



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/395, 39/39, A61P 35/00 // C07K 16/30		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/41722 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 2000 (20.07.00)			
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00174	(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Januar 2000 (12.01.00)	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).				
(30) Prioritätsdaten: 51/99 13. Januar 1999 (13.01.99) CH						
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): IGENEON GMBH [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).	(72) Erfinder; und	(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ECKERT, Helmut [CH/CH]; Hohe Strasse 167, CH-4104 Oberwil (CH). LOIBNER, Hans [AT/AT]; Heimgasse 23, A-1238 Wien (AT).				
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; P.O. Box 86 07 67, D-81634 München (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>					
(54) Title: USE OF ANTIBODIES FOR ANTICANCER VACCINATION						
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ANTIKÖRPERN ZUR VAKZINIERUNG GEGEN KREBS						
(57) Abstract						
The invention relates to the use of antibodies directed against human cellular membrane antigens for vaccinations against cancer.						
(57) Zusammenfassung						
Beschrieben wird die Verwendung von Antikörpern, die gegen menschliche zelluläre Membranantigene gerichtet sind, zur Vakzinierung gegen Krebserkrankungen.						

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	PL	Polen		
CM	Kamerun		Korea	PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verwendung von Antikörpern zur Vakzinierung gegen Krebs

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Antikörpern, die gegen menschliche zelluläre Membranantigene gerichtet sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vakzinierung gegen Krebs.

Mit der Entdeckung der Hybridomtechnologie ist es möglich geworden, monoklonale Antikörper (MAK) gegen verschiedenste Antigene zu generieren. Diese generell für alle biologischen Fragestellungen einsetzbare Technologie hat auch in der Krebsforschung einen wichtigen Platz eingenommen. In den letzten 20 Jahren sind MAK gegen eine Vielzahl von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) hergestellt worden. TAA sind Strukturen, die bevorzugt auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimiert sind, dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglichen und daher als Zielpunkte für diagnostische und therapeutische Anwendungen auf der Basis von spezifischen MAK oder davon abgeleiteten Derivaten gesehen werden.

Direkte therapeutische Anwendungen von MAK gegen TAA beruhen auf passiven Immuntherapien, das heißt, ein MAK oder ein Derivat wird systemisch in geeigneter Menge an Krebspatienten verabreicht und übt eine therapeutische Wirkung nur aus, solange die Konzentration im Organismus dafür genügend groß ist. Die biologische Halbwertszeit solcher Agentien hängt von ihrer Struktur ab und beträgt wenige Stunden bis mehrere Tage. Daher ist es notwendig, wiederholte Applikationen vorzunehmen. Das führt bei Verwendung von xenogenen Antikörpern (z.B. murine MAK) aber zu unerwünschten Immunreaktionen, die eine mögliche therapeutische Wirkung neutralisieren und gefährliche Nebenwirkungen

(anaphylaktische Reaktionen) bedingen können. Daher können solche Immuntherapeutika nur für eine begrenzte Zeit verabreicht werden.

Einem anderen Ansatz für Immuntherapie von Krebs liegt die selektive Aktivierung des Immunsystems von Krebspatienten zugrunde, maligne Zellen zu bekämpfen. Das wird mittels verschiedenster Formen von Krebsvakzinen versucht. Dazu gehören Impfungen mit autologen oder allogenen Tumorzellen, chemisch oder molekularbiologisch modifizierten autologen oder allogenen Tumorzellen, isolierten oder mit Hilfe von chemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellten TAA, daraus abgeleiteten Peptiden, neuerdings auch Impfungen mit DNA, die für TAA oder daraus abgeleiteten Strukturen codieren, etc. Eine alternative Methode beruht auf der Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern zur Vakzinierung gegen Krebs. Geeignete anti-idiotypische Antikörper können ein TAA immunologisch nachahmen. Sie induzieren als Fremdproteine (z.B. murine Antikörper, Ziegen-Antikörper etc.) nach Vakzinierung - im Gegensatz zu den eigentlichen menschlichen Tumorantigenen, die als Selbst-Strukturen oft nur wenig immunogen sind - im Menschen eine starke Immunantwort. Daher können anti-idiotypische Antikörper als immunogener Ersatz eines Tumorantigens zur Impfung verwendet werden.

Im Unterschied zur passiven Immuntherapien mit Anti-Tumorantikörpern genügen für die aktive spezifische Krebs-Immuntherapie im Prinzip sehr kleine Mengen eines geeigneten Impfstoffes, um für Monate bis Jahre eine Immunität zu induzieren, die bei Abschwächung durch Booster-Impfungen wieder aufgefrischt werden kann. Darüberhinaus kann bei aktiver Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität induziert werden, deren Zusammenspiel eine effektive Schutzwirkung ergeben kann.

Zusammenfassend beruht die bisherige Verwendung von Antikörpern oder von deren Derivaten in der Krebs-Immuntherapie im wesentlichen auf zwei Prinzipien:

- Passive Therapie mit Antikörpern oder deren Derivaten, die gegen TAA gerichtetet sind.
- Aktive Immunisierung (Vakzinierung) mit Antikörpern oder deren Derivaten, die gegen den Idiotyp von Antikörpern mit Spezifität gegen TAA gerichtet sind.

Im Verlauf der Entdeckung und nachfolgender Charakterisierung von verschiedenen TAA hat sich herausgestellt, daß diese wichtige Funktionen für Krebszellen haben. Sie ermöglichen den entarteten Zellen, charakteristische Eigenschaften für den malignen Phänotyp wie z.B. vermehrte Adhäsionsfähigkeit auszuüben, die für die Etablierung von Metastasen von großer Bedeutung sind. Allerdings können solche Antigene durchaus in bestimmten Stadien auch auf normalen Zellen exprimiert sein, wo sie für normale Funktionen dieser Zellen verantwortlich sind. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien hier einige Beispiele für solche Antigene angeführt:

- N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule), das oft auf Tumoren neuronalen Ursprungs exprimiert ist und homophile Adhäsion bewirkt (J. Cell Biol. 118 (1992), 937).
- Das Lewis Y Kohlenhydratantigen, das auf der Mehrzahl der Tumoren epithelialen Ursprungs aufscheint, aber auch während der fötalen Entwicklung epithelialer Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, daß die Expression dieses Antigens in Lungenkrebs stark mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, da Lewis Y positive Krebszellen offensichtlich ein höheres metastatisches Potential haben (N. Engl. J. Med. 327 (1992), 14).
- CEA (Carcino Embryonic Antigen), das häufig auf epithelialen Tumoren des Gastro-Intestinaltraktes vorkommt und als Selbstadhäsionsmolekül identifiziert wurde (Cell 57 (1989), 327).
- Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), daß auf fast allen Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert ist, aber auch auf vielen normalen Epithelien vorkommt, das als Selbstadhäsionsmolekül charakterisiert wurde und daher als pan-epitheliales Adhäsionsantigen klassifiziert werden kann (J. Cell Biol. 125 (1994), 437).

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde weitere Mittel und Methoden zur Verfügung zu stellen, die eine effiziente Prophylaxe gegen bzw. Therapie von Krebserkrankungen erlauben.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung die Verwendung von Antikörpern, die gegen menschliche zelluläre Membranantigene gerichtet sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Vakzinierung gegen Krebs. Der Begriff "zelluläre Membranantigene" betrifft dabei Strukturen, die auf der Zellmembran von Zellen präsentiert werden. Hier sind insbesondere Rezeptoren zu nennen, wie z.B. der Transferrin-Rezeptor, oder andere Moleküle, wie z.B. E-Cadherin oder Ep-CAM.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellt ein derartiges zelluläres Membranantigen ein Tumor-assoziiertes Antigen dar. Unter dem Begriff "Tumor-assoziiertes Antigen" wird dabei eine Struktur verstanden, die bevorzugt von Tumorzellen präsentiert wird und dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglicht. Vorzugsweise ist ein solches Tumor-assoziiertes Antigen auf bzw. in der Zellmembran einer Tumorzelle lokalisiert. Dabei ist aber nicht ausgeschlossen, daß derartige Antigene auch auf nicht-entarteten Zellen vorkommen. Bei Tumor-assoziierten Antigenen kann es sich beispielsweise um Polypeptide, insbesondere glykosylierte Proteine, oder Glykosylierungsmuster von Polypeptiden handeln. Andere Strukturen, die ein Tumor-assoziiertes Antigen darstellen können, sind z.B. Glykolipide. Hierzu gehören beispielsweise Ganglioside, wie z.B. GM2. Ferner können Tumor-assoziierte Antigene dargestellt werden durch Veränderungen der Zusammensetzung von Lipiden der Zellmembran, die für Krebszellen charakteristisch sein können.

Beispiele für Tumor-assoziierte Antigene sind N-CAM, das Lewis Y Kohlenhydratantigen, CEA und Ep-CAM, die bereits oben erwähnt wurden. Weitere Beispiele sind Sialyl Tn Kohlenhydrat, Globo H Kohlenhydrat, Ganglioside wie GD2/GD3/GM2, Prostate Specific Antigen (PSA), CA 125, CA 19-9, CA 15-3, TAG-72, EGF Rezeptor, Her2/Neu Rezeptor, p97, CD20 und CD21. Gegen alle

diese Antigene stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung. Weitere Tumor-assoziierte Antigene werden z.B. beschrieben in DeVita et al. (Eds., "Biological Therapy of Cancer", 2. Aufl., Kapitel 3: Biology of Tumor Antigens, Lippincott Company, ISBN 0-397-51416-6 (1995)).

Unter dem Begriff "Antikörper" werden Antikörper aller Art verstanden, insbesondere polyclonale oder monoklonale oder auch chemisch, biochemisch oder molekularbiologisch hergestellte Antikörper. Verfahren zur Herstellung solcher Moleküle sind dem Fachmann geläufig. Auf die Art der Herstellung des Antikörpers kommt es nicht an. Wichtig ist lediglich seine Bindungsspezifität für ein relevantes Epitop eines zellulären Membranantigens. Bevorzugt werden monoklonale Antikörper verwendet, ganz besonders bevorzugt monoklonale Antikörper tierischen, insbesondere murinen Ursprungs. Ganz besonders bevorzugt wird der murine monoklonale Antikörper HE-2 verwendet, der wie beschrieben erzeugt werden kann oder ein Antikörper, der die gleiche Bindungsfeinspezifität wie HE2 aufweist. Der Begriff "Antikörper" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Fragmente und Derivate von Antikörpern, wobei diese Fragmente oder Derivate ein TAA erkennen. Die durch Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen TAA induzierte, therapeutisch wirksame Immunantwort ist durch die Bindungsregion dieser Antikörper, ihrem Idiotyp, determiniert. Daher können im Prinzip statt intakter Antikörper auch Fragmente oder Derivate dieser Antikörper erfolgreich zur Vakzinierung eingesetzt werden, solange diese Derivate den Idiotyp des jeweiligen Ausgangs-Antikörpers weiterhin beinhalten. Als Beispiele, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: $F(ab)_2'$ -Fragmente, $F(ab)'$ -Fragmente, Fv-Fragmente, die entweder nach an sich bekannten biochemischen Methoden (enzymatische Spaltung) oder nach an sich bekannten Methoden der Molekularbiologie hergestellt werden können, sowie Antikörperderivate, die nach an sich bekannten chemischen, biochemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellt werden können. Der Begriff Derivat umfaßt dabei insbesondere auch Produkte, die erzeugt werden können durch chemische Kopplung von Antikörpern (-fragmenten) mit Molekülen, die die

Immunantwort verstärken können, wie z.B. Tetanus-Toxoid, *Pseudomonas* Exotoxin, Derivate von Lipid A, GM-CSF, IL-2 oder durch chemische Kopplung von Antikörpern (-fragmenten) mit Lipiden für bessere Inkorporierung in eine Liposomenformulierung. Der Begriff "Derivat" umfaßt auch molekularbiologisch hergestellte Fusionsproteine von Antikörpern (-fragmenten) mit Polypeptiden, die die Immunantwort verstärken können, wie GM-CSF, IL-2, IL-12, C3d etc. Die Antikörper können erfindungsgemäß selbstverständlich auch in Kombination eingesetzt werden. D.h. es können zwei oder mehr Antikörper, die verschiedene Membranantigene oder verschiedene Epitope desselben Membranantigens erkennen verabreicht werden. Dabei können die verschiedenen Antikörper jeweils gleichzeitig (gemeinsam oder getrennt) oder nacheinander verabreicht werden. Krebszellen exprimieren häufig mehrere TAA gleichzeitig, gegen die für Vakzinierungen geeignete Antikörper zur Verfügung stehen oder generiert werden können. Für eine verstärkte, unter Umständen synergistische Wirkung der induzierten Immunantwort, um die potentielle Gefahr der Selektion von Antigen-negativen Varianten zu minimieren und um möglicher Tumorzellheterogenität entgegenzuwirken, kann es günstig sein, eine Kombination von zwei oder mehreren geeigneten Antikörpern oder deren Fragmenten oder Derivaten gleichzeitig zur Vakzinierung zu verwenden.

