(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 590 T2** 2004.08.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 719 150 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 590.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/08301**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 906 825.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/03814**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.07.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **09.02.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.07.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.03.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.08.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 35/00**
A61K 45/00

(30) Unionspriorität:
100691 **30.07.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Yale University, New Haven, Conn., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767 Hamburg

(72) Erfinder:
EDELSON, Richard L., Westport, US; GASPARRO, Francis P., Hamden, US

(54) Bezeichnung: **ZELLULÄRER IMPFSTOFF UND DEREN VERWENDUNG FÜR DIE BEHANDLUNG VON MALIGNEN, SOLIDEN TUMOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen und deren Verwendung zur Verbesserung der Wirksamkeit der Strahlentherapie zur Behandlung einer Person mit einem bösartigen inneren soliden Tumor durch Kombination von Bestrahlungstherapie mit Photopherese.

[0002] Kutanes T-Zell-Lymphom (cutaneous T cell lymphoma, CTCL) ist eine Malignität des Immunsystems, die durch massive Expansion eines einzigen Klons aberranter T-Zellen verursacht wird. Die Auswahl der Behandlung von CTCL hängt vom Umfang des Krankheitsstandes sowie von der allgemeinen Gesundheit und dem Alter des Patienten ab. Im allgemeinen wird eine Krankheit im frühen Stadium, die auf Haut beschränkt ist, mit aufeinanderfolgenden topischen Therapien wie Stickstofflost, Psoralen-Phototherapie ("PUVA", d. h. Verabreichung von oralem Psoralen mit anschließender UVA-Bestrahlung der Haut) und Ganzhautelektronenbestrahlung (total-skin electron beam therapy, TSEB) behandelt. Krankheiten im späteren Stadium, z. B. Sezary-Syndrom, werden durch extrakorporale Photochemotherapie ("Photopherese") behandelt.

[0003] Photopherese zur Behandlung von kutanem T-Zell-Lymphom wurde durch Edelson im Jahre 1987 eingeführt (Edelson, R., et al., N. Engl. J. Med. 316: 297–303 (1987)). Obwohl relativ neu, wird Photopherese jetzt als Standardtherapie für die erythrodermischen Varianten von CTCL angesehen (Edelson, R., "Light-activated Drugs", Scientific American 256(8): 68–75 (1988); Edelson, R., Photopheresis: A Clinically Relevant Immunobiologic Response Modifier", Annals of N.Y. Academy of Sciences 636: 154–164 (1991). Die Therapie schließt zwei Schritte ein: (1) Bestrahlen einer Zubereitung von Leukozyten des Patienten in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels (z. B. 8-Methoxypsoralen, "8-MOP"), um die Zellen photochemisch zu modifizieren und (2) Reinfundieren der photochemisch modifizierten Zellen.

[0004] Nicht alle CTCL-Patienten mit Erythroderma sprechen auf die Photopherese-Therapie an. Die CTCL-Patienten, die ansprechen, haben eine mittlere Überlebenszeit von mehr als 62 Monaten, d. h. ungefähr zweimal so lang wie Patienten, die mit anderen Modalitäten behandelt wurden (Edelson, R., et al., Prog. Dermatol. 25(3): 1–6 (1991)). Weil jedoch bis zu 25% der Patienten mit CTCL auf Photopherese nur begrenzt ansprechen, wurde kürzlich adjunktive TSEB-Therapie, Chemotherapie (z. B. orales Methotrexat (Rook, A., et al., Arch. Dermatol. 127: 1535–1540 (1991)) oder subkutanes Interferon Alpha-2b (Heald, P. W., et al., Yale J. Biol. Med. 62: 629–638 (1989) eingeführt.

[0005] Der Wirkmechanismus der Photopherese ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Das Aussetzen von malignen T-Zell-Klonen gegenüber 8-MOP und ultraviolettem Licht mit anschließender Rückführung der bestrahlten, geschädigten Zellen in den Patienten scheint eine spezifische Antwort gegenüber den aberranten T-Zellen auszulösen, wobei die Antwort durch T-Zell-Oberflächen-Rezeptoren vermittelt wird. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht die Bildung einer erhöhten Immunität gegenüber dem/den pathogenen Klon/Klonen von T-Zellen in Anschluß an die Reinfundierung der bestrahlten Blut-Leukozyten (Edelson, R., Yale J. Biol. Med. 62: 565–577 (1989); Rook, A. H., et al., Ciba Foundation Symposium 146, New York, John Wiley & Sons, (1989) 171–177).

[0006] Darüber hinaus wurde Photopherese, neben anderen Dingen, dazu verwendet, um aus einem Säugtierkörper entnommene unspezifische nichtpathogene Leukozyten zu verändern. Die veränderten Leukozyten können dann in das Säugetier zurückgeführt werden, worauf ein erhöhter Aufmerksamkeitsstatus des Immunsystems zu beobachten ist, der zu einer allgemeinen Verbesserung der Immunantwort führt (Edelsen R., US-Patent A-5,147,289, 15. Sept. 1992).

[0007] T-Zell-Rezeptoren vermitteln eine zelluläre Immunantwort durch Erkennung eines bestimmten Antigens nur dann, wenn das Antigen mit einem Oberflächenmarker auf einer antigenpräsentierenden Zelle verbunden ist. Die Oberflächenmarker gehören zur Gruppe von Molekülen, die als Hauphistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bekannt sind. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an das Antigen/MHC-Molekül auf der antigenpräsentierenden Zelle induziert Veränderungen in der T-Zelle. Diese Veränderungen umfassen zusammen eine zellvermittelte Immunantwort.

[0008] Zwei Signale sind primär verantwortlich für die Induzierung der T-Zell-vermittelten Antwort auf ein Antigen, das mit einer antigenpräsentierenden Zelle assoziiert ist. Ein erstes Signal wird im Anschluß an die Bindung der T-Zelle an das Antigen auf der antigenpräsentierenden Zelle erzeugt. Ein zweites, kostimulatorisches Signal, wird durch "akzessorische" Membran-Moleküle oder lösliche Botenstoffe von der antigenpräsentierenden Zelle zu der antwortenden T-Zelle gesendet. Diese löslichen interzellulären Botenstoffe regulieren den Umfang und Dauer der Immunantwort und haben die Gattungsbezeichnung Zytokine erhalten. Zytokine schließen die Gruppe ein, die früher in der Literatur als Lymphokine, Monokine, Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktor bezeichnet wurden (Essential Immunology, Siebente Auflage, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Großbritannien, 1991, S. 140–150). Wenn die antigenpräsentierende Zelle das zweite Signal nicht sendet, ist die T-Zelle praktisch inaktiviert, d. h. unfähig eine Immunantwort gegenüber dem Antigen aufzubauen. Bestimmte Typen von antigenpräsentierenden Zellen, z. B. ruhende T-Zellen, sind unfähig, das zweite Signal zu senden. Entsprechend regulieren solche ruhenden T-Zellen, die auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren, in Abwesenheit von exogenem Zytokin oder einem andern zweiten Signal eine Immunantwort gegen-

über dem präsentierten Antigen herunter und führen zu einer antigenspezifischen immunologischen Paralyse der T-Zelle, deren Membran-Rezeptor beteiligt war. Andere Typen von antigenpräsentierenden Zellen, z. B. Monozyten, sind in der Lage, Zytokine abzugeben. Entsprechend regulieren Monozyten, die zur Abgabe von Zytokinen angeregt wurden, eine Immunantwort gegenüber dem präsentierten Antigen hoch.

[0009] Über CTCL und Sklerodermie hinaus ist Photopherese für die Behandlung von verschiedenen anderen Autoimmunstörungen, einschließlich Pemphigus vulgaris, systemischer Sklerose (Rook, A., "Photopheresis in the Treatment of Autoimmune Disease: Experience with Pemphigus Vulgaris and Systemic Scleroris", Annals of N.Y. Academy of Science 636: 209-216 (1991)) und rheumatoider Arthritis (Malawista, S., et al., "Photopheresis for Rheumatoid Arthritis", Annals of N.Y. Academy of Science 636: 217–226 (1991)) verwendet worden. Andere derzeit durchgeführte vorläufige Versuche, die vielversprechende Ergebnisse für die Photopherese-Therapie zeigen, schließen Autoimmun- oder Typ-I-insulin-abhängige Diabetes, Herztransplantat-Abstoßung, "AIDS-related-Complex" und akute Transplantat-gg.-Wirt-Erkrankung ein.

[0010] Zusammengefaßt hat sich gezeigt, daß Photopherese einen allgemeinen klinischen Vorteil für verschiedene Autoimmunkrankheiten bewirkt, die durch eine Fehlfunktion der T-Zell-Regulation gekennzeichnet sind. In der Liste von Krankheitsstadien, die dem Stand der Technik zufolge einer Photopherese-Therapie zugänglich sind, fehlen Krankheiten, die nicht mit klonaler Expansion von zirkulierenden aberranten T-Zellen in Verbindung gebracht wurden, einschließlich, zum Beispiel, Krebsen des/der Lunge, Brust, Ovarien, Gebärmutter, Prostata, Testikel, Leber, Pankreas, Magens, Plattenpithelkarzinom des oralen Schlundes, Fibrosarkomen, Niere, Blase, Gehirns, Rückenmarks, malignes Melanom und metastasierendes Plattenpithelkarzinom der Haut. Zur Zeit ist die Behandlung solcher Malignitäten solider Tumore beschränkt auf Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie (siehe z. B. Harrison's Principles of Internal Medicine, 12. Aufl., Hrsg. J. D. Wilson et al., McGraw-Hill, Inc., N.Y., N.Y. (1991)).

