohne unangemessenen experimentellen Aufwand festgestellt werden.

[0046] Andere supplementäre immunverbessernde Mittel wie beispielsweise Zytokine können in Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Konjugaten zugeführt werden. Die vorgesehenen Zytokine sind solche, die die vorteilhaften Wirkungen fördern, die aus der Verabreichung der Immunmodulatoren gemäß der Erfindung resultieren. Zytokine sind Faktoren, die das Wachstum und die Reifung von Zellen, einschließlich Lymphozyten, fördern. Es wird angenommen, dass die Zugabe von Zytokinen die Zytokinaktivität steigern wird, die in vivo durch die Ausführung der erfindungsgemäßen Verfahren stimuliert wird. Die bevorzugten Zytokine sind Interleukin(IL)-1, IL-2, Gamma-Interferon und Tumornekrosefaktor α . Als weitere geeignete Zytokine werden IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, Erythropoietin, Leukämie inhibierender Faktor (leukemia inhibitory factor), Onkostatin-M, der ciliäre neurotrophe Faktor, Wachstumshormon, Prolaktin, CD40-Ligand, CD27-Ligand, CD30-Ligand, Alpha-Interferon, Beta-Interferon und Tumornekrosefaktor β angesehen. Andere Zytokine, die bekanntermaßen die T-Zell-Aktivität in einer Weise modulieren, die nach der Erfindung wahrscheinlich nützlich ist, sind koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren, einschließlich Granulocyten und/oder Markophagen stimulierende Faktoren (GM-CSF, G-CSF und CSF-1) und Plättchen-abgeleitete, epidermale, insulinartige, transformierende und Fibroblastenwachstumsfaktoren. Die Auswahl der jeweiligen Zytokine hängt von der jeweils gewünschten Modulation des Immunsystems ab. Die Aktivität von Zytokinen bei bestimmten Zelltypen ist dem Durchschnittsfachmann bekannt.

[0047] Die genauen Mengen der bei der Erfindung verwendeten vorstehenden Zytokine hängt von einer Reihe von Faktoren ab, einschließlich dem gewählten Konjugat, der Dosis und dem zeitlichen Ablauf der Dosierung, der Verabreichungsart und den Eigenschaften des Probanden. Die gewählten genauen Mengen können ohne unangemessenen experimen-

telten Aufwand festgestellt werden, insbesondere da eine Schwellenmenge jede Menge sein wird, die die gewünschte Immunantwort verbessert. Es wird daher angenommen, dass, in Abhängigkeit von der Zuführungsart, Nanogramm- bis Milligramm-Mengen geeignet sind, dass Nanogramm- bis Mikrogramm-Mengen jedoch am besten geeignet sind, da physiologische Niveaus von Zytokinen entsprechend niedrig sind.

[0048] Die erfindungsgemäßen Zubereitungen werden in wirksamen Mengen verabreicht. Eine wirksame Menge ist eine Menge eines Konjugates, die allein oder zusammen mit weiteren Dosen eine Immunantwort in gewünschter Form stimuliert. Dies kann die Stimulierung einer humoralen Antikörperreaktion, die zu einem Anstieg des Antikörpertiters im Serum führt, einer verbesserten mukosalen Immunität, einer klonalen Expansion von zytotoxischen T-Lymphozyten oder der Toleranz gegenüber einem Antigen, einschließlich einem Selbst-Antigen, beinhalten. Es wird angenommen, dass, in Abhängigkeit vom Verabreichungsweg, Dosen im Bereich von 1 Nanogramm/Kilogramm bis 100 Milligramm/Kilogramm wirksam sein werden. Es wird davon ausgegangen, dass der bevorzugte Bereich zwischen etwa 500 Nanogramm und 500 Mikrogramm/Kilogramm, und am meisten bevorzugt zwischen 1 Mikrogramm und 100 Mikrogramm/Kilogramm liegt. Die absolute Menge wird von einer Reihe von Faktoren abhängen, einschließlich dem gewählten Konjugat, der gewünschten Immunmodulation, ob die Verabreichung in einer einzelnen oder mehreren Dosen erfolgt, und von individuellen Patientenparametern, einschließlich Alter, körperlichem Zustand, Größe und Gewicht. Für die Behandlung eines Probanden mit einem Tumor können die Größe, Art, Lokalisierung und Metastasen des Tumors als Faktoren bei der Bestimmung der zu verabreichenden Menge Konjugat berücksichtigt werden. Diese Faktoren sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und können ohne unzumutbaren experimentellen Aufwand berücksichtigt werden.