Der Begriff "Vakzinierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine aktive Immunisierung, d.h. eine Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Verabreichung (z.B. subkutan, intradermal, intramuskulär, ev. auch oral, nasal) von geringen Mengen eines Antigens (eines Stoffes, der vom Immunsystem des vakzinierter Individuums als fremd und damit immunogen erkannt wird) in einer geeigneten immunogenen Formulierung. Das Antigen wird also als "Trigger" für das Immunsystem benutzt, um eine für das Antigen spezifische Immunantwort aufzubauen. Die dazu benötigten Mengen des Antigens können grundsätzlich sehr gering sein (manche Impfstoffe beinhalten nur ca. 5-10 µg Antigen pro Impfdosis). Charakteristisch für eine aktive Immunisierung ist eine in großen Bereichen nur wenig Mengen-abhängige Dosis Wirkungskurve. Das heißt, daß die Immunantwort

in einem weiten Dosisbereich in etwa gleich stark ausfällt. Daraus folgt, daß bei einer Vakzinierung der gewünschte Effekt, also die Induktion einer Immunantwort, bereits mit sehr geringen Antigenmengen erzielt werden kann, aber auch mit wesentlich höheren Antigenmengen in vergleichbarer Weise erzielt werden kann. Es ist aber naturgemäß wünschenswert, grundsätzlich mit möglichst niedrigen Dosierungen zu arbeiten, insbesondere im Hinblick auf Nebenwirkungen, Materialkosten etc., was bei einer Vakzinierung zum Tragen kommt.

Eine Vakzinierung im Sinne der vorliegenden Erfindung kann grundsätzlich sowohl im therapeutischen Sinne als auch im prophylaktischen Sinne (wie bei allen antimikrobiellen Impfstoffen) durchgeführt werden. Das heißt, die erfindungsgemäße Vakzinierung gegen Krebs kann sowohl als therapeutische als auch als prophylaktische Anwendung verstanden werden. Somit kann durch die Vakzinierung von nicht an Krebs erkrankten Personen mit geeigneten Antikörpern gegebenenfalls ein vorbeugender Schutz gegen den Ausbruch einer Krebserkrankung erzielt werden. Für eine solche prophylaktische Vakzinierung kommen insbesondere, wenn auch nicht ausschließlich, Personen in Frage, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine Krebserkrankung zu entwickeln.

Die erfindungsgemäße Verwendung unterscheidet sich substantiell von den beiden zuvor genannten, bisher bekannten prinzipiellen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von Antikörpern zur Behandlung von Krebs und erlaubt eine unerwartet wirksame Behandlung.

Die Bindungsregion eines Antikörpers gegen ein TAA kann nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" ein strukturell komplementäres Abbild des Bindungs-Epitopes des jeweiligen TAA's darstellen. Das bedeutet, daß ein solcher Antikörper in seinem Idiotyp eine Strukturinformation des Epitopes des TAA trägt, gegen das er gerichtet ist. Wird daher ein Krebspatient mit einem geeigneten, immunogenen Antikörper gegen ein TAA geimpft (also z.B. mit einem murinen MAK gegen ein TAA), werden dagegen im Patienten Antikörper gebildet, die zum Teil gegen den Idiotyp des als Vakzine eingesetzten Antikörpers gerichtet sind und nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" das Epitop des TAA strukturell nachahmen können.

Daraus folgt, daß durch eine solche Impfung im Krebspatienten gewissermaßen lösliche Varianten des Epitopes des TAA generiert werden, die als aktiv induzierte autologe Antikörper für lange Zeiträume wirken können und deren Titer in geeigneten Abständen durch Booster-Impfungen wieder aufgefrischt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das menschliche zelluläre Membranantigen eine Struktur, die eine Rolle spielt bei Adhäsionsvorgängen. Adhäsionsvorgänge sind dabei vorzugsweise Zell-Zell-Interaktionen, wobei Liganden bzw. Rezeptoren auf der Zelloberfläche involviert sind. Adhäsionsmoleküle sind demnach der Zell-Zell-Interaktion dienende Liganden bzw. Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine Untergruppe von solchen Adhäsionsmolekülen sind die Selbstdhäsionsmoleküle. Diese haben die Eigenschaft, an sich selbst binden zu können.

Die physiologische Wirkung einer durch Impfung mit einem Antikörper gegen ein TAA induzierten Immunantwort hängt naturgemäß von der Funktion des jeweiligen TAA ab. Hat das TAA beispielsweise eine Funktion als Rezeptor für die Adhäsion von Tumorzellen, insbesondere an einen Liganden auf Endothelzellen des Gefäßsystems (eine solche Eigenschaft ist wichtig für die Fähigkeit von disseminierten Krebszellen, aus dem Gefäßsystem auszutreten und sich in Gewebe festzusetzen, um dort eine Metastase auszubilden), dann wird diese Adhäsionsfähigkeit durch Vakzinierung mit einem geeignetem Antikörper gegen dieses TAA herabgesetzt, weil im Kreislauf und im Gewebe permanent induzierte Antikörper vorhanden sind, die die Interaktion des TAA mit seinem Liganden kompetitieren, da sie das TAA in löslicher Form nachahmen.

Allgemein ausgedrückt, kann nach den obenstehenden Ausführungen durch Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen TAA, die eine Funktion für die Malignität von Tumorzellen haben, erreicht werden, daß die induzierte Immunantwort mit der Funktion des TAA in dessen Wechselwirkung mit seinem Liganden interferiert und diese erschwert oder verhindert. Das bedeutet, daß Krebszellen für den malignen Phänotyp wichtige Eigenschaften nicht oder nicht

ausreichend ausüben können, wodurch die Entwicklung der Erkrankung verlangsamt oder gestoppt werden kann und insbesonders in frühen Stadien die Ausbildung von Metastasen unterdrückt werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das zelluläre Membranantigen zur Selbstdadhäsion fähig, d.h. bestimmte Epitope des Antigens sind für die homophile Bindung mit einem gleichen Antigen auf einer anderen Zelle verantwortlich. Beispiele für solche Antigene sind unter anderem N-CAM (Neuronal Cellular Adhesion Molecule), CEA (Carcino Embryonic Antigen) und Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule). Antikörper, die gegen Epitope von Selbstdadhäsionsantigenen gerichtet sind, welche in diese Funktion involviert sind, können nach den obenstehenden Ausführungen eine komplementäre Strukturinformation eines solchen Epitopes tragen. Daher kann, entsprechend den obenstehenden Ausführungen, durch Vakzinierung mit solchen Antikörpern die Ausbildung von Antikörpern induziert werden, die die Eigenschaften dieser Selbstdadhäsion in der Bindungsreaktion tragen. Das bedeutet, daß solche induzierten Antikörper wiederum an dem Selbstdadhäsionsantigen binden können, da in einem solchen Fall Rezeptor und Ligand identisch sind. Damit kann durch Impfung von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen Selbstdadhäsionsantigene eine Immunantwort induziert werden, die wiederum direkt an Tumorzellen bindet und dadurch vielfältige therapeutische Wirkungen auslöst. Einerseits wird die für maligne Zellen wichtige Fähigkeit der Selbstdadhäsion blockiert und andererseits können durch die Bindung der induzierten Antikörper an die Krebszellen humane Effektorfunktionen wie Komplement-abhängige Lyse und/oder Lyse durch Aktivierung von zytotoxischen Effektorzellen ausgelöst werden, die zur Zerstörung der Krebszellen führen.

Durch alle oben genannten Mechanismen und Wirkungen kann die Vakzinierung von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen TAA die Ausbildung neuer Metastasen unterdrücken und die Disseminierung der Erkrankung zumindestens verlangsamen. In frühen Krankheitsstadien, zum Beispiel nach erfolgreicher

Operation eines Primärtumors (adjuvantes Stadium), werden durch solche Impfungen restliche, disseminierte Tumorzellen daran gehindert, sich als neue Metastasen zu etablieren. Dadurch kann die rückfallsfreie Lebensspanne und damit auch die Gesamtüberlebenszeit solcher Patienten verlängert werden. Durch solche Impfungen und in geeigneten Abständen durchgeführte Auffrischungsimpfungen kann gegebenenfalls ein lebenslanger Schutz vor der Ausbildung von Metastasen erreicht werden. Von besonderem Interesse sind Vakzinierungen von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA, da in diesen Fällen, wie oben beschrieben, durch einen zusätzlichen direkten Angriff der induzierten Immunantwort auf Tumorzellen eine verstärkte therapeutische Wirkung möglich ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung hergestellte Arzneimittel neben dem Antikörper mindestens ein bei der Formulierung von Vakzinen übliches Adjuvans. Durch solche Adjuvantien kann die Immunantwort verstärkt werden. Als Beispiele für Adjuvantien, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: Aluminiumhydroxid (Alu-Gel), Derivate von Lipopolysaccharid, Bacillus Calmette Guerin (BCG), Liposomenbereitungen, Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie z.B. Tetanus Toxoid, Pseudomonas Exotoxin, oder Bestandteile von Influenza-Viren, gegebenenfalls in einer Liposomenbereitung, biologische Adjuvantien wie Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin 2 (IL-2) oder Gamma Interferon (IFN γ).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung hergestellte Arzneimittel geeignet für eine Verabreichung zur Impfung in einer Dosierung von 0,01 bis 4 mg Antikörper, vorzugsweise von 0,5 mg.

Die Impfung kann durch einmalige Applikation der oben angegebenen Dosierung erfolgen. Vorzugsweise erfolgt sie jedoch durch wiederholte Verabreichungen. Die

Zahl der Wiederholungen liegt dabei im Bereich von 1 bis 12 pro Jahr, besonders bevorzugt im Bereich von 4 bis 8 pro Jahr. Die Dosierung kann dabei gleichbleiben oder abnehmen.

Auffrischungsimpfungen können dabei in regelmäßigen Abständen, prinzipiell lebenslang, durchgeführt werden. Geeignete Intervalle liegen hierbei im Bereich von etwa 6 bis zu 24 Monaten und können durch Verfolgung der Titer der induzierten Antikörper festgelegt werden (eine Auffrischung sollte erfolgen, sobald die Titer der induzierten Antikörper deutlich abgefallen sind).

Die Verabreichung des Antikörpers kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen. Vorzugsweise ist das Arzneimittel enthaltend den Antikörper geeignet für eine subcutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Antikörpern, die ein Tumor-assoziiertes Antigen erkennen, zur Vakzinierung gegen Krebserkrankungen, sowie ein Verfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen durch Vakzinierung, wobei einem Patienten eine zur Vakzinierung ausreichende Menge an einem oder mehreren Antikörpern, die ein TAA erkennen, verabreicht wird. Für die Definitionen und bevorzugten Ausführungsformen gilt das bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung Gesagte.

Die Verwendung von Antikörpern gegen TAA, oder von deren Derivaten oder Fragmenten als Vakzinen unterscheidet sich substantiell von den bekannten Anwendungen solcher Anti-TAA Antikörper für die passive Immuntherapie, einige wesentliche Vorteile der erfindungsgemäßen Verwendung gegenüber der passiven Antikörper-Immuntherapie sind wie folgt zusammengefaßt:

Antikörper gegen TAA zur passiven Immuntherapie von Krebs:

- Hohe Dosis (≥ 100 mg / intravenöse Infusion)

- Kurze Wirkung durch Elimination des Wirkstoffes
- Xenogene Antikörper unerwünscht wegen Immunogenität
- Therapiedauer insbesonders bei xenogenen Antikörpern wegen der Induktion einer Immunantwort und der dadurch entstehenden Gefahr von anaphylaktischen Reaktionen bei wiederholter Anwendung limitiert

Antikörper gegen TAA zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Vakzinierung gegen Krebs:

- Niedrige Dosis (< 1 mg/Impfung; subcutane, intradermale oder intramuskuläre Injektion)
- Lang andauernde Wirkung der direkt induzierten Immunantwort
- Xenogene Antikörper erwünscht, da die Wirkung auf Immunogenität beruht
- Behandlungsdauer unlimitiert (Auffrischungsimpfungen immer wieder möglich)

Im folgenden werden Experimente beschrieben, die belegen, daß die Vakzinierung mit einem bestirnmten murinen MAK (HE2), der gegen das Selbstadhäsions-TAA Ep-CAM gerichtet ist, oder die Vakzinierung mit seinem F(ab)₂-Fragment, direkt zur Induktion von Antikörpern führt, die selektiv auf menschlichen Tumorzellen binden, die dieses Antigen exprimieren. Damit wird beispielhaft, aber ohne jede Einschränkung gezeigt, daß durch die Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA, oder deren Derivaten, die zumindestens den Idiotyp des Ausgangsantikörpers enthalten, eine Immunantwort induziert wird, die therapeutische Wirksamkeit bei Krebserkrankungen haben kann.