[0011] Obwohl die Verwendung von Röntgenbestrahlung in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von inneren soliden Tumoren einen allgemeinen therapeutischen Vorteil aufweisen kann, z. B. durch Zerstörung oder Hemmung der Proliferation wenigstens einiger Tumorzellen, sind solche konventionellen Behandlungsschemata weit davon entfernt, ideal zu sein. Insbesondere sind diese adjunkten Therapien durch die potentiellen toxischen Nebenwirkungen, die von dem Fehlen einer Spezifität des chemotherapeutischen Mittels herrühren, limitiert.

[0012] Die vorliegende Erfindung überwindet diese Probleme konventioneller Ansätze zur Behandlung von malignen soliden Tumoren durch Verwendung einer Strahlentherapie zur Herstellung eines Medikaments, das spezifisch auf den Tumor zur Zerstörung durch das zelluläre Immunsystem des Patienten gerichtet ist. Im wesentlichen verwendet die Erfindung eine synergistische Kombination von zwei therapeutischen Verfahren, Röntgenbestrahlung und Photopherese, die beide als wirksam bei der Behandlung eines anderen Krankheitsstadiums bekannt sind, um das Medikament herzustellen. Die Erfindung des Anmelders ist die Feststellung, daß diese beiden Verfahren, wenn sie kombiniert werden, einen synergistischen therapeutischen Vorteil bei der Behandlung einer Person mit einem malignen soliden Tumor ausüben. Da die Modulierung der zellulären Immunantwort wichtig für die Ausführung der Erfindung ist, ist es bevorzugt, daß die Person, die den (unten beschriebenen) Zellimpfstoff, der die zelluläre Immunantwort vermittelt, empfängt, ein kompetentes Immunsystem aufweist, was zum Beispiel durch nahezu normale Spiegel von CD8-positiven Zellen gezeigt werden kann.

[0013] In einem ersten Aspekt der Erfindung wird die Verwendung einer Leukozytenzubereitung zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor bereitgestellt, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird umfassend das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden; das Aussetzen der mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle exprimieren; das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassoziierter Leukozyten; und das Anordnen der mehreren antigenassoziierten Leukozyten in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

[0014] In einem zweiten Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines photoaktivierbaren Mittels zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor bereitgestellt, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird, umfassend das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden; das Aussetzen der mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle exprimieren; das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung

photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassoziierter Leukozyten und das Anordnen der mehreren antigenassoziierten Leukozyten in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

[0015] In einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung einer Zellzubereitung bereitgestellt, die mehrere antigenpräsentierende Zellen zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor enthält, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird, umfassend das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden, das Behandeln der Zellzubereitung zum verbessern der Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls durch die Zellen, wobei jede der antigenpräsentierenden Zellen für die Verabreichung an die Person geeignet ist; das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der behandelten Zellzubereitung unter Bedingungen für die Bildung mehrerer antigenassoziierter, antigenpräsentierender Zellen; und das Anordnen mehrerer antigenassoziierter, antigenpräsentierender Zellen in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

[0016] In einem vierten Aspekt der Erfindung wird eine Zubereitung eines antigenassoziierten Leukozyten bereitgestellt, wobei der antigenassoziierte Leukozyt herstellbar ist durch Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden; Aussetzen einer mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätsmoleküle exprimieren; Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassozierter Leukozyten.

[0017] In einem fünften Aspekt der Erfindung wird eine Zubereitung einer antigenassoziierten antigenpräsentierenden Zellen bereitgestellt, wobei die antigenassoziierte antigenpräsentierende Zelle zubereitet wird durch Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigen durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden; Behandeln der Zellzubereitung zum Verbessern der Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls durch die Zellen, wobei jede der antigenpräsentierenden Zellen für die Verabreichung an die Person geeignet ist; Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der behandelten Zellzubereitung unter Bedingungen für die Bildung mehrerer antigenassoziierter antigenpräsentierender Zellen.

[0018] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden in ihren verschiedenen Aspekten untern beschrieben oder in den Unteransprüchen definiert.

[0019] Die Zubereitungen gemäß der Erfindung können in einem Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit von Bestrahlungstherapie zur Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor verwendet werden. Solche Verfahren beinhalten die Bestrahlung des inneren soliden Tumors, um die tumorderivierten Antigene freizusetzen, die Isolierung mehrerer dieser Antigene und das Inkontaktbringen der tumorderivierten Antigene mit einer Leukozytenzubereitung, die vorher Photopherese ausgesetzt wurde, d. h. in der Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten bestrahlt wurde. Die tumorderivierten Antigene werden mit der Zubereitung photoinaktiverter Leukozyten unter Bedingungen zur Bildung des Zellimpfstoffs in Kontakt gebracht, wobei der Impfstoff dann an die Person verabreicht wird, um die Wirksamkeit der Strahlentherapie zu verbessern.

[0020] Die Erfindung stellt in bestimmten Aspekten einen Zellimpfstoff zur Verbesserung der Wirksamkeit von Strahlentherapie bereit. Der Zellimpfstoff beinhaltet eine wirksame Menge einer Mischung enthaltend mehrere aus einem soliden Tumor derivierte Antigene, vermischt mit mehreren antigenpräsentierenden Zellen, die behandelt wurden, um die Expression von leeren Klasse-I- und/oder leeren Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen zu induzieren. Typischerweise wird eine solche Induktion durch Photopherese erreicht und die induzierten Zellen werden "photoinaktivierte" antigenpräsentierende Zellen bezeichnet. Die Mischung wird in einen pharmazeutisch akzeptablen Träger eingebracht.

[0021] So wie hier verwendet, ist eine "wirksame Menge" der Mischung eine solche Menge, die ausreicht, um die Wirksamkeit der Strahlentherapie zur Behandlung der Person zu verbessern. Ob die Menge eine "wirksame Menge" ist, wird anhand von Kriterien bestimmt, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Bei den bevorzugten Ausführungsformen sind die zur Herstellung des Zellimpfstoffs verwendeten antigenpräsentierenden Zellen autologe Zellen, d. h. von einer Empfängerperson isoliert, die durch Aussetzen einer Leukozytenzubereitung gegenüber Photopherese photoinaktiviert worden sind. Es werden jedoch auch alternative Quellen antigenpräsentierenden Zellen und Verfahren zur Herstellung des funktionellen Äquivalents von photoinaktivierten Leukozyten bereitgestellt. Weil die aus dem soliden Tumor derivierten Antigene aus Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Vollblut, Lymphflüssigkeit und möglicherweise Urin isoliert werden, beinhaltet der Zel-

limpfstoff optional eine feststellbare Menge der Körperflüssigkeit, aus der das Antigen isoliert wurde.

[0022] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung des oben beschriebenen Zellimpfstoffs bereit. Das Verfahren beinhaltet das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, das Aussetzen eine Leukozytenzubereitung gegenüber Bestrahlung in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten und das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für die Bildung des Zellimpfstoffs. Wenn die Mischung noch nicht in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten ist, wird sie vor der Verabreichung an die Person in solch einem Träger plaziert.

[0023] Die erfinderischen Zubereitungen können in einem alternativen Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit von Strahlentherapie zur Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor verwendet werden. Das Verfahren beinhaltet das Bestrahlen des soliden Tumors, um tumorderivierte Antigene in vivo abzugeben, das Isolieren mehrerer der tumorderivierten Antigene, Behandeln einer Zellzubereitung (enthaltend antigenpräsentierende Zellen, die zur Verabreichung an die Person geeignet sind), um die Oberflächenexpression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls durch die Zellen zu verbessern, das Inkontaktbringen der tumorderivierten Antigene mit der behandelten Zellzubereitung unter Bedingungen für die Bildung mehrerer antigenassoziierter antigenpräsentierender Zellen und die Verabreichung der antigenassoziierten antigenpräsentierenden Zellen an die Person. Verfahren zur Behandlung der Zellzubereitung, um die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls zu verbessern, beinhalten zum Beispiel das Aussetzen der Zellzubereitung gegenüber einer oder mehreren der folgenden extrakorporalen Verfahren oder Bedingungen; (1) Photopherese, (2) Temperaturen unterhalb der physiologischen Temperaturen und (3) Inkontaktbringen der Zellzubereitung mit einem oder mehreren Zytokinen, von denen bekannt ist, daß sie die Expression des Haupthistokompatibilitäts-Moleküls induzieren. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die antigenpräsentierenden Zellen autologe Zellen, d. h. die Zellen sind von der Empfängerperson isoliert worden. Besonders bevorzugt sind die Zellen Monozyten oder B-Zellen.

[0024] Die erfinderischen Zubereitungen können auch in einem Verfahren zur Verbesserung einer Immunsystemantwort auf ein tumorspezifisches Antigen verwendet werden. Das Verfahren beinhaltet das Abgeben mehrerer tumorderivierter Antigene in vivo, das Isolieren der tumorderivierten Antigene und Inkontaktbringen der isolierten Antigene mit einer Zellzubereitung, die antigenpräsentierende Zellen enthält, wobei die Zubereitung behandelt worden ist, um die Expression von leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen durch Zellen zu fördern. Bevorzugt sind die antigenpräsentierenden Zellen Leukozyten, besonders bevorzugt Monozyten oder B-Zellen. In den bevorzugten Ausführungsformen wird die Zellzubereitung zur Förderung der Expression von leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen durch irgendeine der oben angegebenen extrakorporalen Verfahren, z. B. Aussetzen der Zellzubereitung gegenüber Photopherese und/oder gegenüber einer Temperatur unterhalb der physiologischen Temperatur behandelt. Der Zellimpfstoff zur Förderung des Immunsystems gegenüber einem tumorspezifischen Antigen wird gebildet durch das Inkontaktbringen der oben beschriebenen Zellzubereitung mit mehreren tumorderivierten Antigenen unter Bedingungen, von denen bekannt ist, daß sie die Assoziierung der Antigen mit den leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen an der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen verbessern. Anschließend wird der Impfstoff gemäß verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, an die Person verabreicht.