[0049] Verschiedene Verabreichungswege sind verfügbar. Der jeweilige Modus wird natürlich von dem jeweils gewählten Konjugat, dem jeweils behandelten Zustand und der für die therapeutische Wirksamkeit erforderlichen Dosierung abhängen. Die erfindungsgemäßen Verfahren beinhalten allgemein gesagt die Zuführung der erfindungsgemäßen Konjugate an eine epitheliale Oberfläche. Bevorzugte Verabreichungsarten sind oral, intrapulmonal, intrabiliär und intranasal.

[0050] Zusammensetzungen können in geeigneter Weise in Einheitsdosierform angeboten werden, und können durch jedes der auf dem Gebiet der Pharmazie gut bekannten Verfahren hergestellt werden. Alle Verfahren beinhalten den Schritt des Inverbindungbringers des Konjugates mit einem Träger, der eine

oder mehrere akzessorische Bestandteile bildet. Im Allgemeinen werden die Zusammensetzungen hergestellt, indem das Konjugat mit einem flüssigen Träger, fein verteilten festen Träger oder beidem gleichmäßig und gründlich in Verbindung gebracht wird und anschließend, falls erforderlich, das Produkt geformt wird.

[0051] Andere Zufuhrsysteme können Zufuhrsysteme mit zeitgesteuerter, verzögerter oder anhaltender Abgabe sein. Solche Systeme können wiederholte Verabreichungen des erfindungsgemäßen Konjugates vermeiden, was die Annehmlichkeit für den Probanden und den Arzt erhöht. Viele Arten von Abgabe-/Zufuhrsystemen sind erhältlich und dem Durchschnittsfachmann bekannt. Sie beinhalten polymerbasierte Systeme wie Polymilchsäure und Polyglykolsäure, Polyanhydride und Polycaprolakton; Wachsbeschichtungen, komprimierte Tabletten unter Verwendung konventioneller Bindemittel und Excipienten, und dergleichen. Bioadhäutive Polymersysteme zur Verbesserung der Zufuhr eines Materials an das Darmepithel sind bekannt und in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/21906 beschrieben. Kapseln für die Zufuhr von Mitteln an das Darmepithel sind ebenso beschrieben in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/19660.

BEISPIELE

Materialien

Abkürzungen

BSA, Rinderserumalbumin; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure; CT-B, Choleratoxin B-Untereinheit; DMEM, Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium; DMSO, Dimethylsulfoxid; DOC, Desoxycholat; ECL, verbesserte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence); ELISA, enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay; HBSS, gepufferte Salzlösung nach Hanks (Hanks' balanced salt solution) ohne Kalzium oder Magnesium; HEPES, N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure); hGH, humanes Wachstumshormon; IEC, Darmepithelzellen (intestinal epithelial cells); KI, Kaliumiodid; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; NaOH, Natriumhydroxid; NH₄Cl, Ammoniumchlorid; NHS-Rhodamin, N-Hydroxysuccinimidyl-Rhodamin; RNA, Ribonukleinsäure; RT-PCR, Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion; SATA, N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat; SDS-PAGE, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Sulfo-LC-SPDP, Sulfosuccinimidyl-6-[3-(2-pyridyl-dithio)propionamid]hexanoat; Sulfo-NHS-Biotin, Sulfosuccinimidobiotin; Sulfo-SMCC, Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclo-hexan-1-carboxylat.