Der murine monoklonale Antikörper HE2 wurde dafür nach an sich beschriebenen Standardverfahren der Hybridomtechnologie generiert (siehe z.B. H. Zola. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-6476-0; 1988) Balb/c-Mäuse wurden mit menschlichen Kolorektal-Krebszellen nach Standardprotokollen immunisiert. Die Milzzellen wurden mit der Maus-Myelomlinie P3X63Ag8 fusioniert und Hybridome selektiert, die Antikörper produzieren, die selektiv an humane kolorektale Krebszellen, aber nicht an

Melanomzellen binden. Letztlich wurde ein Hybridom ausgewählt, das einen IgG2a/kappa Antikörper sezerniert. Dieser Antikörper (HE2) bindet an Ep-CAM, wie z.B. durch Westernblotanalyse mit Membranpräparationen von KATO III Magenkrebszellen im Vergleich mit einem bekannten anti-Ep-CAM Antikörper (KS1-4) gezeigt werden kann.

Die Aminosäuresequenzen der variablen Regionen des MAK HE2 sind wie folgt:

Schwere Kette:

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPG
SGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDGPWFAYWG
QGTLTVSA (SEQ ID NO: 1)

Leichte Kette:

NIVMTQSPKSMSMSVGGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNR
YTGVVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO. 2)

Die Figuren zeigen:

- Figur 1** zeigt die Inhibierung *in vitro* der Selbstadhäsion der kleinzelligen Lungenkrebslinie SW2 durch den MAK HE2.
- Figur 2** zeigt die Selbstadhäsion *in vitro* der human kleinzelligen Lungenkrebslinie SW2 ohne Einfluß des MAK HE2, als Kontrolle zu dem in Figur 1 dargestellten Experiment.
- Figur 3** zeigt die Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen HE2 nach Vakzinierung von Ziegen mit dem F(ab)'2-Fragment von HE2, gemessen in einem ELISA.
- Figur 4** zeigt die Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen Ep-CAM positive human Magenkrebszellen (Kato III) nach Vakzinierung von

Ziegen mit dem F(ab)'2-Fragment von HE2, gemessen in einem Zell-ELISA.

- Figur 5** zeigt das Fehlen einer Antikörperimmunantwort gegen Ep-CAM negative humane Melanomzellen (WM9) nach Vakzinierung von Ziegen mit dem F(ab)'2-Fragment von HE2, gemessen in einem Zell-ELISA, als Kontrolle zu dem in Figur 4 dargestellten Experiment.
- Figur 6** zeigt die Bindung einer affinitätsgereinigten Antikörperfraktion aus Serum von Ziegen, die mit dem F(ab)'2-Fragment von HE2 vakziniert wurden, an Ep-CAM positive humane Magenkrebszellen (Kato III), gemessen in einem Zell-ELISA.
- Figur 7** zeigt das Fehlen der Bindung einer affinitätsgereinigten Antikörperfraktion aus Serum von Ziegen, die mit dem F(ab)'2-Fragment von HE2 vakziniert wurden, an Ep-CAM negative humane Melanomzellen (WM9), gemessen in einem Zell-ELISA, als Kontrolle zu dem in Figur 6 dargestellten Experiment.
- Figur 8** zeigt die Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen HE2 nach Vakzinierung von Rhesusaffen mit 0,5 mg an Aluminiumhydroxid adsorbiertem HE2, gemessen in einem ELISA.
- Figur 9** zeigt die Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen Ep-CAM positive humane Magenkrebszellen (Kato III) nach Vakzinierung von Rhesusaffen mit 0,5 mg an Aluminiumhydroxid adsorbiertem HE2, gemessen in einem Zell-ELISA.
- Figur 10** zeigt die im Rahmen einer Rhesusaffen-Toxizitätsstudie mit HE2 gefundene Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen HE2 nach Vakzinierung einer Gruppe von Rhesusaffen mit 0,5 mg an Aluminiumhydroxid adsorbiertem HE2, sowie das Fehlen einer Immunantwort gegen HE2 nach Behandlung einer anderen Gruppe von Rhesusaffen mit einer Aluminiumhydroxidformulierung ohne Antigen (Plazebo), gemessen in einem ELISA.
- Figur 11** zeigt beispielhaft die im Rahmen der Rhesusaffen-Toxizitätsstudie mit HE2 gefundene Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen

Ep-CAM positive humane Magenkrebszellen (Kato III), gemessen in einem Zell-ELISA.

Figur 12 zeigt die Induktion einer Antikörperimmunantwort gegen Ep-CAM positive humane Magenkrebszellen (Kato III) nach wiederholter Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit je 0,5 mg an Aluminiumhydroxid adsorbiertem HE2, gemessen in einem Zell-ELISA.

Figur 13 zeigt die Induktion einer Serum-Zytotoxizität gegen Ep-CAM positive humane Magenkrebszellen (Kato III) nach wiederholter Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit je 0,5 mg an Aluminiumhydroxid adsorbiertem HE2, gemessen in einem Zell-Lyse-Experiment.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung weiter erläutern, aber nicht einschränken:

Um zu zeigen, daß der murine MAK HE2 an einem Epitop des Selbstadhäsionsantigens Ep-CAM bindet, das in die homophile Bindung involviert ist, wurde der Einfluß von HE2 auf die Selbstadhäsionsfähigkeit der humanen Zelllinie SW2 untersucht. Diese kleinzellige Lungenkarzinomlinie neigt dazu, sich in Kultur in vitro nach vorhergehender Vereinzelung innerhalb von einigen Stunden zu Zellklustern zusammenzuschließen. Die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 1. Wie aus den Figuren 1 und 2 ersichtlich ist, wird durch die Zugabe von HE2 die Ausbildung von Zellklustern weitestgehend verhindert. Damit wird bewiesen, daß HE2 an ein Epitop von Ep-CAM bindet, das in die homophile Bindung dieses Membranproteines involviert ist.

Um die direkte humorale Immunantwort auf die Vakzinierung mit dem F(ab)²-Fragment des murinen MAK HE2 untersuchen zu können, wurden Ziegen mit diesem Fragment immunisiert. Das Fragment wurde nach an sich bekannten und beschriebenen Methoden durch Spaltung von HE2 mit Pepsin hergestellt und gereinigt. Die Immunisierung der Ziegen ist in Beispiel 2 beschrieben.

Zunächst wurde das gewonnene und gepoolte Ziegen-Immunserum im Vergleich zu einem Prä-Serum auf Immunglobuline untersucht, die gegen den MAK HE2 gerichtet sind, um die Total-Immunantwort der vakzinierter Ziegen zu bestimmen. Diese Untersuchung wurde mit Hilfe eines ELISA Tests durchgeführt, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 3. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Figur 3 dargestellt: Die Ziegen haben durch die Vakzinierungen mit dem F(ab)'₂-Fragment des MAK HE2 eine starke Immunantwort dagegen aufgebaut, während in einem Prä-Serum keine Antikörper gegen HE2 gefunden werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich in dem Ziegen-Immunserum Immunglobuline nachweisen lassen, die an humane Krebszellen binden, die das TAA exprimieren, gegen das der MAK HE2 gerichtet ist (Ep-CAM). Dafür wurde die KATO III Magenkrebszelllinie herangezogen. Als Kontrolle wurde auch die Bindung an eine humane Zelllinie getestet, die Ep-CAM nicht exprimiert (WM9 Melanomzellen). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Zell-ELISA Tests durchgeführt, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 4. Das Ergebnis dieser Experimente ist in den Figuren 4 und 5 dargestellt: Das Ziegen-Immunserum enthält Immunglobuline, die stark auf den Ep-CAM positiven KATO-Zellen binden, während keine Bindung auf den Ep-CAM negativen WM9-Zellen nachgewiesen wird. Im Prä-Serum befinden sich keine Antikörper, die an diese Zellen binden. Dieses sehr überraschende Ergebnis zeigt, daß durch Vakzinierung mit HE2-F(ab)'₂ Fragment entstandene Antikörper tatsächlich in der Lage sind, selbst wieder an Zellen zu binden, die das TAA exprimieren, das HE2 erkennt. Danach konnte die Funktion des TAA zur Selbst-Adhäsion auf diese durch die Impfung mit HE2 entstandenen Antikörper übertragen werden, wie zuvor ausführlich erläutert wurde.

Um zu beweisen, daß die in den Ziegen durch Impfung mit dem F(ab)'₂-Fragment von HE2 gegen den Idiotyp dieses MAK entstandenen Antikörper tatsächlich

diejenigen sind, die an die KATO-Zellen binden, wurde der anti-idiotypische Anteil dieser induzierten Antikörper mit Hilfe einer Sequenz von Immunaffinitätschromatographien spezifisch aus dem Ziegen-Immunserum gereinigt, wie grundsätzlich beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 216). Die Sequenz der Reinigungsschritte ist in Beispiel 5 noch einmal zusammengefaßt.

Diese affinitätsgereinigten Ziegenantikörper wurden wieder auf ihre Bindung an die Ep-CAM positiven KATO-Zellen sowie an die Ep-CAM negativen WM9-Zellen untersucht, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 6. Das Ergebnis dieser Experimente ist in den Figuren 6 und 7 dargestellt: Das Ziegen-IgG, das gegen den Idiotyp von HE2 gerichtet ist, bindet stark an die Ep-CAM positiven KATO-Zellen, während unspezifisches Ziegen-IgG kaum bindet. Die Bindung des affinitätsgereinigten spezifischen Ziegen IgG an die Ep-CAM negativen WM9-Zellen unterscheidet sich hingegen nicht von der des unspezifischen Ziegen-IgG. Damit ist bewiesen, daß die Fraktion der Antikörper, die durch Vakzinierung mit dem F(ab)'₂-Fragment von HE2 gegen den Idiotyp dieses Antikörpers direkt entstanden ist, diejenigen Antikörper enthält, die an den Krebszellen binden, die das TAA exprimieren, das HE2 erkennt. Durch dieses Experiment ist auch schlüssig gezeigt, daß die durch Vakzinierung mit HE2 induzierten Antikörper gegen Ep-CAM positive Zellen nicht durch eine doppelte autologe idiotypische Netzwerkkaskade entstanden sind, wie in einigen Publikationen postuliert worden ist (siehe z.B.: Cancer Immunol Immunother 42 (1996), 81-87.). Solche anti-anti-idiotypischen Antikörper (Ab3) könnten nämlich in keiner Weise durch Affinitätschromatographie an einer Ab1 Säule (=HE2) gereinigt werden, da sie entsprechend dem idiotypischen Netzwerk nicht an Ab1, sondern nur an Ab2 binden können.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse der Immunisierung von Ziegen mit dem F(ab)'₂-Fragment von HE2 wurden Vakzinierungsstudien auch mit Rhesusaffen durchgeführt, um die immunologischen Resultate in einer dem

Menschen nahestehenden Spezies zu bestätigen. Für diese Experimente wurde der gesamte murine MAK HE2 als Immunogen verwendet. Es wurde angenommen, daß der murine Fc Teil als großes Fremdprotein die Immunantwort auch gegen den Idiotyp verstärkt (Carrier-Effekt). Um mögliche lokale Nebenwirkungen zu vermeiden, wurde Aluminiumhydroxid als mildes Adjuvans verwendet. Die Herstellung der Formulierung für diese Impfversuche wird in Beispiel 7 beschrieben.

Vier Rhesusaffen wurde die in Beispiel 7 beschriebene Formulierung subkutan in den Rücken injiziert (0,5 mg HE2 = 0,5 ml pro Impfung, 2 mal verabreicht im Abstand von 4 Wochen). Zu mehreren Zeitpunkten wurde Blut zur Serumgewinnung abgenommen.