[0025] **Fig.** 1 zeigt die Wirkungen von 8-MOP und UVA auf das Überleben von RMA-Zellen, nachgewiesen durch Trypanblau-Ausschluß; und

[0026] **Fig.** 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Förderung von D^b-Klasse-I-MHC-Molekülen auf RMA-Zellen, die in einer zusammengesetzten Gruppe von Experimenten mit 100 ng/ml 8-MOP und 1 J/cm^2 UVA behandelt wurden.

[0027] Es wird eine Zubereitung bereitgestellt, die in einem Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit von Strahlentherapie zur Behandlung einer Person mit einem malignen inneren soliden Tumor verwendet wird. Das Verfahren kombiniert synergistisch zwei therapeutische Verfahren: Röntgenbestrahlung zur Behandlung von malignen inneren soliden Tumoren und ein Verfahren zur Stimulierung des Immunsystems, um spezifisch tumorspezifische Antigene zu erkennen. Die tumorspezifischen Antigene werden von dem soliden Tumor im Anschluß an die Bestrahlung abgegeben. Die spezifische Immunantwort wird vermittelt durch Verabreichung eines Zellimpfstoffs (unten beschrieben), der das tumorderivierte Antigen enthält. In seiner einfachsten Form beinhaltet der Zellimpfstoff eine wirksame Menge einer Mischung enthaltend mehrere der tumorderivierten Antigene gemischt mit mehreren photoinaktivierten Leukozyten. Die Mischung ist in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten.

[0028] Die Zubereitung wird bevorzugt in einem Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit von Strahlen zur Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor verwendet, wobei das Verfahren die Bestrahlung des inneren soliden Tumors zur Freisetzung der tumorderivierten Antigene in vivo beinhaltet, das Isolieren mehrerer der tumorderivierten Antigene und Inkontaktbringen mit einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten zur Bildung des Zellimpfstoffs. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform wird die photoinaktivierte Leukozytenzubereitung durch Bestrahlung der Leukozytenzubereitung mit Ultaviolett-A-Strahlung ("UVA")

oder sichtbarem Licht in der Gegenwart eines photoinaktivierbaren Mittels gebildet, d. h. durch Aussetzen der Leukozytenzubereitung gegenüber Photopherese. Bedingungen zur Aktivierung von Psoralenen in Gegenwart von sichtbarem Licht sind der U.S-Anmeldung Seriennr. 08,013,831, angemeldet 4. Februar 1993, offenbart.

[0029] Der Zellimpfstoff wird durch Mischen der von einem soliden Tumor derivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für die Beladung der tumorderivierten Antigene in die leeren Klasse-2- oder Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle der antigenpräsentierenden Zelle gebildet. Im allgemeinen beinhalten solche Bedingungen das Mischen der Zellen bei Temperaturen zwischen etwa 22°C und etwa 30°C, um die Stabilität der leeren Klasse-I- oder Klasse-II-Moleküle zu stabilisieren. Beispielhafte Bedingungen für die Beladung der Antigene in leere Klasse-I-Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle sind in Beispiel 3 offenbart.

[0030] Wie in der oben angegebenen U.S.-Anmeldung 5,462,733 angegeben, sind andere Verfahren als die Photoinaktivierung mit UVA-Licht in der Gegenwart eines Psoralens zur Herstellung einer Zubereitung von Zellen, die eine verbesserte Expression von leeren Klasse-I- und/oder leeren Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen aufweisen, verwendbar. Exemplarische alternative Verfahren beinhalten Ultraviolett-B("UVB")-Bestrahlung, Inkontaktbringen der Zellen mit einem chemotherapeutischen Mittel bzw. chemotherapeutischen Mitteln und/oder einem Zytokin bzw. mehreren Zytokinen wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor (TNF), Aussetzen der Zellen gegenüber Temperaturen im Bereich von etwa 22°C bis etwa 30°C, Aussetzen der Zellen gegenüber Hypotonie oder hypertonischer Salzlösung oder Gewebekulturmedium und Aussetzen der Zellen gegenüber hydrostatischem Druck.

[0031] Leere Klasse-I-Moleküle sind bei physiologischen Temperaturen thermodynamisch instabil. Entsprechend wird angenommen, daß das Aussetzen der Zellzubereitung gegenüber einer Temperatur unterhalb physiologischer Temperaturen zu "verbesserter Expression" der leeren Klasse-I-Haupthistkompatibilitätskomplex-Moleküle durch Stabilisierung der "leeren" Moleküle führt. Der hier verwendete Begriff "verbesserte Expression" bezieht sich auf eine Zelle, die an ihrer Oberfläche wesentlich mehr leere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle aufweist als auf der Oberfläche einer entsprechenden natürlich vorkommenden antigenpräsentierenden Zelle vorhanden wären.

[0032] Der Zellimpfstoff ist mit Hilfe einer geeigneten Verabreichungsart, die in der Fachwelt bekannt sind, z. B. Einführung in den Blutstrom oder das Immunsystem des Patienten, an die Person verabreichbar. Intradermale Injektion ist eine bevorzugte Methode der Verabreichung. Subkutane Injektion, intramuskuläre Injektion und/oder jede andere Art der Deposition des Zellimpfstoffs in einem Reservoir in einer Weise, daß die tumorderivierten Antigene gegenüber dem zelluläre Immunsystem der Person ausgesetzt werden, d. h. die Zellen, die das zelluläre Immunsystem bilden, können das tumorderivierte Antigen erkennen und auf dessen Gegenwart reagieren, können jedoch verwendet werden. Entsprechend enthält der Zellimpfstoff darüber hinaus einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, der für die gewählte Art der Verabreichung geeignet ist. Pharmazeutisch akzeptable Träger sind in der Fachwelt bekannt und beinhalten zum Beispiel normale Salzlösung für Impfstoffe, die zur Verabreichung durch Injektion in das Blutsystem vorgesehen sind.

[0033] Die Person ist bevorzugt ein Mensch, der einen inneren soliden Tumor aufweist, der Röntgenstrahlentherapie gegenüber empfänglich ist. Der hier verwendete Ausdruck "empfänglich gegenüber Röntgenstrahlentherapie" in Bezug auf einen soliden Tumor bedeutet einen Tumor, der mindestens einige Tumorzellen enthält, die anfällig für eine Zellschädigung als Reaktion auf Bestrahlung sind, wobei der Schaden ausreicht, um tumorderivierte Antigene in vivo freizusetzen.

[0034] Der hier verwendete Begriff "Strahlung" hat seine konventionelle Bedeutung und ist nur in dem Maße beschränkt, daß die Röntgenstrahlung genügend Energie aufweist, um den Körper zu durchdringen und befähigt ist, die Abgabe von tumorspezifischen Antigenen in vivo zu induzieren. Die optimale Strahlungsintensität zur Schädigung eines bestimmten Tumortyps ist dem Fachmann bekannt. Im allgemeinen ist jede Form oder Intensität von Strahlung, die fachlich zur Behandlung innerer solider Tumoren akzeptabel ist, zur Freisetzung tumorderivierter Antigene in vivo für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendbar.

[0035] Strahlung wird in RADS gemessen, mit einer typischen Röntgenstrahlendosis zwischen etwa 1000 bis etwa 4000 RADS für die Tumor-Bestrahlungstherapie. Der Bereich der Strahlendosis für die vorliegende Erfindung liegt im Bereich von etwa 100 bis etwa 6000 RADS. Da weniger Strahlung benötigt wird, um den Tumor derartig zu schädigen, daß die Abgabe von tumorderivierten Antigenen in vivo induziert wird, als nötig ist, um den Tumor zu zerstören (das Ziel konventioneller Strahlentherapie), erlaubt die vorliegende Erfindung die Verwendung geringerer Strahlendosen, wodurch die toxischen Nebenwirkungen, die mit hohen Dosen von Röntgenstrahlung verbunden sind, vermieden werden. Typischerweise wird die Strahlung in fraktionierten Dosen über mehrere Wochen verabreicht, wobei nicht mehr als 300 RADS pro Behandlung verabreicht werden.

[0036] Da die Kombinationstherapie das Immunsystem der Person einbezieht, um den inneren soliden Tumor spezifisch anzusteuern und zu zerstören, ist es bevorzugt, daß die Empfängerperson der Kombinationstherapie ein kompetentes Immunsystem aufweist. Im allgemeinen wird die Immunkompetenz einer bestimmten Person durch Messung der Menge von CD8-positiven T-Zellen in einer Blutprobe, die der Person entnommen wird, bestimmt. Personen, die nahezu normale Spiegel von CD8-positiven T-Zellen aufweisen, werden als immun-

kompetent für die Zwecke der vorliegenden Erfindung angesehen. Im allgemeinen wird eine Person mit einem CD8-Spiegel von mindestens 100 CD8-Zellen/100 ml Blut als immunkompetent angesehen.

[0037] Der Ausdruck "innerer solider Tumor" bezieht sich auf extrakutanes, d. h. nichtkutanes T-Zell-Lymphom, Neoplasma. Ob eine bestimmte Behandlung oder Kombinationstherapie bei der Hemmung des Fortschritts des Neoplasmas wirksam ist, wird anhand von Kriterien bestimmt, die dem Fachmann bekannt sind. Beispielsweise kann die Wirksamkeit durch die Beobachtung der Wachstumsrate des Tumors (z. B. eine statische oder verminderte Wachstumsrate, nachgewiesen durch die Rate der Veränderung in der Größe des Tumors über die Zeit) und/oder durch Beobachtung einer Verlangsamung im Fortschreiten des Krankheitsstatus (z. B. eine Verminderung der mit der Krankheit verbundenen Symptome über die Zeit) gezeigt werden. Solche Kriterien sind sowohl nützlich für die Feststellung, ob der solide Tumor für eine Strahlentherapie empfänglich ist als auch für die Feststellung, ob die Verfahren und/oder Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung die Wirksamkeit der Strahlentherapie zur Behandlung der Person verbessern. Beispielhafte maligne solide Tumoren, die der Behandlung durch die Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zugänglich sind, sind oben angegeben.