Chemikalien

[0052] cDNA-Zykluskits wurden von Invitrogen (San Diego, CA) bezogen. Taq-Polymerase wurde von Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT) bezogen. Circum-Vent™-Kits wurden von New England Biolabs (Beverly, MA) bezogen. Radionuklide und radioaktive Chemikalien wurden von DuPont/NEN (Boston, MA) bezogen. HBSS und DMEM wurden von GIBCO/Life Technologies (Gaithersburg, MD) bezogen. RPMI 1640 wurde von Cellgro (Herndon, VA) bezogen. L-Glutamin wurde von Cellgro bezogen. Protein-A-Sepharose wurde von Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) bezogen. Streptavidin-Meerrettichperoxidase, Sulfo-LC-SPDP, Sulfo-NHS-Biotin, Sulfo-SM-CC, SATA und immobilisiertes Ficin wurde von Pierce (Rockford, IL) bezogen. Balb/c-Mäusen wurden von den Charles River Laboratories (Wilmington, MA) bezogen. ECL-Kits wurden von Amersham (Arlington Heights, IL) bezogen. Plasmin, AvidChrom-Protein A, Protein-G-Sepharose, BSA, Choleratoxin-B-Untereinheit, Anti-hGH-Antikörper und alle anderen Chemikalien wurden von Sigma (St. Louis, MO) bezogen.

Beispiel 1: Expression von FcRn-mRNA in menschlichen intestinalen epithelialen Primärzellen und Zelllinien.

[0053] Die Gesamt-RNA wurde aus adulten menschlichen Enterocyten durch im Stand der Technik gut bekannte Standardmethoden (Sambrook et al., ibid.) extrahiert. Ein Mikrogramm RNA von jedem Zelltyp wurde als Matrize verwendet, um das cDNA-Substrat für die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung eines cDNA-Zyklus-Kits (Invitrogen, San Diego, CA) herzustellen. Dreißig PCR-Zyklen wurden an der cDNA unter Verwendung von Taq-Polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) nach Herstelleranweisungen unter Verwendung der Primer TGCTGGG-CTGTGAACTG und CGCTTTAGCAGTCGGAA durchgeführt. Die PCR-Zyklusbedingungen waren: Denaturierung bei 94°C für eine Minute, Anlagerung bei 55°C für zwei Minuten und Verlängerung bei 72°C für drei Minuten. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Gelektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht, was die Anwesenheit des erwarteten etwa 800 Basenpaare großen Amplifikationsproduktes in allen Proben mit Ausnahme der adulten Epithelzellen des Dickdarms zeigte. Um die Identität des RT-PCR-Amplifikationsproduktes zu bestätigen, wurde die DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in pCR II (Invitrogen, San Diego, CA) subkloniert und unter Verwendung eines Prism™-Farbstoff-Desoxy-Terminator-Zyklus-Sequenzierungskits (Applied Biosystems, Foster City, CA) unter Verwendung von Primern von sowohl der Vektor- als auch der Human-FcRn-Sequenz sequenziert. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Sequenzierer von Ap-

plied Biosystems analysiert. Die Sequenz der Amplifikationsprodukte passte exakt zu der FcRn-Gensequenz, was die Identität des exprimierten Gens bestätigte.

Beispiel 2: Detektion von FcRn-mRNA durch Northern-Blot

[0054] Um die Expression von FcRn in menschlichen Darmepithelzellen und Zelllinien zu bestätigen, wurde ein Northern Blot unter Verwendung der wie in Beispiel 1 beschrieben aus adulten menschlichen Enterozyten hergestellten RNA-Proben und von zwei menschlichen vom Enddarm stammenden Adenokarzinom-Zelllinien, Caco-2 und HT-29, hergestellt. Die RNA-Proben wurden durch Formaldehyd/Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Standardverfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 1989) auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde unter Verwendung einer ³²P-radiomarkierten Sonde von 120 Basenpaaren von der 3'-untranslatierten Region von FcRn durch Standardverfahren sondiert. Autoradiogramme des Northern-Blots zeigten die Anwesenheit des 1,5-Kilobasen-hFcRn-Transkripts in den Enterozyten und beiden Zelllinien. Die Expression von FcRn in menschlichen adulten Darmepithelzellen und Zelllinien wurde somit durch zwei verschiedene Verfahren der RNA-Detektion demonstriert.