Zunächst wurde die Immunantwort gegen HE2 in einem ELISA gemessen. Die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 8. Wie in Figur 8 gezeigt wird, werden bereits am Tag 29 deutliche Titer von Antikörpern gegen HE2 gemessen.

Weiters wurde untersucht, ob durch die Impfungen Antikörper induziert werden, die an KATO III Zellen binden. Für diese Tests wurde ein Zell-ELISA eingesetzt, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 9. Wie in Figur 9 gezeigt wird, sind bereits am Tag 29 in allen Tieren Antikörper induziert, die auf Ep-CAM positiven Kato III Tumorzellen binden.

In weiterer Folge wurden im Rahmen einer Toxizitätsstudie mit Rhesusaffen vier Tiere mit an Aluminiumhydroxid adsorbierten HE2 geimpft. Vier weitere Rhesusaffen erhielten als Plazebo nur Aluminiumhydroxid. Die Herstellung der Formulierungen ist in den Beispielen 10 und 11 beschrieben. Den Rhesusaffen wurde insgesamt 4 mal je 0,5 ml der jeweiligen Formulierung (Wirkstoff oder Plazebo) subkutan in den Rücken injiziert (Tage 1, 15, 29 und 57). Vor Beginn der

Studie und zu verschiedenen Zeiten während der Behandlungen wurde Blut für Serumgewinnung abgenommen.

Zunächst wurde wieder die Immunantwort gegen HE2 in einem ELISA gemessen. Die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 8. Wie in Figur 10 gezeigt wird, haben alle vier Rhesusaffen aus der HE2-Gruppe bereits nach einer Impfung eine deutliche humorale Immunantwort gegen HE2 aufgebaut, die durch die zweite Impfung noch verstärkt wird, während die Rhesusaffen aus der Plazebogruppe keinerlei Erhöhung der Titer von Antikörpern gegen HE2 aufweisen.

Diese Befunde wurden weiters durch Immunaffinitätsreinigungen der Seren Tag 43 der Rhesusaffen der HE2-Gruppe bestätigt. Die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 12. Wie in folgender Tabelle gezeigt wird, haben alle vier Affen am Tag 43 in ihrem Serum eine starke IgG-Immunantwort gegen HE2 aufgebaut (sekundäre Immunantwort), der IgM-Anteil ist hingegen mit dem der Präseren vergleichbar.

Affe	Tag	µg / ml IgM gegen	µg / ml IgG gegen
9206m	-14	7,7	2,8
	43	16,3	135,2
9599m	-14	17,9	2,5
	43	25,4	449,3
8415f	-14	16,0	3,2
	43	22,5	159,9
9139f	-14	5,3	5,0
	43	10,3	69,8

Es wurde auch die Induktion von Antikörpern gegen Ep-CAM positive Kato III Zellen untersucht. Für diese Tests wurde wieder ein Zell-ELISA eingesetzt, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 9. Wie in Figur 11 beispielhaft gezeigt wird, haben Rhesusaffen aus der HE2-Gruppe bereits am Tag 29 Antikörper gegen Kato III Zellen entwickelt.

In weiterer Folge und aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse der Vakzinierung von Ziegen und Rhesusaffen wurde ein Darmkrebspatient mit Metastasen (Dukes D) im Sinne einer Einzelbeobachtung mit dem MAK HE2, adsorbiert an Aluminiumhydroxid, geimpft. Die Herstellung der dafür verwendeten Formulierung ist in Beispiel 7 beschrieben. Diesem Patienten wurden je 0,5 ml dieser Formulierung (entspricht 0,5 mg HE2) insgesamt 4 mal subkutan in die oberen Extremitäten injiziert (Tag 1, 50, 78, 114). Vor jeder Impfung und am Tag 128 wurde Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Es wurde zunächst untersucht, ob durch die Impfungen Antikörper induziert werden, die an KATO III-Zellen binden. Für diese Tests wurde wieder der Zell-ELISA eingesetzt, die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 9. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Figur 12 gezeigt. Durch die Impfungen werden in diesem Krebspatienten offensichtlich hohe Titer von Antikörpern induziert, die an KATO III-Zellen binden.

Weiters wurde untersucht, ob die durch die Vakzinierung mit HE2 induzierten Antikörper ex vivo einen zytotoxischen Effekt gegen KATO III Krebszellen vermitteln. Zu diesem Zweck wurden KATO III Zellen mit Prä- und Immunseren dieses Krebspatienten inkubiert, um eine durch die induzierten Antikörper medierte Komplement abhängige Lyse zu zeigen. Die experimentelle Beschreibung befindet sich in Beispiel 13.

Die Ergebnisse sind in Figur 13 dargestellt. Die durch die Impfung mit HE2 induzierten Antikörper sind offensichtlich in autologem Patientenserum in der Lage, mittels Komplement-abhängiger Lyse Ep-CAM positive KATO III-Zellen zu zerstören.

Auf Grund der oben beschriebenen Experimente ist beispielhaft gezeigt, daß die Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA wie z.B. Ep-CAM, oder deren Derivaten mit gleichem Idiotyp wie die jeweiligen Ausgangsantikörper, eine humorale Immunantwort auslöst, die selektiv auf Tumorzellen bindet, die dieses Selbstadhäsions-TAA exprimieren. Die induzierten

Antikörper können ein zytotoxisches Potential gegen solche Tumorzellen aufweisen. Eine Vakzinierung mit einem solchen Antikörper kann damit zu einer therapeutischen Wirkung bei Krebserkrankungen führen.

Beispiele

Verwendete Materialien:

Mikrotiterplatten: Immuno Plate F96 MaxiSorp (Nunc) für ELISA
Cell Culture Cluster (Costar; Cat.Nr. 3598) für Zell-ELISA

Zelllinien: SW2: menschliche kleinzellige Lungenkarzinomlinie, Ep-CAM positiv
KATO III: menschliche Magenkrebszelllinie, Ep-CAM positiv (ATCC HTB 103)
WM 9: menschliche Melanomzelllinie, Ep-CAM negativ

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl
pH-Wert 8,0

Reinigungspuffer A: PBS def
0,2 M NaCl
pH-Wert 7,2

Reinigungspuffer B: 0,1 M Glycin / HCl
0,2 M NaCl
pH-Wert 2,9

Medium A: RPMI 1640 + 2 g/l NaHCO₃

100 U/ml Penicillin G
100 µg/ml Streptomycinsulfat
4 mM Glutamin
10 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)

Bindungspuffer: 15 mM Na_2CO_3
35 mM NaHCO_3
3 mM NaN_3
pH-Wert: 9,6

PBS deficient: 138 mM NaCl
1,5 mM KH_2PO_4
2,7 mM KCl
6,5 mM Na_2HPO_4
pH-Wert: 7,2

Fixierlösung: 0,1 % Glutardialdehyd in
physiologischer NaCl-Lösung

Waschpuffer A: 2% NaCl
0,2% Triton X-100
in PBS deficient

Waschpuffer B: 0,05 % Tween 20 in PBS deficient

Blockierungspuffer A: 5 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
in PBS deficient

Blockierungspuffer B: 1 % Rinderserumalbumin
0,1 % NaN_3
in PBS deficient

Verdünnungspuffer A: 2% foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
in PBS deficient

Verdünnungspuffer B: PBS deficient

Färbepuffer: 24,3 mM Zitronensäure
51,4 mM Na₂HPO₄
pH-Wert: 5,0

Substrat: 40 mg o-Phenyldiamin Dihydrochlorid
100 ml Färbepuffer
20 µl H₂O₂ (30%)

Stopplösung: 4 N H₂SO₄

Beispiel 1:

In vitro kultivierte SW2 Zellen werden abzentrifugiert, das Pellet in Medium A aufgenommen und auf 7x10⁴ Zellen/ml eingestellt. In den Kammern eines LabTek^s werden entweder 0,1 ml PBS def mit 0,3 ml der Zellsuspension, oder 0,1 ml PBS def mit 40µg HE2 und dann mit 0,3 ml der Zellsuspension gemischt (Endkonzentration HE2 100µg/ml). Unmittelbar bevor die Zellsuspension jeweils als Letztes zupipettiert wird, werden die Zellen mit der Pipette vereinzelt. Gleich nach Zusammenfügen werden die jeweiligen Zellsuspensionen im Umkehrmikroskop fotografiert (Vergrößerung 100-fach). Anschließend werden die Zellsuspensionen 4 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert und dann wieder fotografiert.

Beispiel 2:

Zwei Ziegen werden mit je 1,5 mg des F(ab)'₂-Fragmentes in 3 ml PBS deficient zusammen mit 3ml von Freunds Complete Adjuvant (Difco) an multiplen Stellen intradermal vakziniert. Am Tag 8 wird eine erste Booster-Impfung wie an Tag 1 gegeben, aber mit Freunds Incomplete Adjuvans (Difco). Am Tag 29 wird in gleicher Weise eine zweite Booster-Impfung gegeben, bei der aber kein Adjuvans zugesetzt wird. Blut zur Serumgewinnung für die Analyse der entstandenen Immunantwort wird vor Impfbeginn und am Tag 54 abgenommen.

Beispiel 3:

100 µl Aliquots des MAK HE2 (Lösung mit 10µg/ml in Bindungspuffer) werden in den Löchern einer Mikrotiterplatte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer A werden je 200µl des Blockierungspuffers A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100µl Aliquots der zu testenden Ziegenserien in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1 000 000 in Verdünnungspuffer A 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100µl des Peroxidase- konjugierten Kaninchen anti-Ziegen-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wird viermal mit Waschpuffer A und zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Stopplösung nach ca. 10 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Beispiel 4:

Die Löcher einer Mikrotiterplatte werden mit je 100 µl einer Zellsuspension der zu testenden Zelllinie in der Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Medium A über Nacht bei +4°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wird die Platte mit je 50µl Fixierlösung pro Loch 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes werden je 200µl Blockierungspuffer B zupipettiert und die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200µl Waschpuffer B werden je 100µl Aliquots der zu testenden Ziegenserien in Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 000 in Verdünnungspuffer B 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B werden je 100µl des Peroxidase- konjugierten Kaninchen anti-Ziegen-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wird dreimal mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Stopplösung nach ca. 10 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Beispiel 5:

Die Reinigung ist grundsätzlich in Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:216, 1984 beschrieben und wird hier wie folgt zusammengefaßt: In einem ersten Schritt wird nach bekannten Methoden an einer DEAE Anionenaustauscher Säule eine Reinigung des im Ziegenserum enthaltenen Gesamt-IgG durchgeführt. Anschließend werden an einer Immunaffinitätssäule (CH-Sepharose 4B, Pharmacia), an die irrelevantes murines IgG2a gekoppelt wurde, diejenigen Ziegenantikörper gebunden, die gegen konstante Regionen des F(ab)'₂-Fragmentes von HE2 gerichtet sind, während die Fraktion der anti-idiotypischen Ziegenantikörper nicht an dieser Säule bindet. In einem letzten Schritt wird daher

der Durchbruch dieser Immunaffinitätschromatographie an einer Immunaffinitätssäule (CH-Sepharose 4B, Pharmacia) gebunden, an die HE2 gekoppelt wurde. Die spezifisch an diese Säule gebundene Fraktion wird mit einem Puffer pH 2,8 (0,1 M Glycin/HCl) eluiert und neutralisiert. Die so erhaltene Ziegen IgG Fraktion ist gegen den Idiotyp von HE2 gerichtet.

Beispiel 6:

Dieser Zell-ELISA wird grundsätzlich gleich ausgeführt wie in Beispiel 4 beschrieben. Statt Serumverdünnungen werden Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0,031 µg/ml des immunaffinitätsgereinigten Ziegen IgG bzw. von unspezifischem gereinigten Ziegen IgG verwendet.

Beispiel 7:

0,83 ml einer Suspension von Alu-Gel (Alu-Gel S von Serva, 2% Suspension, Qualitätsgrad: Adjuvans zur Präparation von Vakzinen) wird unter sterilen Bedingungen mit 0,5 ml einer Lösung von 10 mg/ml HE2 in PBS pH 5,5 zusammen mit 3,67 ml PBS def. eine Stunde bei Raumtemperatur sanft geschwenkt (Endkonzentration HE2: 1 mg/ml; Alu-Gel S: 0,33 %). Die Suspension wird anschließend in 0,5 ml Aliquots in Durchstichfläschchen steril abgefüllt.