[0038] Durch Röntgenbestrahlung induzierte Zellschädigung oder Zelltod führt zu der In-vivo-Abgabe von unzähligen Oligopeptiden, Proteinen und/oder anderen Zellbestandteilen aus der bestrahlten Zelle. Diese vorher immobilen (d. h. mit dem soliden Tumor assoziierten) Zellbestandteile gelangen in die lymphatischen und/oder Blutsysteme, aus denen sie nach in der Fachwelt gut bekannten Verfahren isoliert werden können. Der hier verwendete Begriff "isoliert" bezieht sich auf eine Zubereitung (z. B. eine Ansammlung von tumorderivierten Antigenen oder eine Leukozytenzubereitung), die aus ihrer natürlich vorkommenden Umgebung entnommen wurde. Daher ist beispielsweise eine aus einer Person entnommene Blutprobe im oben definierten Sinne "isoliert", selbst wenn die Blutprobe Teil eines kontinuierlichen Stroms ist, der später in die Person zurückgeführt wird.

[0039] Der Begriff "tumorderivierte Antigene" bezieht sich auf Bestandteile, die von dem soliden Tumor im Anschluß an Bestrahlung abgegeben werden. Es ist nicht erforderlich, daß die tumorderivierten Antigene gereinigt oder konzentriert werden, bevor sie gemäß den verfahren oder Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Konzentration von tumorderivierten Antigenen in der isolierten Zubereitung wird jedoch optional vor der Lagerung angereichert, um die Lagerungs-Stabilität des Antigens zu verbessern. Mit "angereichert" ist gemeint, daß das tumorderivierte Antigen in einer höheren Konzentration zugegen ist als die, zu der sie bei der Isolierung aus der Person vorlag. Im allgemeinen ist eine angereicherte Zubereitung aus tumorderivierten Antigenen bevorzugt, weil die höhere Konzentration von Antigen beim Vermischen mit den behandelten antigenpräsentierenden Zellen die Beladung von tumorderiviertem Antigen in die leeren Klasse-I- oder leeren Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle der behandelten antigenpräsentierenden Zellen kinetisch befördert.

[0040] Antigenlagerungsbedingungen sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und schließen beispielsweise Lagerung bei einer reduzierten Temperatur (z. B. bei –70°C) in der Gegenwart von proteinstabilisierenden Mitteln wie z. B. Proteaseinhibitoren und/oder Mitteln, von denen bekannt ist, daß sie die native Konformation von Peptid- und/oder Proteinantigenen (z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO)) stabilisieren, ein. Solche Mittel sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und schließen beispielsweise Glycerin, Saccharose und Harnstoff ein.

[0041] Der Zellimpfstoff wird hergestellt durch Inkontaktbringen der tumorderivierten Antigene mit einer Zellzubereitung, die "verändert" (z. B. photoinaktiviert) wurde, um die Wechselwirkung (z. B. Assoziierung) der tumorderivierten Antigene mit den in der Zellzubereitung enthaltenen Zellen zu fördern. Der hier verwendete Ausdruck "Zellzubereitung" bezieht sich auf eine Zubereitung von antigenpräsentierenden Zellen. Antigen-präsentierende Zellen sind eine Gruppe von Zellen, die in der Lage sind, anderen Zellen des Immunsystems, welche Antigene erkennen können, wenn sie mit einem Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül assoziiert sind, Antigene zu präsentieren. Antigenpräsentierende Zellen schließen solch verschiedenartige Zelltypen wie Leukozyten (z. B. Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten wie T-Zellen und B-Zellen) sowie synthetische ("artefizielle") Zellen ein.

[0042] Diese verschiedenen Zelltypen haben die Fähigkeit gemeinsam, Antigene in einer Form zu präsentieren, die durch bestimmte T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Die bevorzugten antigenpräsentierenden Zellen sind Leukozyten, besonders bevorzugt Monozyten oder B-Zellen. Die Leukozytenzubereitung wird beispielsweise aus Blut, Lymphflüssigkeit, Knochenmark, Lymphorgangewebe oder Gewebekulturflüssigkeit isoliert. Wahlweise werden die Monozyten oder B-Zellen in vitro kultiviert, um die Zahl von Zellen, die zur Bildung des Zellimpfstoffs in vitro zu erhöhen.

[0043] Wie vorher diskutiert, exprimiert jeder T-Lymphozytenklon, z. B. T-Helferzellklon oder Klon zytotoxischer T-Zellen einen anderen Oberflächenrezeptor, der ein Antigen nur dann erkennt, wenn es mit einem Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül an der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle assoziiert ist. Im allgemeinen bezieht sich der Begriff "Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül" auf ein Molekül auf einer antigenpräsentierenden Zelle, das die Fähigkeit besitzt, mit dem Antigen zu assoziieren, um eine antigenassoziierte antigenpräsentierende Zelle zu bilden. Die Erkennung der antigenassoziierten präsentierenden Zelle

durch die T-Zelle wird durch den T-Zell-Oberflächenrezeptor vermittelt. In den bevorzugten Ausführungsformen ist das Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle ein Klasse-I- oder Klasse-II-Molekül. Eine zytotoxische T-Zelle bindet Antigen, wenn das Antigen mit einem Klasse-I-Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül assoziiert ist. Eine T-Helferzelle erkennt und bindet ein Antigen, wenn das Antigen mit einem Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül assoziiert ist. Jede diese T-Zell-Typen vermittelt die Immunantwort der Person gegenüber dem Tumor.

[0044] Das Klasse-I-Molekül, das aus einer schweren Kette und einem nicht-kovalent gebundenen Beta-2-Mikroglobulin-Molekül besteht, besitzt eine Spalte zur Aufnahme des tumorderivierten Antigens. Entsprechend weist das bevorzugte tumorderivierte Antigen eine Größe und Dimension auf, die den Eintritt des Antigens in die Spalte des Klasse-I-Moleküls erlaubt (siehe z. B. F. Latron, "A Critical Role for Conserved Residues in the Cleft of HLA-A2 in the Presentation of a Nonapeptide to T-cells", Science 257: 964–967, 1992 für eine Diskussion von Spaltdimensionen von Klasse-I-Molekülen). Obwohl das tumorderivierte Antigen im wesentlichen in die Spalte paßt, ist es weiterhin für eine T-Zelle zugänglich, die in der Lage ist, das Antigen zu erkennen, wenn es mit einem Klasse-I-Molekül assoziiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist daher das tumorderivierte Antigen ein Peptid, das zwischen acht und zehn Aminosäuren aufweist. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das tumorderivierte Antigen ein Peptid das zwischen acht und zehn Aminosäuren aufweist, von denen zwei Aminosäuren hydrophobe Reste aufweisen, um das Peptid in der Spalte zurückzuhalten. Die Assoziierung der tumorderivierten Antigene mit den Klasse-I-Molekülen wird mit Hilfe von Screening-Assays durchgeführt, die in der Lage sind, zwischen leeren und vollen Klasse-I-Molekülen zu unterscheiden. Ein Beispiel für einen Screening-Assay ist in Beispiel 3 offenbart.

[0045] Die Assoziierung eines tumorderivierten Antigens mit einem Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle ist Voraussetzung für die Induzierung der zellulären Immunantwort gegenüber dem Tumor. Entsprechend werden hier verschiedene Verfahren offenbart, um die Expression von leeren Haupthistokompatibilitäts-Molekülen auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen zu verbessern.

[0046] Das bevorzugte Verfahren zur Verbesserung der Expression von leeren Haupthistokompatibilitäts-Molekülen ist Photopherese. Photophereseverfahren sind in den US-Patenten Nr. 5,147,289 ("Edelson '289") und 4,838,852 ("Edelson '852") beschrieben.

[0047] Photopherese kann an einem kontinuierlichen Strom durchgeführt werden, wie im Edelson-'289-Patent beschrieben, oder satzweise. Es wird angenommen, daß das Aussetzen der Zubereitung gegenüber Photopherese die Stoffwechselwege unterbricht, die für die Verarbeitung intrazellulären Antigens in eine Form, die in die durch das Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül gebildeten Spalten paßt, verantwortlich ist, wodurch eine Vielzahl von antigenpräsentierenden Zellen mit ungefüllten (d. h. "leeren") Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen auf ihrer Oberfläche erhalten wird. Diese photoinaktivierten Zellen binden tumorderivierte Antigene, die die oben beschriebene erforderliche Größe und Ladungscharakteristiken aufweisen. Einmal gebunden, werden die tumorderivierten antigenassoziierten antigenpräsentierenden Zellen in der Form eines Zellimpfstoffs an die Person verabreicht.

[0048] Wenn die photoaktivierbare Substanz ein Psoralen (unten beschrieben) ist, ist die Strahlung ultraviolette Strahlung oder sichtbares Licht mit einer Wellenlänge größer etwa 420 nm (Gasparro, F., et al., "The Excitation of 8-methoxypsoralens with Visible Light. Reversed Phase HPLC Quantitation of Monoadducts and Crosslinks", in Druck).

[0049] Ein weiterer Weg zur Förderung der Expression von leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen besteht darin, die Zellzubereitung mit einem Zytokin in Kontakt zu bringen. Der Begriff Zytokine bezeichnet Moleküle, die früher in der Literatur als Lymphokine, Monokine, Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktor (TNF) (Essential Immunology, 7. Aufl., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Großbritannien, 1991, S. 140–150) bezeichnet wurden und schließen beispielsweise Gamma-Interferon, Tumornekrosefaktor alpha und granulozytenkoloniestimulierenden Faktor sowie Moleküle aus der Familie der Interleukine ein. Zytokine sind bekannt dafür, die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen auf einigen antigenpräsentierenden Zellen, z. B. Monozyten oder B-Zellen zu fördern.