Beispiel 3: Markierung und Immunpräzipitation des MHC-Klasse-I-verwandten Fc-Rezeptors (FcRn) von Darmepithelzellen

[0055] Die Expression von FcRn in menschlichen Darmepithelzellen wurde durch Immunpräzipitation des Proteins bestätigt. Caco-2-Zellen wurden metabolisch unter Verwendung von 32S-Methionin (DuPont/NEN, Boston, MA) markiert, und Proteine wurden durch im Stand der Technik gut bekannte Verfahren extrahiert (Harlow und Lane, Antibodies: A Laboratory Manual). Ein an Protein-A-Sepharose gebundenes für die schwere Kette des Ratten-MHC-Klasse-I-verwandten FcR spezifisches Antiserum vom Kaninchen wurde verwendet, um FcRn aus den Zellextrakten unter Verwendung von Standardverfahren einer Immunpräzipitation zu unterwerfen (FcRn kann durch gut etablierte Verfahren gereinigt werden, Simister und Rees 1985, European J. Immunology 15: 733–8, und verwendet werden, um Ratten zu immunisieren, mit anschließender Sammlung von Serum, Harlow und Lane, oben). Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Ein FcRn-Protein von 48 Kilodalton wurde beobachtet, was die Expression auf dem RNA-Niveau bestätigte.

Beispiel 4: Expression von FcRn-Protein auf der Zelloberfläche von menschlichen Darmepithelzellen

[0056] Etwa 3×10^7 HT-29 Darmepithelzellen wurden mittels nichtenzymatischer Verfahren von Zellkulturplatten abgelöst und vier Mal mit eiskalter gepufferter Salzlösung nach Hanks, die kein Kalzium oder Magnesium enthielt, (HBSS-, GIBCO/Life Technologies, Gaithersburg, MD) gewaschen. Um die Zelloberflächenproteine zu markieren, wurden die gewaschenen Zellen zweimal für 20 Minuten mit 1,5 ml 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL) in DMSO inkubiert. Die markierten Zellen wurden fünf Mal mit 50 mM NH₄Cl gewaschen, 20 Minuten mit 10 ml RPMI 1640 (Cellgro, Herndon, VA), enthaltend 1 mM L-Glutamin (Mediatech, Washington, DC), inkubiert und vier Mal mit HBSS-gewaschen. Die Zellen wurden lysiert, dann über Nacht mit Protein-A-Sepharose-Perlen (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) unter Verwendung von im Stand der Technik gut bekannten Standardtechniken vorgereinigt. SDS und Desoxycholsäure (DOC) wurden zu den Überständen zu Endkonzentrationen von 0,1% bzw. 0,5% zugegeben. Die Lysate wurden vorgereinigt mit normalem Kaninchenserum und durch im Stand der Technik gut bekannte Techniken mit polyklonalem Antikörper gegen Ratten-MHC-Klasse-I-verwandtem FcR aus Kaninchen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde für die Inkubation mit 1:10.000 verdünnter Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Pierce, Rockford, IL) nach Herstellerempfehlungen aufbereitet. Die Membran wurde dann für die Detektion von gebundener Meerrettichperoxidase unter Verwendung eines ECL-Kits (Amersham, Arlington Heights, IL) aufbereitet. Durch Spaltung des chemilumineszierenden Substrates emittiertes Licht wurde durch Exposition der Membran gegenüber lichtempfindlichem Film detektiert. Die Filmexpositionen zeigten, dass FcRn auf der Oberfläche von HT-29-Darmepithelzellen exprimiert wurde.

Beispiel 5: Funktionelle Aktivität von menschlichem FcRn auf der Zelloberfläche von Darmepithelzellen

[0057] Um zu zeigen, dass der auf der Zelloberfläche von Darmepithelzellen exprimierte FcRn funktionstüchtig war, wurden Caco-2-Zellen und menschliche adulte jejunale Darmepithelzellen (IECs) auf ihre Fähigkeit getestet, das Fc-Fragment eines Antikörpers zu binden. Caco-2-Zellen und jejunale IECs wurden auf Mikrozentrifugengefäße aufgeteilt (2×10^6 Zellen pro Gefäß) und bei 2000 UPM für 2–3 Minuten bei 4°C niedergeschlagen. Die Zellniederschläge wurden einmal in DMEM, enthaltend 20 mM HEPES, pH 6,0 oder pH 8,0, bei 4°C gewaschen und in 0,2 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden für den Assay in 12-Napf-Platten übertragen. ¹²⁵I-Fc-Fragment (200 ng/ml, 4×10^{-9} M)