Beispiel 8:

Dieser ELISA wird grundsätzlich gleich ausgeführt wie in Beispiel 3 beschrieben, mit der Ausnahme, daß zur Detektion der gebundenen Rhesusaffenantikörper ein Peroxidase konjugierter Ziegen-anti-Human-Ig Antikörper (Zymed) verwendet wird. Mit diesem Reagens lassen sich Rhesusaffenantikörper in gleicher Weise wie Humanantikörper nachweisen, da die Sequenzhomologie der Konstantregionen von Humanantikörpern und Rhesusaffenantikörpern bei ca. 98% liegt.

Beispiel 9:

Dieser Zell-ELISA wird grundsätzlich gleich ausgeführt wie in Beispiel 4 beschrieben, mit der Ausnahme, daß zur Detektion der an die Zellen gebundenen Rhesusaffenantikörper (bzw. Humanantikörper) ein Peroxidase konjugierter Ziegen-anti-Human-Ig Antikörper (Zymed) verwendet wird. Zur Detektion des murinen HE2 als Standard wird ein Peroxidase konjugierter Ziegen-anti-Maus-IgG Antikörper (Zymed) eingesetzt.

Beispiel 10:

3,5 ml einer Lösung von HE2 (10 mg/ml in PBS def. pH=5,5) werden unter sterilen Bedingungen mit 0,35 ml einer wässrigen Thimerosalösung (10 mg /ml; Sigma) sowie 27,25 ml physiologischer Kochsalzlösung gemischt und 3,9 ml einer Aluminium-hydroxidsuspension (3% in Wasser; Alhydrogel, Superfos Biosector, Dänemark) unter vorsichtigem Schwenken versetzt. Je 0,6 ml der so erhaltenen Suspension werden dann unter sterilen Bedingungen in entpyrogenisierte Glaskrüppelchen abgefüllt und mit einem Gummistopfen mit Aluminiumkappe verschlossen.

Beispiel 11:

Die Plazeboformulierung wird in gleicher Weise hergestellt wie in Beispiel 10 beschrieben, nur daß statt der Antikörperlösung 3,5 ml PBS def pH=5,5 und statt der Thimerosalösung 0,35 ml physiologischer NaCl-Lösung verwendet werden.

Beispiel 12:

1 g CH-Sepharose 4B (Pharmacia) werden für 15 Minuten in 30 ml 1 mM HCl suspendiert. Das Gel wird dann mit 1 Liter 1 mM HCl und anschließend mit 200 ml Kopplungspuffer auf einem Sinterglasfilter AG3 gewaschen. 10 mg HE2

(Stammlösung 10 mg/ml) werden gegen ca 0,5 Liter Kopplungspuffer dialysiert. Diese Lösung wird mit der Gelsuspension in einem verschlossenen Gefäß vermischt. Ein Verhältnis von Gel : Puffer von 1 : 2 ergibt eine für die Kopplung geeignete Suspension. Diese Suspension wird 5,5 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird der Überschuß des Liganden mit 3 x 30 ml Kopplungspuffer weggewaschen. Überbleibende reaktive Gruppen werden durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 M Äthanolamin geblockt. Dann wird das Gel für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem 0,1 M Tris-HCl Puffer pH=8 geschüttelt. Letztlich wird das Gel mit 3 Zyklen von Puffern mit alternierendem pH gewaschen. Jeder Zyklus besteht aus 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4 mit 0,5 M NaCl, und anschließend 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8 mit 0,5 M NaCl. Das Gel wird bei 4°C aufbewahrt.

Die Immunaffinitätsreinigung der gegen HE2 gerichteten Antikörperfraktion aus Serum der Rhesusaffen erfolgt nach folgender Vorschrift: Die Immunaffinitätsreinigung wird auf einem FPLC-System (Pharmacia) durchgeführt. 1 ml des nach obiger Vorschrift erhaltenen Gels wird in eine Pharmacia HR5/5 Säule gefüllt. 0,5 ml Serum werden 1:10 mit dem Reinigungspuffer A verdünnt. Diese Lösung wird mit 1 ml / Minute über die Säule gepumpt und mit Reinigungspuffer A nachgewaschen, bis die UV-Basislinie des Detektors wieder erreicht ist (280 nm). Gebundene Immunglobuline werden dann mit Reinigungspuffer B eluiert und die Fraktion mit 0,5 M Na₂HPO₄ unmittelbar nach Desorption neutralisiert und mit 0,02% NaN₃ versetzt. 50µl der so gereinigten Antikörperfraktion werden auf einer Größentrennungssäule (SEC, Zorbax 250 GF) analysiert und die IgG- und IgM- Anteile quantifiziert. Als Laufmittel für die SEC wird 220 mM Phosphatpuffer pH 7 + 10% Acetonitril verwendet. Als Standard für die SEC dient Human IgG und Human IgM, die zum Erstellen einer Standard-Eichgerade jeweils in mehreren Konzentrationen chromatographiert werden (Peakfläche vs. Konzentration). Die Berechnung der IgG- und IgM-Konzentrationen in den affinitätsgereinigten Rhesuaffen-Antikörperfraktionen erfolgt mittels Linearregression anhand der Standardkurven. Die Konzentrationen werden als µg / ml eingesetzten Affenserums angegeben.

Beispiel 13:

Ein Tag vor Durchführung des Tests werden KATO III Zellen in frisches Medium A transferiert und bei 37°C/5% CO₂ in einer Zellkulturflasche gehalten. Am nächsten Tag werden die Zellen zunächst mit ⁵¹Chrom markiert. Dabei werden 5x10⁶ Zellen in 800 µl Medium A bei 37°C/5% CO₂ mit 100 µCi Na₂⁵¹CrO₄ inkubiert, anschließend mit Medium A gewaschen und auf eine Dichte von 2.5x10⁵ Zellen/ml adjustiert. 100 µl Aliquots dieser Zellsuspension werden in Löcher einer Mikrotiterplatte pipettiert. 100 µl Aliquots der zu testenden Patientenserien werden zugegeben und 3 Stunden bei 37°C/5% CO₂ inkubiert (die Seren werden bei -80°C aufbewahrt und für diesen Test nur einmal aufgetaut, um die Aktivität des Komplements nicht zu beeinträchtigen). Die Überstände werden mit einer Skatron-Harvesting-Presse geerntet und in einem Gamma-Counter vermessen, wodurch die Werte für den "experimental release" erhalten werden. Für die Bestimmung des "total release" werden die Zellen wie oben behandelt, wobei Serum durch eine Lösung aus 2% SDS, 50 mM Na₂CO₃ and 10 mM EDTA ersetzt wird. Die Werte für den "spontaneous release" werden erhalten, in dem Serum durch Medium A ersetzt wird. Das Resultat wird wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{total release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

Der Test wird in 3-fach Werten durchgeführt und der Mittelwert und Standardabweichung der Einzelergebnisse angegeben.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein menschliches zelluläres Membranantigen gerichtet ist, zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Vakzinierung gegen Krebs.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das zelluläre Membranantigen ein Tumor-assoziiertes Antigen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das zelluläre Membranantigen eine Rolle bei Adhäsionsvorgängen spielt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das zelluläre Membranantigen ein Antigen epithelialer Zellen ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das zelluläre Membranantigen zur Selbstadhäsion fähig ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das zelluläre Membranantigen Ep-CAM, N-CAM oder CEA ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Antikörper tierischen Ursprungs ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Antikörper ein monoklonale: Antikörper ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei der Antikörper der murine monoklonale Antikörper HE2 ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Antikörper dieselbe Bindungsfeinspezifität wie der Antikörper HE2 aufweist.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei zwei oder mehr Antikörper, die gegen verschiedene zelluläre Membranantigene oder gegen

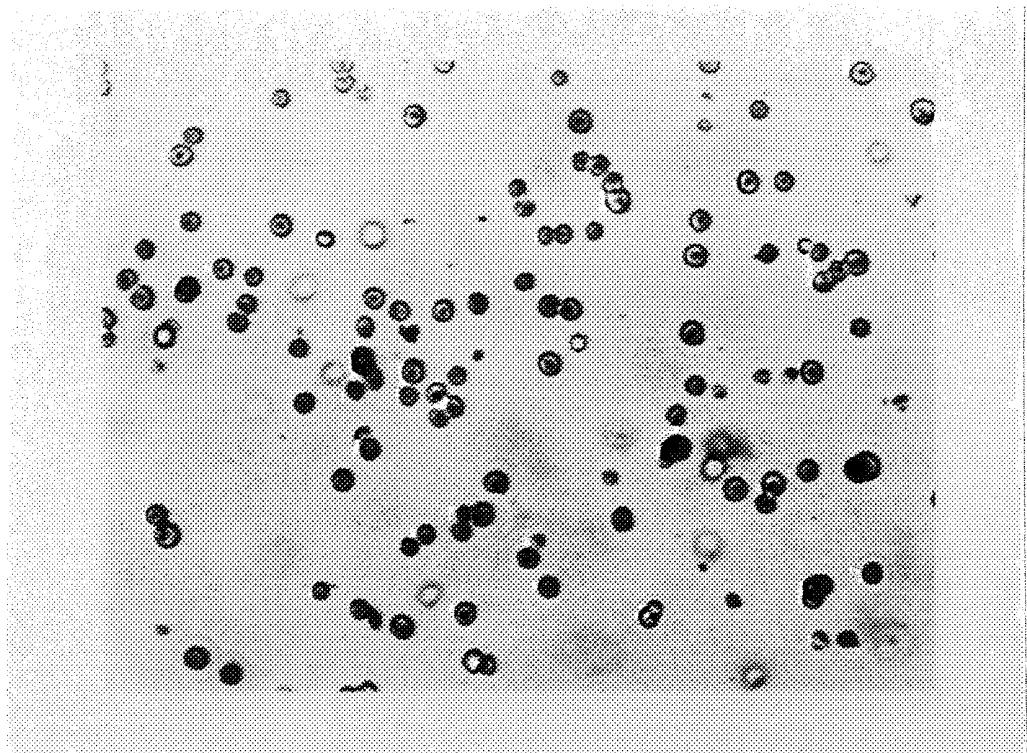
verschiedene Epitope eines Membranantigens gerichtet sind, in Kombination verwendet werden.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Arzneimittel weiterhin mindestens noch ein Vakzine-Adjuvans enthält.

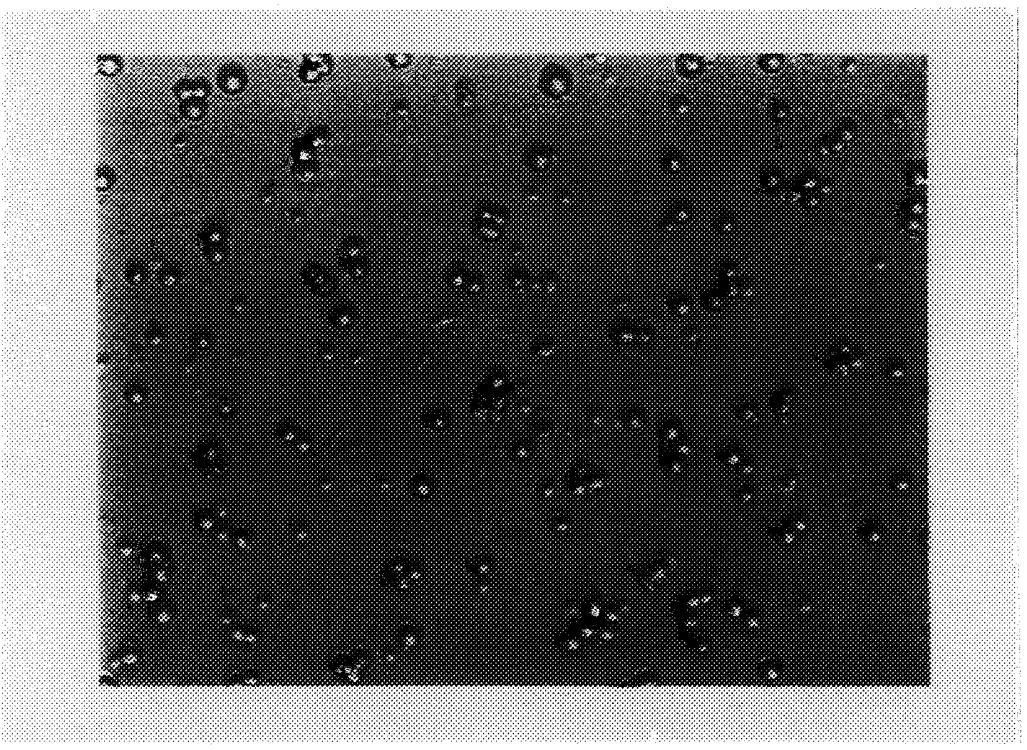
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Arzneimittel für die Verabreichung des Antikörpers in einer Dosierung im Bereich von 0,01 bis 4 mg Antikörper geeignet ist.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Arzneimittel zur Verabreichung durch subcutane, intradermale oder intramuskuläre Injektionen geeignet ist.