[0050] Die oben beschriebenen, z. B. durch Photopherese oder Aussetzen gegenüber einem Zytokin veränderten antigenpräsentierenden Zellen werden mit den tumorderivierten Antigenen unter Bedingungen für die Bildung des Zellimpfstoffs in Kontakt gebracht. Der hier verwendete Ausdruck "Zellimpfstoff" bezieht sich auf eine Zubereitung von Zellen, die, wenn sie in eine Person eingeführt werden, eine zelluläre Immunantwort, die spezifisch für einen in dem Zellimpfstoff vorhandene Bestandteil (z. B. das tumorderivierte Antigen) ist, auslöst. Der Begriff "Impfstoff" wird hier verwendet, weil ein weitreichender therapeutischer Effekt in Bezug auf den bestrahlten Tumor im Anschluß an die Infusion des Impfstoffs erhalten wird, obwohl nur ein kleiner Teil der gesamten Leukozyten der Person behandelt werden.

[0051] Der Zellimpfstoff wird bevorzugt vor der Verabreichung an die Person gelagert. Bevorzugt wird der Impfstoff in Teilmengen aufbewahrt, die eine Menge von tumorderivierten antigenassoziierten antigenpräsentierenden Zellen enthält, die ausreicht, um die zelluläre Immunantwort der Person gegenüber dem soliden Tumor aufzufrischen. Die Bestimmung der Menge von Impfstoff, die notwendig ist, um das Immunsystem des Pa-

tienten aufzufrischen, liegt innerhalb des üblichen Fachkönnens eines Durchschnittsfachmanns. Das Auswählen einer Menge von Zellen, die ausreicht, um die Immunantwort des Patienten aufzufrischen, liegt innerhalb des üblichen Fachkönnens. Bevorzugt ist eine Menge von Zellen in einem Bereich von einem Minimum von etwa 10000 bis zu einem Maximum von 200×10^6 antigenpräsentierenden Zellen ausreichend, um das Immunsystem der Person aufzufrischen. Die Menge von zu verwendenden Zellen hängt, teilweise, davon ab, ob die antigenpräsentierenden Zellen effizient sind, z. B. B-Zellen oder Monozyten, oder ineffizient sind, z. B. T-Zellen.

[0052] Die Antigen- und Zellkomponenten des Zellimpfstoffs unterscheiden sich von ihren entsprechenden natürlichen Gegenstücken in verschiedener Hinsicht. Die antigenassoziierten antigenpräsentierenden Zellen der vorliegenden Erfindung bilden eine relativ homogene Population von Zellen. Dies liegt erstens daran, daß das tumorderivierte Antigen durch die antigenpräsentierende Zelle vor der Assoziierung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen nicht weiter verarbeitet wird. Zweitens besitzen die antigenpräsentierenden Zellen der vorliegenden Erfindung optional eine erhöhte Konzentration von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen auf einer Pro-Zell-Basis. Darüber hinaus beinhaltet die pharmazeutische Zusammensetzung optionale Beta-2-Mikroglobulin, um die Assoziierung des Antigens mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen zu erleichtern. Die Konzentration von Beta-2-Mikroglobulin in der Zubereitung ist größer als die, die in vivo gefunden würde. Die Auswahl der Konzentration von Beta-2-Mikroglobulin, die ausreicht, um die Assoziierung von Antigen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül zu verstärken, erfolgt im Rahmen des durchschnittlichen Fachkönnens. Im allgemeinen liegt die In-vivo-Konzentration von Beta-2-Mikroglobulin im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 100 Mikrogramm/ml, weiter bevorzugt zwischen etwa 2,0 bis etwa 10 Mikrogramm/ml (Rock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 7517–7521, 1990).

[0053] Der Zellimpfstoff stimuliert das Immunsystem dahingehend, den Tumor der Empfängerperson spezifisch zu erkennen, wodurch die Wirksamkeit der Strahlentherapie zur Behandlung der Person verbessert wird. Obwohl die Zellzubereitung typischerweise eine Leukozyten enthaltende Zubereitung ist, gelten andere Arten von antigenpräsentierenden Zellen als innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung liegend. Entsprechend bezieht sich der Begriff "funktionelles Äquivalent" der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten auf eine antigenpräsentierende Zellen enthaltende Zubereitung, die mittels photochemischer (z. B. Photopherese) oder nicht-photochemischer (z. B. Aussetzen der Zellen gegenüber verminderter Temperatur) Verfahren zur Förderung der Expression der leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle auf der Oberfläche der in der Zubereitung anwesenden Zellen behandelt worden ist.

[0054] Der Bestrahlungsschritt findet in der Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels statt. Andere Verfahren (oben beschrieben) zur Induktion der Expression der leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen können verwendet werden. Das photoaktivierbare Mittel kann ein Mittel sein, welches eine Affinität für einen wichtigen Bestandteil der Leukozyte oder einer anderen antigenpräsentierenden Zelle aufweist, und das auf Bindung an die Komponente die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle fördert und/oder stabilisiert. Beispiele für photoaktivierbare Mittel sind Psoralene, Porphyrine, Pyrene, Phtalocyanine, photoaktivierte Kortisone, photoaktivierte Antikörper, die spezifisch mit der antigenpräsentierenden Zelle reagieren, und monoklonale Antikörper, die an Porphyrinmoleküle gebunden sind.

[0055] Die Psoralene sind eine bevorzugte Gruppe von photoaktivierbaren Substanzen. Die Wechselwirkungen von Psoralenen mit den DNA-, Protein- und Lipidkomponenten von T-Zellen sind beschrieben worden ("T Cell Molecular Targets for Psoralens", Annals of N.Y. Academy of Science 636: 196–208, 1991, Malane, M. and Gasparro, F.). Nach oraler Verabreichung werden Psoralene vom Verdauungstrakt aufgenommen, erreichen Höchstwerte im Blut und anderen Geweben innerhalb von einer bis zu vier Stunden, und werden nahezu vollständig innerhalb von 24 Stunden nach der oralen Verabreichung ausgeschieden. Diese Mittel können dem extrakorporalen Zellpräparat auch direkt zugefügt werden. Die Psoralen-Moleküle sind inert, bevor sie der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ausgesetzt werden, und werden nach der Bestrahlung vorübergehend in einen angeregten Zustand versetzt. Diese vorübergehend aktivierten Moleküle sind in der Lage, biologische Moleküle (z. B. DNA, Protein) zu photomodifizieren und andere reaktive Substanzen, z. B. Singulettsauerstoff, zu erzeugen, die in der Lage sind, andere Zellbestandteile zu modifizieren. Andere Substanzen, z. B. Mitomycin C und Cis-Platin-Verbindungen schädigen DNA durch Querverknüpfung von Nukleinsäuresträngen. Jedoch verbleiben diese Substanzen in einem aktiven Zustand, wenn sie in den Patienten zurückgeführt werden, und sind daher für die Veränderung von Zellen zur Förderung der Expression von leeren Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen nicht so geeignet wie die Psoralene.

[0056] Bevorzugte Psoralene beinhalten 8-Methoxypsoralen (8-MOP), 4'-Aminomethyl-4,5'8-Trimethylpsoralen (AMT), 5-Methoxypsoralen (5-MOP) und Trimethylpsoralen (TMP). 8-MOP ist sowohl ein Anti-Krebs-Mittel als auch ein Immunsystemmodulator und ein Prototyp für die Entwicklung von Arzneimittelgruppen, die photoaktivierbar sind. AMT ist ein synthetisches, wasserlösliches Analogon von 8-MOP. Diese und andere wasserlösliche Analoga von 8-MOP sind beschrieben in Berger et al., "The Medical and Biological Effects of Light", Annals of N.Y. Academy of Science 453: 80–90, 1985. Einige Forscher haben berichtet, daß 5-MOP bei der

Behandlung von Psoriasis nicht so effizient ist wie 8-MOP (Calzavara-Pinton, et al., Exptl. Dermatol. 1: 46–51, 1992). TMP wird häufig bei der Behandlung von Vitiligo-Patienten zur Repigmentierung von entpigmentierten Hautbereichen verwendet.

[0057] Monoklonale Antikörper, welche 8-MOP-DNA-Photoaddukte in bestrahlten Zellen erkennen, können zur Bestimmung der optimalen Bestrahlungsmenge mit ultraviolettem oder sichtbarem Licht verwendet werden, um optimale T-Zell-Inaktivierung zu erreichen (siehe Yang et al., "8-MOP DNA Photoadducts in Patients Treated with 8-MOP and UVA", J. Invest. Dermatol. 92: 59–63, 1989).

BEISPIELE

Referenzbeispiel 1: Fallstudie von drei Patienten, bei denen kutanes T-Zell-Lymphom (CTCL) diagnostiziert wurde.

[0058] Kutanes T-Zell-Lymphom (CTCL) im Tumorstadium ist gut bekannt dafür, daß es unempfänglich gegenüber konventioneller Chemotherapie und Ganzkörper-Elektronenstrahl-(Total Body Electron Beam, TBEB)-Radiotherapie ist, was das Überleben von Patienten und verlängerte krankheitsfreie Zeiträume anbelangt. Im allgemeinen beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit eines CTCL-Patienten mit einem oder mehreren Tumoren, die einen Durchmesser von mehr als 3 cm aufweisen, achtzehn Monate.

[0059] Drei Fallstudien werden unten wiedergegeben. In jeder Studie wurde ein CTCL-Patient mit Ganzkörper-Elektronenstrahl-(TBEB)-Strahlung behandelt. Im Anschluß an die Behandlung wurde jeder Patient monatlich auf Hauttumoren untersucht und periodischen Haut-Biopsien und regelmäßigen CAT-Scans unterzogen, um zu bestimmen, ob innere Lymphome gebildet wurden. Im Gegensatz zu dem erwarteten Fortschreiten der Krankheit blieb jeder der unten beschriebenen CTCL-Patienten hauttumorfrei.

(a) Patient M. K.