in DMEM, enthaltend 20 mM HEPES, 1,0 mM KI und 0,1% Fischgelatine, pH 6,0 oder 8,0, mit oder ohne 0,5 mg/ml unmarkiertes Human-IgG ($3,3 \times 10^{-6}$ M), wurden zu jedem Napf zugegeben. Die Zellen konnten für zwei Stunden bei 37°C in einer befeuchteten 5% CO₂-Atmosphäre IgG oder Fc binden. Die Zellen wurden in Mikrozentrifugengefäße transferiert und bei 2000 UPM für 2–3 Minuten bei 4°C niedergeschlagen. Ungebundenes ¹²⁵I-Fc wurde durch einmäßiges Waschen des Zellniederschlags mit kaltem DMEM, enthaltend 20 mM HEPES, pH 6,0 oder pH 8,0, bei 4°C entfernt. Die Zellen wurden in 0,5 ml 0,1 M NaOH zersetzt und die erhaltene Lösung wurde in Szintillationsgefäße transferiert. ¹²⁵I wurde unter Verwendung eines Clinigamma-1272-Gamma-Zählers (LKB Wallac, Piscataway, NJ) quantifiziert. Sowohl die Caco-2-Zellen als auch die menschlichen adulten Jejunum-IECs banden ¹²⁵I spezifisch bei pH 6,0, jedoch nicht bei pH 8,0, was eine funktionelle pH-abhängige Bindung zeigt, wie sie für neonatalen Ratten-FcRn und klonierten menschlichen FcRn gezeigt wurde (Story et al., J. Exp. Med. 180: 2377–2381; Dezember 1994).

Beispiel 6: Zubereitung von menschlichem Immunoglobulin G

[0058] Nichtspezifisches gereinigtes Immunglobulin G von Mensch, Maus, Ratte, Ziege, Schwein, Kuh und anderen Arten kann von kommerziellen Anbietern wie Sigma Chemical Co., Pierce Chemical, HyClone Laboratories, ICN Biomedicals und Organon Teknica-Cappel bezogen werden.

[0059] Immunglobulin G kann auch durch Ammoniumsulfat-Präzipitation von Blut-Serum isoliert werden. Das Proteinpräzipitat wird durch Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltrationschromatographie weiter fraktioniert, um im Wesentlichen gereinigtes nichtspezifisches IgG zu isolieren. Mit nichtspezifischem IgG ist gemeint, dass innerhalb der Antikörperpopulation oder des Antikörperpools keine einzelne Spezifität dominant ist.

[0060] Immunglobulin G kann auch aus Blutserum durch Adsorption an Protein A, das an einen festen Träger wie beispielsweise Protein-A-Sepharose (Pharmacia), AvidChrom-Protein A (Sigma) oder Protein-G-Sepharose geheftet ist, gereinigt werden. Andere Verfahren zur Aufreinigung von IgG sind dem Fachmann gut bekannt und können für die Zwecke der Isolierung nichtspezifischen IgGs eingesetzt werden.

Beispiel 7: Herstellung von menschlichem Immunglobulin-G-Fc-Fragment

[0061] Zur Herstellung des Fc-Fragments von menschlichem IgG wurde IgG, wie es in Beispiel 6 isoliert wurde, nach vom Hersteller empfohlenem

Protokoll einem Verdau mit immobilisiertem Papain (Pierce) unterzogen. Andere Proteasen, die IgG verdauen, um intakte Fc-Fragmente herzustellen, die an Fc-Rezeptoren binden, z.B. Plasmin (Sigma) oder immobilisiertes Ficin (Pierce), sind dem Fachmann bekannt und können verwendet werden, um Fc-Fragmente herzustellen. Das verdaute Immunglobulin wird dann mit einer Affinitätsmatrix wie beispielsweise Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Sepharose inkubiert. Nichtbindende Bereiche von IgG werden von der Affinitätsmatrix durch ausgiebiges Waschen in Satz- oder Säulenformat eluiert. Fc-Fragmente von IgG werden dann durch Zugabe eines Puffers, der mit der Fc-Adsorptionsmittelbindung inkompatibel ist, eluiert. Andere bei der Aufreinigung von Fc-Fragmenten wirksame Methoden können ebenfalls eingesetzt werden.