1/13
Figur 1

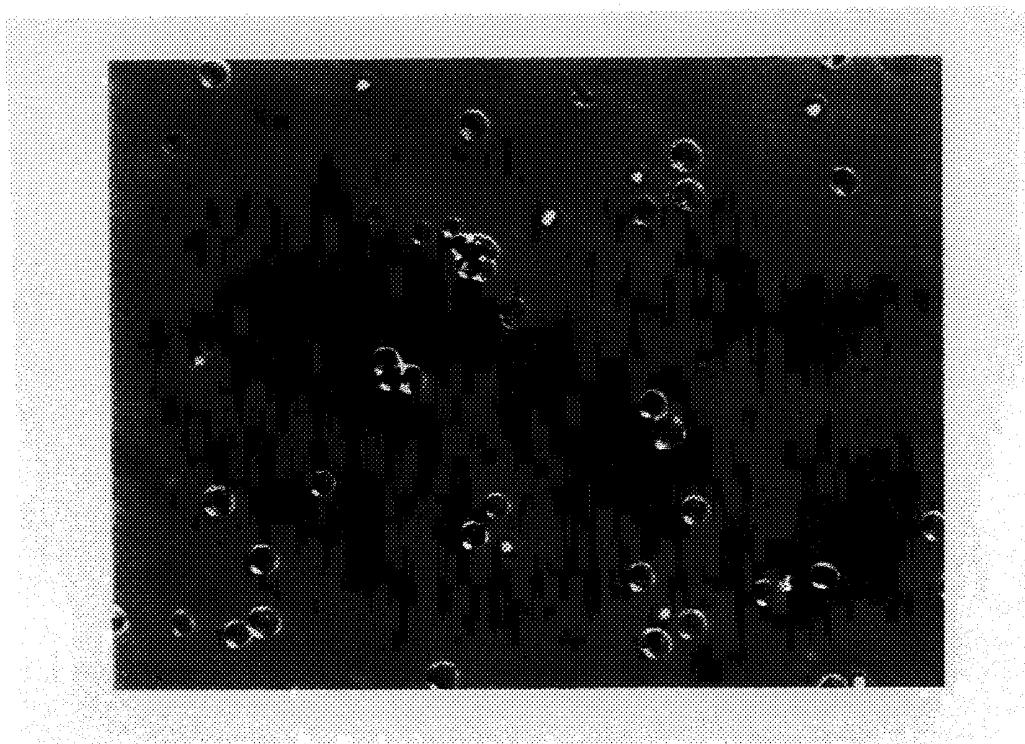


SW2 Zellen in Medium mit 100 μ g/ml HE2, Stunde 0

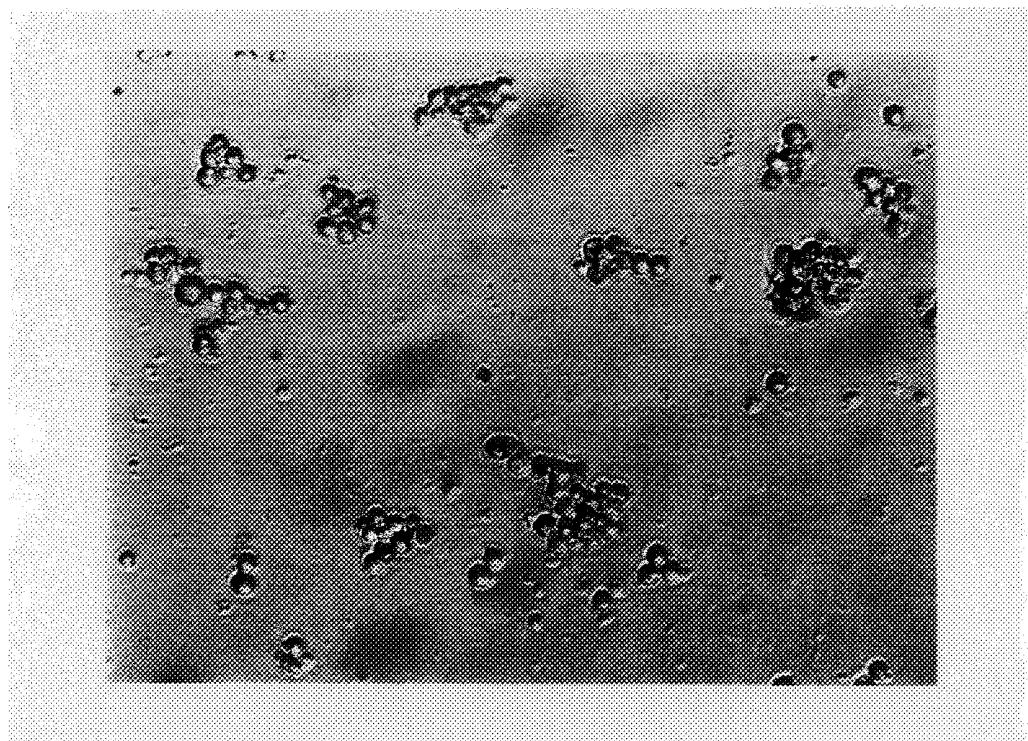


SW2 Zellen in Medium mit 100 μ g/ml HE2, Stunde 4

2/13
Figur 2



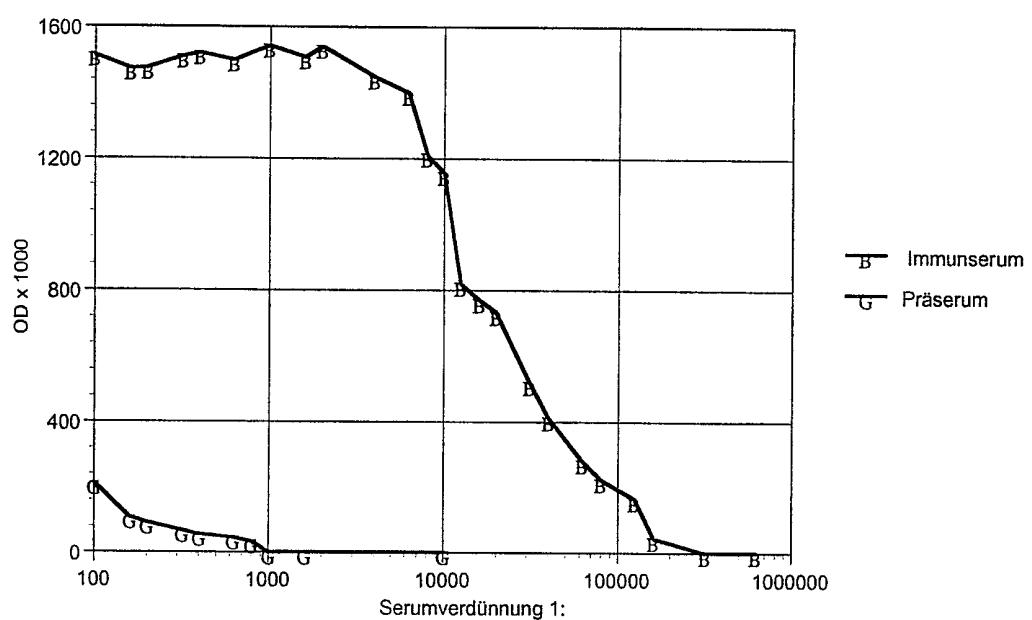
SW2 Zellen in Medium, Stunde 0



SW2 Zellen in Medium, Stunde 4

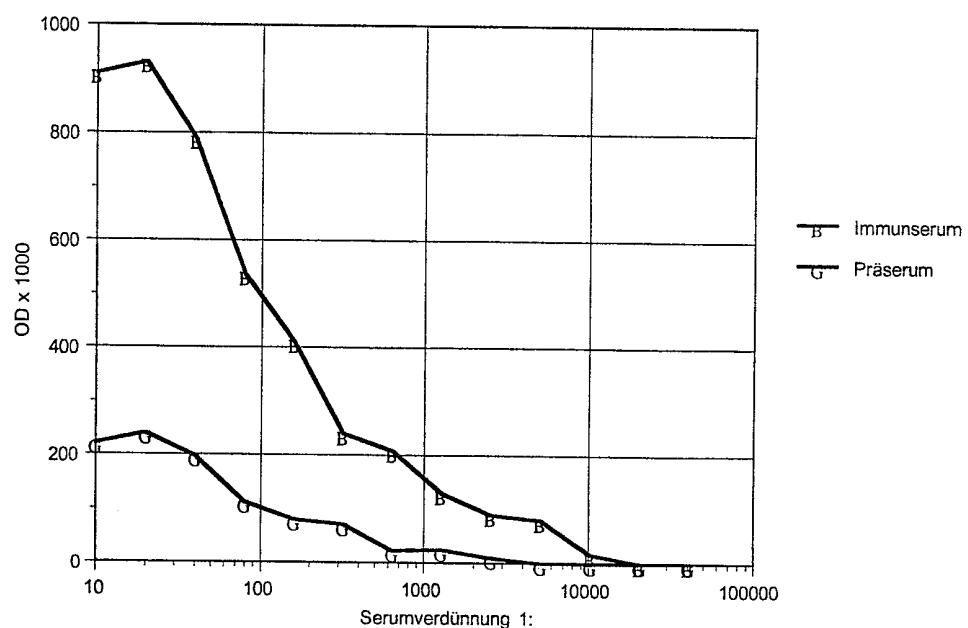
Figur 3

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Serum Ig mit Spezifität für HE2



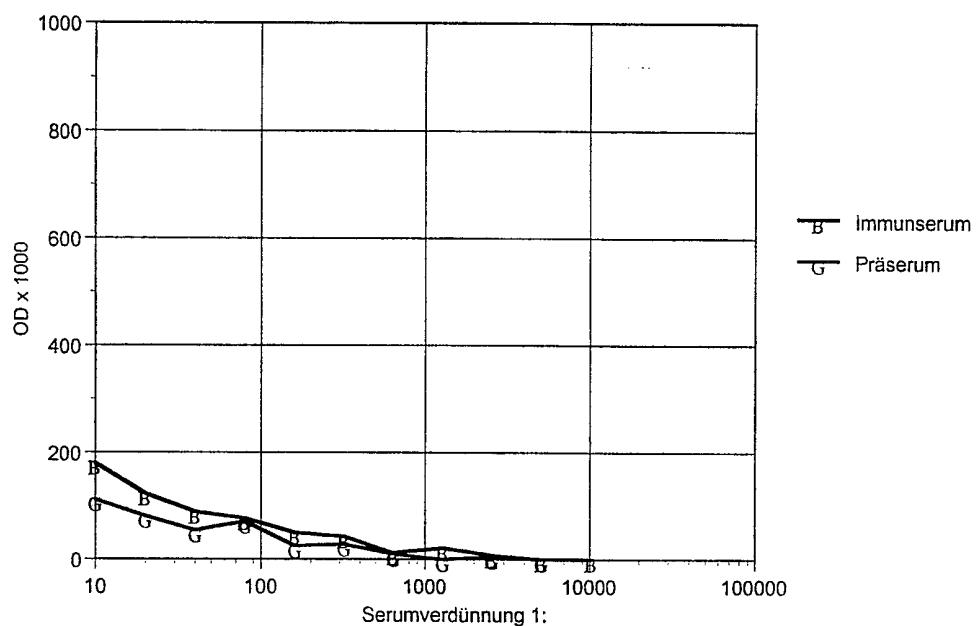
Figur 4

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von Serum Ig an Ep-CAM positive
menschliche Magenkrebszellen (KATO III)