[0060] Patientenprofil und Diagnose: Patient M. K., ein 68 Jahre alter weißer männlicher Milchbauer, wurde uns im Februar 1990 mit ausgedehnten Hauttumoren präsentiert, die sich über einen Zeitraum von etwa einem Jahr entwickelt hatten. Haut-Biopsien wurden durchgeführt und CTCL diagnostiziert; Ein CAT-Scan schloß die Anwesenheit von offensichtlichen inneren Lymphomen aus.

[0061] Therapie: M. K. erhielt über einen Zeitraum von neun Wochen insgesamt 3600 RADS von Ganzkörper-Elektronenstrahl-(TBEB)-Strahlung in zwei Gruppen von 18 Behandlungen (d. h. 100 RADS/Behandlung). Etwa zur Hälfte der TBEB-Strahlentherapie erhielt M. K. erstmalig Photopherese-Therapie (an zwei aufeinanderfolgenden Tagen). M. K. erhielt in der Folge monatlich Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

[0062] Patientenbewertung: Seit der Behandlung blieb M. K. hauttumorfrei.

(b) Patient C. Q.

[0063] Patientenprofil und Diagnose: Patient C. Q., ein 64 Jahre alter weißer männlicher Angestellter, wurde uns im Jahre 1986 mit ausgedehnten großen Hauttumoren (d. h. Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 3 cm) präsentiert. Haut-Biopsien wurden durchgeführt und CTCL diagnostiziert; Ein CAT-Scan schloß die Anwesenheit von offensichtlichen inneren Lymphomen aus.

[0064] Therapie: C. Q. erhielt über einen Zeitraum von neun Wochen insgesamt 3600 RADS von Gesamtkörper-Elektronenstrahl-(TBEB)-Strahlung in 36 Behandlungen (d. h. 100 RADS/Behandlung; vier Behandlungen pro Woche). Etwa zur Hälfte der TBEB-Strahlentherapie erhielt C. Q. seine erste Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. C. Q. erhielt in der Folge bis 1992, als die Photopherese-Therapie unterbrochen wurde, monatlich Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

[0065] Patientenbewertung: Seit der Behandlung (sieben Jahre) ist C. Q. hauttumorfrei geblieben.

(b) Patient C. D.

[0066] Patientenprofil und Diagnose: Patient C. D., ein 48 Jahre alter weißer männlicher Angestellter, wurde uns im Jahre 1988 mit mehr als fünfzig Hauttumoren, einschließlich eines sehr großen (d. h. ein Tumor mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm) ulzerierten Tumors an seinem rechten Oberschenkel präsentiert. Haut-Biopsien wurden durchgeführt und CTCL diagnostiziert; Ein CAT-Scan schloß die Anwesenheit von offensichtlichen inneren Lymphomen aus.

[0067] Therapie: C. D. erhielt über einen Zeitraum von neun Wochen insgesamt 3600 RADS Gesamtkörper-Elektronenstrahl-(TBEB)-Strahlung in 36 Behandlungen (d. h. 100 RADS/Behandlung; vier Behandlungen/Woche). Etwa zur Hälfte der TBEB-Strahlentherapie erhielt C. D. seine erste Photopherese-Therapie an

zwei aufeinanderfolgenden Tagen. C. D. erhielt in der Folge monatlich Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

[0068] Patientenbewertung: Seit der Behandlung ist C. D. hauttumorfrei geblieben.

BEISPIEL 2: Fallstudie eines Patienten, bei dem metastasierendes Dickdarmkarzinom diagnostiziert wurde.

[0069] Patientenprofil und Diagnose: Patient S. C., ein 78 Jahre alter weißer Mann, wurde uns mit einem schweren Husten mit Auswurf (helles rotes Blut aushustend) präsentiert und es wurde ein metastasierendes Dickdarmkarzinom und Läsionen in der Lunge und Leber diagnostiziert. Biopsie der Lungenläsion durch Bronchioskopie zeigte, daß die große Masse in der rechten Lunge des Patienten Dickdarmkarzinom war.

[0070] Therapie: S. C. wurde zunächst mit 5-Fluoruracil-Chemotherapie behandelt, sprach hierauf aber nicht an. Anschließend erhielt S. C. über einen Zeitraum von 12 Tagen insgesamt 3600 RADS von Gesamtkörper-Elektronenstrahl-(TBEB)-Strahlung an die Lunge in zehn Teildosen von jeweils 300 RADS. Die Leber-Läsionen erhielten keine Röntgenbestrahlung. Etwa zur Hälfte der TBEB-Strahlentherapie erhielt S. C. seine erste Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Monatliche Photopherese-Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde für vier Monate fortgesetzt.

[0071] Patientenbewertung: Am Ende der vier Monate Photopheresetherapie waren die Lebermetastasen nach wie vor anwesend (nachweisbar durch CAT-Scan), aber die Lungenläsion war nicht länger nachweisbar. Wie durch periodische CAT-Scans nachgewiesen wurde, blieb die Lunge bis zum Tod des Patienten ungefähr drei Jahre nach der ersten Röntgenbestrahlung/Photopherese-Behandlung tumorfrei.

BEISPIEL 3: 8-MOP/UVA-Induktion von leeren Klasse-I-MHC-Molekülen an der Zelloberfläche: Assoziation von leeren Klasse-I-MHC-Molekülen mit exogenem Peptid.

Experimenteller Aufbau:

[0072] Überblick: RMA-Zellen (Ljunggren et al., Nature 346: 476–480, 1990) wurden im Anschluß an die Behandlung mit 8-MOP/UVA mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf leere Klasse-I-Expression untersucht, um zu bestimmen, ob 8-MOP/UVA den Transport von peptidassoziierten MHC-Klasse-I-Komplexen zur Zelloberfläche entkoppelt. Die photobehandelten Zellen wurden Temperaturen ausgesetzt (etwa 28°C), die spezifisch das Auftreten von leeren Klasse-I-MHC-Molekülen verstärken. Im Anschluß an die Photoinaktivierung wurden die leeren Klasse-I-Moleküle quantifiziert, indem eines von zwei Peptiden (Sequenz-ID NO 1 und 2), die jeweils dafür bekannt sind, MHC-Moleküle zu binden und zu stabilisieren (zwei spezifische Influenza-Nukleoproteinfragmente), zugefügt wurde. Um zu ermitteln, ob die behandelten Zellen Oligopeptide freisetzten, die an Klasse-I binden, wurden die Klasse-I-Moleküle auch zu Beginn im Anschluß an die Behandlung quantifiziert.

[0073] Zellen. Murine RMA-Zellen, die nur wenige leere Klasse-I-Moleküle und RMA-S-Zellen, eine Mutanten-Zellinie, bei der gezeigt wurde, daß leere Klasse-I-Moleküle bei Raumtemperatur stabil, bei Körpertemperatur aber labil sind, wurden von P. Cresswell (Male Immunobiology) zur Verfügung gestellt.

[0074] 8-MOP UVA-Behandlung. RMA-Zellen, suspendiert in PBS, wurden therapeutischen Dosen von 8-MOP (20–200 ng/ml) und UVA (1–10 J/cm^2) ausgesetzt, um die spezifische Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber der Photobehandlung zu bestimmen. Lebensfähigkeit wurde durch Trypan-Blau-Ausschluß unmittelbar nach der Behandlung untersucht.

[0075] Immunchemikalien. Monoklonale Antikörper mit spezifischen Reaktivitäten gegen Klasse-I-MHC (K^b, Y3 murines Hybridom ATCC Nr. HB176 und D^b, 28148S murines Hybridom ATCC Nr. HB27) wurden von der ATCC erhalten (Rockville MD). Influenzavirus-Nukleoprotein-Oligopeptide (NP365-380 und NP345-360) wurden am Keck Protein Center hergestellt. Das K^b-bindende 16mer (SEQ ID NO 2 mit der Sequenz SFIRGTKVSPRGKLST) und das D^b optimal bindende 9mer (SEQ ID NO 1 mit der Sequenz AENENMETM) wurden in IMDM-Medium (Iscove's modified Dulbecco's medium, GIBCO, Grand Island NY) in PBS zu 50 µM gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

[0076] FACS-Analyse von Klasse-I-MHC-Molekülen. RMA-S-Zellen dienten als Positivkontrolle für die Expression von Klasse-I-MHC-Molekülen. Die Zellen wurden in 5% IMDM, 10% fötalem Kälberserum (FCS), versetzt mit 1% Pen/Strep-Antibiotika (GIBCO), kultiviert. Die Zellen wurden aus der Inkubation (37°C, 5 CO_2) entnommen, in Gewebekulturflaschen (10^6/ml) mit verschlossenen Deckeln kultiviert. Um die thermische Labilität/Stabilität von Klasse-I-Molekülen zu ermitteln, wurden die Zellen in einem einstellbaren Wasserbad für 48 h bei einer gegebenen Temperatur inkubiert. Für Durchflußzytometrie-Assays wurden 2 × 10^6 Zellen auf Eis mit 10% Humanserum Typ AB (GIBCO), dann mit 0,15 ml Anti-Klasse-I-Monoklonalem-Antikörper-Gewebekulturüberstand für 30 min auf Eis inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, und dann mit 0,15 ml fluoresceinisothiocyanat(FITC)-konjugiertem Anti-Maus-Immunglobulin von der Ziege (Sigma, St Louis MO) auf Eis für 30 min inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 1% Formaldehyd fixiert und in einem FACS analysiert. Um die Klasse-I-MHC-Moleküle zu stabilisieren, wurden Influenza-Nukleoproteinfragmente (Sequenz-ID NO 1 oder 2)

hinzugefügt (50 µM).