Beispiel 8: Konjugation von Verbindungen an menschliche Immunglobulin-Fc-Fragmente

[0062] Um Verbindungen über die FcRn-Transportmechanismen zuzuführen, können solche Verbindungen an vollständiges IgG oder Fc-Fragmente gekoppelt werden. Die Chemie der Quervernetzung und wirksame Reagenzien für solche Zwecke sind im Stand der Technik gut bekannt. Die Art des zur Konjugierung des vollständigen IgG oder Fc-Fragments verwendeten Quervernetzungsreagenzes und die zuzuführende Verbindung sind durch die Erfindung nicht begrenzt. Jedes Quervernetzungsmittel kann verwendet werden, vorausgesetzt, dass a) die Aktivität der Verbindung erhalten bleibt, und b) die Bindung des Fc-Teils des Konjugats durch den FcRn nicht nachteilig beeinflusst wird.

[0063] Ein Beispiel einer wirksamen Ein-Schritt-Quervernetzung von Fc und einer Verbindung ist die Oxidation von Fc mit Natriumperiodat in Natriumphosphatpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 4°C mit der zu konjugierenden Verbindung. Die Konjugation kann auch vorgenommen werden durch Derivatisierung sowohl der Verbindung als auch des Fc-Fragments mit Sulfosuccinimidyl-6-[3-(2-pyridyl-dithio)propioanamid]hexanoat (Sulfo-LC-SPDP, Pierce) für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Die Konjugate können auch hergestellt werden durch Derivatisierung von Fc-Fragmenten mit Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC, Pierce) und die mit Fc zu konjugierende Verbindung wird mit N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA) thioliert. Die derivatisierten Verbindungen werden von Quervernetzer gereinigt und bei Raumtemperatur für eine Stunde zusammengebracht, um die Quervernetzung zu ermöglichen. Andere Quervernetzungsreagenzien, umfassend funktionelle Aldehyd-, Imid-, Cyano-, Halogen-, Carboxyl-, aktivierte Carboxyl-, Anhydrid- und Maleimid-Gruppen, sind dem Fachmann bekannt und können eben-

falls für die Konjugation von Verbindungen an Fc-Fragmente verwendet werden. Die Wahl des Quervernetzungsmittels hängt natürlich von der Art der Verbindung ab, die an Fc gebunden werden soll. Die oben beschriebenen Quervernetzungsreagenzien sind wirksam für Protein-Protein-Konjugationen. Wenn die zu konjugierende Verbindung ein Kohlenhydrat ist oder einen Kohlenhydratrest aufweist, sind heterobifunktionelle Quervernetzungsreagenzien wie beispielsweise ABH, M_2C_2H , MPBH und PDPH nützlich für die Konjugation mit einem proteinartigen FcRn-Bindungsmolekül (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Ein weiteres Verfahren zur Konjugierung von Proteinen und Kohlenhydraten wurde von Brumman et al. offenbart worden (Genetic Engineering News, October 1, 1995, 5, 16). Wenn die zu konjugierende Verbindung ein Lipid ist oder einen Lipidrest aufweist, der als Konjugationsstelle für das FcRn-Bindungsmolekül geeignet ist, dann können Quervernetzer wie SPDP, SMPB und Derivate davon verwendet werden (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Es ist auch möglich, jedes zuzuführende Molekül durch nichtkovalente Mittel zu konjugieren. Ein geeigneter Weg für die Erlangung einer nichtkovalenten Konjugation besteht darin, Antikörper gegen die zuzuführende Verbindung, beispielsweise monoklonale Antikörper, durch im Stand der Technik gut bekannte Techniken zu erzeugen und einen monoklonalen Antikörper auszuwählen, der die richtige Fc-Region und die gewünschten antigenbindenden Eigenschaften aufweist. Das zuzuführende Antigen wird dann zunächst an den monoklonalen Antikörperträger gebunden. Bei all den obigen Quervernetzungsreaktionen ist es wichtig, die derivatisierten Verbindungen von Quervernetzungsreagenz zu reinigen. Es ist auch wichtig, das endgültige Konjugat im Wesentlichen von unkonjugierten Reaktanten zu reinigen. Die Aufreinigung kann bewirkt werden durch Affinitäts-, Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie, basierend auf den Eigenschaften einer der Komponenten. Ein besonders bevorzugtes Verfahren ist ein anfänglicher Affinitätsreinigungsschritt unter Verwendung von Protein-A-Sepharose, um Fc- und Fc-Verbindungskonjugate zu erhalten, gefolgt von Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie auf Basis der Masse, Größe oder Ladung des Fc-Konjugates. Der anfängliche Schritt des Reinigungsschemas stellt sicher, dass das Konjugat an FcRn bindet, was ein wesentliches Erfordernis der Erfindung ist.