Figur 5

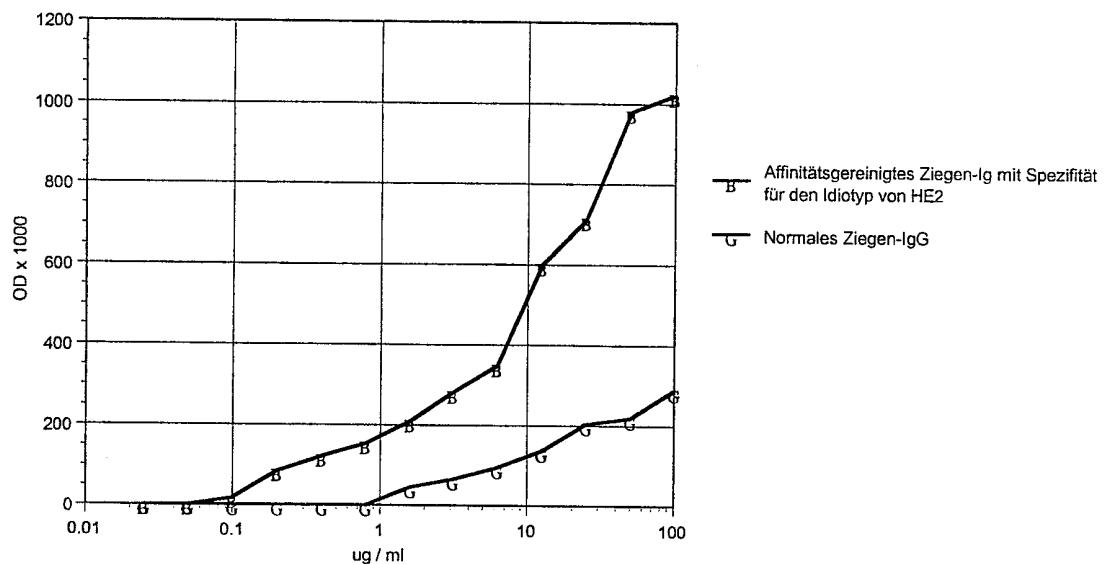
Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von Serum-Ig an Ep-CAM negative
menschliche Melanomzellen (WM9)



6/13

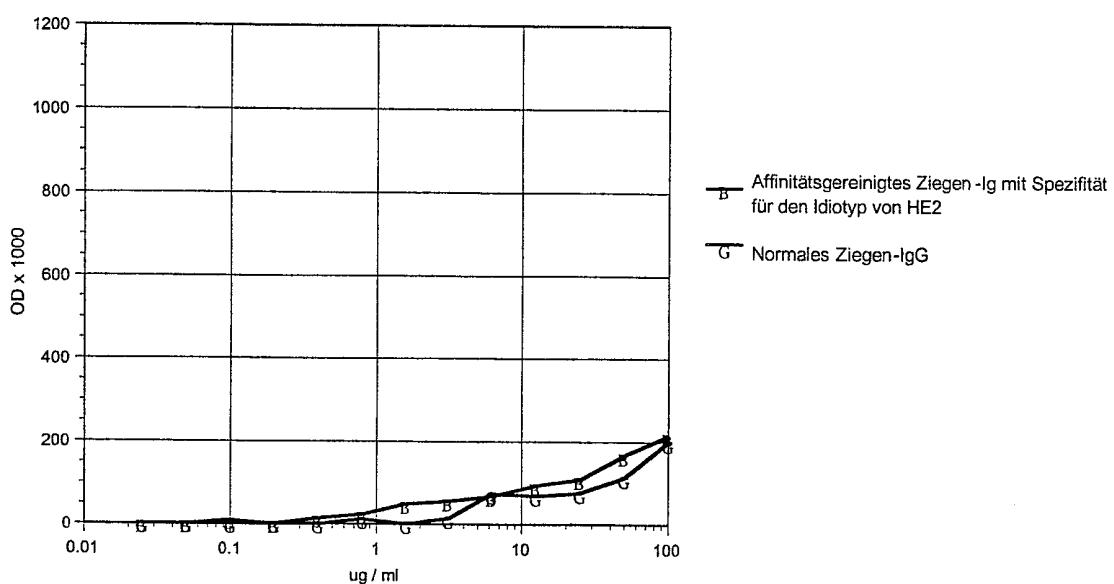
Figur 6

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von affinitätsgereinigtem Serum Ig an Ep-CAM positive
menschliche Magenkrebszellen (KATO III)

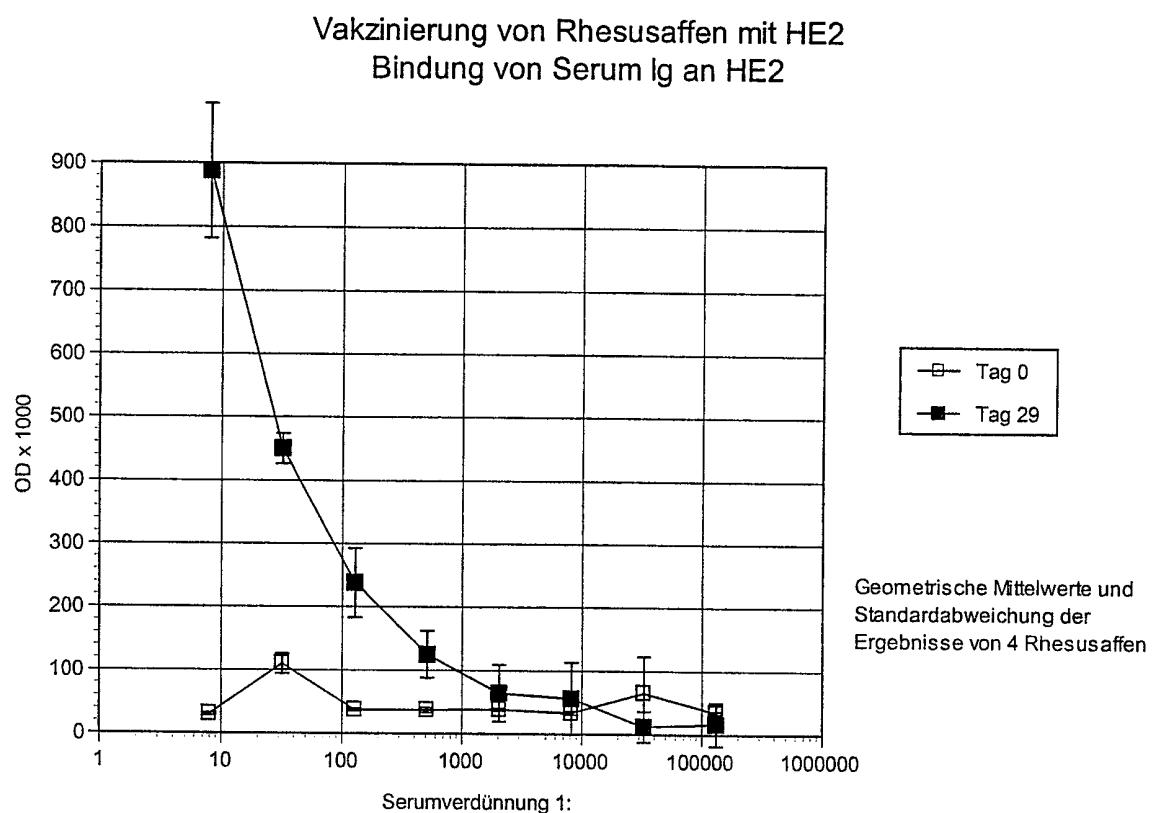


Figur 7

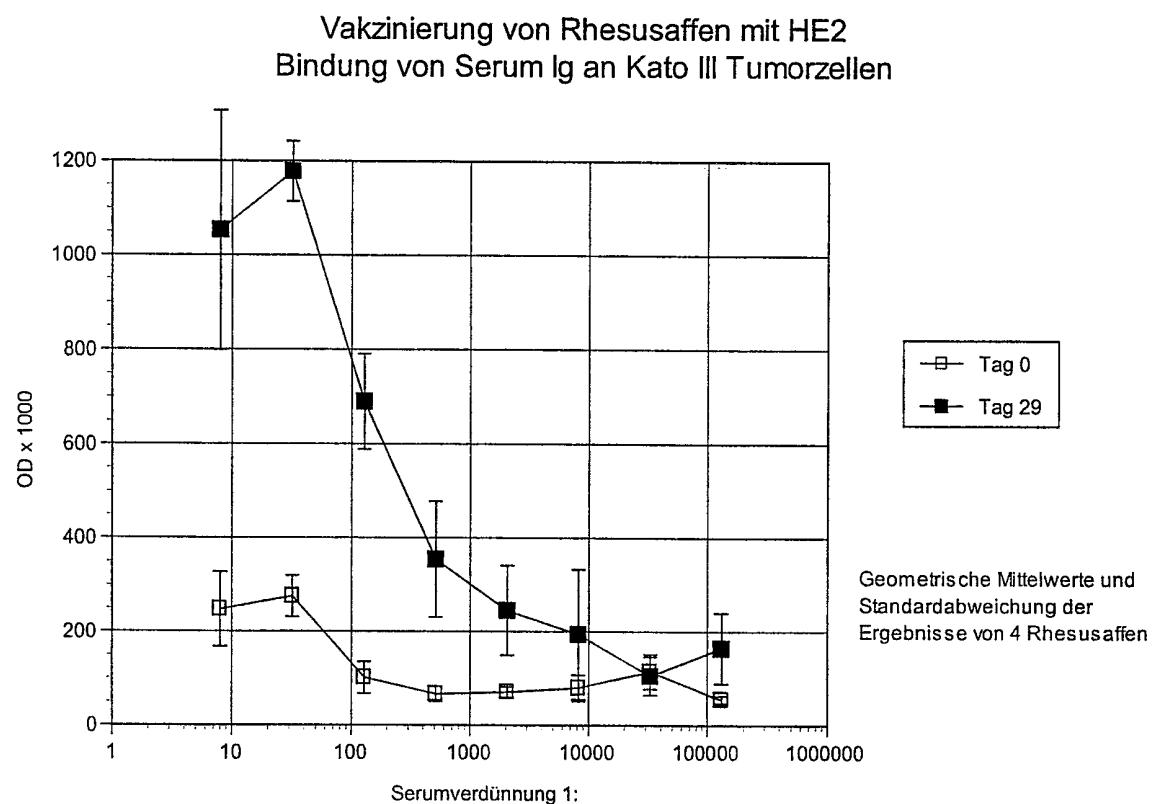
Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von affinitätsgereinigtem Serum Ig an Ep-CAM negative
menschliche Melanomzellen