Ergebnisse

[0077] **Fig.** 1 zeigt die Wirkung von 8-MOP (10–300 ng/ml) und UVA (1 J/cm^2) auf die Lebensfähigkeit von RMA-Zellen (bestimmt durch Trypan-Blau-Ausschluß). Die Lebensfähigkeit von Zellen, die 8-MOP oder UVA nicht ausgesetzt waren, sind durch "no Tx" (d. h. keine Behandlung) in der Figur gekennzeichnet. Die Lebensfähigkeit von Zellen, die UVA, aber nicht 8-MOP ausgesetzt waren, ist mit "1 J/cm" in der Figur gekennzeichnet. Ein dosisabhängiger Anstieg von Zellschäden wurde bei steigenden Dosen von 8-MOP in Kombination mit 1 J/cm^2 beobachtet. Die steigenden Dosen sind in der Figur gekennzeichnet (d. h. die Bezeichnungen 10, 30, 100 und 300 beziehen sich auf die Konzentration von 8-MOP in ng/ml).

[0078] Die Wirkungen von 8-MOP (100 ng/ml) und UVA (1 J/cm^2) auf die Klasse-I-Expression und die Bindung von spezifischen Oligopeptiden (Sequenz-ID NO 1) an Klasse-I-RMA-Molekülen wurde untersucht. **Fig.** 2 repräsentiert eine zusammengesetzte Gruppe von Experimenten, die den zeitlichen Verlauf für die Verstärkung von D^b-Klasse-I-Molekülen auf RMA-Zellen, die mit 100 ng/ml 8-MOP und 1 J/cm^2 UVA behandelt wurden, zeigt. In dieser Serie von Experimenten wurden die 8-MOP/UVA-behandelten Zellen mit Zellen verglichen, die UVA allein ausgesetzt wurden (1 J/cm^2).

[0079] FACS-Analyse wurde verwendet, um das Maß von Klasse-I-Expression unter Verwendung von ATCC-Antikörpern, die für D^b und K^b-Klasse-I-Moleküle spezifisch sind, abzugleichen. Die mittlere Kanalfluoreszenz (Δ% MCF, mean channel fluorescence) wurde berechnet durch Differenzbildung im Signal für Zellen, die mit und ohne das Klasse-2-Oligopeptid (Sequenz-ID NO 2, d. h. AENENMETM) inkubiert wurden. **Fig.** 2 zeigt, daß das optimale Signal (d. h. der größte Anstieg in Klasse-I-Molekül-Expression) innerhalb von 10 h 8-MOP/UVA-Behandlung festgestellt wurde. Die optimale Zeit für die Induktion der Klasse-I-Expression wird mit Hilfe von detaillierteren Studien, d. h. durch Untersuchungen von Zellen in kürzeren Intervallen und unter mehreren verschiedenen Temperaturbedingungen im Anschluß an 8-MOP/UVA-Behandlung bestimmt.

[0080] Antigene werden bezüglich ihrer Fähigkeit zur Assoziierung mit leeren Klasse-I-Molekülen unter Verwendung der oben beschriebenen FACS-Methode ausgewählt. Der FACS-Assay dient daher als ein Screening-Protokoll zur Auswahl optimaler Bedingungen für die Induktion der Expression von leeren Klasse-I-Molekülen, sowie als Screening-Protokoll für die Auswahl von Antigen, die in der Lage sind, an leere Klasse-I-Moleküle zu binden und diese zu stabilisieren. In dieser weise werden verschiedene Peptide, und deren optimale Konzentrationen, auf ihre Fähigkeit zur Stabilisierung leerer Klasse-I-Moleküle untersucht.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

(A)	NAME:	Yale University
(B)	STRASSE:	451 College Street
(C)	STADT:	New Haven
(D)	STAAT:	Connecticut
(E)	LAND:	Vereinigte Staaten von Amerika
(F)	POSTLEITZAHL:	06520

(i) ERFINDER:

(A)	NAME:	Edelson, Richard L.
(B)	STRASSE:	76 Coleytown Road
(C)	STADT:	WestPort
(D)	STAAT:	Connecticut
(E)	LAND:	Vereinigte Staaten von Amerika
(F)	POSTLEITZAHL:	06880

(i) ERFINDER:

(A)	NAME:	Gasparro, Francis P.
(B)	STRASSE:	37 Myra Road
(C)	STADT:	Hamden
(D)	STAAT:	Connecticut
(E)	LAND:	Vereinigte Staaten von Amerika
(F)	POSTLEITZAHL:	06517

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Zellulärer Impfstoff und dessen Verwendung für die Behandlung von malignen soliden Tumoren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Wolf, Greenfield & Sacks, P.C.

(B) STRASSE: 600 Atlantic Ave.

(C) STADT: Boston

(D) STAAT: MA

(E) LAND: U.S.A.

(F) PLZ: 02210

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGERTYP: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC DOS/MS DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Version #1.0, Version # 1.25

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: Nicht verfügbar

(B) ANMELDETAG: hiermit

(vii) DATEN DER FRÜHEREN PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 08/100691

(B) ANMELDETAG: 30 JUL 1993

(viii) ANWALT-/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: Plumer, Elizabeth R.

(B) REGISTERNUMMER, 36,637

(C) ZEICHEN/BEARBEITUNGSNUMMER: Y0060/7005

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 617/720 3500

(B) TELEFAX:617/720 2441

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID N0:1:

Ala Glu Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäuren
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Ser Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val Ser Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr
1 5 10 15

Patentansprüche

1. Verwendung einer Leukozytenzubereitung zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird umfassend:
(a) das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden,
(b) das Aussetzen der mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle exprimieren,
(c) das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassoziierter Leukozyten und
(d) das Anordnen der mehreren antigenassoziierter Leukozyten in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

2. Verwendung eines photoaktivierten Mittels zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird umfassend:
(a) das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor

hervorzurufen, hergestellt werden,
(b) das Aussetzen einer mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart des photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle exprimieren,
(c) das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassoziierter Leukozyten und
(d) das Anordnen der mehreren antigenassoziierter Leukozyten in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der interne solide Tumor mit einem Krebs assoziiert ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lunge, Brust, Ovarium, Gebärmutter, Prostata, Testikeln, Leber, Pankreas, dem Magen, Plattenepithelkarzinom des oralen Schlunds, Fibrosarkom, Niere, Blase, Gehirn, Rückenmark, bösartigem Melanom und metastatischem Plattenepithelkarzinom der Haut.

4. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Zusammensetzung für die Verabreichung an eine Person bestimmt ist, die ein kompetentes Immunsystem aufweist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung für die Verabreichung an eine Person bestimmt ist, die einen fast normalen absoluten Spiegel CD8-positiver T-Zellen aufweist.

6. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Bestrahlen des inneren soliden Tumors das Bestrahlen des Tumors mit einer Gesamtdosis von 100 bis ca. 6000 Rad umfaßt.

7. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Isolieren der mehreren tumorderivierten Antigene das Isolierend der Antigene aus Vollblut umfaßt.

8. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Behandlung des weiteren den Schritt des Zubereitens einer Antigenzubereitung mit einer angereicherten Konzentration von tumorderivierten Antigenen und/oder den Schritt des Lagerns der mehreren tumorderivierten Antigene vor dem Inkontaktbringen mit der bestrahlten Leukozytenzubereitung umfaßt.

9. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Leukozytenzubereitung aus der Person isoliert wird und wahlweise mehrere Lymphozyten und/oder mehrere Monozyten oder B-Zellen umfaßt.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Leukozytenzubereitung mehrere Monozyten oder B-Zellen umfaßt und die Behandlung des weiteren den Schritt des Kultivierens der Monozyten oder B-Zellen vor dem Aussetzen der Zubereitung Strahlung gegenüber umfaßt.

11. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Leukozytenzubereitung mehrere Lymphozyten umfaßt und aus einer Quelle isoliert wird, die aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Blut, Lymphflüssigkeit, Knochenmark, Lymphorgangewebe oder Gewebekulturflüssigkeit.

12. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das photoaktivierbare Mittel ein Psoralen ist und das Psoralen bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus 8-Methoxypsoralen, Aminomethyltrimethylpsoralen, 5-Methoxypsoralen und Trimethylpsoralen, und noch bevorzugter 8-Methoxypsoralen ist.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Ultraviolett A-Strahlung eine Wellenlänge von mehr als ca. 420 nm aufweist.

14. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten bei einer Temperatur von ca. 22°C bis ca. 30°C in Kontakt gebracht werden.

15. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die pharmazeutisch akzeptable Form des antigenassoziierten Leukozyten für die Lagerung vor der Verabreichung geeignet ist.

16. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die pharmazeutisch akzeptable Form des antigenassoziierten Leukozyten für das Einspritzen in den Blutstrom der Person oder für das intradermale Einspritzen geeignet ist.

17. Verwendung einer Mischung enthaltend mehrere aus einem soliden Tumor derivierte Antigene, die mit mehreren photoinaktivierten B-Zellen oder Monozyten vermischt sind, zur Herstellung eines Medikaments für das Verbessern der Wirksamkeit der Röntgenstrahlentherapie für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor, wobei das Medikament eine wirksame Menge der Mischung und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

18. Verwendung einer Zellzubereitung enthaltend mehrere antigenpräsentierende Zellen zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Person mit einem inneren soliden Tumor, wobei das Medikament durch ein Verfahren hergestellt wird umfassend:
(a) das Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden,
(b) das Behandeln der Zellzubereitung zum Verbessern der Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls durch die Zellen, wobei jede der antigenpräsentierenden Zellen für die Verabreichung an die Person geeignet ist,
(c) das Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der behandelten Zellzubereitung unter Bedingungen für die Bildung mehrerer antigenassoziierter antigenpräsentierender Zellen und
(d) das Anordnen mehrerer antigenassoziierter, antigenpräsentierender Zellen in einer pharmazeutisch akzeptablen Form.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Schritte des Behandelns der Zellzubereitung zum Verbessern der Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls das Unterwerfen der Zubereitung einer Temperatur zwischen ca. 22°C und 30°C und/oder das Bestrahlen der Zellzubereitung in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels und/oder das Inkontaktbringen der Zellzubereitung mit einem oder mehreren Zytokinen umfaßt, die dafür bekannt sind, die Expression eines Haupthistokompatibilitätsmoleküls auszulösen.

20. Zubereitung antigenassoziierter Leukozyten, wobei der antigenassoziierte Leukozyt zubereitbar ist durch:
(a) Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden,
(b) Aussetzen einer mehrere Leukozyten enthaltenden Leukozytenzubereitung gegenüber Ultraviolett-A-Bestrahlung oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines photoaktivierbaren Mittels zur Bildung einer Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten, wobei die Leukozyten mehrere Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle exprimieren,
(c) Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der Zubereitung photoinaktivierter Leukozyten unter Bedingungen für das Assoziieren der tumorderivierten Antigene mit den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen unter Bildung mehrerer antigenassoziierter Leukozyten.

21. Zubereitung antigenassoziierter Leukozyten nach Anspruch 20 für die Verwendung als Medikament.

22. Zubereitung antigenassoziierter antigenpräsentierender Zellen, wobei die antigenassoziierte, antigenpräsentierende Zelle zubereitbar ist durch:
a) Bereitstellen mehrerer tumorderivierter Antigene, die durch Bestrahlen des inneren soliden Tumors mit Röntgenstrahlen, die eine ausreichende Energie aufweisen, um die Abgabe der Antigene durch den Tumor hervorzurufen, hergestellt werden,
(b) Behandeln der Zellzubereitung zum Verbessern der Expression eines Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküls durch die Zellen, wobei jede der antigenpräsentierenden Zellen für die Verabreichung an die Person geeignet ist,
(c) Inkontaktbringen der mehreren tumorderivierten Antigene mit der behandelten Zellzubereitung unter Bedingungen für die Bildung mehrerer antigenassoziierter, antigenpräsentierender Zellen.

23. Zubereitung antigenassoziierter antigenpräsentierender Zellen nach Anspruch 21 für die Verwendung als Medikament.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

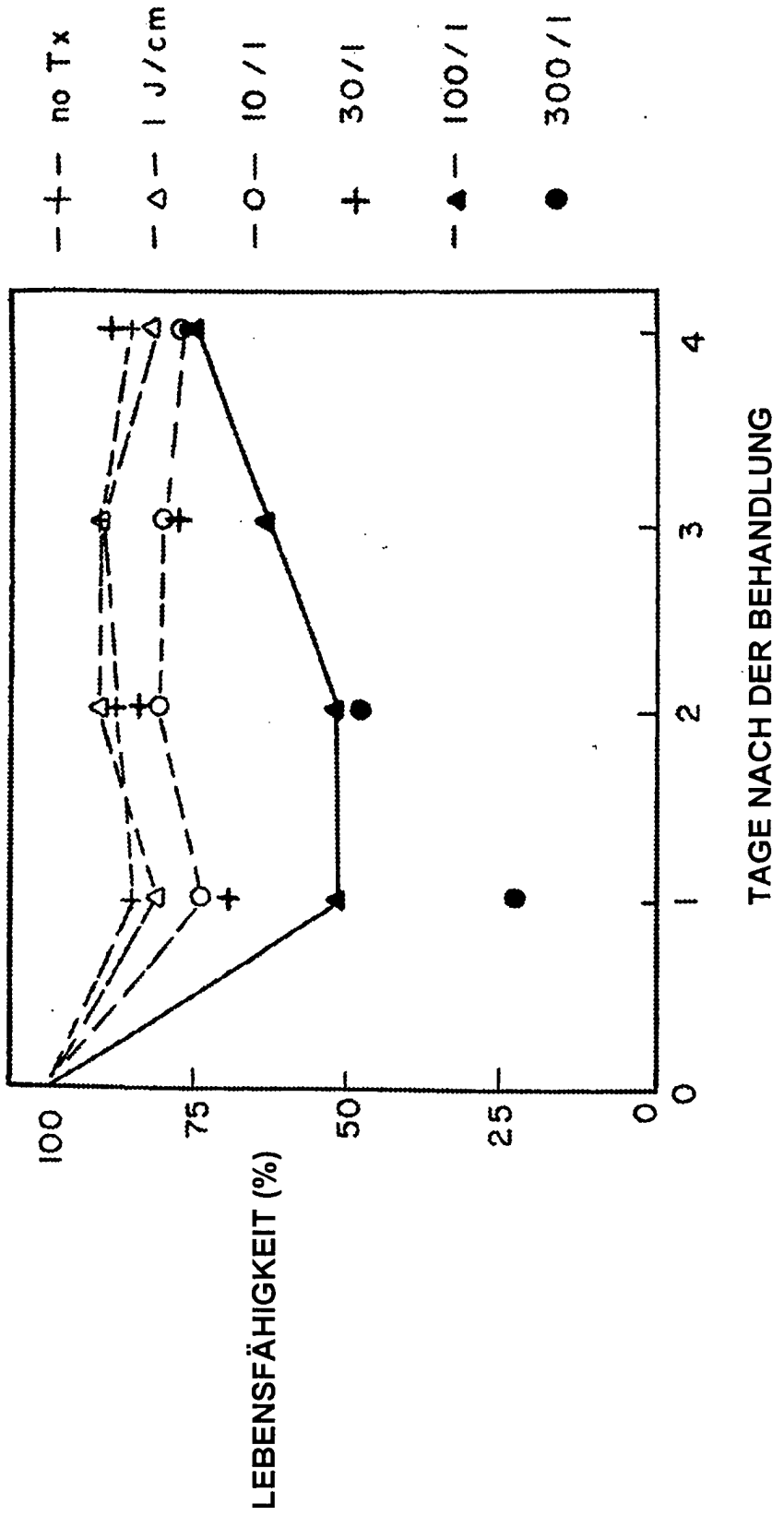


FIG. 1

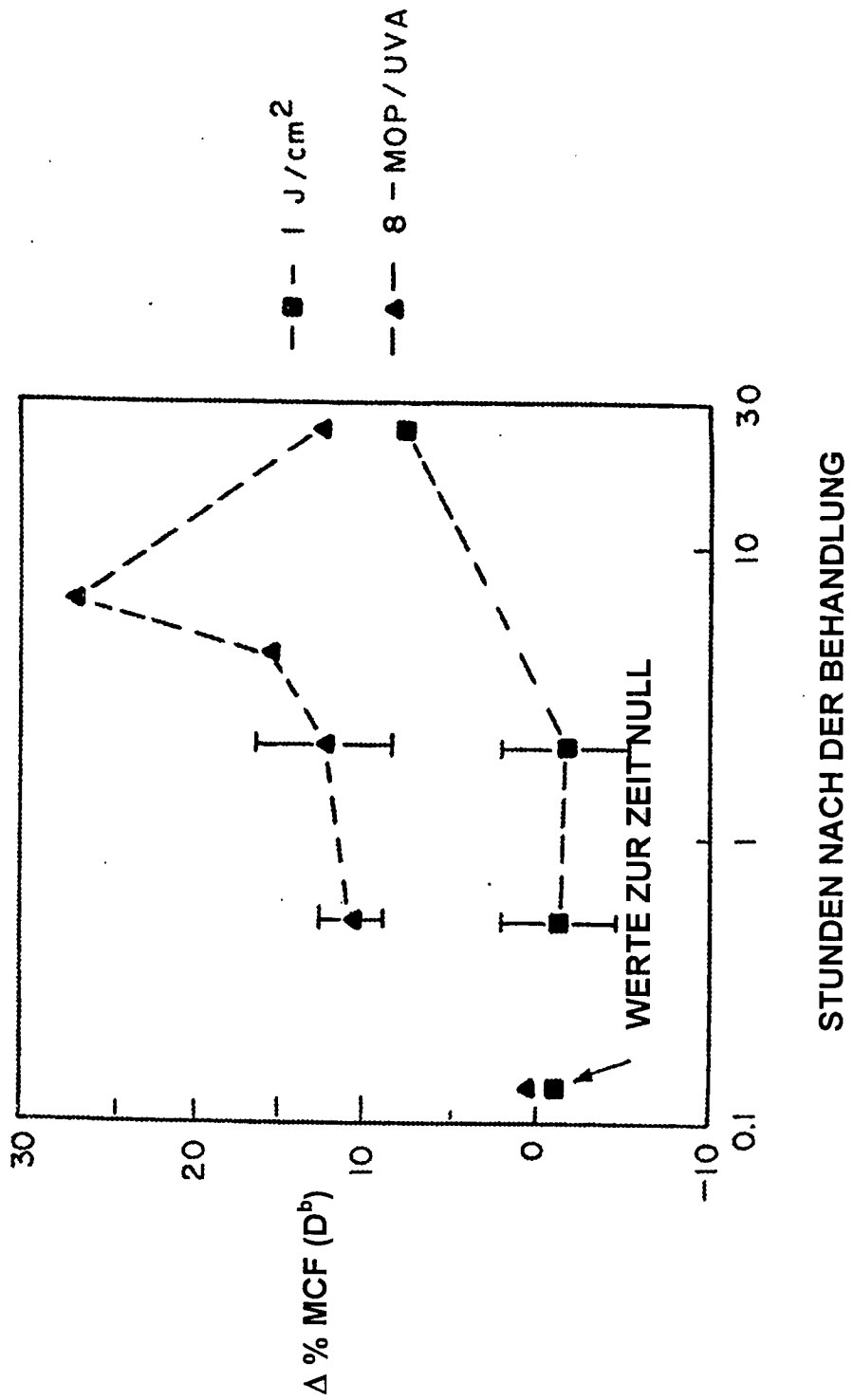

1 J/cm²
8-MOP/UVA
Δ % MCF (D^b)
30
20
10
0
-10
0.1
1
10
30
WERTE ZUR ZEIT NULL
STUNDEN NACH DER BEHANDLUNG

FIG. 2