Beispiel 9: IgG-erleichterte Zufuhr von Fremd-Antigen über die Darmepithelbarriere

[0064] Um die Fähigkeit von Fc-Bindungspartner-Antigenkonjugaten zu testen, über Epithelbarrieren transportiert zu werden, werden Fremd-Antigene zur Verabreichung an Mäuse an IgG-Moleküle konjugiert. Ein geeignetes Fremd-Antigen ist der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin, da er in gefrorenen Semidünnsschnitten von Darmepithel sichtbar gemacht

werden kann. Rhodamin wird durch Inkubation mit Succinyl-Rhodamin (Molecular Probes, Eugene, OR) nach Herstellerempfehlungen kovalent mit nichtspezifischem Maus-IgG, hergestellt wie in Beispiel 6 beschrieben, Choleratoxin-B-Untereinheit (Sigma) und Ovalbumin (Sigma) verknüpft. Das IgG-Rhodamin-Konjugat wird durch Protein-G-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Dialyse zur Entfernung von unkonjugiertem Succinyl-Rhodamin werden Choleratoxin-B(CT-B)-Rhodamin- und Ovalbumin-Rhodamin-Konjugate durch Gelfiltrationen oder Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Fraktionen des Eluats werden durch Feststellung der Fluoreszenz auf Anwesenheit von Konjugaten untersucht. Die funktionelle Bindung der IgG- und CT-B-Untereinheit-Konjugate kann durch Bindung an FcRn bzw. Gangliosid GM1 getestet werden. Choleratoxin-B-Rhodamin und Ovalbumin-Rhodamin dienen als Positiv- bzw. Negativkontrollen.

[0065] Durch intragastrische Verabreichung in Gegenwart von 75 Mikromol NaHCO₃ und 20 mg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor zur Hemmung des Abbaus im Magen wurden Balb/c-Mäusen 0,2 Nanomol der oben beschriebenen drei Rhodamin-Konjugate verabreicht, mit oder ohne 0,2 Nanomol unmarkiertem Choleratoxin als unspezifisches Adjuvans. Nach 6 Stunden wurden die Mäuse getötet und der Darm wurde entfernt, gefroren und für die Anfertigung von Semidünnschnitten aufbereitet. Schnitte des Darmepithels werden auf einem Fluoreszenzmikroskop beleuchtet und auf intrazelluläre Fluoreszenz untersucht. Die Anwesenheit von Fluoreszenz in Darmepithelzellen von mit IgG-Rhodamin gefütterten Mäusen zeigt, dass die IgG-Konjugate tatsächlich in apikal-basolateraler Richtung über die Darmepithelbarriere transportiert werden. FcRn ist in der Lage, Immungene als Konjugate mit FcRn-Bindungspartner zu transportieren.

Beispiel 10: Immunantwort der Maus-Mukosa auf oral zugeführtes Antigen-IgG-Konjugat über FcRn-vermittelte Transzytose