Figur 8



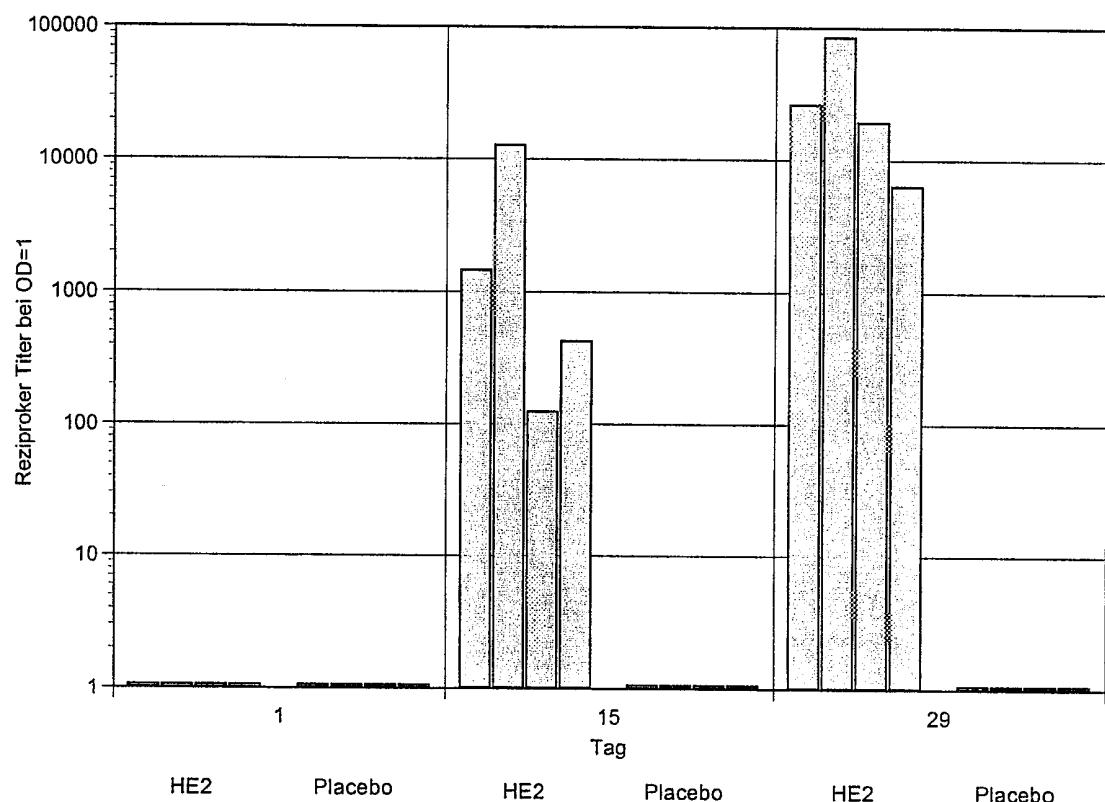
Figur 9



10/13

Figur 10

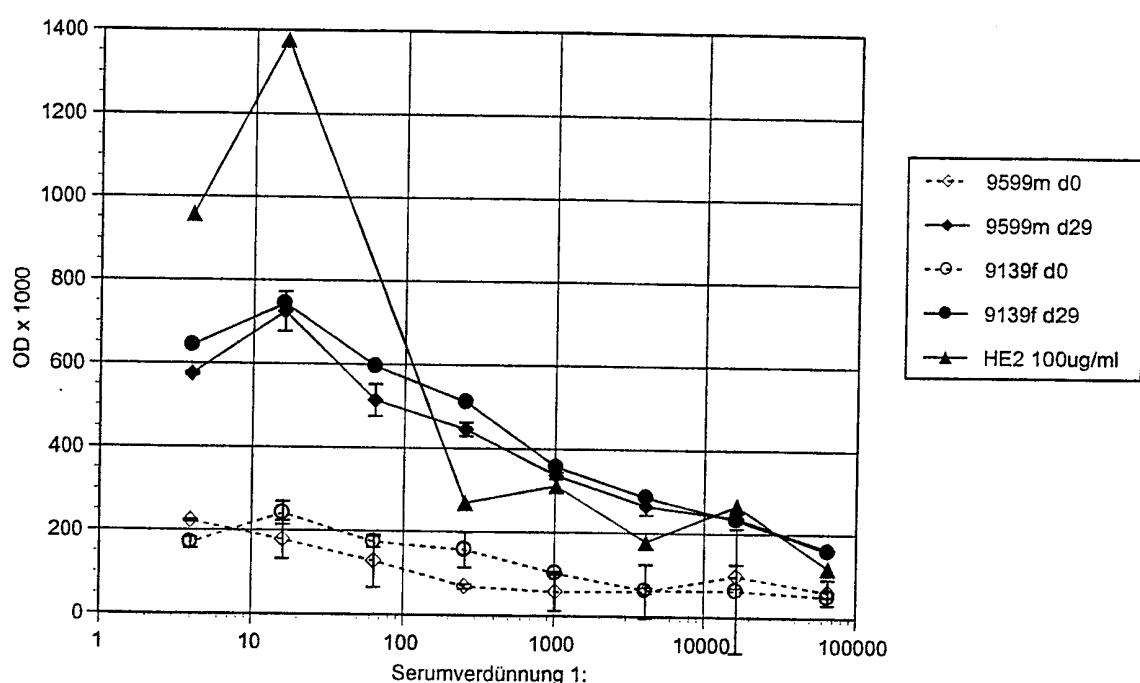
Rhesusaffenstudie
Antikörpertiter gegen HE2



11/13

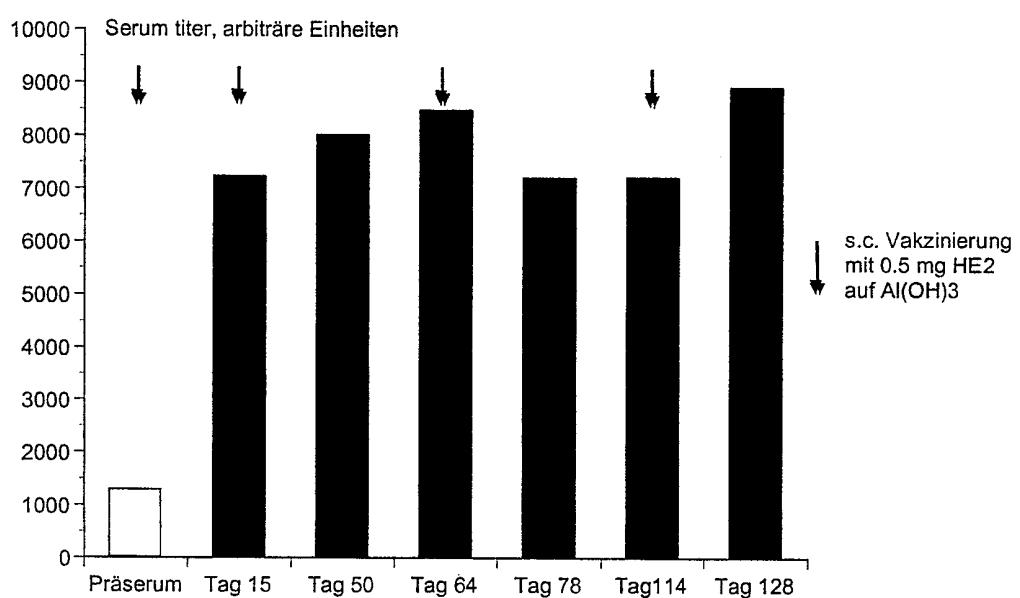
Figur 11

Rhesusaffenstudie:
Serum Ig gegen Kato III Tumorzellen



Figur 12

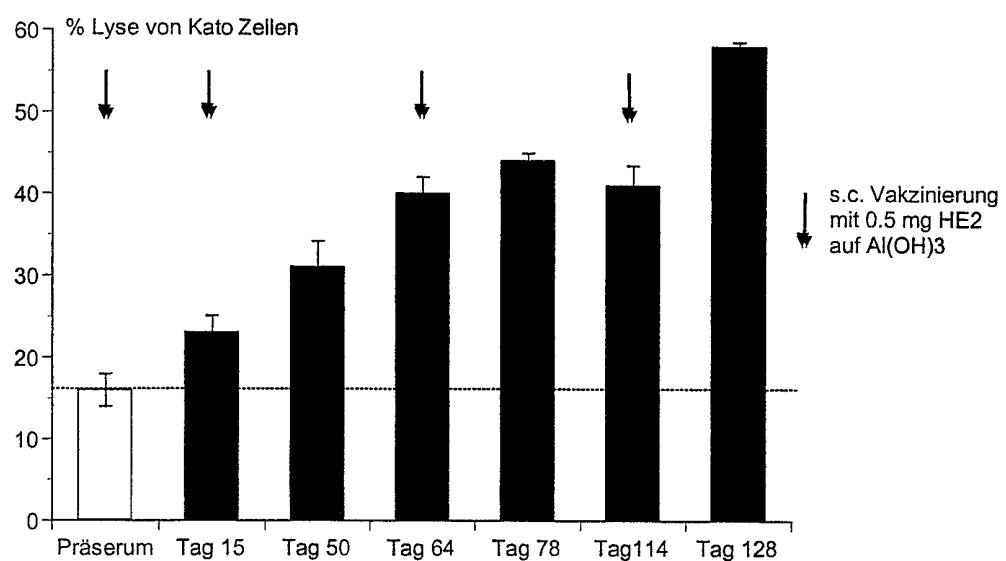
Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit HE2:
Induktion von Antikörpern gegen menschliche
Magenkrebszellen (KATO III)



13/13

Figur 13

Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit HE2:
Induktion von Serum-Zytotoxizität gegen menschliche
Magenkrebszellen (KATO III)



1/2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> IGENEON GmbH

<120> Verwendung von Antikörpern zur Vakzinierung gegen Krebs

<130> D 2923 PCT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95Ala Arg Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110Thr Val Ser Ala
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

2/2

35	40	45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
65	70	75
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 00/00174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61K39/39 A61P35/00 //C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 56416 A (HERKEL JOHANNES ; COHEN IRUN R (IL); EREZ ALON NETA (IL); ROTTER VA) 17 December 1998 (1998-12-17) page 6, line 1-19 page 7, line 1-3 page 16, line 1-5 examples 1,2 claim 1 ----	1-8, 11-14
X	LEVEUGLE B ET AL: "PSA-directed immunotherapy of prostate cancer" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, March 1998 (1998-03), XP002117652 the whole document ----	1,2,4,7, 8,11,12, 14 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

^o Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May 2000	30/05/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Covone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/00174

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 15597 A (CENTOCOR B V ;WARNAAR SVEN OLLE (NL); MELIEF CORNELIS JOSEPH MARIA) 1 May 1997 (1997-05-01) page 2, line 4-25 claims 8-15 ---	1-8
X	CHAKRABORTY M ET AL: "Immune responses in advanced breast cancer patients treated with an anti-idiotype antibody vaccine" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, PHILADELPHIA, AACR, vol. 38, 1997, page 616 XP002076982 the whole document ---	1,2,4,7, 8,11-14
X	WO 98 56419 A (CHATTERJEE MALAYA ;UNIV KENTUCKY RES FOUND (US); FOON KENNETH A (U) 17 December 1998 (1998-12-17) page 2, line 21 -page 3, line 9 examples 1,2 ---	1,2,4,7, 8,11-14
A	PERVIN S ET AL: "Proliferation of T-cells from colon cancer patients by peptides based on the structure of an anti-idiotype antibody mimicking CEA" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, PHILADELPHIA, AACR, vol. MEETING 87, 1996, page 473 XP002076985 ISSN: 0197-016X the whole document ---	1-14
P,X	WO 99 65523 A (LEVEUGLE BEATRICE ;MADIYALAKAN RAGUPATHY (CA); NOUJAIM ANTOINE A () 23 December 1999 (1999-12-23) claims figure 1 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00174

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9856416 A	17-12-1998	AU EP	7672398 A 0989861 A	30-12-1998 05-04-2000
WO 9715597 A	01-05-1997	EP	0857176 A	12-08-1998
WO 9856419 A	17-12-1998	AU EP	8068998 A 0998302 A	30-12-1998 10-05-2000
WO 9965523 A	23-12-1999	AU	4159499 A	05-01-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00174

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/395 A61K39/39 A61P35/00 //C07K16/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 56416 A (HERKEL JOHANNES ; COHEN IRUN R (IL); EREZ ALON NETA (IL); ROTTER VA) 17. Dezember 1998 (1998-12-17) Seite 6, Zeile 1-19 Seite 7, Zeile 1-3 Seite 16, Zeile 1-5 Beispiele 1,2 Anspruch 1 ---	1-8, 11-14
X	LEVEUGLE B ET AL: "PSA-directed immunotherapy of prostate cancer" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, März 1998 (1998-03), XP002117652 das ganze Dokument ---	1,2,4,7, 8,11,12, 14 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
23. Mai 2000	30/05/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Covone, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00174

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 15597 A (CENTOCOR B V ;WARNAAR SVEN OLLE (NL); MELIEF CORNELIS JOSEPH MARIA) 1. Mai 1997 (1997-05-01) Seite 2, Zeile 4-25 Ansprüche 8-15 ---	1-8
X	CHAKRABORTY M ET AL: "Immune responses in advanced breast cancer patients treated with an anti-idiotype antibody vaccine" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, PHILADELPHIA, AACR, Bd. 38, 1997, Seite 616 XP002076982 das ganze Dokument ---	1,2,4,7, 8,11-14
X	WO 98 56419 A (CHATTERJEE MALAYA ;UNIV KENTUCKY RES FOUND (US); FOON KENNETH A (U) 17. Dezember 1998 (1998-12-17) Seite 2, Zeile 21 -Seite 3, Zeile 9 Beispiele 1,2 ---	1,2,4,7, 8,11-14
A	PERVIN S ET AL: "Proliferation of T-cells from colon cancer patients by peptides based on the structure of an anti-idiotype antibody mimicking CEA" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, PHILADELPHIA, AACR, Bd. MEETING 87, 1996, Seite 473 XP002076985 ISSN: 0197-016X das ganze Dokument ---	1-14
P, X	WO 99 65523 A (LEVEUGLE BEATRICE ;MADIYALAKAN RAGUPATHY (CA); NOUJAIME ANTOINE A () 23. Dezember 1999 (1999-12-23) Ansprüche Abbildung 1 -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00174

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9856416 A	17-12-1998	AU EP	7672398 A 0989861 A	30-12-1998 05-04-2000
WO 9715597 A	01-05-1997	EP	0857176 A	12-08-1998
WO 9856419 A	17-12-1998	AU EP	8068998 A 0998302 A	30-12-1998 10-05-2000
WO 9965523 A	23-12-1999	AU	4159499 A	05-01-2000