[0066] Transgene Mäuse, die für die Deletion von β₂-Mikroglobulin (eine kritische Komponente der Fc-Rezeptor-Funktion) homozygot waren, und ihre normalen Wildtyp-Wurfgefährten werden für Untersuchungen zur Erzeugung einer mukosalen Immunantwort verwendet. Wenn Rhodamin-IgG durch Bindung an Fc-Rezeptoren der apikalen Membran eine mukosale Immunantwort auslöst, sollte eine positive Immunantwort in den Wildtyp-, nicht jedoch in den β₂-Mikroglobulin-"Knockout"-Mäusen gefunden werden. Im Gegensatz dazu sollte Rhodamin-Choleratoxin-B-Untereinheit (CT-B) eine positive Immunantwort sowohl in den Wildtyp- als auch den "Knockout"-Mäusen auslösen, da eine Transzytose von CT-B über die epitheliale Barriere nicht von der Bindung an die Fc-Rezeptoren der apikalen Membran

abhängt. Rhodamin-Ovalbumin tritt nicht in Transzytose-Vesikel ein (kann jedoch durch Flüssigphasen-Endozytose in Darmepithelien eintreten) und sollte in keiner der Mäuse eine Immunantwort auslösen.

[0067] Drei Gruppen von Wildtyp- und β₂-Mikroglobulin-Knockout-Mäusen wurden oral mit den in Beispiel 9 beschriebenen drei Rhodamin-Konjugaten immunisiert. Parallelversuche werden unter Zugabe von 0,2 Nanomol Choleratoxin als unspezifisches Adjuvans durchgeführt. Äquimolare Mengen des Rhodamin-Konjugates werden intragastrisch verabreicht. Die Mäuse werden durch dieses Verfahren alle zehn Tage insgesamt drei Mal "immunisiert". Zwei Wochen nach der dritten oralen Immunisierung werden die Mäuse getötet und die Rhodamin-spezifische Immunantwort wird durch ELISA an Darmsekreten und Serum mittels Standardverfahren festgestellt. Anti-Rhodamin-Serum-Immunglobuline sind in den mit Rhodamin-Konjugaten von CT-B und IgG gefütterten Wildtyp-Mäusen am augenfälligsten. Knockout-Mäuse, denen β₂-Mikroglobulin fehlte, erzeugen eine mukosale Immunantwort gegen Rhodamin-CT-B, nicht jedoch gegen Rhodamin-IgG, was zeigt, dass die Rezeptor-vermittelte Transzytose eine wesentliche Rolle bei der mukosalen Immunantwort spielt. Das Kontroll-Rhodamin-Ovalbumin-Konjugat löst in den Wildtyp- oder den β₂-Mikroglobulin-Knockout-Mäusen eine geringe oder gar keine Immunantwort aus.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitung für die Verabreichung an eine Epithelbarriere eines Patienten für die Zuführung eines Moleküls über die Epithelbarriere, umfassend ein Konjugat eines FcRn-Bindungspartners, der an das Molekül gekoppelt ist, wobei der FcRn-Bindungspartner in dem Konjugat menschliches FcRn bindet und wobei die Zubereitung als Kapsel, Tablette, Elixier oder Sirup für die Zuführung an eine menschliche Epithelbarriere formuliert ist.
2. Pharmazeutische Zubereitung für die Verabreichung an eine Epithelbarriere eines Patienten für die Zuführung eines Moleküls über die Epithelbarriere, umfassend ein Konjugat eines FcRn-Bindungspartners, der an das Molekül gekoppelt ist, wobei der FcRn-Bindungspartner in dem Konjugat menschliches FcRn bindet und wobei die Zubereitung als Aerosol für die Zuführung an eine menschliche Epithelbarriere formuliert ist.
3. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein Antigen oder ein therapeutisches Mittel ist.
4. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein Zytokin ist.

5. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 4, wobei das Zytokin ein Interleukin, ein Wachstumsfaktor, ein Interferon oder ein Tumornekrosefaktor ist.

6. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 5, wobei das Zytokin Alphainterferon ist.

7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 5, wobei das Zytokin Betainterferon ist.

8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 4, wobei das Zytokin Erythropoietin ist.

9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein für einen Tumor kennzeichnendes Antigen ist.

10. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein für einen Krankheitserreger kennzeichnendes Antigen ist.

11. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein für ein Allergen kennzeichnendes Antigen ist.

12. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekül ein für eine Autoimmunkrankheit kennzeichnendes Antigen ist.

13. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der FcRn-Bindungs-partner ein nichtspezifisches IgG oder ein FcRn-Bindungsfragment von IgG ist.

14. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der FcRn-Bindungs-partner ein Fc-Fragment von IgG ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen