

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1510/2006**
(22) Anmeldetag: **11.09.2006**
(43) Veröffentlicht am: **15.03.2008**

(51) Int. Cl.⁸: **A61K 39/385** (2006.01),
A61K 39/395 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

KIRCHEIS RALF DR.
A-1230 WIEN (AT)

(72) Erfinder:

KIRCHEIS RALF DR.
WIEN (AT)
NECHANSKY ANDREAS DR.
OBERWALTERSDORF (AT)

(54) **VERWENDUNG EINER MEHRKOMONENTEN-TUMORVAKZINE**

(57) Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine, die Epitope von mindestens zwei tumorassoziierten Antigenen, mindestens einen immunogenen Träger und mindestens ein Adjuvans enthält, formuliert in einer immunogenen Formulierung zur Induzierung einer Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene und Mit-Induzierung einer Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen, die zu einer Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

AT 504 160 A1 2008-03-15

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung, die Epitope von mindestens zwei tumorassoziierten Antigenen, mindestens einen immunogenen Träger und mindestens ein Adjuvans enthält, formuliert in einer immunogenen Formulierung zur Induzierung einer Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene und Mit-Induzierung einer Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen, die zu einer Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

69/69

Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffe

Kurze Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffe, die Epitope von mindestens zwei tumor-assoziierten Antigenen, mindestens einen immunogenen Träger und mindestens ein Adjuvans enthält, formuliert in einer immunogenen Formulierung zur Induzierung einer spezifischen Immunantwort gegen tumor-assoziierte Antigene und Mit-Induzierung einer Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen, die zu einer Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

Hintergrund

Krebs steht an zweiter Stelle als Todesgrund in den Industrieländern. Besonders metastatische Krankheitsstadien bei Krebs sind nicht oder nicht ausreichend für herkömmliche Krebstherapiemodalitäten wie Chirurgie, Strahlentherapie oder Chemotherapie zugänglich. Diese Metastasen, nicht der Primärtumor, sind verantwortlich für die Mehrheit der Todesfälle bei Krebspatienten. Immuntherapie ist eine neue Modalität der Krebsbehandlung geworden, indem sie auf die Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems gerichtet ist, um den Tumor zu bekämpfen. Besonders die sich im Umlauf befindenden Tumorzellen und Mikro- und Makrometastasen, die nach einem chirurgischen Eingriff oder Strahlentherapie zurückbleiben können, sind wichtige Angriffsziele für die Krebsimmuntherapie. Innerhalb der "passiven Immuntherapie" wurden immunologische Effektormoleküle (z.B. Antikörper oder Zytokine) oder Immunzellen verwendet, um Krebspatienten zu behandeln (Kammula US. et al. Cancer 1998; 83: 797-805; Vuky J and Motzer RJ. Urol. Oncol. 2000; 5: 249-257; Markman M. et al. Oncology. 2004; 66: 343-346; Schiller JH. et al., Clin. Cancer Res. 1996; 2: 29-36.). Alternativ dazu zielt die aktive Immunisierung ("Antikrebsimpfung") darauf ab, dem Immunsystem des Patienten zu helfen, Tumorzellen als fremd zu erkennen und das Immunsystem zu aktivieren, Tumorzellen zu zerstören (Rosenberg SA. Immunol. Today, 1997; 18:175-182; Pardoll DM. Ann. Rev. Immunol. 1995; 13: 399-415; Dranoff G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 3539-3543).

NACHGEREICHT

Es wurde gezeigt, dass tumor-assoziierte Antigene (TAAs) von T-Zellen oder Antikörpern erkannt werden können, was die Zerstörung der Tumorzellen zur Folge hat (Kawakami Y, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 6458-6462. Van der Bruggen P, et al., Science 1991; 254: 1643-1647. Watson SA, et al. Cancer Res. 1996; 56:880-885). Die Ermittlung und Auswahl von geeigneten TAAs und wie sie dem Immunsystem auf hochimmunogene Weise präsentiert werden können, ist äußerst wichtig für die Wirksamkeit aktiver Krebsimmuntherapie. Eine Vielfalt an tumor-assoziierten Antigenen wurde inzwischen als potentielle Angriffsziele für die Krebsimmuntherapie ermittelt, einschließlich CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendes Protein A-33, Gastrin, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs usw. (Sem. Cancer Biol. (1995), 6:321. (Rosenberg SA. Immunol. Today, 1997; 18:175-182; Kawakami Y, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 6458-6462. Van der Bruggen P, et al., Science 1991; 254: 1643-1647. Watson SA, et al. Cancer Res. 1996; 56:880-885).

Weiters wurde gezeigt, dass Kohlenhydrate und Mucinantigene (die an der Zelloberfläche exponiert sind), die von einer abnormalen Glykosylierung von Tumorzellen stammen und dadurch Krebszellen von normalen Zellen unterscheiden, attraktive Angriffsziele für die Krebsimmuntherapie darstellen (Singhal A, et al. Cancer Res. 1991; 51:1406-1411; Zhang S, et al. Cancer Res. 1996; 55: 3364-3368. Zhang H, et al. Cancer Res. 1998; 58: 2844-2849; Livingston PO, et al. J. Clin. Oncol. 1994; 12: 1036-1044; MacLean GD et al., J. Immunother. 1996; 19: 59-68). Obwohl sich die Modifikationen zwischen den Geweben unterscheiden, wurde beobachtet, dass eine modifizierte Glykosylierung ein typisches Merkmal von Krebszellen ist. (Annu. Rev. Biochem. (1988), 57:785). Beispiele von tumor-assoziierten Kohlenhydratstrukturen sind das blutgruppenverwandte Lewis-Antigen, das allgemein in vielen Epithelialkrebsarten exprimiert ist. Sie inkludieren Strukturen von Lewis X, Lewis B und Lewis Y sowie sialylierte Lewis-Y-Strukturen. Andere relevante Kohlenhydratantigene sind GloboH-Strukturen, KH1, Tn-Antigen, TF-Antigen, Alpha-1,3-Galactosylepitop, das SialylTn-Antigen sowie Ganglioside wie GD2, GD3, GM1 und GM2 (Singhal A, et al. Cancer Res. 1991; 51:1406-1411; Zhang S, et al. Cancer Res. 1996; 55: 3364-3368. Zhang H, et al. Cancer Res. 1998; 58: 2844-2849; Livingston PO, et al. J. Clin. Oncol. 1994; 12: 1036-1044; MacLean GD et al., J. Immunother. 1996; 19: 59-68).

Das SialylTn-Kohlenhydratantigen – ein Beispiel eines markant exprimierten Kohlenhydrat-TAAs – ist in mehr als 80% aller Brust-, Darm-, Prostata und Eierstockkrebsarten exprimiert (Itzkowitz SH et al., Cancer Res. 1989; 49: 197-204; Zhang S et al., Int. J. Cancer. 1997; 73: 50-56), und es wurde gezeigt, dass sein Expressionsgrad mit einem aggressiveren Tumorercheinungsbild und daher schlechten Prognosen korreliert. (Itzkowitz SH et al., Cancer 1990; 66:1960-1966; Werther JL et al., Br. J. Cancer 1994; 69: 613-616).

Jedoch gibt es eine Vielzahl von Hindernissen für den Einsatz von TAAs als Antikrebsimpfungen. Eine der Haupteinschränkungen für die Anwendung von TAAs ist ihre geringe oder sogar gar nicht vorhandene Immunogenität. Besonders Kohlenhydrat-TAAs – als thymusunabhängige Antigene – sind unfähig, T-Zell-Hilfe zu erzeugen und überhaupt nicht in der Lage, ein Gedächtnis zu erzeugen. Die Verbindung von “immunologisch inerten” Kohlenhydratstrukturen mit thymusabhängigen Antigenen wie Proteine wird ihre Immunogenität verstärken. Daher werden Impfstoffe, die auf tumor-assoziierten Kohlenhydratstrukturen basieren, an sogenannte “Trägermoleküle” gekoppelt, um ihre Immunogenität zu verstärken. Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA) oder das Hämozyanin der Napfschnecke (KLH) dienen oft als Trägermoleküle (Kagan E et al., Cancer Immunol Immunother. 2005; 54: 424-430). Das Trägerprotein wird die trägerspezifischen T-Helferzellen anregen, die dann in der Induzierung der Antikörpersynthese gegen das Kohlenhydrat eine Rolle spielen.

Eine weitere Alternative, eine Immunantwort gegen Kohlenhydrate hervorzurufen, ist die Immunisierung mit sogenannten “Mimotopen”, die aufgrund ihrer Molekularstruktur keine Kohlenhydrate sind (z.B. Peptide; Biotechnol. (1999), 17:660; Nat. Biotechnol. (1997), 15:512). Ein anderer Weg, eine Immunantwort gegen nicht-immunogene TAAs zu erzeugen, ist die Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern als Immunogene, die die Struktur eines TAAs imitieren und dadurch eine Immunantwort auslösen, die auch mit dem entsprechenden TAA (Cancer Immunol. Immunother. (2000), 49:133) oder der Fusion von TAAs mit spezifischen Fremdproteinsequenzen (U.S. Pat. No. 5,869,057, U.S. Pat. No. 5,843,648 and U.S. Pat. No. 6,069,242) reagiert.

Eine andere große Einschränkung für die Antikrebsimpfung ist allerdings die heterogene Expression der TAAs auf Krebszellen, denn nur ein Teil der Zellen des

Tumors oder der Tumorart exprimiert das bestimmte Antigen. Tumore verwenden diesen Mechanismus, um dem Immunsystem zu entgehen. Um das Risiko von Ausbruchsvarianten möglichst gering zu halten, ist es notwendig, mehr als ein Antigen für die maximale Vernichtung von Tumorzellen anzusprechen (Ragupathi G. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52: 608-616; Ragupathi G et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2002; 99: 13699-13704).

Eine andere schwerwiegende Einschränkung der zur Zeit umgesetzten Krebsimmuntherapieansätze ist die Tatsache, dass Krebs oft mit einer steigenden Beeinträchtigung der Immunantwort gegen den Tumor einhergeht. Fluchtmechanismen des Tumors, wie ein Ausfall der Antigenexpression [Marincola FM et al., *Adv. Immunol.* 2000; 74: 181-273.], verminderte MHC-Expression [Travers PJ et al., *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1982; 60:175-180], Abwesenheit von ko-stimulatorischen Molekülen [Ochsenbein AF, et al., *Nature* 2001; 411: 1058-1064], Unterdrückung der antitumoralen Immunantworten durch CD4⁺CD25⁺ T-regulatorische (Treg) Zellen [Antony PA et al., *J. Immunother.* 2005; 28: 120-128], und Veränderungen im Zytokinprofil [Yamamura M et al *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 1005-1010] – oft in Richtung einer Th2-Antwort verschoben [Clerici M, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90: 261-263. Rayman P, et al., *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 6360S-6366S] – beeinträchtigen die Fähigkeit des Immunsystems, eine effektive Antwort gegen den wachsenden Tumor aufzubauen. Deshalb ist die Verwendung von geeigneten Zielantigen(en) (Rosenberg SA. *Immunol. Today*, 1997; 18:175-182) gemeinsam mit einem Th1/Th2-ausgewogenen Zytokinprofil (Knutson KL and Disis ML. *Cancer Immunol. Immunother.* 2005; 5: 365-371) unter Umständen entscheidend, um die therapeutische Wirksamkeit zu steigern. Die ersten Andeutungen einer Wirkungskraft dieser Herangehensweise kamen bereits durch die Anwendung des Coley-Toxin, - ein bakterieller Auszug, der direkt in den Tumor verabreicht wird – was zu markanten Veränderungen der Zytokinmengen und drastischen Antitumorantworten, aber auch zu signifikanten Toxizitäten in Patienten [Nauts H, et al., *Acta Med. Scand.* 1953; 144: S1-S103] führte. Die Anwendung von rekombinanten Zytokinen hat sich auch als mit schweren Nebenwirkungen verbunden herausgestellt, und therapeutische Effekte wurden erst in wenigen Fällen nachgewiesen [Kammula US, et al., *Cancer* 1998; 83: 797-805. Panelli MC, et al. *J. Translational Medicine* 2004, 2: 17-31. Schiller JH, et al., *Clin. Cancer Res.* 1996; 2:

29-36]. Diese eingeschränkte Wirksamkeit könnte auf die Grenzen der genauen Simulation von biologischen parakrinen Zytokinfunktionen im Zusammenhang mit der Antigenaufnahme und -präsentation zurückzuführen sein [Pardoll DM., Ann. Rev. Immunol. 1995; 13: 399-415]. Weiters dürfte eher die synchronisierte, oft synergistische Wirkung verschiedener Zytokine [Kircheis R, et al., Cytokines Cell Mol Ther. 1998; 4: 95-103.] als die einzelner Zytokine für die optimale Induzierung einer Immunantwort erforderlich sein. Der Beweis für die Theorie für die "parakrine Wirkung" von Zytokinen wurde durch die Verwendung von zytokin-genmodifizierten Tumorzellen von autologem Tumormaterial des Patienten erbracht [Dranoff G et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 3539-3543. Fearon ER, et al. Cell 1990; 60:397-403]. Allerdings ist dieser Ansatz, autologes Tumormaterial zu nutzen, sehr mühsam und unbrauchbar für die großtechnische Entwicklung von Medikamenten und wird nicht auf die Behandlung von großen Patientenpopulationen anwendbar sein. Für die Entwicklung von Antikrebsmedikamenten, die auf große Patientenpopulationen anwendbar sind, sind in ihrer Molekularstruktur definierte, synthetische Impfstoffe notwendig, die eine Immunogenpräsentation der relevanten TAAs mit der Fähigkeit vereinen, ein ausgewogenes Th1/Th2-Zytokinprofil zu gewährleisten, und die in großtechnischen pharmazeutischen Prozessen umsetzbar sind.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile der zur Zeit erhältlichen Tumorstoffe, wie sie im Stand der Technik beschrieben worden sind, zu vermeiden, und eine Methode zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte Immunantwort gegen Tumorzellen erzeugt.

Zusammenfassung der Erfindung

Gemäß der Erfindung ist dieses Ziel durch die Bereitstellung einer Methode erreicht, die eine Immunantwort gegen Tumorzellen in Kombination mit der Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen mit Antitumoraktivität erzeugt, wobei tumor-assoziierte Antigenepitope wie Peptide, Proteine, Oligosaccharide, Glykoproteine oder glykosylierte Peptide (d.h. Antigene, die aus abnormaler Glykosylierung stammen), die an immunogene Trägermoleküle gekoppelt sind, verwendet werden, resultierend in einem "Tumorantigen-Träger-Konjugat" enthaltend Epitope von

mindestens zwei verschiedenen tumor-assoziierten Antigenen, und die Formulierung dieses Molekülkonjugats in einer hochimmunogenen Formulierung resultierend in einer "Mehrkomponenten-Tumorvakzine" die vorzugsweise zusätzlich noch ein oder mehrere Adjuvantien beinhaltet.

Vorzugsweise ist der immunogene Träger ein immunogenes Protein, möglichst ein anti-idiotypischer Antikörper oder ein mimotopisches Protein, also ein mimotopischer Antikörper, der die Struktur von mindestens einem TAA-Epitop imitiert und so eine Immunantwort auslöst, die dann auch mit diesem TAA reagiert.

Optimalerweise werden Epitope von tumor-assoziierten Antigenen ("TAAs"), die aus einer Gruppe ausgewählt werden, die aus Peptiden oder Proteinen besteht, speziell CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs usw. und T-Zell-Peptide nach Möglichkeit aus tumor-assoziierten Antigenen, oder aus Kohlenhydraten, im Speziellen Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH und Ganglioside wie GD2, GD3, GM1 und GM2 an immunogene Träger gekoppelt und bilden somit ein Tumorantigen-Träger-Konjugat, das mehrere Epitope einschließt, mindestens aber zwei TAAs.

Entsprechend der Erfindung wird das Tumorantigen-Träger-Konjugat auf hochimmunogene Weise formuliert, und läßt somit eine Mehrkomponenten-Tumorvakzine entstehen. Vorzugsweise wird eine Multikomponenten-Tumorvakzine gemeinsam mit zusätzlichen Adjuvantien formuliert, um eine starke Immunantwort zu erzeugen und um die Bildung immunstimulatorische Zytokine, wie IFN γ , IL-2, IL-1 β , TNF γ , IL-4, GM-CSF, IL-12 und IL-6 anzuregen, was zu einer zusätzlichen Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In dieser Erfindung wurde überraschenderweise gezeigt, dass die Injektion einer immunogenen, an einen hochimmunogenen (für Menschen oder Rhesusaffen als Wirt) murinen IgG2a-Antikörper gekoppelte Formulierung einer Tumorantigen-Träger-Konjugatvakzine in Rhesusaffen, die sich aus tumor-assoziierten-Antigenepitopen des SialylTn-Kohlenhydrats zusammensetzt, (i) eine starke Immunantwort gegen das Trägermolekül, (ii) eine signifikante Immunantwort gegen das SialylTn-Kohlenhydratantigen, (iii) eine signifikante Immunantwort gegen SialylTn-positive

OVCAR-3-Tumorzellen und (iv) antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen SialylTn-positive OVCAR-3-Tumorzellen induziert. Weiters wurde eine signifikante Immunantwort auch gegen SialylTn-negative KATOIII-Tumorzellen gefunden, die zur Immunantwort gegen das Trägermolekül im Zusammenhang zu stehen scheint. Weiters wurde erstaunlicherweise festgestellt, dass die Verabreichung dieses Impfstoffes auch eine Zytokinfreisetzung bewirkt, speziell $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-1 β , IL-4, GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-12 und IL-6 waren im Serum von immunisierten Tieren messbar, die wiederum mit der Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen wie NK-Zellen und anderen PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) korrelierten und zu signifikanter Antitumoraktivität (Tumorzell-Lyse) gegen Tumorzellen führte, die nicht das SialylTn-Immunisierungsantigen exprimieren.

Der Terminus "immunogen" schließt hier jegliche Struktur ein, die zu einer Immunantwort in einem spezifischen Wirtssystem führt. Ein xenogenes Protein (also ein Protein, das aus einer anderen Spezies stammt), z.B. ein muriner Antikörper, oder Fragmente dieses Antikörpers, werden zum Beispiel eine sehr starke immunogene Wirkung in Affen oder menschlichen Organismen aufweisen, welche durch eine Kombination mit Adjuvantien weiter verstärkt würde.

Der Terminus "Epitop" definiert die Region innerhalb eines Moleküls (Antigen), das durch einen spezifischen Antikörper oder eine spezifische T-Zelle erkannt werden kann, oder das die Bildung von spezifischen Antikörpern oder spezifischen T-Zellen gegen dieses Epitop hervorruft. Epitope können konformative (strukturelle) oder lineare Epitope sein. Vor allem imitieren oder beinhalten sie Domänen eines natürlichen, homologen oder derivatisierten tumor-assoziierten Antigen, TAA. Oft sind sie mit TAAs zumindest aufgrund ihrer Primärstrukturen und möglicherweise auch Sekundärstrukturen vergleichbar. Aber Epitope können sich auch von TAAs in dieser Hinsicht komplett unterscheiden und nur durch ihre Ähnlichkeit der räumlichen (Tertiär-)strukturen Komponenten von TAAs wie Kohlenhydratantigene imitieren. Daher ist die Tertiärstruktur eines Moleküls selbst in der Lage, eine Mimicry ("immunologische Imitation") zu bilden, die eine Immunantwort für ein spezifisches TAA induziert.

Die Epitope des Tumorantigen-Träger-Konjugats entsprechend der Erfindung schließen nach Möglichkeit Epitope von ausgewählten Antigenen aus der Gruppe der Peptide oder Proteine ein, im besonderen CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs usw. und T-Zell-Peptide, vorzugsweise aus tumor-assoziierten Antigenen, oder aus Kohlenhydraten, speziell Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH und Ganglioside wie GD2, GD3, GM1 und GM2. Bevorzugte Epitope stammen aus Antigenen, die nach Möglichkeit auf epithelialen Tumoren exprimiert oder überexprimiert sind, wie bei Brustkrebs, Magen- und Darmkrebs, Prostatakrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Eierstockkrebs, Gebärmutterhalskrebs und Lungenkrebs. Unter den bevorzugten Epitopen befinden sich solche, die entweder eine humorale Immunantwort, d.h. eine spezifische Antikörperbildung *in vivo* bewirken, bei der nicht nur z.B. Antikörper der IgM-Klasse, sondern auch Antikörper der IgG-Klasse als Reaktion auf die Verabreichung des besagten Mehrkomponentenimpfstoffs gebildet werden. Alternativ dazu könnten auch zum Beispiel diese Antigene, die T-Zell-spezifische Immunantworten erzeugen, als Epitope im Sinne der Entwicklung ausgesucht werden. Unter ihnen sind auch intrazelluläre Strukturen oder T-Zell-Peptide, die im Sinne der Erfindung gewählt werden können. Die Tumorantigen-Träger-Konjugatformulierung beziehungsweise der Mehrkomponentenimpfstoff sollte möglichst dazu fähig sein, eine T-Zell-spezifische und eine humorale Immunantwort auszulösen.

In einer konkreten Ausführung werden gemäß der Erfindung mindestens zwei identische oder verschiedene Epitope auf einem Adhäsionsprotein, z.B. ein homophiles zelluläre Membranprotein wie EpCAM, zur Verfügung gestellt oder auf einem Antikörper imitiert. Daher kann eine Vielzahl an Antikörpern, die für dasselbe Molekül spezifisch sind, jedoch unterschiedliche EpCAM-Bindungsstellen durch aktive Immunisierung erzeugt werden.

Die verwendete Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung kann allerdings auch, laut der Erfindung, in Form eines glykosylierten Antikörpers verfügbar gemacht werden, wobei die Glykosylierung selbst auch fähig ist, ein Kohlenhydratepitop eines TAA's zu imitieren.

NACHGEREICHT

In konkreter Ausführung werden mindestens zwei unterschiedliche Epitope zur Verfügung gestellt oder imitiert, wobei mindestens ein Epitop aus der Gruppe der Peptide oder Proteine und mindestens ein Epitop aus der Gruppe der Kohlenhydrate stammt. Ein Epitop von einem EpCAM, CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGE, GAGE, BAGE-Protein und ein Epitop einer Kohlenhydratkomponente, zum Beispiel von Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH und von Glykolipiden, besonders GD2, GD3, GM1 und GM2 haben sich als vorzügliche Kombination herausgestellt.

Da ein Lewis Y-glykosylierter Antikörper auch eine Spezifität für eine EpCAM-Struktur besitzen kann, stellt er ein besonders wünschenswertes Immunogen in einer solchen Vakzinformulierung dar. Dieser spezielle Antikörper ist in der Lage, zelluläre Tumorantigene zu imitieren, und dieses Immunogen zu EpCAM-exprimierenden Tumorzellen zu leiten, wodurch es die gewünschte Immunantwort, epitheliale Tumorzellen zu hemmen, induziert.

Auf die gewünschte Art fungiert der immunogene Träger gemäß der Erfindung selbst als Antigen, d.h. als Proteinantigen, im Impfstoff und erfüllt zusätzlich die Rolle des Trägers für ein oder mehrere zusätzliche Epitope, z.B. Peptide oder Kohlenhydratantigene. Das bedeutet, dass das Tumorantigen-Trägermolekül gemäß der Erfindung ein multivalentes Antigen, zum Beispiel ein Bi-, Tri- oder Polyvalentes Antigen bildet. Die Epitope werden so präsentiert, dass der Impfstoff zum Einleiten einer Immunantwort gegen diese Epitope veranlaßt. Somit wird ein Impfstoff geboten, der einen Antikörper in Form eines Di-, Tri- oder Polyvalenten Antigens enthält.

In einer bevorzugten Art der Erfindung ist der Träger hochimmunogen, wenn er auf Menschen oder Affen angewendet wird. Vorzugsweise besteht es aus einem xenogenen Protein (also ein Protein einer anderen Spezies).

In gewünschter Ausführung der Erfindung ist der immunogene Träger ein xenogener Antikörper, z.B. ein muriner Antikörper, oder Fragmente dieses Antikörpers, die in Affen oder menschlichen Organismen eine sehr starke immunogene Wirkung zeigen, welche mit Adjuvantien weiter verstärkt wird.

Das Tumorantigen-Träger-Konjugat gemäß der Erfindung wird hauptsächlich für die aktive Immunisierung verwendet und wird daher nur in kleinen Mengen verabreicht. Deshalb müssen keine besonderen Nebenwirkungen erwartet werden, auch wenn der Träger gemäß der Erfindung, z.B. ein Antikörper, von einer nicht-humanen Spezies stammt, wie zum Beispiel ein Mausantikörper. Es wird jedenfalls angenommen, dass ein rekombinanter, chimertischer sowie humanisierter oder humaner Antikörper, wenn er mit xenogenen, d.h. immunogenen, Komponenten wie zum Beispiel murinen und humanen Komponenten kombiniert wird, besonders sicher in der Verabreichung an den Menschen ist. Andererseits ist ein muriner Anteil im Antikörper gemäß der Erfindung in der Lage, aufgrund seiner Fremdheit die Immunantwort im Menschen zusätzlich herbeizuführen.

Obwohl ein Antikörper entsprechend der Erfindung natürlich von einem ursprünglichen Antikörper stammen kann, der wahlweise von einem Organismus oder Patienten isoliert wurde, wird ein Antikörperderivat aus der Gruppe der Antikörperfragmente, Konjugate oder Homologe, aber auch der Komplexe und Adsorbate normalerweise bevorzugt eingesetzt. Also sind immer, wenn der Ausdruck "Antikörper" innerhalb dieser Offenlegung verwendet wird, auch Derivate, Homologe und deren Fragmente miteingeschlossen. In jedem Fall wird es vorgezogen, dass das Antikörperderivat zumindest einen Anteil des Fab-Fragmentes enthält, am besten gemeinsam mit zumindest Teilen des F(ab')₂-Fragmentes und/oder Teilen der Scharnierregion und/oder des Fc-Teils eines Lambda- oder Kappa-Antikörpers.

Weiters kann auch ein einkettiges Antikörperderivat wie zum Beispiel ein sogenannter "Single chain"-Antikörper als Epitopträger im Zusammenhang mit der Erfindung verwendet werden. Der Antikörper gemäß der Erfindung ist vorzugsweise eine IgG-, IgM- oder IgA-Immunglobulinart.

Auf dem Antikörper entsprechend der Erfindung können zusätzlich andere Substanzen wie Peptide, Glykopeptide, Kohlenhydrate, Lipide oder Nukleinsäuren, aber auch ionische Gruppen wie Phosphatgruppen, oder sogar Trägermoleküle wie Polyethylenglykol oder KLH kovalent gebunden sein. Diese Nebengruppen selbst können unter Umständen Epitope von TAAs im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen.

NACHGEREICHT

Gemäß der Erfindung wird es vorgezogen, einen monoklonalen Antikörper zu verwenden, der als ab1 selbst eine Spezifität für einen TAA enthält, sodass er möglicherweise direkt an eine Tumorzelle oder deren Abkömmling binden kann. Damit kann eine Immunantwort wahlweise an einem Tumor selbst oder an einer disseminierten Tumorzelle entsprechend lokalisiert werden. Die Spezifität des Antikörpers wird ebenso bevorzugt von einer der oben genannten TAA-Gruppen ausgesucht, und besonders der Gruppe, die aus EpCAM, CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendem Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs-Protein und Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH und aus Glykolipiden, besonders GD2, GD3, GM1 und GM2 besteht.

Ein besonders gutes Immunogen für EpCAM ist zum Beispiel ein Anti-EpCAM-Antikörper, der mindestens einen oder zwei EpCAM-Epitope imitiert oder enthält, zum Beispiel durch seine EpCAM-ähnlichen Idiotyp.

In einer anderen Ausführung kann jedoch der im Sinne der Erfindung verwendete Antikörper auch so gewählt werden, dass er spezifisch einen Antikörper bindet, also ab2 werden bevorzugt für die aktive Immunisierung eingesetzt. Diese Antikörper können mit zusätzlichen Sequenzen oder Strukturen ausgestattet werden, um ein Immunogen entsprechend dieser Erfindung zu erhalten.

Entsprechend der Erfindung verwendete Anti-idiotypische Antikörper erkennen bevorzugt den Idiotyp eines Antikörpers wieder, der gegen ein TAA gerichtet ist. Somit wird bereits ein Epitop eines TAA auf einem Paratop eines anti-idiotypischen Antikörpers als Mimikry für den TAA gebildet. Die Auswahl der Epitope wird wieder bevorzugt aus einer der oben genannten TAA-Gruppen getroffen. Als Beispiel wird ein anti-idiotypischer Antikörper gegen glykanspezifische Antikörper verwendet, z.B. ein anti-idiotypischer Antikörper, der den Idiotyp eines Anti-Lewis-Y-Antikörpers erkennt.

Der gemäß der Erfindung verwendete immunogene Antikörper ist vor allem als Grundlage für pharmazeutische Formulierungen und Präparate und besonders Impfstoffe geeignet. Bevorzugt werden pharmazeutische Präparate, die pharmazeutisch zulässige Träger enthalten. Diese beinhalten zum Beispiel Adjuvantien, Puffer, Salze oder Konservierungsstoffe. Diese pharmazeutischen Präparate können zum Beispiel zur Prophylaxe und Therapie von krebsassoziierten

pathologischen Konditionen, wie Metastasenbildung in Krebspatienten verwendet werden. Dazu werden antigenpräsentierende Zellen *in vivo* oder auch *ex vivo* speziell angepaßt, sodass eine Immunantwort gegen die TAAs zu erzeugt wird, der im immunogenen Antikörper enthalten ist.

Eine Vakzinformulierung entsprechend der Erfindung enthält den immunogenen Antikörper möglichst nur in geringen Konzentrationen, zum Beispiel in einer immunogenen Menge zwischen 10ng und 10mg. Abhängig von der Art des Tumorantigen-Träger-Konjugats werden aber auch Hilfsstoffe oder Adjuvantien eingesetzt; die geeignete immunogene Dosis wird innerhalb eines Bereichs von etwa 10ng bis 10mg und bevorzugt von 1µg bis 1mg, oder sogar noch besser zwischen 10µg und 500µg ausgesucht.

In einer anderen Ausführung könnte allerdings ein Depotimpfstoff, der über längere Zeit an den Organismus abgegeben wird, viel größere Antikörpermengen, wie zum Beispiel mindestens 1mg bis mehr als 10mg enthalten. Diese Konzentration ist eine Funktion der verabreichten Flüssigkeitsmenge bzw. Menge des suspendierten Impfstoffs. Ein Impfstoff wird normalerweise in gebrauchsfertigen Spritzen mit einem Volumen von 0,01 bis 1ml, besser 0,1 bis 0,75ml zur Verfügung gestellt.

Der immunogene Mehrkomponenten-Tumorstoffe gemäß der Erfindung wird nach Möglichkeit in einem pharmazeutisch zulässigen Träger für subkutane, intramuskuläre, aber auch intradermale oder transdermale Verabreichung dargeboten. Eine andere Art der Verabreichung funktioniert über den Weg der Schleimhäute, zum Beispiel die Impfung durch Verabreichung über die Nase oder den Mund. Wenn Feststoffe als Adjuvantien für die Vakzinformulierung verwendet werden, wird zum Beispiel ein Adsorbat oder eine Suspensionsmischung des Antikörpers mit dem Adjuvans eingesetzt. In besonderen Ausführungsformen wird der Impfstoff als Lösung oder als flüssiger Impfstoff in einem wäßrigen Lösemittel verabreicht.

Impfeinheiten der Tumorstoffe werden bevorzugt in geeigneten gebrauchsfertigen Spritzen bereitgestellt. Nachdem ein Antikörper verglichen mit TAAs relativ stabil ist, bietet der Impfstoff gemäß der Erfindung den grundlegenden Vorteil, dass er als lagerstabile Lösung oder Suspension schon in gebrauchsfertiger Form handelsfähig ist. Ein Anteil eines Konservierungsmittels wie Thimerosal oder irgendeines anderen Konservierungsmittel mit verbesserter Verträglichkeit ist nicht unbedingt erforderlich, könnte aber in der Formulierung angeboten werden, um die

Lagerbeständigkeit bei Lagertemperaturen von Kühlschränken auf die mit Zimmertemperatur auszudehnen. Der Impfstoff entsprechend der Erfindung kann allerdings auch in gefrorener oder lyophilisierter Form dargeboten werden, um bei Bedarf aufgetaut oder rekonstituiert zu werden.

Auf jeden Fall hat es sich als erfolgreich herausgestellt, die Immunogenität der Mehrkomponenten-Tumorvakzine gemäß der Erfindung durch die Verwendung von Adjuvantien zu verstärken. Dazu wird ein Adjuvans wie zum Beispiel Aluminiumhydroxid (Alu-Gel) oder Phosphate, z.B. Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Zytokine wie IL-2, IL-12, GM-CSF, Gamma-Interferon oder Faktoren des Komplementsystems wie C3d und ferner Liposompräparate oder Lipopolysaccharide von E. coli (LPS) gemeinsam mit dem Impfstoff formuliert oder verabreicht. Aber auch Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits starke Immunantworten eingeleitet hat, wie Tetanustoxoid, bakterielle Toxine wie Pseudomonas-Exotoxine, Diphtherietoxin und Derivate des Lipid A werden ins Auge gefaßt. In einer bevorzugten Form der Erfindung werden semisynthetische Adjuvantien wie QS-21, ENHANZYN oder verwandte Adjuvantien aus natürlichen Quellen, oder alternativ dazu kationische oder anionische Polymere wie Polylysin, Polyarginin, Polyethylenimin (PEI) oder Derivatprodukte wie IC31 mit dem Impfstoff mitformuliert.

In einer anderen Verfahrensform der Erfindung werden Wasser-in-Öl-, Öl-in-Öl- oder Öl-in-Wasser-Formulierungen in die Mehrkomponenten-Tumorvakzine mit aufgenommen, um die Immunogenität zu erhöhen und/oder als Depot für anhaltende Freisetzung des Immunogens und/oder Adjuvans zu dienen.

In einer besonders bevorzugten Darreichungsform der Erfindung werden nanopartikuläre Strukturen ("Nanopartikel") oder mikropartikuläre Strukturen ("Mikropartikel") oder andere besonders langsamfreisetzende Formulierungen für die Präparation der besagten Mehrkomponenten-Tumorvakzine verwendet. Die Nanopartikel, Mikropartikel oder andere langsamfreisetzende Formulierungen werden verwendet, um die Immunogenität der Vakzinformulierung zu erhöhen, indem sie die Aufnahme von Antigen in antigenpräsentierenden Zellen (APC) erhöhen und/oder eine anhaltende Freisetzung von Antigen/Immunogen und/oder Adjuvans ermöglichen.

NACHGEREICHT

Zum Formulieren der Impfstoffe könnten auch andere bekannte Methoden zum Konjugieren oder Denaturieren von Impfstoffkomponenten eingesetzt werden, um weitere Immunogenität der aktiven Substanz zu verstärken.

Spezielle Formen des Impfstoffs gemäß der Erfindung enthalten zusätzliche Impfstoffantigene, besonders anti-idiotypische Antikörper, d.h. Mischungen der immunogenen Tumorantigen-Träger-Konjugate gemäß der Erfindung, bei der mehrere von ihnen gleichzeitig verabreicht werden.

Der immunogene Antikörper entsprechend der Erfindung ist auch für die Bereitstellung von diagnostischen Mitteln im Sinne der Erfindung geeignet. Daher könnten Reagenzien, die den immunogenen Antikörper in Verbindung mit anderen Reaktanten oder Nachweisreagenzien enthalten, als diagnostische Mittel in Set-Form angeboten werden. Ein solches Mittel enthält nach Möglichkeit eine Markierung für den direkten Nachweis des Antikörpers oder seiner Reaktionsprodukte. Das diagnostische Mittel gemäß der Erfindung wird zum Beispiel für die qualitative und/oder quantitative Bewertung von Tumorzellen oder Metastasen oder die Ermittlung eines Metastasierungsvermögens, bei dem das besagte Mittel über eine Immunreaktion oder Immunkomplexierung funktioniert.

Die für die vorliegende Erfindung nutzbare Mehrkomponenten-Tumervakzine kann durch eine Methode hergestellt werden, die die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Bereitstellung eines Trägermoleküls, z.B. ein immunogenes Protein, z.B. ein Antikörper; und
- b) Koppelung von mindestens zwei Epitope eines tumor-assoziierten Antigens an das besagte Trägermolekül.

Alternativ dazu könnte die Methode im Sinne der Erfindung schon von einem anti-idiotypischen Antikörper ausgehen, wobei die methodischen Schritte in diesem Fall umfassen würden:

- a) Bereitstellung eines Antikörpers einschließlich des Idiotyps eines tumor-assoziierten Antigens (z.B. ein anti-idiotypischer Antikörper, der einen TAA imitiert); und

NACHGEREICHT

- b) b) Koppelung von mindestens einem Epitop eines tumor-assoziierten Antigens an den besagten Antikörper.

Die Koppelung wird normalerweise mit chemischen oder biologischen, z.B. enzymatischen, Reaktionen durchgeführt. Die Verbindung eines Antikörpers mit einem Epitop ist aber auch schon auf molekularbiologischer Ebene machbar. Ein konjugiertes Produkt kann exprimiert werden und einfach durch die Rekombination von Nukleinsäuren hergestellt werden. Solche Methoden sind im Sinne der Entwicklung durch diese Schritte charakterisiert:

- a) Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für den Antikörper einschließlich des Idiotyps eines tumor-assoziierten Antigens kodiert; und
 - b) Rekombination der besagten Nukleinsäure mit einer Nukleinsäure, die für ein Epitop eines tumor-assoziierten Antigens oder seiner Mimikry kodiert;
- oder
- a) Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für einen Antikörper kodiert; und
 - b) Rekombination der besagten Nukleinsäure mit einer oder mehrerer Nukleinsäuren, die für mindestens zwei Epitope von tumor-assoziierten Antigenen oder ihren Mimikrys kodieren.

Alternativ dazu kann der Träger, auf welchem die Erfindung basiert, zum Beispiel ein anti-idiotypischer Antikörper sein, also ein ab2, und/oder ein Antikörper, der die Spezifität für mindestens ein Epitop aus mindestens einem tumor-assoziierten Antigen, also ab1, trägt.

Beim Kopplungsverfahren werden die beiden Moleküle durch die Bildung einer kovalenten Bindung konjugiert. Ein Derivat, das sich vom herkömmlichen Antikörper unterscheidet, wird dazu synthetisiert. Die Kombination aus zwei naturgemäß komplett unterschiedlichen immunogenen TAA-Mimikrys gemäß der Erfindung erlaubt erstaunlicherweise eine extrem effiziente Immunisierung gegen tumor-assoziierte oder tumorspezifische Strukturen, sodass das endogene Immunsystem effizient gegen die entsprechenden Tumore geschützt oder in der Lage sein wird, diese Tumore zu bekämpfen.

Der Antikörper gemäß der Erfindung fungiert als Protein-Antigen-Träger, wie er zum Beispiel gemeinsam mit einem Kohlenhydratantigen vorhanden ist, um ein Konjugat

gemäß der Erfindung zu bilden. Es ist ebenso machbar, mehrere Kohlenhydrate im Konjugat gemäß der Erfindung bereitzustellen. Daher könnten mehrere verschiedene Glykane, die Immunantworten gegen zwei oder mehrere verschiedene tumor-assoziierte Kohlenhydratstrukturen auslösen, zum Beispiel an einen Antikörper gekoppelt werden. Ein solches Konjugat gibt es in der Natur nicht. Die autoantigenen Strukturen werden dabei als fremd erkannt, was zusätzlich die Immunogenität erhöht. Im Sinne der Erfindung kommt daher ein Konjugat dieser Art in seiner synthetischen Zusammensetzung weder sterisch noch funktionell in der Natur vor (z.B. in Tumorzellen). Entsprechend der Erfindung, führt die Koppelung zweier naturgemäß komplett unterschiedlicher Strukturen an ein Trägermolekül – zusätzlich zum Vorteil einer einfachen Formulierung des Impfstoffes – auch zu einem viel einfacheren Impfschema, weil derselbe Impfstoff bei beidem, der Eingangsimpfung und der nachfolgenden Auffrischungsimpfungen verabreicht werden kann.

Außerdem hängt die Erfindung mit einer Methode zum "immunogenisieren" von TAA-Epitopen oder deren Mimikrys zusammen. Dazu werden hauptsächlich niedrigmolekulare Epitope eines Antigens verwendet, die selbst kaum vom Immunsystem von Säugetieren, besonders dem des Menschen, erkannt werden würden. Die Immunogenisierung erfolgt so, dass das Antigen an einen Antikörper konjugiert wird, wobei der Antikörper als Träger fungiert. Durch diese Methode im Sinne der Erfindung ist es möglich, eine Vielzahl von Epitopen und natürlich besonders die Epitope der schon erwähnten Auswahl von Antigenen immunogen zu machen. Der hergestellte immunogene Antikörper im Sinne der Erfindung enthält möglichst das Epitop, gegen das immunisiert werden soll, und ein weiteres Epitop eines tumor-assoziierten Antigens.

Immunogenisierung ergibt ein Material, das erstaunlich gut für die Immunisierung von Patienten geeignet ist. Das Produkt, das durch die Erfindung erhalten wird, wird daher vorzugsweise als Impfstoff bereitgestellt.

Methoden, um geeignete antigene Strukturen nachzuweisen, zu modellieren und TAA-ähnliche Peptide, Polypeptide oder Proteine, oder Nukleinsäuren, die für diese kodieren, und ferner Lipoproteine, Glykolipide, Kohlenhydrate oder Lipide, sind dem sachkundigen Kunsthandwerker bekannt und können für die entsprechende Tumorstruktur ohne viel experimentellen Aufwand bereitgestellt werden. Weiters sind Methoden für die Konjugierung von Proteinen mit solchen Strukturen bekannt, die geeignete Methoden gemäß der Erfindung darstellen.

NACHGEREICHT

Die als Epitopmimikrys gewählten Kohlenhydratstrukturen können von natürlichen oder synthetischen Quellen stammen, bei denen die Kohlenhydrate als Glykoproteine oder Glykolipide vorliegen und als solche an das entsprechende Trägermolekül gekoppelt werden können.

Auch die Antikörperkomponenten können chemisch synthetisiert und anschließend mit Epitopstrukturen verbunden werden, oder gemeinsam synthetisiert werden. Nach der chemischen Synthese der Antikörper-Trägermoleküle ist es möglich, reaktive Gruppen an bestimmten Stellen anzuhängen, um sowohl das Ausmaß der Koppelung mit einem Epitop als auch die Art und Lage der Bindung steuern zu können.

Die Antikörper-Träger können auch mithilfe von Gentechnik als rekombinante Moleküle produziert werden. Es ist denkbar, diese Antikörper in Wirtszellen zu produzieren, die die Glykosylierung nicht beeinflussen (wie zum Beispiel *Escherichia coli*). Solche Polypeptide könnten dann chemisch oder enzymatisch an ein gewünschtes Kohlenhydratantigen gekoppelt werden.

Es ist aber auch vorstellbar, dass der Antikörper-Träger in Zellen hergestellt wird, die eine Glykosylierung des Moleküls durchführen können. Die genetische Modifikation von Nukleinsäuren, die für herkömmliche Antikörper kodieren, könnten zum Beispiel die Bildung von entsprechenden Glykosylierungsstellen im translatierten Molekül verursachen.

Die Glykosylierung eines solchen rekombinanten Genprodukts mit den entsprechenden tumor-assoziierten Glykanstrukturen kann durch genetisch modifizierten Zellen bewirkt werden, um passende Proteine zu glykosylieren. Solche Zellen können natürliche Isolate (Zellklone) sein, die durch adäquates Absuchen ("Screening") nach der gewünschten Glykosylierung gefunden werden können.

Aber es ist auch praktikabel, Zellen so zu modifizieren, dass sie die entsprechenden, für die gewünschte Glykosylierung notwendigen Enzyme exprimieren, sodass die gewünschte Glykosylierung genau so auf einem rekombinanten Polypeptid-Trägerprotein gefunden werden kann (Glycoconj. J. (1999), 16:81).

Es ist aber genauso möglich, die Glykosylierungsmuster der Proteine enzymatisch herzustellen oder zu modifizieren (Clin. Chem. Lab. Med. (1998), 36:373).

Im Tumorantigen-Träger-Konjugat gemäß der Erfindung können die verschiedenen Epitopstrukturen durch Verbindungsmoleküle aneinandergesetzt werden. Ein solcher "Linker" besteht nach Möglichkeit aus einem kurzen, bi-funktionellen

Molekül, wie z.B. N-Hydroxysuccinimid. Die Koppelung eines nitrophenylaktivierten Kohlenhydrats an die primären Aminogruppen des Trägers ist auch eine bevorzugte Methode der Koppelung gemäß der Erfindung. In einer weiteren bevorzugten Verfahrensform wird die Kopplung durch Sulfhydryl-Gruppen durchgeführt (Biochim. Biophys. Acta (1983), 761, 152-162). Beispiele von sulfhydryl-reaktiven Linkern sind BMH, DFDNB oder DPDPB. Aber der reaktive Linker kann auch durch größere chemische Verbindungen als ein einfaches Kopplermolekül gestellt werden. Die Voraussetzung ist dabei immer, dass ein solcher Koppler die immunologischen Eigenschaften des Konjugats nicht negativ beeinflusst, d.h. nicht selbst eine erhebliche Immunogenität auslöst. Gemäß der Erfindung könnte ein Koppler auch gleichsam "in situ" durch die chemische Umwandlung eines Teils des Antikörpers oder der Epitopstruktur, die konjugiert werden soll, produziert werden. Dieser an einem Antikörper oder einer Epitopstruktur direkt produzierte Koppler kann dann direkt an den entsprechenden anderen Bindungspartner konjugiert werden (z.B. über dieselbe Aminogruppe des Lysin, über OH-Gruppen, Schwefelgruppen, usw.). Kopplungsmethoden sind durch den Stand der Technik bekannt (Anal. Biochem, (1986) 156, 220-222; Proc. Natl. Acad. Sci., (1981), 78, 2086-2089; Biochem. Biophys. Res. Comm. (1983), 115, 29-37).

Gemäß einer besonderen Verfahrensform der vorliegenden Erfindung enthält der Antikörper gemäß der Erfindung ein Nukleinsäuremolekül, das für ein proteinisches TAA als Epitopstruktur im Sinne der vorliegenden Erfindung kodiert, wobei die Nukleinsäure kovalent gebunden ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein für die Tumorstimmung geeignetes Set. Das Set umfaßt eine Präparat einer Mehrkomponenten-Tumorstimmung gemäß der Erfindung und ein geeignetes Hilfsmittel für die Anwendung wie z.B. Spritzen, Infusionsinstrumente, usw. Wenn das Konjugatpräparat in lyophilisierter Form vorliegt, wird das Set außerdem noch eine geeignete Rekonstitutionslösung beinhalten, die unter Umständen spezielle Stabilisatoren oder Rekonstitutionsbeschleuniger enthält.

Die vorliegende Erfindung, mit der der immunogene Träger bereitgestellt wird, der mit mehreren unterschiedlichen Epitopstrukturen und speziell der Struktur eines tumor-assoziierten Kohlenhydratantigens gekoppelt ist, ermöglicht die Einleitung

einer Immunantwort mit zwei oder mehr Spezifitäten und kann so eine Tumorzelle über zwei oder mehrere unterschiedliche tumor-assoziierten Antigenen bekämpfen. Folglich wird die effektive Reichweite des Impfstoffs erweitert und spezifischer gestaltet.

Die Erfindung wird mit den folgenden Beispielen detaillierter erklärt, wobei diese sich nicht auf die Beispiele, die gebracht werden, oder die Zahlen in den Abbildungen, beschränkt.

Eine kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 erläutert Kohlehydrat- und Mucin-Antigene als attraktive Angriffsziele für die Krebsimpfung.

Abb. 2 zeigt, dass aufgrund der Heterogenität der TAA-Expression der Angriff auf mehrere Antigene gleichzeitig eine unentbehrliche Voraussetzung für therapeutische Effizienz ist.

Abb. 3 stellt die Kopplungschemie dar: Koppelung von nitrophenyl-aktivierten Liganden, wie synthetische Oligasaccharide oder Peptide mit einer Abstandhalter-Verbindung ("spacer"; sp), an hochimmunogene Proteinträger durch ein standardisiertes Kopplungsverfahren, zum Beispiel Kopplung an die primäre Aminogruppe des Trägerproteins.

Abb. 4 erklärt die Kopplung eines SialylTn-Kohlenhydratepitops an einen Proteinträger:

Kopplungschemie: Die Bindung von nitrophenylaktiviertem synthetischem, durch Abstandhalter ("spacer") verbundenem SialylTn an die primären Aminogruppen des Proteinträgers.

Abb. 5 zeigt die Charakterisierung des Kopplungsproduktes SialylTn-mAb17-1A durch LDS-PAGE, Western Blot und IEF.

NACHGEREICHT

Abb. 6 zeigt die Daten der Immunantwort gegen das Trägerprotein und SialylTn nach der Immunisierung mit der Mehrkomponenten-Tumorstoffvakzine mit und ohne Formulierung mit QS-21.

Abb. 7 zeigt die Spezifität der Immunantwort gegen SialylTn und den mAb17-1A-Träger.

Abb. 8 zeigt die induzierte Reaktivität gegen SialylTn-positive Tumorzellen (FACS-Analyse).

Abb. 9 zeigt die ADCC der induzierten Immunantwort auf die SialylTn-mAb17-1A-Mehrkosten-Tumorstoffvakzine gegen SialylTn-exprimierende OVCAR-3 Tumorzellen.

Abb. 10 zeigt das Binden der induzierten Immunantwort an KatoIII-Tumorzellen.

Abb. 11 zeigt die gemessene Zytokinabgabe nach Immunisierung mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkosten-Tumorstoffvakzine mit und ohne dem Adjuvans QS-21.

Abb. 12 zeigt, dass die Kinetik der Immunantwort gegen SialylTn mit dem vorübergehend abgegebenen Zytokinausstoß im Serum zeitlich übereinstimmt.

Abb. 13 zeigt die Lyse von KatoIII-Tumorzellen durch NK-Zellen nach *in vitro*-Aktivierung von humanen NK-Zellen durch Immserum von immunisierten Rhesusaffen.

Abb. 14 zeigt die Lyse von KatoIII-Tumorzellen durch aus Rhesusaffen gewonnenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach wiederholten Auffrischungsimpfungen.

Abb. 15 zeigt die Western Blot-Analyse vom Kopplungsprodukt LewisY-mAb17-1A.

Abb. 16 erläutert das Konzept anti-idiotypischer Antikörper, die tumor-assoziierte Antigene (Kohlenhydrate oder Peptide) als immunogenen Träger imitieren.

Beispiele

Beispiel 1

Kohlenhydrat- und Mucin-Antigene sind attraktive Angriffsziele für die Krebsimpfung.

Eine wachsende Datensammlung aus präklinischen und klinischen Studien zeigt, dass aktiv induzierte Antikörper oder Immuneffektorzellen eine entscheidende Rolle in der Krebstherapie haben könnten. Eliminierung von zirkulierenden Tumorzellen und Mikrometastasen oder Vernichtung von zurückgebliebenen Tumorzellen nach Operationen oder Strahlentherapie sind die Hauptangriffsziele von Krebsimmuntherapien.

Die Wahl eines oder mehrerer geeigneter Zielantigene, sogenannte tumor-assoziierte Antigene (TAAs), ist wesentlich für die Effizienz einer Immuntherapie. Kohlenhydrat- und Mucin-Antigene, die aus einer anomalen Glykosylierung in Tumorzellen entstehen, sind auf der Oberfläche von Tumorzellen vorhanden. Diese dienen als empfängliche Angriffspunkte für Immuntherapien in Forschungstieren und Krebspatienten.

Abb. 1

SialylTn ist ein gekapptes o-glykosyliertes, kurzes Kohlenhydrat aus einer abnormalen Glykosylierung des Mucins, charakteristisch für Krebszellen (rechte Seite) im Vergleich zu einer komplexeren Glykosylierung des Mucins wie es auf normalen Zellen vorkommt (linke Seite).

SialylTn ist in mehr als 80% aller Brust-, Darm-, Prostata-, Gebärmutter- und Eierstockkrebszellen exprimiert, aber keine oder sehr geringe Expression ist in den entsprechenden normalen Geweben vorhanden. Die SialylTn-Expression verschiedener epithelialen Krebsarten korreliert mit einem aggressiveren Phänotyp und schlechteren Prognosen.

Beispiel 2

Angriff auf mehrere Antigene gleichzeitig ist eine unentbehrliche Voraussetzung für therapeutische Effizienz

Die heterogene Expression der TAAs auf Krebszellen macht es erforderlich, dass mehr als ein Antigen für eine maximale Vernichtung von Tumorzellen angesprochen werden muß, ebenso um ein Risiko Ausbruchvarianten möglichst gering zu halten.

Weiters wäre es pharmazeutisch äußerst günstig, wenn man mehrere immunologische Ansätze auf einem einzigen Molekül vereinen könnte.

Abb. 2

Die Heterogenität in der TAA-Expression in dieser Abbildung zeigt das Auftreten von LewisY- und EpCam-Expression in unterschiedlichen Brustkrebsindikationen, wobei hier zwischen nur Lewis Y Expression, nur EpCAM Expression und einer Expression von beiden Antigenen gleichzeitig (Lewis Y und EpCAM) unterschieden wurde. Um einen therapeutischen Effekt in >50% der Tumore einer bestimmten Tumorindikation zu erreichen, weist eine auf einen einzigen Angriffspunkt zielende LewisY-spezifische Vakzine nur in zwei kleineren Indikationen (Tubulares Karzinom (50% „nur Lewis Y“ Expression plus 5% Expression „beide“ Antigene) und Papilläres Karzinom (33% „nur Lewis Y“ Expression plus 29% Expression „beide“ Antigene)) ausreichende Effizienz auf, was einen Anteil von <5% (bezogen auf die Anzahl gemessener Tubularer Karzinome von 36 plus Anzahl gemessener Papillärer Karzinome von 21 verglichen zur Gesamtanzahl aller gemessenen Brustkrebstumore von n=1226) aller gemessenen Brustkrebsarten darstellt. Entsprechend wird eine auf ein einzelnes Target zielende Anti-EpCAM-Vakzine ebenfalls nur bei 5 schwachen Indikationen, die weniger als 10% der Brustkrebsarten umfassen, effizient sein.

Ein bivalenter Impfstoff („Multi-Epitop-Vakzine“), das sowohl LewisY als auch EpCAM angreift, wird in den meisten (>75% der Brustkrebsarten) Brustkrebsindikationen Wirksamkeit haben. Dieses Beispiel zeigt, wie potent eine Vakzine ist, das mehr als ein Tumorantigen-Epitop anspricht.

Beispiel 3

Konjugatimpfstoff mit mehreren Tumorantigenen

Tumor-assoziierte Kohlenhydratepitope werden an immunogene Proteinträger gekoppelt, z.B. murine Antikörper, was zu einer erhöhten Immunogenität des Kohlenhydratantigens führt und T-Zell-Unterstützung bietet.

In einer optimalen Ausführung induziert das Trägermolekül selbst auch eine Tumorreaktion (z.B. MMA383 und mAb17-1A), was zusätzlich zur Immunantwort auf die Kohlenhydrat-TAAs eine starke Anti-Träger-Immunantwort hinzufügt. Auf jeden Fall wird das Koppeln von mehr als einem Kohlenhydrat-Antigen an einen immunogenen Träger eine Multi-Epitop-Vakzine bilden.

Gemäß dieser Erfindung ist eine Vielzahl an Trägermolekülen geeignet.

Während die vordergründige Absicht dieser Technologie eine Steigerung der Immunogenität von *per se* nicht-immunogenen Kohlenhydrat-Antigenen ist, bietet diese Technologie aber auch die Möglichkeit, zusätzliche immunogene Prinzipien zu nutzen, die durch das Trägermolekül zur Verfügung gestellt werden.

- Das Trägermolekül selbst ist in der Lage, eine bedeutende Immunantwort gegen tumor-assoziierte Epitope vermitteln, z.B. indem es anti-idiotypische Antikörper wie MMA383, ein für Lewis Y anti-idiotypischer Antikörper, dazu verwendet.
- Das Trägermolekül kann an Zelloberflächenstrukturen angreifen, was zu einer zusätzlichen Immunstimulation führt (z.B. *Diphtheria*-Toxin, Anti-TLR9-Ab: Ein Antikörper, der den auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) vorkommenden Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) mit einem potentiellen intrinsischen Adjuvans-Effekt angreift).

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Proteinträger, die sich selbst als Epitopträger für tumor-assoziierte Antigene zur Verfügung stellen, bevorzugt: EpCAM, CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, Folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs und BAGEs Proteine.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Antigene bevorzugt an die Trägerproteine gekoppelt: Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und GD2, GD3, GM1 und GM2.

Abb. 3

Kopplungschemie: Bindung von nitrophenyl-aktivierten Liganden wie synthetische Oligosaccharide, chemische Funktionseinheiten oder Peptide mit einer Abstandhalterverbindung (sp) an hochimmunogene Proteinträger durch ein standardisiertes Kopplungsverfahren, zum Beispiel Kopplung an die primäre Aminogruppe des Trägerproteins.

Beispiel 4

Kopplung des SialylTn-Kohlenhydrates an einen EpCAM-spezifischen Antikörper (mAb17-1A) und Formulierung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine.

Methoden:

Kopplung des SialylTn-Kohlenhydrats an mAb17-1A

Das SialylTn-Kohlenhydrat-Antigen wurde an den mAb17-1A (murines IgG2a) Proteinträger in einem molaren Verhältnis von SialylTn zu mAb17-1A von 18:1 gekoppelt, indem 10mg des mit Abstandhalter ("spacer") nitrophenyliertem SialylTn, Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄COO-(p-NO₂C₆H₄) (MW 819 g/mol, Lectinity, Finnland) mit 100mg des mAb17-1A in Reaktion gebracht wurden. In Kürze, 100mg des mAb17-1A (10mg/ml) wurden zweimal bei 4°C 20h lang gegen 700ml Kopplungspuffer (0,1M Na-PO₄, 0,15M NaCl, pH 8,5) dialysiert, wobei "Slide-A-Lyzer"-Dialysierkassetten (Pierce) mit einer MWCO (Molekulargewicht-Durchlaßgrenze) von 10K verwendet wurden. Die Konzentration des mAb17-1A wurde mittels Größenausschlußchromatographie (SEC) bestimmt. Parallel dazu wurden 10ml des Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄COO-(p-NO₂C₆H₄)-Moleküls in 300µl DMF gelöst und dem eisgekühlten mAb17-1A zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 4°C rotierend inkubiert. Die Kinetik der Reaktion wurde durch die Analyse der Größe durch SEC (Größenausschlußchromatographie)

des Kopplungsprodukts kontrolliert. Nach 28h wurde die Reaktionsmischung bei 4°C gegen Formulierungspuffer (1 mM Na-PO₄, 0,86% NaCl, pH 6) in "Slide-A-Lyzer"-Dialysierkassetten (Pierce) 20 h lang dialysiert. Zum Vergleich wurde ungekoppelter mAb17-1A daneben genauso aufgearbeitet. Die Kopplungsprodukte SialylTn-mAb17-1A wurden durch Größenausschlußchromatographie, LDS-PAGE, Western Blot, Isoelektrische Fokussierung (IEF) und Resorcin-Untersuchung analysiert.

Die Analyse der Kopplungsprodukte (Tumor-Antigen-Trägerkonjugate)

Größenausschlußchromatographie

Die Konzentrationen der SialylTn-mAb17-1A-Kopplungsprodukte wurden durch Größenausschlußchromatographie (SEC) an einer ZORBAX GF-250-Säule in einem Dionex-System und an einer TSK-Gel G3000SW-Säule in einem HP1100-System quantitativ bestimmt.

IEF, LDS-PAGE und Western Blots

SialylTn-mAb17-1A-Kopplungsprodukte wurden durch horizontale SERVALYT PRECOTES-Flachbett-IEF-Elektrophorese pH 3-10 (SERVA), gefolgt von einer Coomassieblau-Färbung (Invitrogen) und einer Lithium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE, NuPAGE-Elektrophoresesystem, Bis-Tris-Gel, 4-10%) unter reduzierenden Bedingungen (DTT, 1,4-Dithiothretiol) und anschließender SilverXpress™-Färbung (Invitrogen) analysiert.

Für die Western Blot-Analyse wurden die Proben nach der LDS-PAGE (25V; 1,1W; 1,5h) auf Immobilon-Membranen (PVDF 0,45µm; Millipore) überführt. Die Membranen wurden mit 3%iger Magermilch blockiert und mit einem Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L)-HRP-Konjugat (1:1000; Zymed) beziehungsweise mit Anti-SialylTn CD175s (IgG1) (10µg/ml, DAKO) und einem Ratte-anti-Maus IgG1-HRP-Konjugat (1:1000, Becton Dickinson) gefärbt.

Quantitative Bestimmung von Sialsäure mittels Resorcin-Untersuchung

Die Sialsäuremenge in den Kopplungsprodukten wurde durch eine Resorcin-HCl-Reaktion in Gegenwart von CuSO₄ und durch spektrometrische Messung der Absorption bei 562nm bestimmt. In Kürze, 0,15ml Probe und 0,15ml Resorcin-Reagens (2% Resorcin, 2,5mM CuSO₄, HCl (37%)) wurden in dichtverschlossenen

Glasfläschchen gemischt und bei 100°C 1 h lang inkubiert. Die Farbreaktion wurde als Absorption bei 562nm (Spectrophotometer Ultrospec II, LKB Biochrom) gemessen. Als Standard wurden 1,25-25µg/ml einer "SialylTn-Mischung" (bestehend aus Sialsäure, d.h. N-Acetylneuraminsäure, und GalNAc in einem molaren Verhältnis von 1:1) für die Kalibration verwendet.

Formulierung der Mehrkomponenten-Tumorvakzine

500µg des SialylTn-mAb17-1A-Konjugats wurden an 1,67mg Aluminiumhydroxid in 0,5ml Formulierungspuffer (1mM Na-PO₄, 0.86% NaCl, pH6) adsorbiert. Der Impfstoff wurde entweder ohne zusätzliches Adjuvans verwendet, oder in einer gemeinsamen Formulierung mit 100µg QS-21-Adjuvans (Antigenics Inc., Lexington, MA).

LAL-Untersuchung

Die Endotoxinmenge in den Vakzinformulierungen wurden durch Limulus-Amöbozytenlysat-Untersuchung ("Limulus Amebocyte Lysate-EndochromeTM-Test", Charles River Endosafe) laut Hersteller abgeschätzt. Keine der endgültigen Impfstoff-Formulierungen enthielt nachweisbare Mengen an Endotoxin.

Pyrogentest in Kaninchen

Endgültige Vakzinformulierungen wurden durch i.v.-Verabreichung in Kaninchen einem Pyrogentest ausgesetzt. Die Formulierungen, die für diese Studie verwendet wurden, waren negativ in bezug auf den Pyrogentest, wonach die Summe des individuell in drei Kaninschen aufgenommenen Temperaturanstiegs 0°C war (ohne zusätzliches Adjuvans) und +0,3°C bei der adjuvans-begleiteten Impfstoff-Formulierung.

Ergebnisse:

Nitrophenyl-aktivierter, durch Abstandhalter ("spacer") verbundene SialylTn wurde mit mAb17-1A in einem molaren Verhältnis von 18:1 zur Reaktion gebracht. Die Kinetik der Reaktion wurde mithilfe von SEC kontrolliert, und die Reaktion wurde gestoppt, wenn kein weiterer Anstieg der Größe des Kopplungsproduktes zu verzeichnen war. Das SialylTn-mAb17-1A-Kopplungsprodukt wurde mittels LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen gefolgt von einer Silberfärbung (Abb. 5A)

und Western Blot gefärbt mit Anti-SialylTn CD175s (IgG1) und Ratte-anti-Maus IgG1-HRP (Abb. 5B) analysiert. Die LDS-PAGE zeigt eine Steigerung des Molekulargewichts der schweren Ketten (50kDa) und der leichten Ketten (25kDa) in den Kopplungsprodukten (A: Bahnen 3, 5, 7 und 9 im Vergleich zum ungekoppelten mAb17-1A, Bahnen 2, 4, 6 und 8), was anzeigt, dass SialylTn an beide gekoppelt wurde, schwere und leichte Ketten des mAb17-1A. Eine Western Blot-Analyse zeigt, dass SialylTn in den SialylTn-mAb17-1A-Kopplungsprodukten, nicht jedoch im mAb17-1A nachweisbar ist (Abb. 5B, Bahnen 2, 4 und 6 vs. Bahnen 1, 3 und 5 (ungekoppelter mAb17-1A)). Die Kopplung des (negativ geladenen) SialylTn an den mAb17-1A hat eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts zur Folge, wie durch IEF dargelegt wurde (Abb. 5C, Bahn 2: SialylTn-mAb17-1A, Bahn 3: mAb17-1A). Das molare Verhältnis von SialylTn zum mAb17-1A im Kopplungsprodukt wurde unter Verwendung der Resorcin-Untersuchung quantitativ bestimmt. In dieser Untersuchung wird die Menge an Sialsäure in den Kopplungsprodukten durch Resorcin-HCl-Reaktion in Gegenwart von CuSO_4 bestimmt. Ein molares Verhältnis von SialylTn zu mAb17-1A von etwa 14:1 im Kopplungsprodukt wurde per Resorcin-Untersuchung bestimmt.

Das SialylTn-mAb17-1A-Kopplungsprodukt (500 μg) wurde an Aluminiumhydroxid adsorbiert und in sterile Röhrchen aliquotiert. Die an Aluminium adsorbierte Mehrkomponentenvakzine wurde entweder ohne zusätzliches Adjuvans verwendet, oder in einer gemeinsamen Formulierung mit 100 μg des Adjuvans QS-21. Die Vakzinformulierungen wurden auf Spuren von Endotoxin mittels Limulus-Amöbozytenlysat untersucht, und durch i.v.-Verabreichung in Kaninchen auf Pyrogenität getestet.

Es konnten weder erhöhte Endotoxinwerte noch signifikante Pyrogenität nachgewiesen werden.

Abb. 4

Kopplung des SialylTn-Kohlenhydrat-Epitops an einen Proteinträger:

Die Bindung von nitrophenylaktiviertem synthetischem, durch Abstandhalter ("spacer") verbundenem SialylTn an die primäre Aminogruppe des Proteinträgers (z.B. muriner monoklonaler EpCAM Bindungsantikörper mAb17-1A), gefolgt von

einem Reinigungsschritt, einem Formulierungsschritt mit Aluminiumhydroxid und einer Ko-Formulierung mit weiteren Adjuvantien, z.B. QS-21

Abb. 5 Charakterisierung des Kopplungsproduktes SialylTn-mAb17-1A durch LDS-PAGE, Western Blot und IEF

Unkonjugierter mAb17-1A und SialylTn-mAb17-1A wurden einer LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen unterworfen, gefolgt von einer Silberfärbung (A: mAb17-1A (Bahnen 2,4,6 und 8) and SialylTn-mAb17-1A (Bahnen 3,5,7 und 9), jeweils zwei Verdünnungsreihen; Standardmarker: 1 und 10), oder durch Western Blotting mit einer Anti-SialylTn CD175s (mIgG1)- und Ratte-anti-Maus IgG1-HRP-Färbung (B: mAb17-1A (Bahnen 1,3,5 und 7) and SialylTn-mAb17-1A (Bahnen 2,4,6 und 8), Positivkontrolle: Bahn 9, Standardmarker: Bahn 10).

Schwere (50kDa) und leichte (25kDa) Ketten von mAb17-1A oder konjugierter SialylTn-mAb17-1A können unter reduzierenden Bedingungen erkannt werden (A,B). Nichtkonjugierter mAb17-1A und SialylTn-mAb17-1A wurden ebenfalls einer IEF-PAGE unterzogen und mit Coomassieblau gefärbt (C: SialylTn-mAb17-1A (Bahn 2) und mAb17-1A (Bahn 3), Marker (Bahnen 1, 4 und 5)).

Beispiel 5:

Immunisierung von Rhesusaffen mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffe und Analyse der induzierten Immunantwort gegen Träger und gekoppeltes Tumorstoffe (SialylTn): Effekt von zusätzlichem Adjuvans (QS-21)

Methoden:

Immunisierungsstudie mit Rhesusaffen

Sicherheit, Verträglichkeit und Immunogenität von mehreren subkutanen Injektionen der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffe wurden in Impfstudien in Rhesusaffen bewertet. Alle Tierstudien wurden unter kontrollierten und dokumentierten Bedingungen entsprechend den Richtlinien der Tiergesundheitsfürsorge bei Biotest Ltd., Konarovice, Tschechische Republik, durchgeführt. Pro Gruppe wurden vier gesunde erwachsene Rhesusaffen (abgestimmt nach Alter und Geschlecht, Gruppe I: #152, #258, #292 und #330 und Gruppe II: #38,

#269, #308 und #382, mit beziehungsweise ohne QS-21) an den Tagen (d) 1, 15, 29 und 57 durch subkutane Injektion geimpft und noch eine Auffrischung am d226 ("boost"). Vollblutproben wurden vor (d -7 und d -3) und nach den Immunisierungen (Tage 15, 22, 29, 43, 57, 71, 85 und 99), d226 (nach der Auffrischung) und d240 (zwei Wochen nach der Auffrischung) für Serumanalytik entnommen.

In einer zweiten Rhesusaffenstudie wurden die Tiere – vier Tiere pro Gruppe (#31, #48, #76 und #318) – mit vier Anfangsimmunisierungen mit QS-21-mitformuliertem SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Impfstoff an den Tagen (d) 1, 21, 49 und 76 geimpft. Vor (d1) und nach Immunisierung (d38, d60 und d86) werden für eine PBMC-Aufbereitung Blutproben heparinisiert abgenommen.

Alle Immunisierungen wurden von allen Tieren gut und ohne Anzeichen von systemischer oder lokaler Toxizität, die mit einer der Immunisierungen in Verbindung stehen könnte, vertragen.

ELISA für Immunreaktivität gegen mAb17-1A

"Präseren" und "Immunseren" der Rhesusaffen, also die Seren, die vor beziehungsweise nach Immunisierung gewonnen wurden, wurden hinsichtlich der induzierten Immunantwort gegen mAb17-1A mittels ELISA analysiert. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) wurden mit 10µg/ml mAb17-1A beschichtet. Die Nüpfchen wurden mit 10%FCS in PBS 1 h lang bei 37°C blockiert, und die in PBS mit 2%FCS vorverdünnten Proben danach 1,5h lang bei 37°C inkubiert. Eine positives Kontrollserum (von einem Rhesusaffen stammend, der mit auf Alhydrogel formuliertem mAb17-1A immunisiert worden war) mit einer bekannten Reaktivität gegen mAb17-1A wurde mitgetestet und für die Normalisation der OD-Werte zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion wurden die Platten mit einem 1:2000 verdünnten Schaf-anti-Human IgG-(γ-Kette)-HRP-Konjugat (Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte mit dem Substrat OPD (10mg OPD wurden in 25ml Färbepuffer gelöst, dem 10µl 30%iges H₂O₂ zugefügt wurden), wurde durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (30%) gestoppt, und die Farbintensität wurde bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Der Titer wurde als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1.0 auf einer Titrationskurve ergab. Die Kurvendiskussion wurde mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

NACHGEREICHT

SialylTn-PAA ELISA

Präserum und Immunseren der Rhesusaffen wurden mittels SialylTn-PAA-ELISA auf Reaktivität gegen das synthetische SialylTn-Kohlenhydratantigen getestet. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) wurden mit 10µg/ml SialylTn-PAA (Lectinity, Finnland) beschichtet. Die Nüpfchen wurden mit PBS, das 10% FCS enthielt, 1 h bei 37°C blockiert. Die Serumproben wurden in PBS mit 2%FCS und 5% Glucose vorverdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen SialylTn wurde für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion wurden die Platten mit 1:2000 verdünntem Maus-anti-Human IgM-HRP-Konjugat (Southern Biotechnology) beziehungsweise 1:2000 verdünntem Schaf-anti-Human IgG-(γ-Kette)-HRP-Konjugat (Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte mit dem Substrat OPD (10mg OPD wurden in 25ml Färbepuffer gelöst, dem 10µl 30%iges H₂O₂ zugefügt wurden), wurde durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (30%) gestoppt und die Farbtintensität wurde bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Titer wurden als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1,0 auf einer Titrationskurve ergab. Die Kurvendiskussion wurde mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

Ergebnisse:

Immunisierung der Rhesusaffen mit SialylTn-mAb17-1A in Gegenwart oder Abwesenheit des Adjuvans QS-21.

Das SialylTn-mAb17-1A-Konjugat wurde auf Alhydrogel entweder mit oder ohne Adjuvans QS-21 formuliert. Verabreichung beider Vakzinformulierungen an Rhesusaffen wurde von allen Tieren gut vertragen. Die Immunantworten gegen das SialylTn-Kohlenhydratantigen (IgG, IgM) und das mAb17-1A Trägerprotein (IgG) wurden durch entsprechenden ELISA analysiert. Die Zusammenfassung der Daten der Anti-SialylTn-Immunantwort und die Immunantwort gegen das mAb17-1A-Trägermolekül sind in Abb. 6 dargestellt. Beide Impfstoffe haben hohe IgG-Titer gegen das Trägermolekül erzeugt. In Anwesenheit von QS-21 zeigte die Immunantwort gegen das Trägermolekül einen etwas schnelleren Start (signifikante Titer bei Tag 15 mit QS-21 gegen d22 ohne QS-21) und etwa 5-10fach höhere Titterspitzen im Vergleich zur Vakzine ohne QS-21. Eine ähnliche Kinetik konnte bei

der IgM-Antwort gegen SialylTn beobachtet werden, mit einem schnelleren Beginn und etwa 10fach höheren IgM-Titer bei Anwesenheit von Adjuvans QS-21. Der drastischste Effekt von Adjuvans QS-21 war die Induktion einer ausgeprägten SialylTn-spezifischen IgG-Antwort in der QS-21-geförderten Gruppe. In drei von vier Tieren war eine SialylTn-spezifische IgG-Antwort ab dem Tag 29 messbar, also 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung. In einem Tier (#308) wurde eine SialylTn-spezifische IgG-Antwort erst nach der 5. Immunisierung gefunden. Wie erwartet war eine ein- bis zweiwöchige Verzögerung der Anti-SialylTn IgG-Immunantwort festzustellen, im Vergleich zur Anti-SialylTn IgM-, und IgG-Antwort gegen den Träger (Abb. 6A). Hingegen wurde kein SialylTn-spezifisches IgG in der ohne Adjuvans QS-21-immunisierten Gruppe erzeugt.

Abb. 6 Immunantwort gegen das Trägerprotein und SialylTn nach Immunisierung mit dem SialylTn-mAb17-1A-Impfstoff mit und ohne Formulierung mit QS-21.

Rhesusaffen (vier Tiere pro Gruppe) wurden mit SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Impfstoff mit (A) oder ohne (B) Adjuvans QS-21 an den Tagen 1, 15, 29 und 57 und einmal an d226 aufgefrischt ("boost"). Präseren und Immunseren wurden mittels ELISA auf eine Immunantwort analysiert. Die Kinetik der Immunantworten, d.h. Antikörpertiter (geometrisches Mittel und Streufaktor) gegen SialylTn (IgG, IgM) und mAb17-1A (IgG) sind dargestellt. Statistische Auswertung:

* $p < 0,05$ gegenüber Präserum (einseitig, gepaarter t-Test).

Beispiel 6:

Spezifität der hervorgerufenen Anti-SialylTn-Immunantwort

Methoden:

ELISA für die Immunreaktivität gegen mAb17-1A

Präseren und Immunseren der Rhesusaffen wurden bezüglich der erzeugten Immunantwort gegen mAb17-1A einer Analyse durch ELISA unterzogen. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) wurden mit 10µg/ml mAb17-1A beschichtet. Die ELISA-Platten wurden mit 10%FCS in PBS blockiert (1h, 37°C), und die in PBS mit 2%FCS vorverdünnten Proben danach 1.5h lang bei 37°C inkubiert. Eine

positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen mAb17-1A wurde mitgetestet und für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion wurden die Platten mit Schaf-anti-Human IgG-(γ -Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD gelöst in 25ml Färbepuffer + 10 μ l 30% H₂O₂) wurde durch Zugabe von 50 μ l H₂SO₄ (30%) gestoppt. Die Absorption wurde bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Der Titer wurde als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1,0 auf einer Titrationskurve ergab. Die Kurvendiskussion wurde mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

SialylTn-PAA ELISA

Präserum und Immunseren der Rhesusaffen wurden mittels SialylTn-PAA-ELISA auf Reaktivität gegen das synthetische SialylTn-Kohlenhydrat-Antigen getestet. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) wurden mit 10 μ g/ml SialylTn-PAA (Lectinity, Finnland) beschichtet. Die Platten wurden mit PBS, das 10% FCS enthielt, 1 h bei 37°C blockiert. Die Serumproben wurden in PBS mit 2%FCS und 5% Glucose vorverdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen SialylTn wurde für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion wurden die Platten mit Maus-anti-Human IgM-HRP-Konjugat (1:2000, SB, Southern Biotechnology) beziehungsweise Schaf-anti-Human IgG-(γ -Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD gelöst in 25ml Färbepuffer + 10 μ l 30% H₂O₂) wurde durch Zugabe von 50 μ l H₂SO₄ (30%) gestoppt. Die Absorption wurde bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Titer wurden als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1,0 und OD=0,5 für IgM beziehungsweise IgG ergab. Die Kurvendiskussion wurde mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

Depletionsexperiment:

Immunserum (IS) wurde durch Inkubation mit Sepharoseperlen, an die mAb17-1A (mAb), SialylTn-mAb17-1A, SialylTn-HSA, HSA beziehungsweise LeY-HSA gekoppelt worden war, depletiert.

Der Antikörpertiter gegen SialylTn (A) oder mAb17-1A (B) in Präserum (PS) oder Immunserum (IS) oder Immunserum nach der Depletion wurden mittels ELISA gemessen.

Ergebnisse:

Spezifität der Anti-SialylTn-Antwort und Anti-Träger-Antworten

Die Spezifität der Anti-SialylTn-Antwort, die durch Immunisierung von Rhesusaffen mit der SialylTn-mAb17-1A- Mehrkomponenten-Tumorstoffvakzine erzeugt worden war, wurde durch Depletionsexperimente getestet: Immunserum (IS) wurde mit Sepharoseperlen inkubiert, die je nachdem entweder mit SialylTn-mAb17-1A, mAb17-1A, SialylTn-HSA, HSA oder LeY-HSA gekoppelt waren. Präserum (PS) oder Immunserum (IS) oder depletierte Immunserum wurden auf ihre Bindung an SialylTn in einem SialylTn-PAA-ELISA getestet. Die im IS messbare induzierte Immunantwort wurde durch Depletion mit SialylTn-mAb17-1A oder SialylTn-HSA-Sepharoseperlen signifikant erniedrigt, nicht aber mit mAb17-1A, HSA oder HSA-LeY-Sepharoseperlen, wobei HSA an das unbeteiligte Kohlenhydratantigen LeY gekoppelt und als Kontrolle eingesetzt worden war (Abb. 7 A (obere Graphik)).

Spezifität gegen den Träger, also Anti-mAb17-1A-Immunantwort, die durch Immunisierungen von Rhesusaffen mit der SialylTn-mAb17-1A- Mehrkomponenten-Tumorstoffvakzine erzeugt wurde, wurde auch durch Depletionsversuche getestet: Immunserum (IS) wurde mit Sepharoseperlen inkubiert, die mit SialylTn-mAb17-1A, mAb17-1A, SialylTn-HSA, HSA oder LeY-HSA gekoppelt worden waren. Unbehandelte Präserum (PS) oder Immunserum (IS) oder depletierte Immunserum wurden per ELISA auf ihre Bindung an mAb17-1A untersucht. Die im IS messbare induzierte Immunantwort wurde durch Depletion mit mAb17-1A oder SialylTn-mAb17-1A -Sepharoseperlen signifikant erniedrigt, nicht jedoch mit HSA-SialylTn, HSA oder HSA-LeY-Sepharoseperlen, (Abb. 7B (untere Graphik)).

Abb. 7 Spezifität der Immunantwort gegen SialylTn und den mAb17-1A-Träger

Die Spezifität der Immunantwort gegen das SialylTn-Kohlenhydrat-Antigen (A) und mAb17-1A-Trägerprotein (B) wurde durch Depletionsversuche gezeigt. Im Präserum (PS) oder Immunsrum (IS), oder Immunsrum, das durch Inkubation mit je nachdem entweder mit mAb17-1A (mAb), SialylTn-mAb17-1A, SialylTn-HSA, HSA oder LeY-HSA gekoppelten Sepharoseperlen depletiert worden war, wurden die Antikörpertiter gegen SialylTN (A) oder mAb17-1A (B) im ELISA gemessen. Die Zusammenfassung der Daten (geometrisches Mittel und Streufaktor) von vier Rhesusaffen sind dargestellt. Statistische Auswertung: * $p < 0,05$ gegen IS und ** $p < 0,01$ gegen IS (einseitig, gepaarter t-Test).

Beispiel 7:

Reaktivität der hervorgerufenen Immunantwort mit natürlichen Tumorzielen: OSM (Ovine submaxillary Mucin – Schafsunterkiefermucin)

Methoden:

“Ovine submaxillary mucin” (OSM)-ELISA

Präseren und Immunsrumen von Rhesusaffen wurden hinsichtlich ihrer Immunantwort auf OSM getestet, das ein natürliches SialylTn-hochexprimierendes Substrat darstellt. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) wurden mit $10\mu\text{g/ml}$ OSM beschichtet. Die Platten wurden mit 10% FCS 1 h bei 37°C blockiert, gefolgt von einem Wasch-Schritt. Die Serumproben wurden in PBS mit 2% FCS vorverdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen OSM wurde mitgetestet und für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion wurden die Platten mit Maus-anti-Human IgM-HRP-Konjugat (1:2000, SB, Southern Biotechnology) beziehungsweise Schaf-anti-Human IgG-(γ -Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD gelöst in 25ml Färbepuffer + $10\mu\text{l}$ 30% H_2O_2) wurde durch Zugabe von $50\mu\text{l}$ H_2SO_4 (30%) gestoppt. Die Absorption wurde bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Titer wurden als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von $\text{OD}=1,0$ und $\text{OD}=0,5$ für IgM beziehungsweise IgG ergab. Die Kurvendiskussion wurde mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

NACHGEREICHT

Ergebnisse:

Signifikante Antikörpertiter gegen OSM (IgM) konnten im Immunserum von allen Rhesusaffen nachgewiesen werden, die mit SialylTn-mAb17-1A plus QS-21 geimpft worden waren. Die Serentiter gegen IgM hatten ihre Höchstwerte nach der zweiten Immunisierung. In drei von vier Tieren wurden auch geringe IgG-Titer gegen OSM nach der 3. Immunisierung erzeugt (Daten hier nicht dargestellt).

Beispiel 8:

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort mit natürlichen Angriffszielen:
Bindung an SialylTn-positive Tumorzellen (FACS-Analyse)

Methoden:

Immunantwort gegen Tumorzellen (FACS-Analyse):

Die Bindung von Immunseren von Rhesusaffen an Tumorzellen wurde durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACScan (Becton Dickinson) gemessen. OVCAR-3-Zellen (Eierstock-Adenokarzinomzellen; ATCC, HTB-161) wurden mit Serum (1:40 verdünnt in PBS mit 2% FCS) 2 h lang auf Eis inkubiert. Zur Detektion wurde ein Ziegen-F(ab')₂-anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet. Prä- und Immunseren wurden nebeneinander analysiert. Hintergrundbindung von Präseren wurde auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Ergebnisse:

Die Immunantwort gegen das natürliche Angriffsziel, SialylTn-positive Tumorzellen, wurde getestet. Präserum und Immunserum von Rhesusaffen, die mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorvakzine plus QS-21 immunisiert worden waren, wurde nach ihrer Bindung an SialylTn-positive OVCAR-3-Zellen mittels FACS analysiert. Histogramme von IgG- und IgM-Bindung an OVCAR-3-Zellen werden für die SialylTn-mAb17-1A-Vakzine dargestellt (Abb. 8A). Ein statistisch

signifikanter Anstieg der Zellbindung an OVCAR-3-Zellen (sowohl IgG als auch IgM) wurde festgestellt ($p < 0,05$, gepaarter t-Test) (Abb. 8B).

Abb. 8 Induzierte Reaktivität gegen SialylTn-positive Tumorzellen (FACS-Analyse).

Rhesusaffen wurden mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoff plus QS-21 immunisiert. Präserum und Immunsereen wurden auf ihre Bindung an SialylTn-positive OVCAR-3-Zellen durch FACS-Analyse getestet. (A) Histogramme für eine IgM-Bindung (linke Seite) und IgG-Bindung (rechte Seite) an OVCAR-3-Zellen ist abgebildet, wobei das Immunsereum (schwarze Linie) das Präserum überlagert (graue durchgehende Linie). Punktierte Linie: ungefärbte Kontrolle.

(B) Präserum und Immunsereen wurden auf ihre Bindung an SialylTn-positive OVCAR-3-Tumorzellen mithilfe von FACS-Analyse getestet. Die Daten von vier Rhesusaffen sind zu sehen. Statistische Auswertung: $*p < 0,05$ gegen Präserum (einseitig, gepaarter t-Test).

Beispiel 9:

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort bei natürlichen Angriffszellen: Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen SialylTn-positive Tumorzellen.

Methoden:

Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wird durch die Messung der Chromfreisetzung bei der Zell-Lyse bestimmt

Präserum und Immunsereen von vier Rhesusaffen, die mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoff immunisiert worden waren, wurden auf ADCC gegen SialylTn-positive OVCAR-3-Zellen getestet. Humane PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet und mit den Zielzellen in zwei Effektor : Zielzellen (E:T)-Verhältnissen, d.h. 60:1 und 20:1, 14 h lang inkubiert. Die Freisetzung von ^{51}Cr wurde am γ -Zähler gemessen.

Ergebnisse:

NACHGEREICHT

Während unterschiedliche Ausgangsmengen an lytischer Aktivität in verschiedenen Tieren gefunden wurden, war eine eindeutige Erhöhung der ADCC-Aktivität in den Immunseren (IS) von allen Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Präseren (PS) zu erkennen (Abb. 9).

Abb. 9 ADCC der induzierten Immunantwort auf die SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffe gegen SialylTn-exprimierende OVCAR-3 Tumorzellen.

Rhesusaffen wurden mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffe immunisiert. Präserum und Immunserum wurde auf ADCC gegen SialylTn-positive OVCAR-3-Zellen getestet. Humane PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet und mit den ^{51}Cr -markierten Zielzellen in Effektor : Zielzellen (E:T)-Verhältnissen von 60:1 und 20:1 14h lang inkubiert. Die Freisetzung von ^{51}Cr wurde am γ -Zähler gemessen.

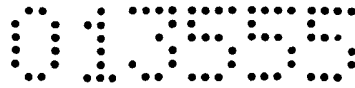
Beispiel 10:

Reaktivität von induzierter Immunantwort mit natürlichen Angriffszielen: Auch Bindung an SialylTn-negative Tumorzellen (FACS-Analyse) – Korrelation mit der Reaktivität gegen den Träger

Methoden:

Immunantwort gegen Tumorzellen (FACS-Analyse):

Die Bindung der Immunseren von Rhesusaffen an Tumorzellen wurde durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACSCalibur (Becton Dickinson) gemessen. KatoIII-Tumorzellen wurden 2 h lang auf Eis mit Serum inkubiert (1:40 verdünnt in PBS mit 2% FCS). Zur Detektion wurde ein Ziegen F(ab')_2 -anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet. Prä- und Immunseren wurden nebeneinander getestet. Hintergrundbindung von Präseren



wurde auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Ergebnisse:

Auch gegen KATOIII, Tumorzellen, die SialylTn-negativ sind, konnte durch eine FACS-Analyse eine Immunantwort entdeckt werden. Eine statistisch signifikante Steigerung der Zellbindung an KATOIII-Tumorzellen (IgG) wurde nachgewiesen ($p < 0,05$, gepaarter t-Test).

Die Kinetik der gefundenen durch Immunisierung hervorgerufen KATOIII-Bindungsreaktivität korreliert mit der Kinetik der hervorgerufenen Immunantwort gegen das Trägermolekül (siehe Abb. 6).

Abb. 10

Das Binden der induzierten Immunantwort an KATOIII-Tumorzellen.

Rhesusaffen wurden mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffvakzine immunisiert. Präserum und Immunseren wurden auf ihre Bindung an KATOIII-Tumorzellen mittels FACS-Analyse getestet. Die Daten von vier Rhesusaffen sind dargestellt. Statistische Auswertung: $*p < 0,05$ gegen Präserum (einseitig, gepaarter t-Test).

Beispiel 11:

Zytokinabgabe in Serum nach Vakzinierung

Methoden: Zytokinabgabe (xMAP Luminex Multiplex):

Präserum und Immunseren wurden auf Zytokine (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF α , IFN γ und GM-CSF) mithilfe der xMAP Multiplex-Technologie (Luminex) unter Verwendung des "Beadlyte Human Multi-Cytokine Detection System 3" (Beadlyte™ Humanes Multizytokin-Detektionssystem 3) (Upstate) gemäß der Anleitung des Herstellers getestet. In Kürze, 25 μ l Serumprobe wurden mit 25 μ l Probenpuffer und einer Mischung aus an "Beads" (farbgefüllte Plastik Kügelchen)

gekoppelten Anti-Humanzytokinantikörpern 2 h lang bei 25°C abgedunkelt inkubiert. Nach Zugabe von biotinyliertem Anti-Humanzytokin-Detektionsantikörpern und 1.5 h langer Inkubation, wurde die Flüssigkeit entfernt und Streptavidin-Phycoerythrin wurde hinzugefügt. Anschließend wurden die "Beads" mit Probenpuffer gewaschen. Das ausgesendete Fluoreszenzsignal (MFI) wird mit einem Luminex 100-Lesegerät gemessen (Einstellungen: 50 Ereignisse pro Bead, 50µl Probengröße, Ausschluß ("Gate"): 7500-13000 MFI).

Ergebnisse:

Zytokinabgabe in Serum nach wiederholter Vakzinierung

Das Serumzytokinprofil über den Zeitraum der Immunisierungen wurde unter Verwendung der xMAP-Multiplextechnologie (Abb. 11) gemessen. Außer der detektierbaren Mengen des Chemokins IL-8 wurden keine signifikanten Zytokinmengen im Präserum (d.h. vor Immunisierung) von gesunden Rhesusaffen gefunden. Ebenso wurden nach der ersten Immunisierung keine nennenswerten Zytokinmengen gemessen. Ab Anfang von Tag 22, d.h. eine Woche nach der zweiten Immunisierung, konnten geringe Mengen IFN γ entdeckt werden. Darüberhinaus wurden nach der 3. und 4. Immunisierung (Tag 43 beziehungsweise 71) signifikante Mengen an IFN γ , IL-8, IL-1 β , TNF α , IL-2, GM-CSF und IL-4 im Serum der Tiere, die mit der Vakzine mit Adjuvans QS-21 immunisiert worden waren, gemessen (Abb. 11A und C). Geringe Mengen an IL-6 und IL-12 wurden ebenfalls in einigen Tieren gefunden, aber in keinem der Tiere wurde IL-10 während der Vakzinierung gemessen. Im Gegensatz dazu führten die Impfungen ohne QS-21 nur zu marginale Zytokinabgaben, wobei IFN γ und IL-8 nach der 3. und 4. Immunisierung messbar waren. Interessanterweise wurden nach einer Auffrischungsimpfung (5. Immunisierung) ein halbes Jahr später in zwei von vier Tieren, die mit der Vakzine ohne QS-21 immunisiert worden waren, signifikante Zytokinmengen gefunden, wenn auch die Zytokinmengen allgemein niedriger als in der QS-21-Gruppe ausfiel (Abb. 11B, D gegen A, C).

Korrelation der Zeitkinetik der SialylTn-spezifischen IgG-Antwort und Zytokinabgabe

Der Vergleich der Kinetik der Induzierung einer Immunantwort gegen das Trägermolekül (IgG) oder das SialylTn-Kohlenhydratantigen (IgM, IgG) (Abb. 6) mit

der Kinetik der Zytokinabgabe (Abb. 11) legt nahe, dass eine zeitliche Korrelation zwischen dem Auslösen eines IgG-Wechsels gegen SialylTn und des im Serum messbaren Zytokinausstoßes herrscht. Für eine detailliertere Analyse wurden für jedes Tier die Kinetik der jeweiligen Immunantwort gegen den Träger und das SialylTn-Kohlenhydratantigen, sowie die Kinetik der Zytokinabgabe auf derselben Zeitachse (Abb. 12) überlagert. Die absoluten Werte für die IgG-Titer (gegen den Träger und SialylTn) wurden, wie angegeben, durch einen Multiplikationsfaktor normalisiert, um sie dem Maßstab anzupassen. Weder wurden induzierte SialylTn-spezifische IgG-Antikörper noch messbare Zytokine während der ersten beiden Immunisierungen gefunden. Im Gegensatz dazu konnten nach der 3. und 4. oder 5. Immunisierung neben hohen IgG-Titer-Antworten gegen das Trägermolekül auch nachweisbare Mengen an IgG-Antworten gegen das SialylTn-Kohlenhydratantigen gefunden werden. Bemerkenswerterweise fiel die Induktion der Anti-SialylTn-IgG-Antwort mit der vorübergehenden Zytokinabgabe zusammen, die im Serum gemessen werden konnte. Nicht zu übersehen war eine besonders übereinstimmende zeitliche Korrelation für die Induktion des SialylTn-spezifischen IgG-Wechsel und der Freisetzung von IL-2, IL-1 β und IFN γ (Abb. 12A-D). In einem Tier dieser Gruppe, #308, wurde der IgG-Wechsel gegen SialylTn erst nach der 5. (Auffrischungs-)Impfung ausgelöst, und korrelierte wieder mit einem ausgeprägten Zytokinausstoß (Abb. 12C).

Abb. 11: Zytokinabgabe nach Immunisierung mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoff mit und ohne Adjuvans QS-21

Rhesusaffen (vier Tiere pro Gruppe) wurden mit dem SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Impfstoff mit (A, C) oder ohne (B, D) Adjuvans QS-21 an den Tagen 1, 15, 29, 57 immunisiert und am Tag 226 aufgefrischt. Präserum und Immunseren wurden auf Zytokinabgabe durch xMAP-Technologie (Luminex) getestet. Im Serum gemessene Zytokinmengen (pg/ml) sind dargestellt (Mittelwert und Standardabweichung).

Abb. 12: Die Kinetik der Immunantwort gegen SialylTn stimmt mit dem vorübergehenden Zytokinausstoß im Serum zeitlich überein.

NACHGEREICHT

Rhesusaffen wurden mit der SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorvakzine, zu dem 100µg Adjuvans QS-21 mitformuliert worden waren, an den Tagen 1, 15, 29 und 57 immunisiert und 24 Wochen nach der letzten Immunisierung an Tag 226 aufgefrischt. Präserum (d -7, d 1) und Immunseren (d 15, 22, 29, 43, 57, 71, 85, 99, 226 und 240) wurden auf Reaktivität ggen SialylTn (IgG) oder mAb17-1A-Träger (IgG) mittels ELISA getestet, und Zytokinabgabe wurde im Serum mit der xMAP-Multiplextechnologie (Luminex) gemessen. Die Antikörpertiter und Zytokinmengen (pg/ml Serum) jedes einzelnen Rhesusaffen (A, B, C beziehungsweise D) sind dargestellt. Der angegebene Multiplikationsfaktor wurde verwendet, um die Werte der Antikörpertiter mit den Zytokinmengen (pg/ml) abzugleichen – Die Skalen der Graphiken sind an die Zytokinmengen angepaßt.

Beispiel 12

Aktivierung von antigenunspezifischen Effektorzellen wie NK-Zellen führen zu Tumorzell-Lyse (ungeachtet der Antigenexpression)

Methoden:

In vitro-Aktivierung von humanen NK-Zellen durch Immunserum

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) wurden aus Lymphozytenkonzentraten ("Buffy-Coats") von gesunden Spendern (bezogen vom Österreichischen Roten Kreuz) an einem Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Die NK-angereicherte Fraktion wurde aus der nicht-adhärenenten PBMC-Fraktion (nach Entfernen der adhärenenten Zellen durch 1-stündige Plastikadhärenz) und durch Negativauslese am AutoMACS™ mithilfe der Antikörper gegen CD3, CD14, CD34 und CD19 gewonnen. Die NK-Zell-angereicherte Population wurde durch FACS-Analyse mit CD56/CD16 als Marker charakterisiert und bestand zu mindestens 60% aus NK-Zellen.

Die NK-angereicherte Zellfraktion wurde mit Präserum oder Immunserum (in einer Endverdünnung von 1:5) und in An- oder Abwesenheit der angegebenen zusätzlichen Mengen hIL-2 48h lang inkubiert. Das Medium wurde durch frisches RPMI 1640 mit 10% FCS ersetzt, und die Inkubation weitere 24h fortgesetzt. Die Zellen wurden gewaschen, in frischem Medium resuspendiert und als Effektorzellen in einem 4h-

NACHGEREICHT

Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung gegen markierte KatoIII-Tumorzielzellen in einem Effektor : Ziel (E:T)-Verhältnis von 10:1 beziehungsweise 1:1 eingesetzt. Die Freisetzung von ^{51}Cr aus den lysierten Zielzellen in den Überstand der Proben ("Cs") wurde im γ -Zähler (Cobra 5005, Canberra-Packard, Australia) gemessen. Spontanfreisetzung ("Sr") und maximale Freisetzung (100%, "Mr") wurden nach der Inkubation der Zielzellen nur in Medium beziehungsweise mit Detergens (2% SDS) gemessen. Zelltoxizität wurde nach der Formel $100\% \times (\text{Cs}-\text{Sr})/(\text{Mr}-\text{Sr})$ berechnet.

Ex vivo-Messung der Aktivierung von nicht-adhärenenten PBMCs aus Rhesusaffen vor und nach Immunisierung

PBMCs wurden aus heparinisiertem Blut von Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung an einem Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Nach dem Waschen der PBMCs wurde die nichtadhärente PBMC-Fraktion durch Entfernung der adhärenenten Zellen mittels 2h Plastikadhärenz gewonnen. Nichtadhärente PBMCs wurden in mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 2 h lang inkubiert und anschließend als Effektorzellen in einem Übernacht-Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung mit markierten KATOIII-Zielzellen in E:T-Verhältnissen von 60:1, 30:1, 10:1 und 3:1 eingesetzt. Zelltoxizität wurde wie weiter oben beschrieben berechnet.

Ergebnisse:

In vitro-Aktivierung der humanen NK-Aktivität durch Vorinkubation mit Immunserum

Um aufzuklären, ob die induzierten Zytokine weitere biologische Effekte ausgelöst haben könnten, wurde die mögliche Aktivierung von NK-Zellen untersucht. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind dafür bekannt, ihre Zielzellen MHC-unabhängig und ohne erneute Antigenexposition zu zerstören. Man hat gezeigt, dass NK-Zellen durch Zytokine wie IL-1, $\text{IFN}\gamma$ und IL-2 aktiviert werden können und mit hohen Dosen an IL-2 Merkmale von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) erzeugt werden können. Unsere Vorversuche, bei denen aufkonzentrierte humane NK-Zellen verwendet wurden, zeigen eine effiziente Lyse der NK-sensitiven Zielzellen K562, aber nur marginale Wirksamkeit gegen die NK-resistenten DAUDI-Zellen oder KATOIII-Tumorzellen. Dagegen führte die Vorinkubation von NK-Zellen mit hohen Dosen an rekombinantem IL-2 (1000U/ml) zu einer deutlichen Lyse

von DAUDI- und KATOIII-Zellen, was auf eine Bildung von LAK-Zellen hinweist (Daten hier nicht präsentiert). Um die Wirkung der freigesetzten Zytokine auf die NK-Effektorfunktionen zu testen, wurde die NK-angereicherte Zellfraktion der humanen PBMCs zwei Tage lang mit 1:5 verdünntem Prä- oder Immuns serum von Rhesusaffen nach wiederholten Auffrischungsimmunisierungen inkubiert (von Zeitpunkten der höchsten messbaren Zytokinmengen). Um etwaigen inhibierenden Faktoren im Rhesusaffenserum entgegenzuwirken, wurden Präserum und Immuns serum entweder direkt verwendet oder mit einer bescheidenen Menge IL-2 (100U/ml) versetzt, die allein nicht genug war, um eine ausreichende Aktivierung von NK-Zellen zur Lyse von DAUDI- oder KATOIII-Tumorzellen hervorzurufen (Daten hier nicht dargestellt). Die Inkubation von Effektorzellen mit Immuns serum verstärkte die lytische Aktivität von NK-angereicherten humanen PBMCs gegen KATOIII-Zielzellen in drei von vier Tieren (Abb. 13).

PBMCs aus Rhesusaffen zeigen verstärkte zell-lytische Aktivität gegen Tumorzellen nach Immunisierung

Um herauszufinden, ob die *in vitro*-Aktivierung von NK-angereicherten PBMCs durch Vorinkubation mit Immuns serum (Abb. 12) auch eine *in vivo*-Stimulierung der Zelltoxizität widerspiegelt, wurden PBMCs von Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung auf ihre lytische Wirkung bei ⁵¹Cr-markierten KATOIII-Tumorzellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen untersucht. Bevor sie als Effektorzellen eingesetzt worden sind, wurden die PBMCs durch Plastikadhärenz von Monozyten depletiert und jegliches Rhesusaffenserum wurde durch wiederholte Waschschr itte entfernt. Die Daten zeigen, dass in allen vier untersuchten Rhesusaffen die zell-lytische Aktivität ihrer PBMCs nach wiederholter Immunisierung der Tiere gegenüber den Zeitpunkten vor Immunisierung, also d 1, verstärkt wurde (Abb. 14).

Abb. 13: Lyse von KatoIII-Tumorzellen durch NK-Zellen nach *in vitro*-Aktivierung von humanen NK-Zellen durch Immuns serum von immunisierten Rhesusaffen

Rhesusaffen wurden mit der mit QS-21 mitformulierten SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoff immunisiert. Die NK-Zellen aus PBMCs (nach Negativauslese mit CD3/CD14/CD34/CD19 gewonnen) wurden mit Präserum (PS) oder Immuns serum (IS; mit Höchstzytokinmengen) 48h lang inkubiert. Nach

Mediumwechsel ohne Serum wurden die gewaschenen Zellen weitere 24h inkubiert. Aktivierte NK-Zellen wurden als Effektorzellen in einem 4h-Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung gegen markierte KatoIII-Zielzellen eingesetzt. Die Daten von drei Einzeltieren, jedes in unabhängigen Triplikaten gemessen (Mittelwert und Standardabweichung dargestellt), sind präsentiert (Bildtafeln A, B, C). Statistische Auswertung: $*p<0,05$ gegen entsprechende Präserumkontrolle (einseitig, gepaarter t-Test).

Abb. 14: Lyse von KatoIII-Tumorzellen durch aus Rhesusaffen gewonnenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach wiederholten Auffrischungsimpfungen

Rhesusaffen wurden mit der mit QS-21-mitformulierten SialylTn-mAb17-1A-Mehrkomponenten-Tumorstoffvakzine immunisiert. Die PBMCs wurden aus heparinisiertem Blut aus Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung an einem Ficoll-Dichtegradienten immunisiert. Nach Entfernung der adhären Zellen durch 2stündige Plastikadhärenz und wiederholten Waschschritten wurden die nicht-adhären PBMCs als Effektorzellen in einem Übernacht-Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung gegen markierte KatoIII-Zielzellen eingesetzt. Die Daten von vier Einzeltieren (#31, #48, #76 und #318), jedes in unabhängigen Triplikaten gemessen (Mittelwert und Standardabweichung sind dargestellt), sind präsentiert. Statistische Auswertung: $*p<0,05$ gegen Präserum (d1), (einseitig, gepaarter t-Test).

Beispiel 13

Kopplung von LewisY-Kohlenhydrat an einen EpCAM-spezifischen Antikörper, mAb-17-1A (auch als HE2 bezeichnet)

Methoden:

Der Antikörper mAb17-1A (auch als HE2 bezeichnet) ist in der Lage, nach geeigneter Immunisierung eine Immunantwort zu erzeugen, die an Tumorzellen bindet. Gemäß der Erfindung wird ein synthetisiertes LewisY-Kohlenhydratantigen an mAb17-1A

gekoppelt. In diesem Beispiel wurde die Kopplung mit einer chemischen Methode durchgeführt:

Der Antikörper mAb17-1A wird in einem passenden Puffer (150mM NaCl in 100mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,5) an ein N-hydroxysuccinimid-aktiviertes synthetisches Lewis Y-Tetrasaccharid (Syntesome GmbH, München, Deutschland) gekoppelt. Das N-hydroxysuccinimid-aktivierte LewisY-Tetrasaccharid wird in N,N-Dimethylformamid (100mg/ml) gelöst, tropfenweise einer mAb17-1A-Antikörperlösung in einem geeigneten Puffer (150mM NaCl in 100mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,5) zugegeben und mindestens 2,5 Stunden lang bei 4°C geschüttelt. Das Ausmaß der Glykosylierung des Antikörpers mit Lewis Y kann durch Wahl des molaren Überschusses von aktiviertem Zucker sowie der Konzentration der antikörperhaltigen Lösung (1-10mg/ml) gesteuert werden. Für Vergleichszwecke werden zwei verschiedene Reaktionschargen durch Variation des molaren Überschusses (5fach beziehungsweise 15fach) von aktiviertem Zucker hergestellt: "Neoglykoprotein I", das einen niedrigeren Kohlenhydratanteil, und "Neoglykoprotein II", das einen höheren Kohlenhydratanteil besitzt.

Die Bispezifität eines Neoglykoproteins kann durch verschiedene immunologische Methoden ermittelt werden (ELISA oder Western Blotting mit gegen Lewis Y-Determinanten oder gegen mAb17-1A gerichteten Antikörper).

Direkter ELISA:

mAb17-1A, mAb17-1A/Lewis-Y-Neoglykoprotein oder LeY-PM (polyacrylamidgekoppeltes Tetrasaccharid, Syntesome 045-PA) wird in Beschichtungspuffer ("Coating buffer"; 15mM Na₂CO₃, 5mM NaHCO₃, 3 mM NaN₃, pH 9,6) auf 10µg/ml verdünnt und an eine Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorb, Dänemark) adsorbiert (1 Stunde bei 37°C, 100µl/well). Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (2% NaCl, 0,2% Triton X-100 in PBS) werden die unspezifischen Stellen mit 200µl Blockierungspuffer (5% fötales Kälberserum in PBS (138mM NaCl, 1,5mM KOH, 2,7mM KCl, 6,5mM Na₂HPO₄, pH 7,2)) 30 Minuten lang bei 37°C blockiert, und anschließend nach dreimaligem Waschen folgte eine Inkubation von 30min bei 37°C. mit spezifischem Anti-LewisY-Antikörper (human) oder Ziegen-anti-mAb17-1A-Antikörper (1µg/ml) verdünnt in 100 ml Verdünnungspuffer ("Dilution buffer"; 2% FCS in PBS) Ungebundene Antikörper

wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem für den entsprechenden Detektionsantikörper spezifischen HRP-Konjugat (Ziegen-anti-Human IgG+A+M HRP von Zymed (USA) für Anti-Lewis Y-Antikörper, Maus-anti-Ziege IgG HRP (Axell, USA) für Anti-HE2-Antikörper (1 µg/ml)) 30min bei 37°C erfaßt. Nach anschließendem Waschen (3 mal mit Waschpuffer und einmal mit Färbepuffer "Staining buffer") wird die Färbung mit 100 µl ortho-Phenylendiamin-dihydrochloridlösung (Sigma, USA; gelöst in Färbepuffer und aktiviert mit H₂O₂, 30%, Merck, Deutschland) vom gebundenen HRP-Konjugat eingeleitet, und die Farbentwicklung wird mit 15% Schwefelsäure (50 µl) gestoppt. Auf einem Photometer für Mikrotiterplatten (Labssystem, Model Nr. 354) wird die entwickelte Farbintensität bei 492nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen.

Sandwich-ELISA:

Humaner Anti-Lewis Y-Antikörper (10mg/ml) verdünnt in Beschichtungspuffer, 1001) wird unspezifisch an eine Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorb) gebunden (1 Stunde Inkubation bei 37°C). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wird diese mit 200 µl 5% Fötales Kälberserum in PBS (Inkubation 30min bei 37°C) blockiert und mit mAb17-1A-Lewis Y-Neoglykoprotein I und II sowie mAb17-1A als Kontrolle in verschiedenen Konzentrationen 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert (1,25-7,63*10⁻⁶ g/ml; 100 µl). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wird erfolgt die Inkubation 30min lang bei 37°C mit einem Ziegen-anti-mAb17-1A-Antikörper (1mg/ml in Verdünnungspuffer; 100 µl). Überschüssige Antikörper werden in einem nachfolgenden Waschschrift entfernt (3 mal mit Waschpuffer). Gebundene Antikörper werden bei Inkubation (30min 37°C) mit Maus-anti-Ziegen IgG HRP (Axell, verdünnt 1:1000 in Verdünnungspuffer, 100 µl) erkannt: Nach nachfolgendem Waschen (3 mal mit Waschpuffer, einmal mit Färbepuffer) löst das gebundene HRP-Konjugat eine Färbereaktion aus, wenn 100 µl ortho-Phenylendiamin-dihydrochlorid-Lösung (Sigma) 10mg in 25ml Färbepuffer gelöst und aktiviert mit 10 µl H₂O₂; 30% Merck) zugegeben werden. Die Farbreaktion wird mit 50 µl 15% H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion wird bei 492nm (Referenzwellenlänge 620nm) in einem Mikroplattenphotometer (Labssystem, Model Nr. 354) gemessen.

Ergebnisse:

NACHGEREICHT

Die Kopplungsprodukte können klar unterscheidbar vom Ausgangsmaterial erkannt werden.

Abb. 15: Analyse der Kopplungsprodukte mittels Western Blot:

Wie bei SDS-PAGE werden die Proben gemäß ihrer Größe getrennt. Danach werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen ("geblottet"), eine Stunde lang in 3% Milchpulverlösung blockiert, und anschließend mit humanem Anti-Lewis Y-Antikörper (10µg/ml in PBS) zwei Stunden lang inkubiert. Gebundene Antikörper werden von Ziegen-anti-human-HRP-Konjugat (1:500 in PBS) spezifisch für Anti-Lewis Y-Antikörper erkannt. Die Lewis Y-glykosylierten Proteine werden durch die nachfolgende Farbreaktion sichtbar gemacht.

Wie aus Abb. 15 ersichtlich ist: Kopplungsprodukte mit Anti-Lewis Y-Antikörper (linke Seite), HE2 wird in dieser Abbildung 15 als Synonym für mAb17-1A verwendet.

Beispiel 14

Einsatz von immunogenem anti-idiotypischem Antikörper (der Lewis Y imitiert) als Träger

Verschiedene anti-idiotypische Antikörper wurden in klinischen Versuchen getestet und zeigten die Umsetzbarkeit dieser Herangehensweise. Zum Beispiel ist der anti-idiotypische murine Antikörper MMA383, also IGN301, der innerhalb seiner Antigen-Bindungsstellen einen Lewis Y imitiert, ein möglicher Kandidat für ein Trägermolekül. Aktive Verabreichung dieses Antikörpers ruft eine Immunantwort hervor, die Antikörper enthält, welche in der Lage sind, an Lewis Y-Reste, die an extrazelluläre (und zelluläre) Proteine und Peptide (Abb. 16) gebunden sind. IGN301 wurde in Phase 1b-Studien in den USA getestet und zeigte gute Sicherheitsprofile.

Ganz allgemein hat die Verwendung jedes Anti-idiotypischen Antikörper als Träger den Vorteil, dass dieses immunogene Molekül schon ein Epitop zur Verfügung stellt, gegen das therapeutische Antikörper erzeugt werden. Weiters kann ein solcher Träger anschließend an z.B. SialylTn und vorausgewählte, immunogene Peptide (z.B. EpCAM-Derivate, oder Her2-neu, oder EGF-Rezeptor) gebunden werden und so

echte Multi-Epitopimpfstoffe bilden. Immunogene, von bekannten TAA-Antigenen stammende Peptide können durch Epitop-Zuordnungsexperimente ("Mapping") oder Proteingestaltung durch computerunterstützte Voraussage ("Rational Design") (z.B. durch Antigenindex) identifiziert werden. Nach aktiver Verabreichung der Multi-Epitopvakzine sollte die induzierte polyklonale, trispezifische Immunantwort eine signifikant erhöhte Erfolgsrate im Angreifen (und Zerstören) von Tumorzellen haben (Abb. 16).

Abb. 16

Anti-idiotypische Antikörper, die tumor-assoziierte Antigene (Kohlenhydrate oder Peptide) als immunogenen Träger imitieren. Grafische Darstellung des immunologischen Konzepts. Symbole: Kreis (blau) = Lewis-Y-Mimikry (Imitat), Dreieck (rot) = gekoppelter SialylTn, Viereck (grün) = gekoppeltes EpCAM-abgeleitetes Epitop

Detaillierte Beschreibung des Beispiels:

Koppeln von SialylTn-Kohlenhydrat an einen anti-idiotypischen Antikörper (MMA383), und Formulierung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffe

Methoden:

Kopplung des SialylTn-Kohlenhydrat an MMA383

Das SialylTn-Kohlenhydratantigen wird an den MMA383 (murines IgG1)-Proteinträger gekoppelt, indem 10mg mit Abstandhalter nitrophenyliertem SialylTn, Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄COO-(p-NO₂C₆H₄) (MW 819 g/mol, Lectinity, Finnland) mit 100mg MMA383 in einem molaren Verhältnis von SialylTn zu MMA383 von 18:1 zur Reaktion gebracht werden. In Kürze, 100 mg MMA383 (10mg/ml) werden zweimal bei 4°C 20 h lang gegen 700ml Kopplungspuffer (0,1 M Na-PO₄, 0,15 M NaCl, pH 8.5) unter Verwendung einer "Slide-A-Lyzer"-Dialysekassette (MWCO 10K; Pierce) dialysiert. Die Konzentration von MMA383 wird durch Größenausschlußchromatographie (SEC) bestimmt. Daneben werden 10mg des Neu5Ac α 2-6GalNAc α -O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₄COO-(p-NO₂C₆H₄) in 300µl DMF gelöst und dem eiskalten MMA383 zugefügt. Die Reaktionsmischung wird bei

4°C und rotierend inkubiert. Die Kinetik der Reaktion wird über die Größe des Kopplungsprodukts per SEC-Analyse kontrolliert. Nach 28h wird die Reaktionsmischung gegen Formulierungspuffer (1 mM Na-PO₄, 0,86% NaCl, pH 6,0) unter Verwendung von "Slide-A-Lyzer"-Dialysekassetten 3.5K (Pierce) 20h lang bei 4°C dialysiert. Zum Vergleich wird daneben ungekoppelter MMA383 aufgearbeitet. SialylTn-MMA383-Kopplungsprodukte werden durch Größenausschlußchromatographie, LDS-PAGE, Western Blot, Isoelektrische Fokussierung (IEF) und Resorcinuntersuchung analysiert.

Analyse von Kopplungsprodukten (Tumorantigen-Trägerkonjugate)

Größenausschlußchromatographie

Die Konzentrationen von der SialylTn-MMA383-Kopplungsprodukte werden durch Größenausschlußchromatographie (SEC) an einer ZORBAX GF-250-Säule in einem Dionex-System sowie an einer TSKgel G3000SW-Säule in einem HP1100-System quantitativ bestimmt.

IEF, LDS-PAGE und Western Blot

SialylTn-MMA383-Kopplungsprodukte werden mittels horizontaler SERVLYT PRECOTES-Flachbett-IEF-Elektrophorese pH 3-10 (SERVA) gefolgt von einer Coomassieblau-Färbung (Invitrogen) und einer Lithium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE, NuPAGE-Elektrophoresesystem, Bis-Tris-Gel, 4-10%) unter reduzierenden Bedingungen (DTT, 1,4-Dithiothreitol) und anschließender SilverXpress™-Färbung (Invitrogen) analysiert.

Zur Western-Blot-Analyse werden die Proben direkt nach der LDS-PAGE auf Immobilonmembranen (PVDF 0,45µm, Millipore) übertragen (25V; 1,1W; 1,5h). Die Membranen wurden mit 3% Magermilch blockiert und mit Kaninchen-anti-Maus-IgG (H+L)-HRP (1:1000, Zymed) oder wahlweise mit an HRP konjugiertem Anti-SialylTn CD175s (IgG1) (10µg/ml, DAKO).

Quantitative Bestimmung von Sialsäure mittels Resorcinuntersuchung

Die Sialsäuremenge in den Kopplungsprodukten wird durch eine Resorcin-HCl-Reaktion in Gegenwart von CuSO₄ und durch spektrometrische Messung der Absorption bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) bestimmt. In Kürze, 0,15ml Probe und 0,15ml Resorcin-Reagens (2% Resorcin, 2,5mM CuSO₄, HCl (37%)) werden in dichtverschlossenen Glasfläschchen gemischt und bei 100°C 1 h lang

inkubiert. Die Farbreaktion wird als Absorption bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) (Spectrophotometer Ultrospec II, LKB Biochrom) gemessen. Als Standard werden 1,25-25µg/ml einer "SialylTn-Mischung" (bestehend aus Sialsäure, d.h. N-Acetylneuraminsäure, und GalNAc in einem molaren Verhältnis von 1:1) für die Kalibration verwendet.

Formulierung der Mehrkomponenten-Tumorstoffe

500µg des SialylTn-MMA383-Konjugats werden an 1,67mg Aluminiumhydroxid in 0,5ml Formulierungspuffer (1mM Na-PO₄, 0.86% NaCl, pH6) adsorbiert. Der Impfstoff wird entweder ohne zusätzliches Adjuvans verwendet, oder 100µg QS-21-Adjuvans (Antigenics Inc., Lexington, MA) wurden mitformuliert.

LAL-Untersuchung

Die Endotoxinmenge in den Vakzinformulierungen werden durch Limulus-Amöbozytenlysate-Untersuchung ("Limulus Amebocyte Lysate-Endochrome™-Test", Charles River Endosafe) laut Hersteller abgeschätzt. Keine der endgültigen Impfstoff-Formulierungen sollten nachweisbare Endotoxinmengen enthalten.

Pyrogentest in Kaninchen

Endgültige Vakzinformulierungen werden durch i.v.-Verabreichung in Kaninchen einem Pyrogentest unterzogen. Die Formulierungen, die für diese Studie verwendet werden, sollten in bezug auf den Pyrogentest negativ sein.

Ergebnisse:

Mit Abstandhalter nitrophenylaktivierter SialylTN wird mit MMA383 in einem molaren Verhältnis von 18:1 zur Reaktion gebracht. Die Kinetik der Reaktion wird mit SEC überwacht, und die Reaktion wird gestoppt, wenn kein weiterer Anstieg in der Größe der Kopplungsprodukte zu verzeichnen ist. Das Kopplungsprodukt SialylTn-MMA383 wird mittels LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen, gefolgt von einer Silberfärbung, analysiert (und im Western Blot mit Anti-SialylTn CD175s (IgG1)-HRP gefärbt). LDS-PAGE sollte einen Anstieg im Molekulargewicht der schweren Ketten (50kDa) und der leichten Ketten (25kDa) in den Kopplungsprodukten im Vergleich zum ungekoppelten MMA383 ergeben, was eine

Koppelung sowohl an die schweren als auch die leichten Ketten von MMA383 anzeigt. Eine Western Blot-Analyse sollte zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes führen, was durch IEF nachgewiesen wird. Das molare Verhältnis von SialylTn zu MMA383 wird durch Resorcinuntersuchung im Kopplungsprodukt quantitativ bestimmt. In dieser Untersuchung wird die Menge an Sialsäure in den Kopplungsprodukten durch Resorcin-HCl-Reaktion in Anwesenheit von CuSO_4 bestimmt.

Das Kopplungsprodukt SialylTn-MMA383 ($500\mu\text{g}$) wird an Aluminiumhydroxid adsorbiert und in sterile Röhrchen aliquotiert. Die an Aluminium adsorbierte Mehrkomponenten-Tumorstoffe werden entweder ohne zusätzliches Adjuvant oder gemeinsam mit $100\mu\text{g}$ des Adjuvans QS-21 formuliert. Die Vakzinformulierungen werden auf Spuren von Endotoxin mit Limulus-Amöbozytenlysat und einem Pyrogentest durch i.v.-Verabreichung an Kaninchen untersucht.

Immunisierung von Rhesusaffen mit der Mehrkomponenten-Tumorstoffe SialylTn-MMA383 und Analyse der Induzierten Immunantwort gegen den Träger und das gekoppelte Tumorstoffe (SialylTn): Erläuterung zur Wirkung von zusätzlichem Adjuvans (QS-21)

Methoden:

Immunisierungsstudie mit Rhesusaffen

Sicherheit, Verträglichkeit und Immunogenität von mehreren subkutanen Injektionen mit der Mehrkomponenten-Tumorstoffe werden in Impfstudien in Rhesusaffen bewertet. Alle Tierstudien werden unter kontrollierten und dokumentierten Bedingungen entsprechend den Richtlinien der Tiergesundheitsfürsorge. Pro Gruppe werden vier gesunde erwachsene Rhesusaffen (abgestimmt nach Alter und Geschlecht) an den Tagen (d) 1, 15, 29 und 57 durch subkutane Injektion geimpft und zu einem späteren Zeitpunkt aufgefrischt. Vor und nach Immunisierung werden Blutproben für eine Serumanalytik entnommen.

In einer zweiten Rhesusaffenstudie werden die Tiere – vier Tiere pro Gruppe werden mit vier Erstimmunisierungen geimpft. Vor und nach Immunisierung werden für eine PBMC-Aufbereitung heparinisierte Blutproben genommen.

NACHGEREICHT

Spezifität der induzierten Anti-SialylTn-Immunantwort

Methoden:

ELISA für Immunreaktivität gegen MMA383

Präseren und Immunseren der Rhesusaffen werden hinsichtlich der induzierten Immunantwort gegen MMA383 mittels ELISA analysiert. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) werden mit 10µg/ml MMA383 beschichtet. ELISA-Platten werden mit 10%FCS in PBS (1h, 37°C) blockiert, und die in PBS mit 2%FCS vorverdünnten Proben danach 1,5h lang bei 37°C inkubiert. Eine positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen MMA383 wird mitgetestet und für die Normalisation der OD-Werte zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion werden die Platten mit einem Schaf-anti-Human IgG-(γ-Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD in 25ml Färbepuffer gelöst + 10µl 30% H₂O₂) wird durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (30%) gestoppt. Die Absorption wird bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Der Titer wird als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1,0 ergibt. Die Kurvendiskussion wird mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

SialylTn-PAA ELISA

Präserum und Immunseren der Rhesusaffen werden mittels SialylTn-PAA-ELISA auf Immunantwort gegen das synthetische SialylTn-Kohlenhydratantigen getestet. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) werden mit 10µg/ml SialylTn-PAA (Lectinity, Finnland) beschichtet. Die ELISA-Platten werden mit PBS, das 10% FCS enthält, 1 h bei 37°C blockiert. Die Serumproben werden in PBS mit 2%FCS und 5% Glucose vorverdünnt und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Ein positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen SialylTn wird für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion werden die Platten mit Maus-anti-Human IgM-HRP-Konjugat (1:2000, Southern Biotechnology) beziehungsweise Schaf-anti-Human IgG-(γ-Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD werden in 25ml Färbepuffer gelöst, dem 10µl 30%iges H₂O₂ zugefügt worden sind) wird durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (30%) gestoppt. Die Absorption wird bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Titer werden als

reziproke Werte der Serumverdünnungen definiert, was eine Absorption von OD=1,0 und OD=0,5 für IGM beziehungsweise IgG ergibt. Die Kurvendiskussion wird mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

Depletionsexperiment:

Immunserum (IS) wurde durch Inkubation mit Sepharoseperlen, an die MMA383 (mAb), SialylTn-MMA383, SialylTn-HSA, HSA beziehungsweise LeY-HSA gekoppelt worden ist, depletiert.

Die Antikörpertiter gegen SialylTn (A) oder MMA383 (B) in Präserum (PS) oder Immunserum (IS) oder Immunserum nach der Depletion werden mittels ELISA gemessen.

Reaktivität der hervorgerufenen Immunantwort mit natürlichen Tumorzielen: OSM ("Ovine submaxillary Mucin" – Schafsunterkiefermucin)

Methoden:

"Ovine submaxillary mucin" (OSM)-ELISA

Präseren und Immunseren von Rhesusaffen werden hinsichtlich ihrer Immunantwort auf OSM getestet, das ein natürliches SialylTn-hochexprimierendes Substrat darstellt. In Kürze, ELISA-Platten (F96 Maxisorp, NUNC) werden mit 10µg/ml OSM beschichtet. Die Platten werden mit 10% FCS 1 h bei 37°C blockiert, gefolgt von einem Wasch-Schritt. Die Serumproben werden in PBS mit 2% FCS vorverdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein positives Kontrollserum mit einer bekannten Reaktivität gegen OSM wird mitgetestet und für die Normalisation zwischen den verschiedenen ELISA-Platten verwendet. Zur Detektion werden die Platten mit Maus-anti-Human IgM-HRP-Konjugat (1:2000, SB, Southern Biotechnology) beziehungsweise Schaf-anti-Human IgG-(γ-Kette)-HRP-Konjugat (1:2000, Chemicon) 30min lang bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion mit dem Substrat OPD (10mg OPD gelöst in 25ml Färbepuffer + 10µl 30% H₂O₂) wird durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (30%) gestoppt. Bei 562nm (620nm Referenzwellenlänge) wird die Absorption gemessen. Die Titer werden als reziproke Serumverdünnung definiert, was eine Absorption von OD=1,0 und OD=0,5 für IgM beziehungsweise IgG ergibt. Die Kurvendiskussion wird mithilfe von GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt.

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort mit natürlichen Angriffsziele:
Bindung an SialylTn-positive Tumorzellen (FACS-Analyse)

Methoden:

Immunantwort gegen Tumorzellen (FACS-Analyse):

Die Bindung von Immunseren von Rhesusaffen an Tumorzellen wird durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Die SialylTn-exprimierenden OVCAR-3- Eierstock-Adenokarzinomzellen (ATCC, HTB-161) werden mit Serum (1:40 verdünnt in PBS mit 2% FCS) 2 h lang auf Eis inkubiert. Zur Detektion wird ein Ziegen-F(ab')₂-anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet. Prä- und Immunseren werden nebeneinander analysiert. Hintergrundbindung von Präseren wird auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort mit natürlichen Angriffsziele:
Bindung an LewisY-positive Tumorzellen (FACS-Analyse)

Methoden:

Immunantwort gegen Tumorzellen (FACS-Analyse):

Die Bindung von Immunseren von Rhesusaffen an Tumorzellen wird durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Die LewisY-exprimierenden SKBR3-Tumorzellen (ATCC, #HTB30) werden mit Serum (1:40 verdünnt in PBS mit 2% FCS) 2 h lang auf Eis inkubiert. Zur Detektion wird ein Ziegen-F(ab')₂-anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet. Prä- und Immunseren werden nebeneinander analysiert. Hintergrundbindung von Präseren wird auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort mit natürlichen Angriffsziele:
Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen SialylTn-positive Tumorzellen

Methoden:

Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wird durch die Messung der Chromfreisetzung bei der Zell-Lyse bestimmt

Präseren und Immunseren von vier Rhesusaffen, die mit der SialylTn-MMA383-Mehrkomponenten-Tumorvakzine immunisiert worden sind, werden auf ADCC gegen SialylTn-positive OVCAR-3-Zellen getestet. Humane PBMCs werden als Effektorzellen verwendet und mit den Zielzellen in zwei Effektor : Zielzellen (E:T)-Verhältnissen, d.h. 60:1 und 20:1, 14 h lang inkubiert. Die Freisetzung von ^{51}Cr wurde am γ -Zähler gemessen.

Die Reaktivität der induzierten Immunantwort mit natürlichen Angriffszielen: Bindung auch an LewisY-positive (SialylTn-negative) Tumorzellen (FACS-Analyse) – Korrelation mit der Reaktivität gegen den Träger

Methoden:

Immunantwort gegen Tumorzellen (FACS-Analyse):

Die Bindung von Immunseren von Rhesusaffen an Tumorzellen wird durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Die LewisY-exprimierenden KATOIII-Tumorzellen beziehungsweise die LewisY-exprimierenden SKBR3 werden mit Serum (1:40 verdünnt in PBS mit 2% FCS) 2 h lang auf Eis inkubiert. Zur Detektion wird ein Ziegen-F(ab')₂-anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet. Prä- und Immunseren werden nebeneinander analysiert. Hintergrundbindung von Präseren wird auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Zytokinabgabe in Serum nach Vakzinierung

Methoden: Zytokinabgabe (xMAP Luminex Multiplex):

NACHGEREICHT

Präseren und Immunseren werden auf Zytokine (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF α , IFN γ und GM-CSF) mithilfe der xMAP Multiplex-Technologie (Luminex) unter Verwendung des "Beadlyte Human Multi-Cytokine Detection System 3" (Beadlyte™ Humanes Multizytokin-Detektionssystem 3) (Upstate) gemäß der Anleitung des Herstellers getestet. In Kürze, 25 μ l Serumprobe werden mit 25 μ l Probenpuffer und einer Mischung aus an "Beads" (farbgefüllte Plastik Kügelchen) gekoppelten Anti-Humanzytokinantikörpern 2 h lang bei 25°C abgedunkelt inkubiert. Nach Zugabe von biotinyliertem Anti-Humanzytokin-Detektionsantikörpern und 1.5 h langer Inkubation wird die flüssige Phase abgezogen und die "Beads" in einer Streptavidin-Phycoerythrin-Verdünnung resuspendiert [Anschließend werden die "Beads" mit Probenpuffer gewaschen. Das ausgesendete Fluoreszenzsignal (MFI) wird mit einem Luminex 100-Lesegerät gemessen (Einstellungen: 50 Ereignisse pro Bead, 50 μ l Probengröße, Ausschluß ("Gate"): 7500-13000 MFI).

Aktivierung von antigenunspezifischen Effektorzellen wie NK-Zellen führen zu Tumorzell-Lyse (ungeachtet der Antigenexpression)

Methoden:

In vitro-Aktivierung von humanen NK-Zellen durch Immunserum

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) werden aus Lymphozytenkonzentraten ("Buffy-Coats") von gesunden Spendern (bezogen vom Österreichischen Roten Kreuz) an einem Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Die NK-angereicherte Fraktion wird aus der nichtadhärenten PBMC-Fraktion (nach Entfernen der adhären Zellen durch 1-stündige Plastikadhärenz) und durch Negativauslese am AutoMACS™ mithilfe der Antikörper gegen CD3, CD14, CD34 und CD19 gewonnen. Die NK-Zell-angereicherte Population wird durch FACS-Analyse mit CD56/CD16 als Marker charakterisiert.

Die NK-angereicherte Zellfraktion wird mit Präserum oder Immunserum (in einer Endverdünnung von 1:5) und in An- oder Abwesenheit der angegebenen zusätzlichen Mengen hIL-2 48h lang inkubiert. Das Medium wird durch frisches RPMI 1640 mit 10% FCS ersetzt, und die Inkubation weitere 24h fortgesetzt. Die Zellen werden gewaschen, in frischem Medium resuspendiert und als Effektorzellen in einem 4h-Lysetest auf ⁵¹Cr-Freisetzung gegen markierte KatoIII-Tumorzielzellen in einem

Effektor : Ziel (E:T)-Verhältnis von 10:1 beziehungsweise 1:1 eingesetzt. Die Freisetzung von Chrom aus lysierten Zielzellen in den Überstand der Proben ("Cs") wird im γ -Zähler (Cobra 5005, Canberra-Packard, Australia) gemessen. Spontanfreisetzung ("Sr") und maximale Freisetzung (100%, "Mr") werden nach der Inkubation der Zielzellen nur in Medium beziehungsweise mit Detergens (2% SDS) gemessen. Zelltoxizität wird nach der Formel $100[\%] \times (Cs-Sr)/(Mr-Sr)$ berechnet.

Ex vivo-Messung der Aktivierung von nichtadhärenten PBMCs aus Rhesusaffen vor und nach Immunisierung

PBMCs werden aus heparinisiertem Blut von Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung an einem Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Nach dem Waschen der PBMCs wird die nichtadhärente PBMC-Fraktion durch Entfernung der adhärenen Zellen mittels 2h Plastikadhärenz gewonnen. Nicht-adhärenente PBMCs werden in mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 2 h lang inkubiert und anschließend als Effektorzellen in einem Übernacht-Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung mit markierten KATOIII-Zielzellen in E:T-Verhältnissen von 60:1, 30:1, 10:1 und 3:1 eingesetzt. Zelltoxizität wird wie weiter oben beschrieben berechnet.

Ergebnisse:

In vitro-Aktivierung der humanen NK-Aktivität durch Vorinkubation mit Immunserum

Um aufzuklären, ob die induzierten Zytokine weitere biologische Effekte ausgelöst haben könnten, wird die mögliche Aktivierung von NK-Zellen untersucht. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind dafür bekannt, ihre Zielzellen MHC-unabhängig und ohne erneute Antigenexposition zu zerstören. Man hat gezeigt, dass NK-Zellen durch Zytokine wie IL-1, IFN γ und IL-2 aktiviert werden können und mit hohen Dosen an IL-2 Merkmale von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) erzeugt werden können. Unsere Vorversuche, bei denen aufkonzentrierte humane NK-Zellen verwendet wurden, zeigen eine effiziente Lyse der NK-sensitiven Zielzellen K562, aber nur marginale Wirksamkeit gegen die NK-resistenten DAUDI-Zellen oder KATOIII-Tumorzellen. Dagegen führte die Vorinkubation von NK-Zellen mit hohen Dosen von rekombinantem IL-2 (1000U/ml) zu einer deutlichen Lyse von DAUDI- und KATOIII-Zellen, was auf eine Bildung von LAK-Zellen hinweist (Daten hier

nicht präsentiert). Um die Wirkung der freigesetzten Zytokine auf die NK-Effektorfunktionen zu testen, wird die NK-angereicherte Zellfraktion der humanen PBMCs zwei Tage lang mit 1:5 verdünntem Prä- oder Immuns serum von Rhesusaffen nach wiederholten Auffrischungsimmunisierungen inkubiert (von Zeitpunkten der höchsten messbaren Zytokinmengen). Um etwaigen inhibierenden Faktoren im Rhesusaffenserum entgegenzuwirken, werden Präserum und Immuns serum entweder direkt verwendet oder mit einer bescheidenen Menge IL-2 (100U/ml) versetzt, die allein nicht genug ist, um eine ausreichende Aktivierung von NK-Zellen zur Lyse von DAUDI- oder KATOIII-Tumorzellen hervorzurufen (Daten hier nicht dargestellt). Die Inkubation von Effektorzellen mit Immuns serum sollte erwartungsgemäß die lytische Aktivität von NK-angereicherten humanen PBMCs gegen KATOIII-Zielzellen verstärken.

PBMCs aus Rhesusaffen zeigen verstärkte zell-lytische Aktivität gegen Tumorzellen nach Immunisierung

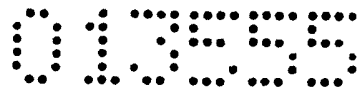
Um herauszufinden, ob die *in vitro*-Aktivierung von NK-angereicherten PBMCs durch Vorinkubation mit Immuns serum (Abb. 12) auch eine *in vivo*-Stimulierung der Zelltoxizität widerspiegelt, werden PBMCs von Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung auf ihre lytische Wirkung bei ^{51}Cr -markierten KATOIII-Tumorzellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen untersucht. Bevor sie als Effektorzellen eingesetzt worden sind, werden die PBMCs durch Plastikadhärenz von Monozyten depletiert und jegliches Rhesusaffenserum wird durch wiederholte Waschschr itte entfernt. Man kann erwarten, dass die zytolytische Aktivität ihrer PBMCs nach wiederholter Immunisierung der Tiere gegenüber den Zeitpunkten vor Immunisierung verstärkt wird.

Beispiel 15

Aufbereitung eines rekombinanten murinen MMA383-Antikörpers (rMMA383)

Methoden:

NACHGEREICHT



Aufbereitung eines molekularbiologischen Konstrukts zur Expression von rekombinantem murinem MMA383-Antikörper (rMMA383)

Der bicistronische pIRES-Vektor (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) erlaubt die Expression von zwei Genen auf hohem Niveau und ermöglicht die Translation von zwei aufeinanderfolgenden offenen Leserahmen der Boten-RNA ("messenger RNA"). Um positive Transformatanten selektieren zu können, wird ein Reportergen verwendet. Die interne Ribosomeneinlaßstelle ("internal ribosome entry site – IRES") ist in diesem Vektor verstümmelt, was niedrigere Expressionsraten im zweiten Leserahmen auftreten läßt. Für unser Expressionsprodukt muß allerdings die ursprüngliche IRES-Sequenz wiederhergestellt werden, um unseren Anforderungen, annähernd gleichviel der schweren und leichten Antikörperketten zu exprimieren, gerecht zu werden. DNA-Klonierung und Handhabung wird gemäß der Standardmethoden (Maniatis et al.) durchgeführt. Mithilfe von PCR-Technologie und des Advantage-HF-PCR-Kits (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) werden die schweren und leichten Ketten des MMA383-Antikörpers vervielfältigt ("amplifiziert"). Zuerst werden die Startermolekül-Sequenzen ("Primer-") benutzt, um die gewünschten Restriktionsstellen, die für die Insertion des Gens notwendig sind, in die Mehrfachklonierungsstelle ("Multi-Cloning-Site") von pIRES einzuschleusen, und danach werden die KOZAK-Sequenzen aufwärts ("upstream") in den offenen Leserahmen eingesetzt. Die autologen Signalsequenzen werden verwendet, um die nackten Polypeptidketten in den sekretorischen Umlauf zu bringen. Nach der Transfektion des E. coli-Bakterienstammes DH5alpha (Gibco-BRL) werden die positiven Transformanten durch PCR gesucht ("screening"). Die Konstrukte werden bidirektional sequenziert und für die folgende Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet.

Transfektion

Der charakterisierte eukaryotische Stamm CHO (ATCC-CRL9096) wird mit dem oben beschriebenen Expressionsvektorkonstrukt transfiziert. Dafür wird der DHFR-Selektionsmarker verwendet, um eine stabile Zelllinie zu etablieren, die rMMA383 exprimiert. In einer 6-Mulden-Zellkulturplatte ("6-well-plate") wird die Zelllinie bei 37°C mit 4mM L-Glutamin und einem Gehalt von 1,5g/L Natriumhydrogencarbonat *kultiviert* mit einem Zusatz von 0,1mM Hypoxanthin und 0,016mM Thymidine *und*

90%; Fötales Kälberserum, 10% (Gibco-BRL). Die Zellen läßt man bis zu einer Dichte von 50% wachsen. Gemäß den Anleitungen des Herstellers werden die Zellen daraufhin in Abwesenheit von Serum mit 2µg DNA mithilfe von Lipofectin-Reagens (Gibco-BRL) transfiziert. Die Transfektion wird durch Zugabe von Komplettmedium nach 6 oder 24h gestoppt.

Auswahl von positiven Transformanten und Kultivierung

Komplettmedium wird 24 oder 48h nach der Transfektion durch Selektionsmedium ersetzt. Das FCS im Komplettmedium wird durch dialysiertes FCS (Gibco BRL, Herkunft: Südamerika) ersetzt. Positive Transformanten erscheinen erwartungsgemäss 10 Tage nach der Transfektion als schnellwachsende mehrzellige Konglomerate. Die Konzentration von rMMA383 wird in den Überständen durch spezifischen Sandwich-ELISA, der sowohl die variablen als auch die konstanten Regionen des Antikörpers erkennt, bestimmt. Jene Zellen, die hohe Produktivität zeigen, werden 1:10 geteilt und in 75cm²-Zellkulturflaschen *für spätere Aufbewahrung in der Zellbank auf flüssigem Stickstoff* untergebracht, Daneben werden diese Produzenten durch Zugabe von Methothrexat zum Kulturmedium einem steigenden Selektionsdruck ausgesetzt, und die Zellen werden in eine 6-Muldenplatte eingesät. Diese Methode wird zirka zwei Wochen später wiederholt, wenn alle Zellen eine stabile Wachstumskinetik erreicht haben. Ausgegangen von einer Konzentration von 0,005mM wird die MTX-Konzentration mit jedem Selektionszyklus bis zu einer Endkonzentration von 1,28mM verdoppelt, und gleichzeitig erfolgt eine Subkultivierung in 96-Mulden-Zellkulturplatten. Einmal pro Woche werden die Überstände in einem spezifischen Sandwich-ELISA, der sowohl die variablen als auch die konstanten Regionen des Antikörpers erkennt, untersucht. Stabile Kulturen, die die höchsten Produktivitäten aufweisen, werden in 75cm²-Zellkulturflaschen und stufenweise in 860cm²-Rollkulturflaschen in nichtselektives Medium überführt. Die Überstände werden geerntet, zentrifugiert, analysiert und weiterer Aufreinigung unterzogen.

Analyse der Expressionsprodukte

Die Überstände werden in einem spezifischen Sandwich-ELISA, der sowohl die variablen als auch die konstanten Regionen des Antikörpers erkennt, untersucht. Maxisorp (NUNC)-Adsorptionsplatten werden mit dem mAbIGN311 bei einer

Konzentration von 10µg/ml beschichtet. Der monoklonale Antikörper IGN311 erkennt die variable Region des MMA373-Antikörpers. Die übrigen aktiven Gruppen werden durch Inkubation mit 1% Milchpulver blockiert, und die Überstände werden aufgetragen. Die exprimierten Antikörper werden an ihrer konstanten Region von einem Kaninchen-anti-Maus IgG1-HRP-Konjugat (Biozym) erkannt. Die Größenbestimmung der exprimierten Proteine wird durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit 4-14% Acrylamid-Gradientengelen in einer Novex (GibcoBRL)-Elektrophoresekammer bestimmt. Eine Silberfärbung der Proteine folgt. Um die exprimierten Antikörper immunologisch nachzuweisen, wird eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Proteine werden durch SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen (0,2µm) in einer Novex-Kammer (Gibco-BRL) elektrotransferiert. Die Membranen werden zweimal gewaschen bevor die Blockierlösung (TBS + 3% Milchpulver BBL) und die Antikörperlösung (10µg/ml IGN311-Antikörper, muriner monoklonaler Anti-Maus-IgG-Antikörper (Zymed) oder Kaninchen-anti-Maus IgG γ -Kette in TBS + 2% Milchpulver) zugegeben werden. Zur Farbentwicklung wird ein Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP- oder ein Maus-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörperkonjugat (BIO-RAD) verwendet, 1:1000 in TBS + 1% Milchpulver verdünnt, und ein HRP-Farbentwicklungsreagens (BIO-RAD) wird gemäß der Anleitung des Herstellers hinzugefügt.

Isoelektrisch fokussierende Gele werden verwendet, um die gereinigten Expressionsprodukte mit dem beschriebenen murinen MMA383-Standard-Hybridomaantikörper zu vergleichen. Die Proben werden auf IEF-Gele, pH 3-7 (Invitrogen) geladen und die Auftrennung wird gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt.

Die Proteine werden durch Silberfärbung oder immunologisch durch Western Blots sichtbar gemacht. Dafür werden die Proteine in einem Tris-gepufferten SDS/Harnstoff/Iodoactamidpuffer geladen und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Das wird nach der gleichen Methode gemacht wie sie für Western Blots beschrieben ist. Die Detektion erfolgt mit IGN311-anti-idiotypischen Antikörpern.

Affinitätsreinigung

Ein Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech) AKTA-System wird verwendet. 1000ml klarer Kulturüberstand, der den Antikörper enthält, wird mit einem Pro-Varion

30kDa-Ausschluß-Konzentrator (Millipore) aufkonzentriert, dann mit PBS verdünnt und auf eine 20ml IGN311-Sepharose-Affinitätsgel XK26/20-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Kontaminierende Proteine werden durch einen Waschschrift mit PBS + 200mM NaCl entfernt. Die gebundenen Antikörper werden mit 100mM Glyzin, pH 2,9 eluiert und sofort mit 0,5M NaHCO₃ neutralisiert. Der Ablauf wird in Echtzeit bei 215nm und 280nm beobachtet und anschließend einer HPLC-Analyse mit einer ZORBAX G-250-Säule (Agilent Technologies) unterzogen. 2000ml geernteten Überstandes aus Rollflaschenkulturen werden zentrifugiert, konzentriert, in PBS verdünnt und bis zur Homogenität durch Affinitätschromatographie mithilfe einer IGN311-Sepharosesäule gereinigt. Nach Elution, Neutralisation und Dialyse gegen PBS wird das Endprodukt mittels SEC-HPLC gemessen. Ein muriner Hybridoma-Immunglobulinstandard desselben Isotyps wird mit rMMA383 verglichen.

Eine weitere Charakterisierung des Expressionsproduktes wird durch reduzierende und nichtreduzierende SDS-PAGE mit Silberfärbung und Western Blots. Die Expressionsprodukte werden durch spezifische Anti-idiotypische IGN311-Antikörper nachgewiesen und mit einem Anti-Human-HRP-konjugiertem Antikörper sichtbar gemacht.

Beispiel 16

Expression eines immunogenen anti-idiotypischen Hybridantikörpers (der Lewis Y imitiert)

Der rekombinante IgG2a-Lewis-Y-Antikörper kombiniert den anti-idiotypischen Lewis-Y, indem er eine hypervariable Region und hochimmunogenen murinen IgG2a-Regionen nachahmt. Die Immuntherapie mit dem rekombinanten IgG2a-Lewis-Y-Antikörper erhöht die Immunogenität des ursprünglichen Anti-idiotypischen Antikörpers IGN301, der von einer Hybridoma-Zelllinie produziert wird und ruft eine starke Immunantwort gegen Lewis-Y und/oder EpCAM hervor, die in epithelialen Tumorzellen überexprimiert oder präsentiert werden. Diese Immunantwort führt durch Komplementaktivierung zu einer Lyse der Tumorzellen oder zur Vorbeugung gegen zellvermittelte Metastasierung.



Molekularbiologische Konstrukte des rekombinanten IgG2a Lewis-Y-Antikörpers werden in einen polycistronischen Vektor eingefügt. Der rekombinante IgG2a Lewis-Y-Antikörper wird vorübergehend in HEK293-Zellen exprimiert und wird danach mit Kalziumphosphat in einem Mikroschleudersystem in Anwesenheit von FCS ausgefällt. Nach der Reinigung an einer Anti-Lewis-Y-Affinitätssäule und Qualitätsanalyse des Expressionsprodukts wird der rekombinante IgG2a Lewis-Y-Antikörper auf $\text{Al}(\text{OH})_3$ formuliert und als Vakzine mit 500µg-Dosen in Immunisierungsstudien in Rhesusaffen verwendet.

Eine hohe Immunogenität wird im Vergleich mit dem ursprünglichen IGN301-Impfstoffs beobachtet werden. Die induzierte IgG-Immunantwort wird mittels ELISA bestimmt und zeigt erwartungsgemäß Spezifität der Immunisierungsantigene Lewis Y und EpCAM.

Die Bindung an Immunseren von Rhesusaffentumorzellen wird durch Zelloberflächenfärbung unter Verwendung eines FACScan (Becton Dickinson) gemessen. Die EpCAM und Lewis Y-exprimierenden KATOIII-Tumorzellen werden mit Serum (1:40 in PBS mit 2% FCS verdünnt) 2 h lang auf Eis inkubiert. Zur Detektion wird ein Kaninchen $\text{F}(\text{ab}')_2$ -anti-Human IgG (H+L)-PE-Konjugat verwendet (1:100, Immunotech, Marseille, Frankreich). Prä- und Immunseren werden parallel analysiert. Hintergrundbindung von Präseren wird auf 10% positive Zellen gesetzt und als Vergleich gegen messbare Zellbindung nach Inkubation mit den entsprechenden Immunseren eingesetzt.

Zur *Ex vivo*-Messung der Aktivierung von nicht-adherenten PBMCs von Rhesusaffen vor und nach Immunisierung werden PBMCs aus heparinisiertem Blut von Rhesusaffen vor beziehungsweise nach Immunisierung an einem Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Nach dem Waschen wird die nicht-adhärenente PBMC-Fraktion durch Entfernung der adhärenenten Zellen mittels 2 h Plastikadhärenz entfernt. Nicht-adhärenente PBMCs werden in mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 2 h lang inkubiert und anschließend als Effektorzellen in einem Übernacht-Lysetest auf ^{51}Cr -Freisetzung mit markierten KATOIII-Zielzellen in E:T-Verhältnissen von 60:1, 30:1, 10:1 und 3:1 getestet. Die Zelltoxizität wird wie oben beschrieben berechnet.

NACHGEREICHT

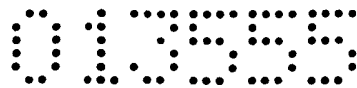
Patentansprüche:

1. Die Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung bestehend aus
 - (i) Epitopen von mindestens zwei Tumor-assoziierten Antigenen
 - (ii) mindestens einem immunogenen Träger
 - (iii) mindestens einem Adjuvans,
 verarbeitet in eine immunogene Formulierung für die Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen tumor-assoziierte Antigene und eine Ko-Induktion der Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen, welche zu einer Aktivierung von Antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

2. Die Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Peptide, Proteine, Oligosaccharide, Glykoproteine oder glykosylierte Peptide, vorzugsweise Antigene resultierend aus einer abnormalen Glykosylierung von Tumorzellen.

3. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteinen, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptide, bevorzugt abgeleitet von tumor-assoziierten Antigenen oder Kohlehydrate, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Gangliosiden, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

4. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die genannten Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, wobei mindestens eines der Epitope ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteinen, bevorzugt CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptiden, vorzugsweise von tumor-assoziierten Antigenen stammend, und mindestens eines von ihnen ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus



Kohlehydraten, bevorzugt Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

5. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der immunogene Träger ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus immunogenen Proteinen, Hitzeschockproteinen, oder xenogenen (spezies-fremden) Proteinen.
6. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der immunogene Träger ein immunogener Antikörper oder ein polyklonales Antikörperpräparat oder ein xenogener Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
7. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der immunogene Träger ein humaner, humanisierter oder chimärer Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
8. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der immunogene Träger ein Kaninchen-, Ratten- oder Mausantikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
9. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der immunogene Träger ein rekombinanter Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon..
10. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der immunogene Träger ein anti-idiotypischer Antikörper oder ein Mimotop-Protein ist, bevorzugt ein mimotopischer Antikörper, welcher die Struktur von mindestens einem Epitop eines tumor-assoziierten Antigens imitiert.
11. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der immunogene Träger ein Antikörper ist, der den Idiotyp eines gegen ein tumor-assoziiertes Antigen gerichteten Antikörpers erkennt.
12. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der anti-idiotypische Antikörper ein Glykosylierungsantigen imitiert.

13. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Antikörper eine Spezifität für ein Antigen aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs, Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, GD2, GD3, GM1 und GM2.

14. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der anti-idiotypische Antikörper ein Lewis-Y Antigen imitiert.

15. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Antikörper EpCAM imitiert.

16. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Epitope der Antigene an den immunogenen Träger durch chemische Reaktionen, oder enzymatische Reaktionen, oder durch eine molekularbiologischen Methode, wie z.B. Rekombination der Nukleinsäuren, von Epitopen und Trägern gekoppelt sind.

17. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Epitope an den immunogenen Träger über ein bi-funktionelles Molekül, bevorzugt über N-Hydroxysuccinimid oder über Sulfhydryl-Gruppen oder über nitrophenyl-aktivierte Zucker, chemisch gekoppelt sind.

18. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die Vakzine mit zusätzlichen Adjuvantien gemeinsam formuliert oder gemeinsam verabreicht wird.

19. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Vakzine mit Adjuvantien gemeinsam formuliert oder gemeinsam verabreicht wird, ausgewählt aus der Gruppe von Aluminiumhydroxid (Alu Gel) oder Aluminiumphosphat, Wachstumsfaktoren, Lymphokinen, Zytokinen wie IL-2, IL-12, GM-CSF, Gamma Interferon, oder Faktoren des Komplementsystems wie C3d oder, des weiteren, Liposomenpräparationen, Lipopolysaccharide von E. coli (LPS), Lipid A. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Adjuvans werden halb-synthetische Adjuvantien wie QS-21 oder ENHANZYN oder verwandte

Adjuvantien abgeleitet von natürlichen Quellen, oder alternativ kationische oder anionische Polymere, wie Poly-Lysin, Poly-Arginin, Poly-Ethylenimin (PEI), oder abgeleitete Produkte wie IC31 verwendet.

20. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei die Vakzine mit Adjuvantien gemeinsam formuliert oder gemeinsam verabreicht wird, ausgewählt aus der Gruppe von zusätzlichen Antigenen gegen die das Immunsystem bereits starke Immunreaktionen aufgebaut hat, wie Tetanus-Toxoid, bakterielle Toxine wie Pseudomonas-Exotoxine, Diphtheria-Toxin, und Derivate von Lipid A.

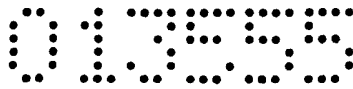
21. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die Vakzine gemeinsam formuliert oder gemeinsam verabreicht wird mit Wasser-in-Öl, oder Öl-in-Öl, oder Öl-in-Wasser Formulierungen oder anderen Systemen mit verzögerter Freisetzung von Immunogenen und/oder Adjuvantien.

22. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei die Vakzine gemeinsam formuliert oder gemeinsam verabreicht wird mit nanopartikulären Strukturen („Nanopartikeln“) oder mikropartikulären Strukturen („Mikropartikeln“) oder anderen partikulären Formulierungen.

23. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei die Multikomponenten-Vakzine in einer Menge von 0,01 Mikrogramm bis 10 mg verabreicht wird, bevorzugt von 1 Mikrogramm bis 1 mg, besonders bevorzugt von 10 Mikrogramm bis zu 500 Mikrogramm.

24. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorkvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen eines Trägers und
- b) Kopplung von Epitopen von mindestens zwei tumor-assoziierten Antigenen oder deren Mimikry an diesen Träger
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine immunogene Formulierung.



25. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine nach einem der Ansprüche bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen eines Antikörpers, der den Idiotyp eines tumor-assoziierten Antigens enthält, als Träger und
- b) Kopplung von mindestens einem Epitop eines tumor-assoziierten Antigens oder seines Mimikry an diesen Antikörper
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine immunogene Formulierung.

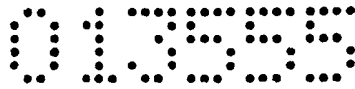
26. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure, welche für ein Trägerprotein kodiert, und
- b) Rekombination dieser Nukleinsäure mit einer oder mehreren Nukleinsäure(n) welche für mindestens zwei Epitope von tumor-assoziierten Antigenen oder deren Mimikry kodieren
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine immunogene Formulierung.

27. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure, welche für einen Antikörper, der den Idiotyp eines tumor-assoziierten Antigens beinhaltet, kodiert und
- b) Rekombination dieser Nukleinsäure mit einer weiteren Nukleinsäure welche mindestens ein Epitop eines tumor-assoziierten Antigens oder dessen Mimikry kodiert
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine immunogene Formulierung.

28. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein Ab1 und/oder Ab2 ist.



29. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24-28, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Proteinen, Kohlehydraten, und Glykolipiden.

30. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24-29, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitopen Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Proteinen, insbesondere CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptide, vorzugsweise abgeleitet von tumor-assoziierten Antigenen, **ODER** von Kohlehydraten, insbesondere Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

31. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24-30, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitopen Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, wobei mindestens eines von ihnen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteinne, insbesondere CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs usw. und T-Zell-Peptide, vorzugsweise abgeleitet von tumor-assoziierten Antigenen, **UND** mindestens eines von ihnen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Gruppe der Kohlehydrate, , insbesondere Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffe, die Epitope von mindestens zwei tumorassoziierten Antigenen, mindestens einen immunogenen Träger und mindestens ein Adjuvans enthält, formuliert in einer immunogenen Formulierung zur Induzierung einer Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene und Mit-Induzierung einer Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen, die zu einer Aktivierung von antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

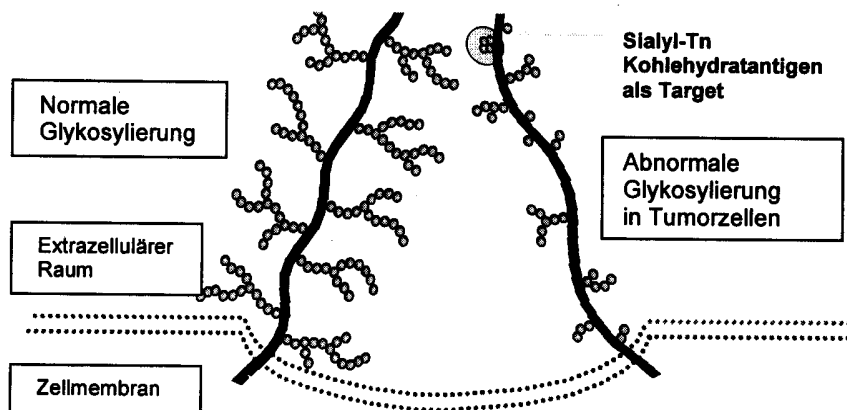
NACHGEREICHT

Fig. 1

Kohlehydratantigene, die aus einer abnormalen Glykosylierung in Tumorzellen resultieren, und auf deren Oberfläche vorhanden sind – sogenannte Tumor-assoziierte Antigene – repräsentieren vielversprechende Angriffsziele für die Immunisierung gegen Krebs

Sialyl-Tn Antigen

Durch abnormale Glykosylierung bedingte Epitope an der Oberfläche von Tumorzellen



→ Kohlehydratantigene (z.B. SialylTn) sind interessante Kandidaten für Immunisierung gegen Krebs

Fig. 2

Der Angriff auf mehrere Antigene bzw. Antigenepitope gleichzeitig (Multiep = Multiepitope) ist eine unentbehrliche Voraussetzung für therapeutische Effizienz einer Impfung gegen Krebs – hier illustriert am Beispiel der diversen Subindikationen des Mammakarzinoms

Histologische Diagnose	n	EpCam / Lewis Y Koexpression				
		Neg %	nur LewisY %	nur EpCAM %	beide pos %	LeYoder EpCAM oder LeY/EpCAM
Ductales Karz	1226	37%	32%	14%	17%	63%
Lobulares Karz	204	61%	27%	5%	6%	39%
Medullares Karz	43	19%	26%	37%	19%	81%
Cribriformes Karz	43	51%	16%	9%	23%	49%
Muzinöses Karz.	49	41%	33%	14%	12%	59%
Tubulares Karz	36	44%	50%	0%	5%	56%
Papillares Karz	21	14%	33%	24%	29%	76%
Klarzelliges Karz	11	36%	9%	36%	18%	64%
Apokrines Karz	13	15%	23%	46%	15%	84%
Atypisch medullares Karz	6	0%	17%	50%	33%	100%
Andere seltene Karzinome	16	50%	31%	19%	0%	50%

Karz = Karzinom

Anti LewisY
Vakzine

Anti EpCAM
Vakzine

Multiep
Vakzine

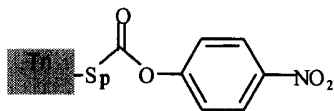
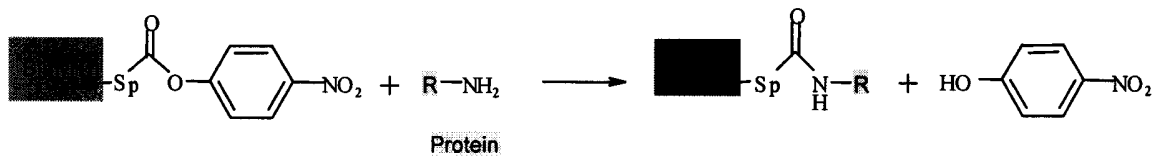
Fig. 3

Mehrkomponenten-Tumorvakzine mit mehreren Tumorantigenen

Kopplungschemie:

Bindung von nitrophenyl-aktivierten Liganden, wie synthetische Oligosaccharide, an hochimmunogene Proteinträger durch eines der gängigen Kopplungsverfahren.

Ein Beispiel für einen typischen Konjugatimpfstoff mit mehreren Tumorantigenen entsprechend der vorliegenden Erfindung:



TAA's: SialylTn, Tn, LewisY (LeY), GloboH,...

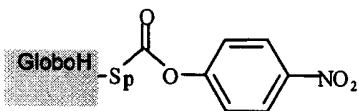
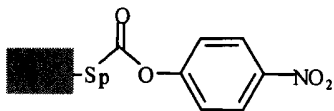


Fig. 4

Kopplung von SialylTn Kohlehydratepitopen an einen Proteinträger

Kopplungschemie:

Die Koppelung von nitrophenyl-aktivierten synthetischen, durch Abstandhalter ("spacer") verbundenen SialylTn Kohlehydratepitopen an die primären Aminogruppen des Proteinträgers.

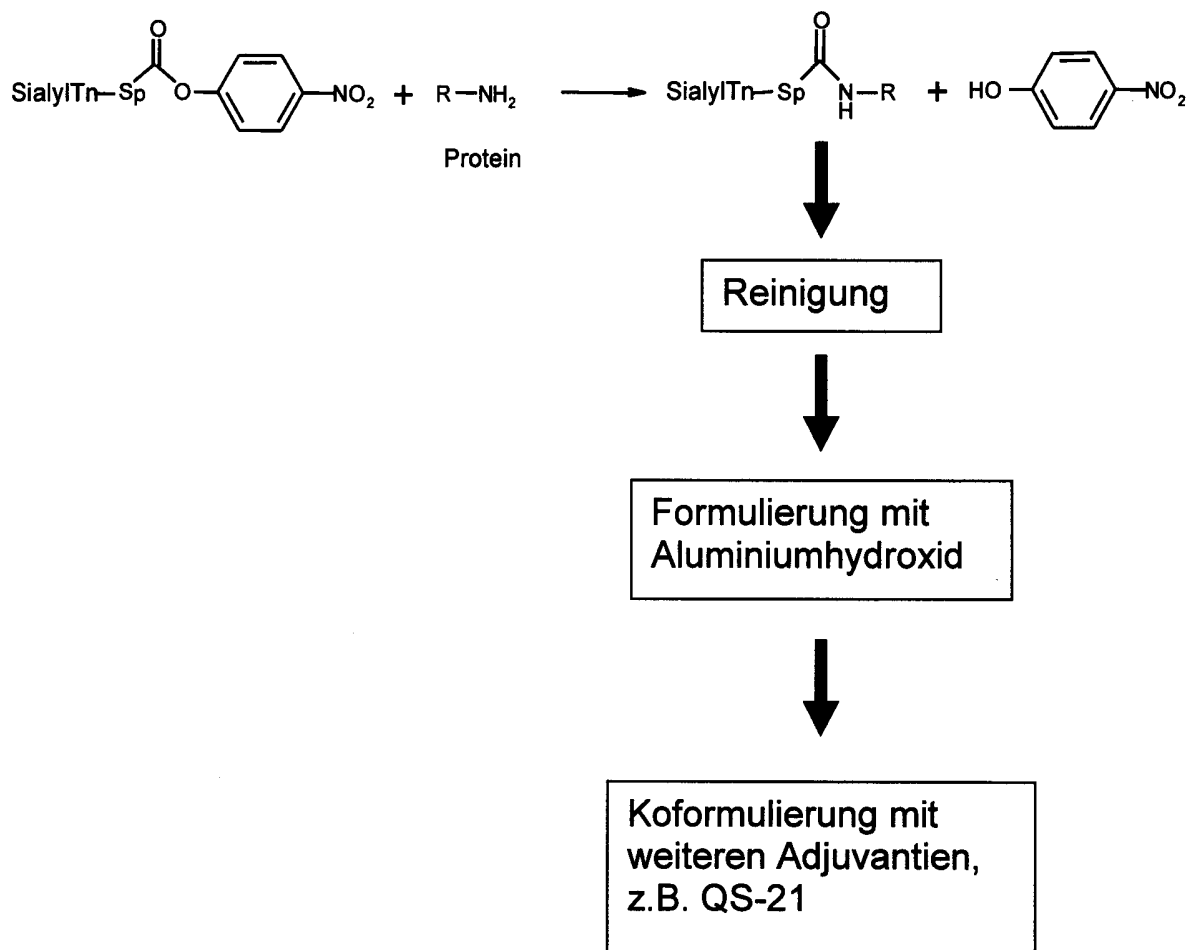
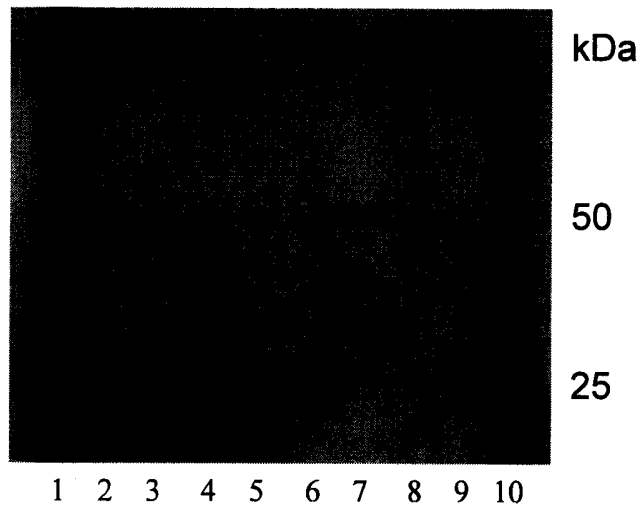


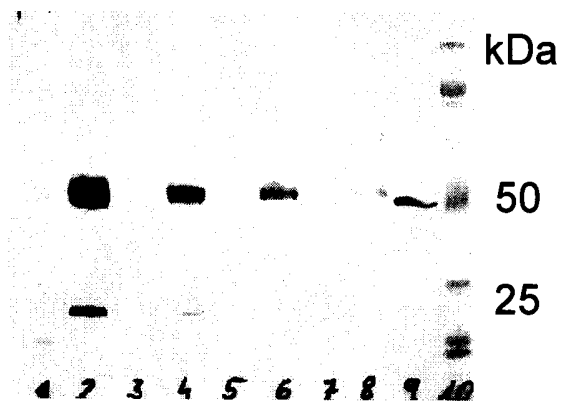
Fig. 5

Charakterisierung des Kopplungsproduktes SialylTn-mAb17-1A durch LDS-PAGE, Western Blot und IEF

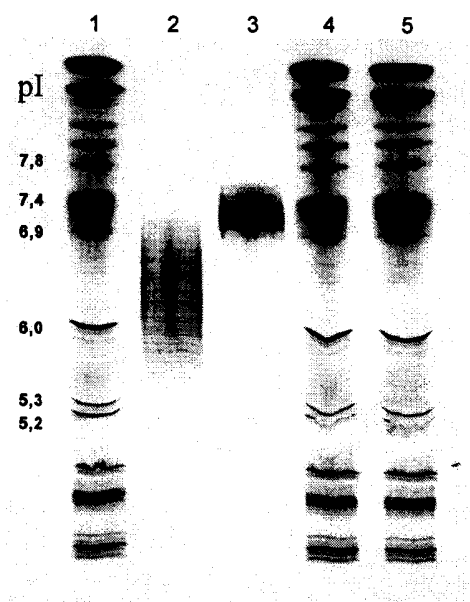
A) LDS-PAGE



B) Western blot



C) IEF



NACHGEREICHT

Fig. 6

Immunantwort gegen das Trägerprotein und SialylTn nach Immunisierung mit der SialylTn-mAb17-1A-Vakzine mit und ohne Formulierung mit einem starken Adjuvans (QS-21).

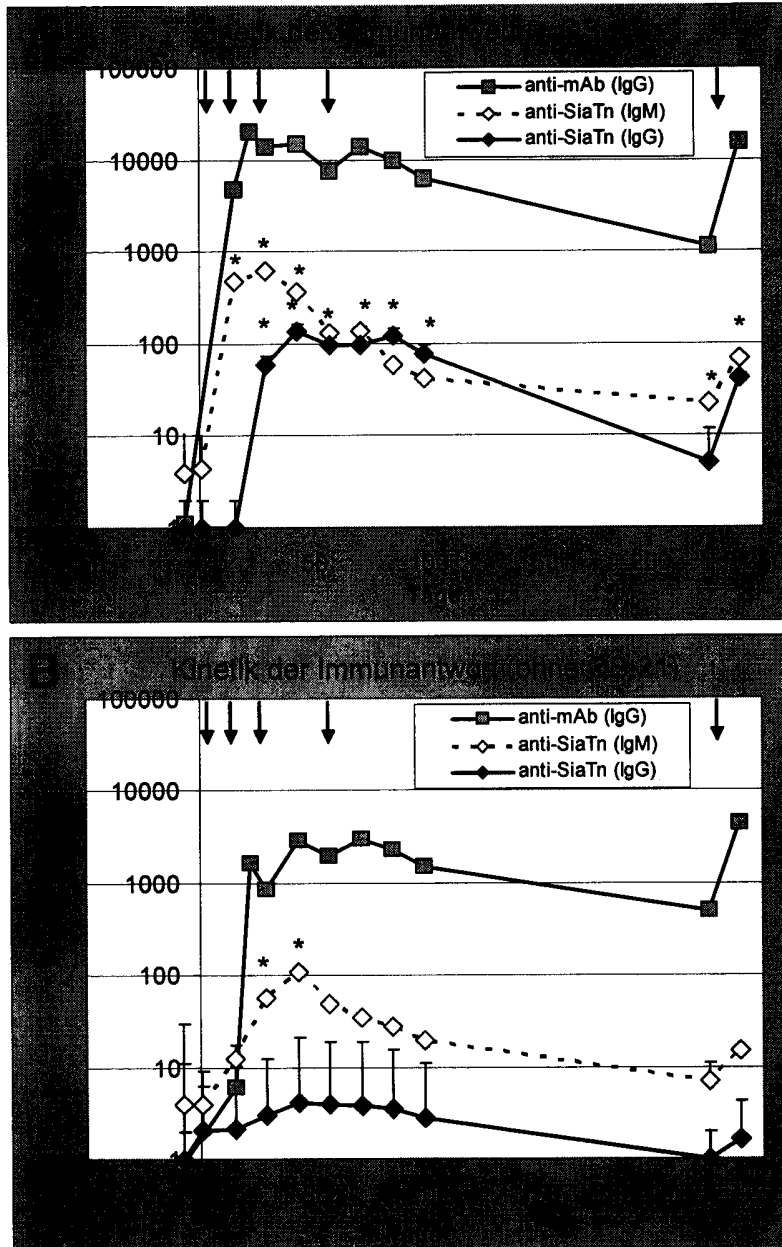


Fig. 7

Spezifität der Immunantwort gegen SialylTn und den mAb17-1A-Träger

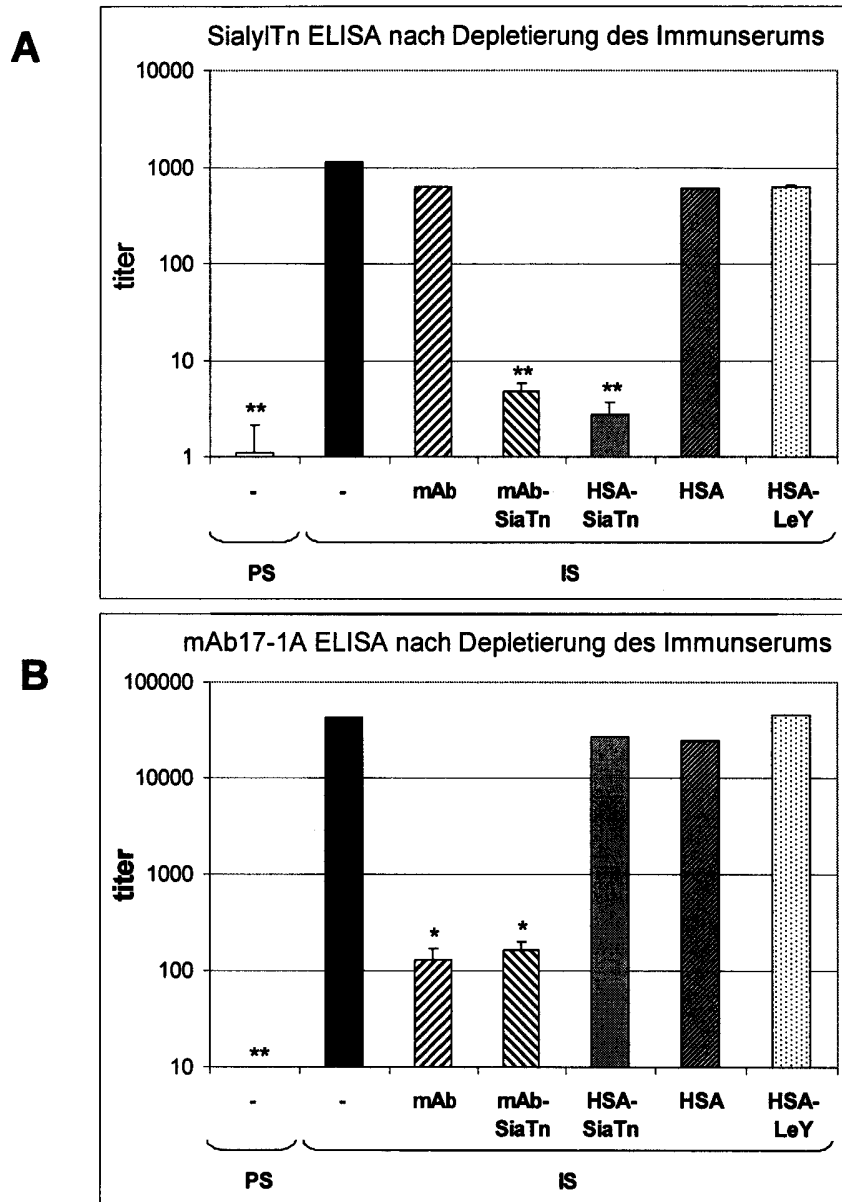


Fig. 8 Bindung der induzierten Immunreaktion an SialyITn positive OVCAR-3 Tumorzellen

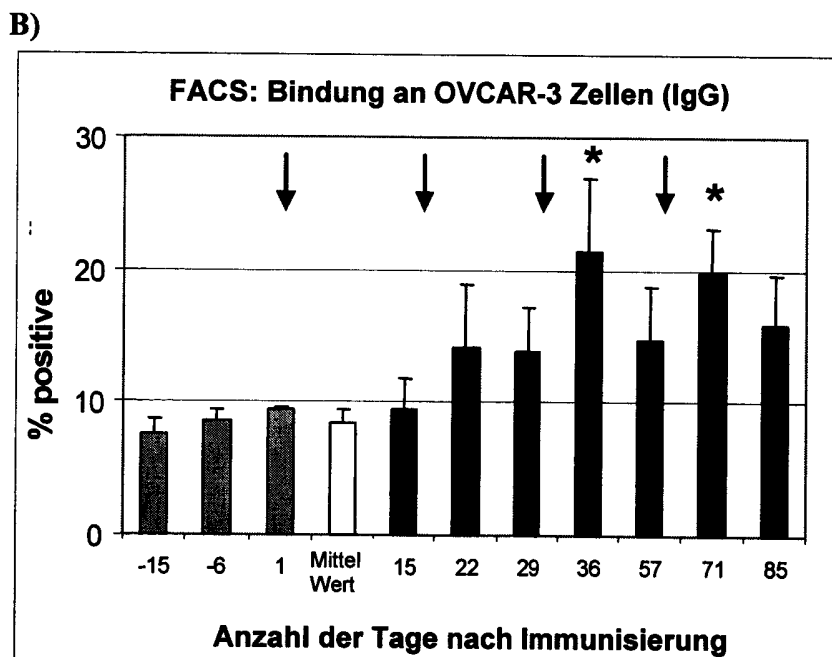
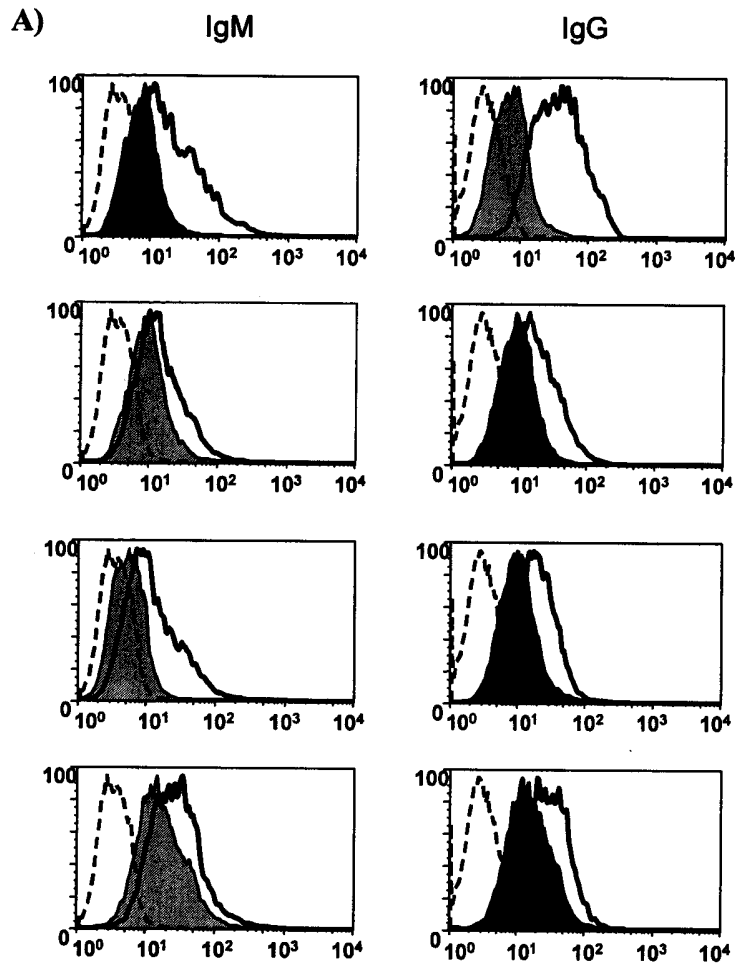


Fig. 9

Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) der Immunantwort, die in immunisierten Tieren gegen SialylTn-positive OVCAR-3-Tumorzellen hervorgerufen wurde.

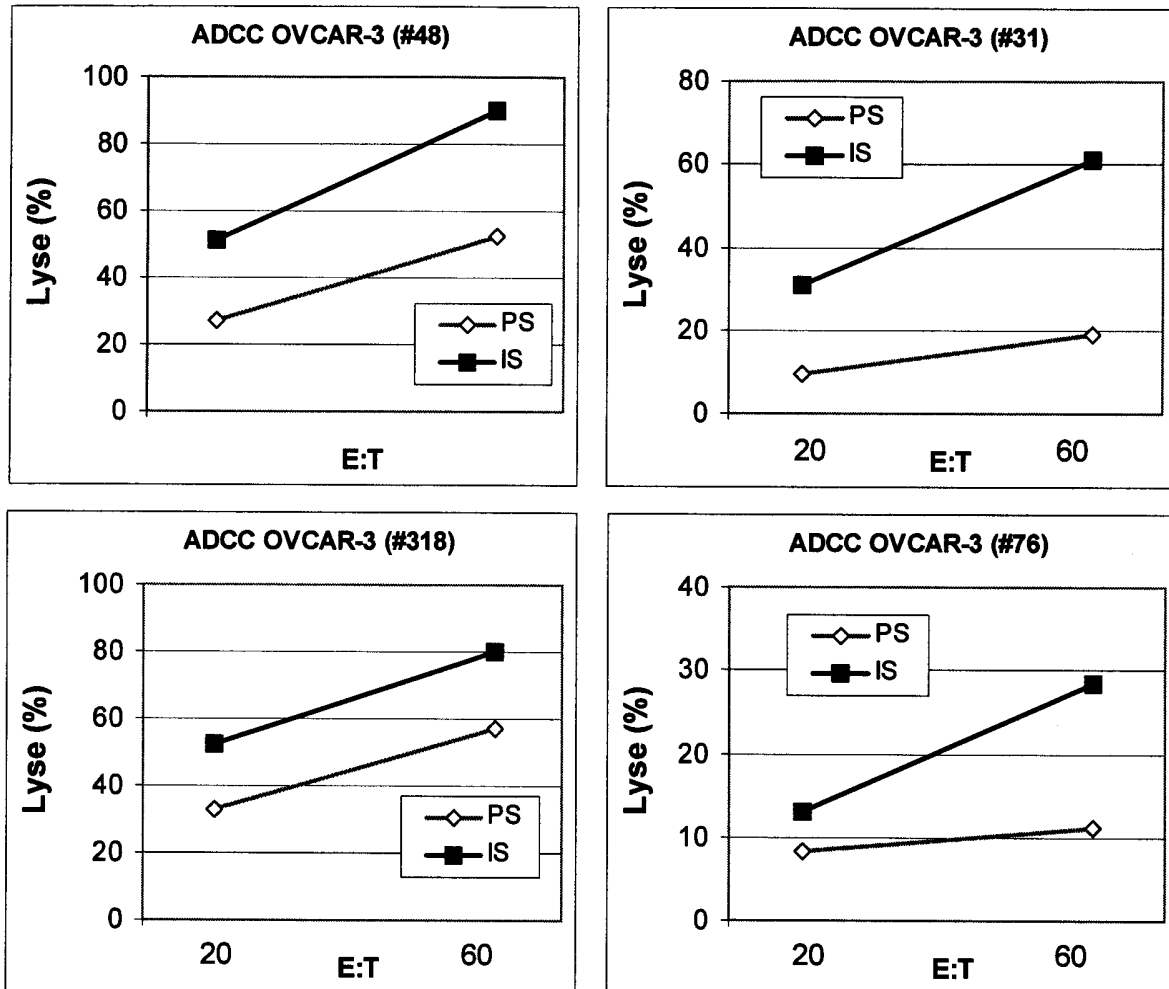


Fig. 10

Bindung der induzierten Immunreaktion an SialylTn negative KATOIII Tumorzellen

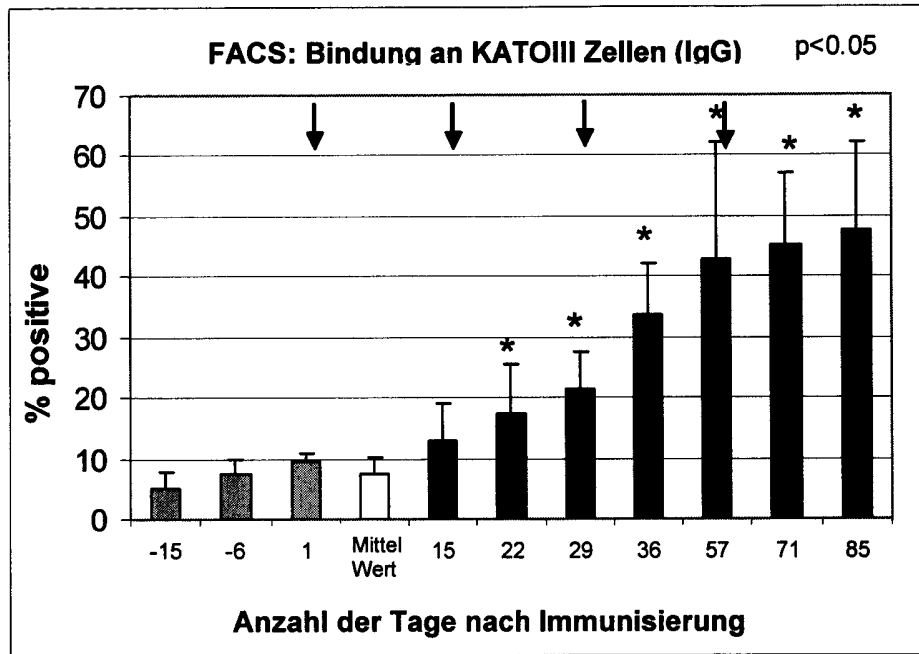


Fig. 11

Zytokinfreisetzung nach Immunisierung mit der SialyTn-mAb17-1A Vakzine mit (+ QS-21) und ohne (- QS-21) Adjuvans QS-21

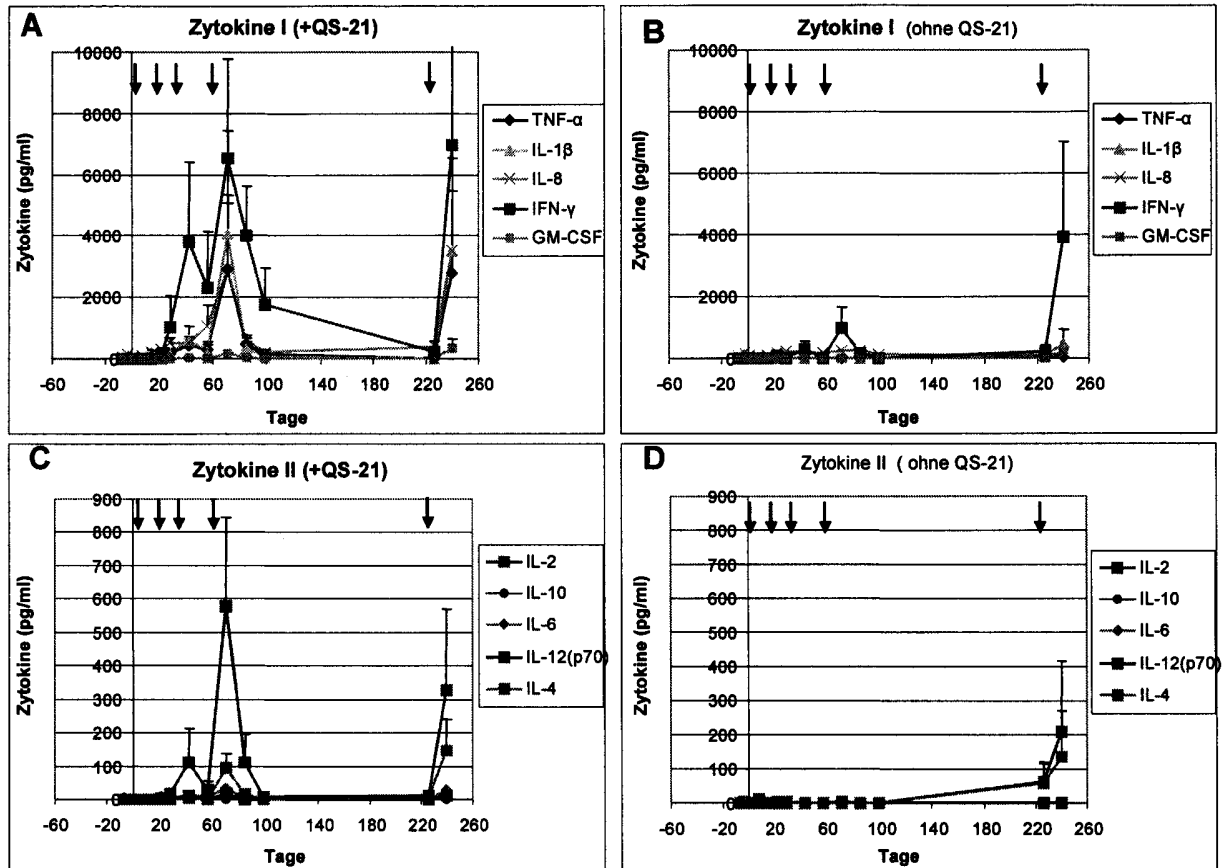


Fig. 12

Die Kinetik der Immunantwort gegen SialylTn stimmt mit dem vorübergehenden Zytokinausstoss im Serum zeitlich überein.

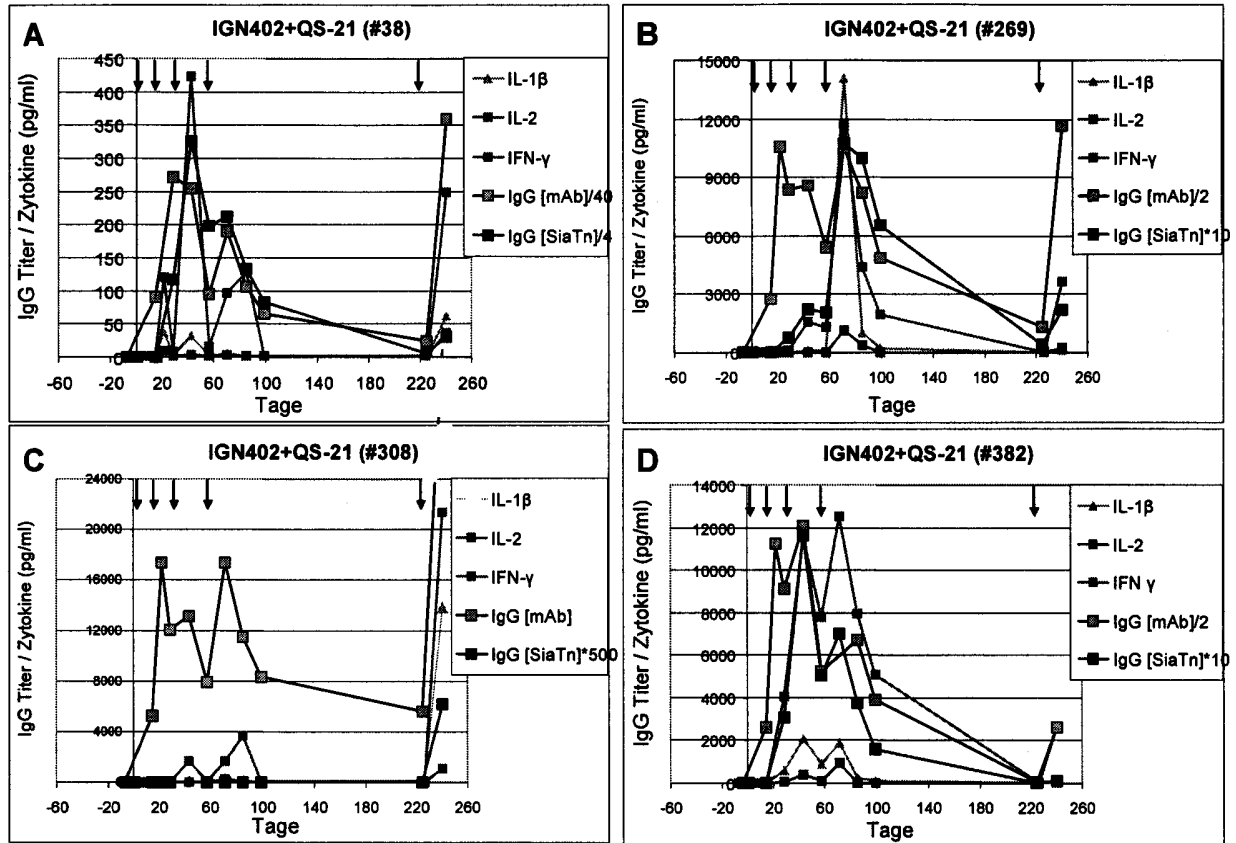


Fig. 13

NK-Zell-bewirkte Lyse von Katolli-Tumorzellen wird durch Immunsrum aktiviert

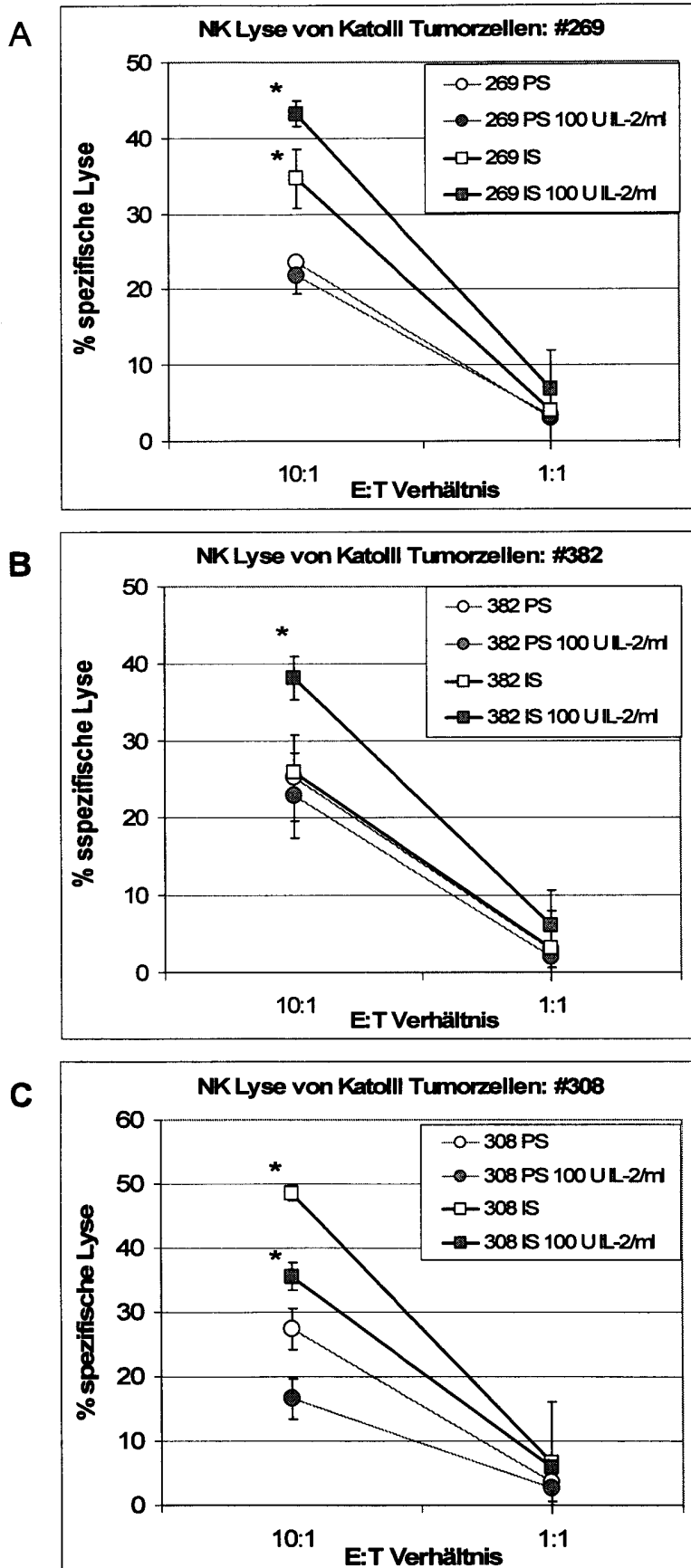


Fig. 14

Lyse von KatoIII-Tumorzellen durch aus Rhesusaffen gewonnene mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) nach wiederholten Auffrischungsimpfungen

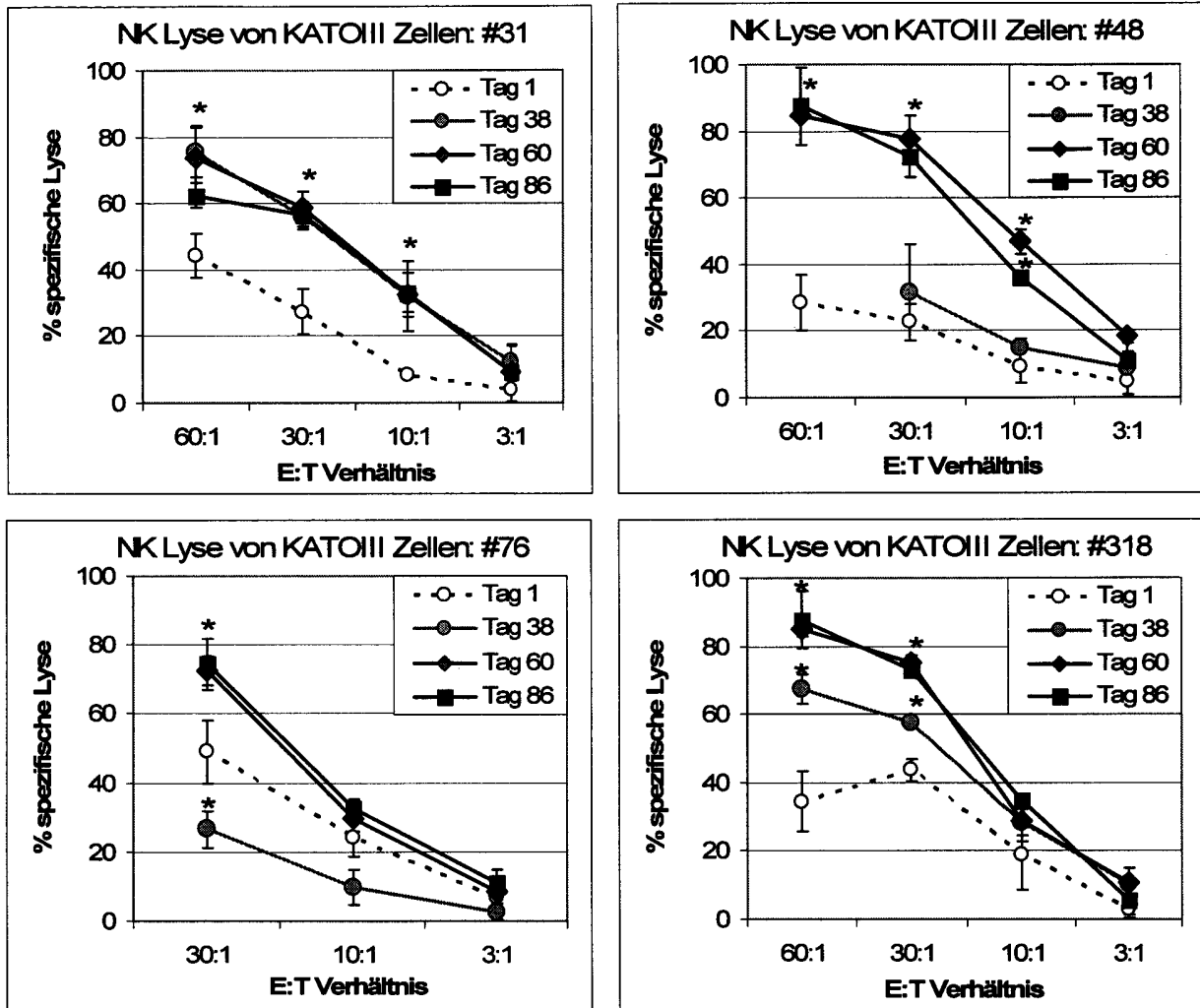


Fig. 15

Bestimmung der Kopplungseffizienz des Lewis Y-Kohlenhydrates an einen EpCAM-spezifischen Antikörpers: Western Blot-Analyse vom Kopplungsprodukt im Vergleich zum ungekoppelten Träger

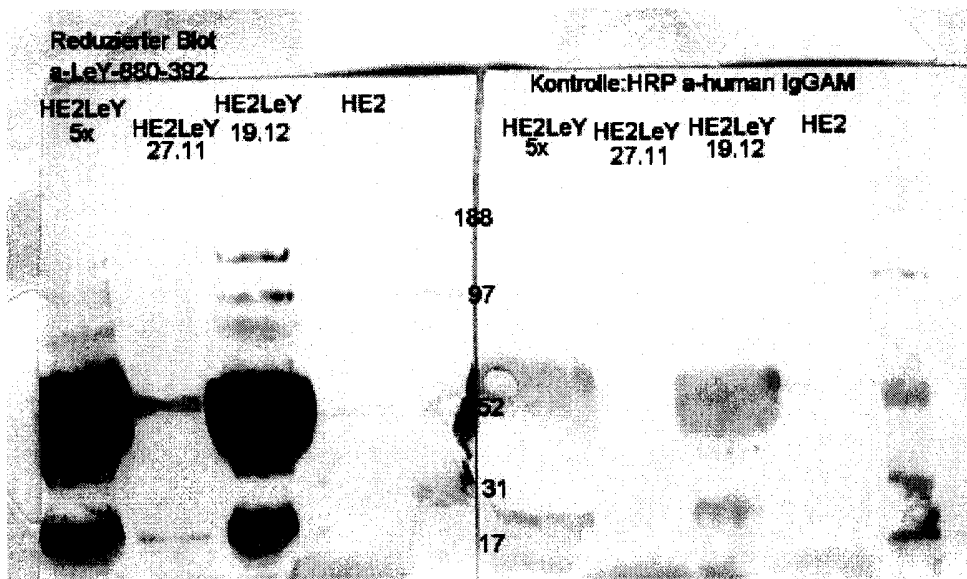


Fig. 16

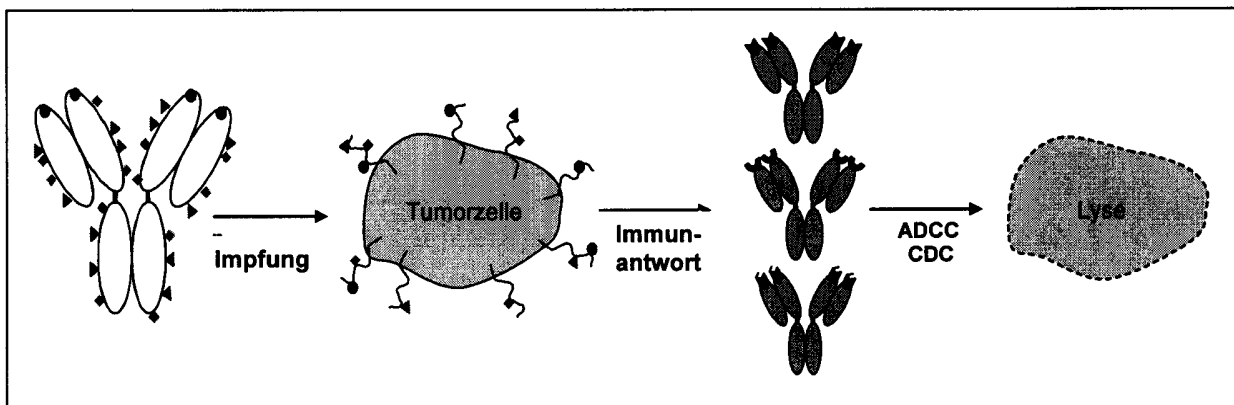
Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern, die tumor-assoziierte Antigene (Kohlenhydrate oder Peptide) imitieren, als immunogene Träger

Grafische Darstellung des zugrunde liegenden immunologischen Konzepts:

Symbole: Kreis (blau) = Lewis-Y-Imitation (Mimikry), Dreieck (rot) = gekoppeltes SialylTn, Viereck (grün) = gekoppeltes EpCAM-abgeleitetes Epitop

ADCC - Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

CDC – Komplementabhängige Zytotoxizität



(Neue) Patentansprüche:**1. Mehrkomponenten-Tumorkvakzine umfassend**

- (i) Epitope von mindestens zwei tumor-assoziierten Antigenen
- (ii) mindestens einen immunogenen Träger
- (iii) mindestens ein Adjuvans,

gemeinsam formuliert in eine langsam freisetzende immunogene Formulierung, welche zu einer Aktivierung von Antigen-unspezifischen Effektorzellen führt.

2. Die Vakzine nach Anspruch 1, wobei die Epitope Epitope von tumorassoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Peptide, Proteine, Oligosaccharide, Glykoproteine oder glykosylierte Peptide, vorzugsweise Antigene resultierend aus einer abnormalen Glykosylierung von Tumorzellen.

3. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteinen, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptide, oder Kohlehydrate, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Gangliosiden, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

4. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, wobei mindestens eines der Epitope ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteinen, bevorzugt CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptiden, und mindestens eines von ihnen ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kohlehydraten, bevorzugt Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

5. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der immunogene Träger ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus immunogenen Proteinen, Hitzeschockproteinen, oder xenogenen (spezies-fremden) Proteinen.

6. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der immunogene Träger ein immunogener Antikörper oder ein polyklonales Antikörperpräparat oder ein xenogener Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.

7. Die Vakzine nach Anspruch 1, wobei der immunogene Träger ein humaner, humanisierter oder chimärer Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
8. Die Vakzine nach Anspruch 1, wobei der immunogene Träger ein Kaninchen-, Ratten- oder Mausantikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
9. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei der immunogene Träger ein rekombinanter Antikörper ist, oder ein Derivat oder Fragment davon.
10. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der immunogene Träger ein anti-idiotypischer Antikörper oder ein Mimotop-Protein ist, bevorzugt ein mimotopischer Antikörper, welcher die Struktur von mindestens einem Epitop eines tumor-assoziierten Antigens imitiert.
11. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei der immunogene Träger ein Antikörper ist, der den Idiotyp eines gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichteten Antikörpers erkennt.
12. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei der anti-idiotypische Antikörper ein Glykosylierungsantigen imitiert.
13. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 6 bis 12, wobei der Antikörper eine Spezifität für ein Antigen aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs, Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, GD2, GD3, GM1 und GM2.
14. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der anti-idiotypische Antikörper ein Lewis-Y Antigen imitiert.
15. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei der Antikörper EpCAM imitiert.
16. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Epitope an den immunogenen Träger durch chemische Reaktionen, oder enzymatische Reaktionen, oder durch eine molekularbiologischen Methode, wie z.B. Rekombination der Nukleinsäuren, von Epitopen und Trägern gekoppelt sind.

17. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Epitope an den immunogenen Träger über ein bi-funktionelles Molekül, bevorzugt über N-Hydroxysuccinimid oder über Sulfhydryl-Gruppen oder über nitrophenyl-aktivierte Zucker, chemisch gekoppelt sind.
18. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die Vakzine mit zusätzlichen Adjuvantien gemeinsam formuliert ist.
19. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe von Aluminiumhydroxid (Alu Gel) oder Aluminiumphosphat, Wachstumsfaktoren, Lymphokinen, Zytokinen wie IL-2, IL-12, GM-CSF, Gamma Interferon, oder Faktoren des Komplementsystems wie C3d oder, des weiteren, Liposomenpräparationen, Lipopolysaccharide von E. coli (LPS), Lipid A halbsynthetische Adjuvantien, insbesondere QS-21 oder ENHANCIN oder verwandte Adjuvantien abgeleitet von natürlichen Quellen, kationische oder anionische Polymere, insbesondere Poly-Lysin, Poly-Arginin, Poly-Ethylenimin (PEI), oder Derivate davon, insbesondere IC31.
20. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei das Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe von zusätzlichen Antigenen, vorzugsweise wie Tetanus-Toxoid, bakterielle Toxine wie Pseudomonas-Exotoxine, Diphtheria-Toxin, und Derivate von Lipid A.
21. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die Vakzine gemeinsam formuliert wird mit Wasser-in-Öl, oder Öl-in-Öl, oder Öl-in-Wasser Formulierungen oder anderen Systemen mit verzögerter Freisetzung des immunogenen Trägers und/oder Adjuvantien.
22. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei die Vakzine gemeinsam formuliert wird mit nanopartikularen Strukturen („Nanopartikeln“) oder mikropartikulären Strukturen („Mikropartikeln“) oder anderen partikulären Formulierungen.
23. Die Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei die Multikomponenten-Vakzine in einer Menge von 0,01 Mikrogramm bis 10 mg vorgesehen wird, bevorzugt von 1 Mikrogramm bis 1 mg, besonders bevorzugt von 10 Mikrogramm bis zu 500 Mikrogramm.
24. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:
- a) Zur Verfügung stellen eines Trägers und
 - b) Kopplung von Epitopen von mindestens zwei tumor-assoziierten Antigenen oder deren Mimikry an diesen Träger

- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine langsam freisetzende Formulierung.

25. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung nach einem der Ansprüche bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen eines Antikörpers, der den Idiotyp eines tumorassoziierten Antigens enthält, als Träger und
- b) Kopplung von mindestens einem Epitop eines tumor-assoziierten Antigens oder seines Mimikry an diesen Antikörper
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine langsam freisetzende Formulierung.

26. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure, welche für ein Trägerprotein kodiert, und
- b) Rekombination dieser Nukleinsäure mit einer oder mehreren Nukleinsäure(n) welche für mindestens zwei Epitope von tumor-assoziierten Antigenen oder deren Mimikry kodieren
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine langsam freisetzende Formulierung.

27. Ein Verfahren zur Herstellung einer Mehrkomponenten-Tumorstoffimpfung nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch:

- a) Zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure, welche für einen Antikörper, der den Idiotyp eines tumor-assoziierten Antigens beinhaltet, kodiert und
- b) Rekombination dieser Nukleinsäure mit einer weiteren Nukleinsäure welche mindestens ein Epitop eines tumor-assoziierten Antigens oder dessen Mimikry kodiert
- c) Formulierung des Kopplungsproduktes aus Schritt (b) in eine langsam freisetzende Formulierung.

28. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein Antikörper-spezifisch für ein Epitop eines Tumor-assoziierten Antigens und/oder ein anti-idiotypischer Antikörper ist.

29. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Proteinen, Kohlehydraten, und

Glykolipiden.

30. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Proteinen, insbesondere CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs oder T-Zell-Peptide ODER von Kohlehydraten, insbesondere Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

31. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitope Epitope von tumor-assoziierten Antigenen sind, wobei mindestens eines von ihnen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Proteine, insbesondere CEA, TAG-72, MUC1, EGF, EGF-R, folatbindendes Protein A-33, CA125, EpCAM, HER-2/neu, PSA, MART, MAGEs, GAGEs, BAGEs usw. und T-Zell-Peptide UND mindestens eines von ihnen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Gruppe der Kohlehydrate, insbesondere Lewis Y, Tn, TF, SialylTn, GloboH, und Ganglioside, wie GD2, GD3, GM1 und GM2.

32. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass formulieren in eine langsam freisetzende Formulierung co-formulieren der Kopplungsprodukte mit Nano- oder Mikropartikel, Wasser-in-Öl, Öl-in-Öl Öl-in-Wasser- Formulierungen umfasst.

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : A61K 39/385 (2006.01); A61K 39/395 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: A61K39/385, A61K39/395C4, A61K39/395C3		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): A61K		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, Fulltext, Medline, CAS		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 11. Dezember 2006 eingereichten Ansprüchen 1-31 erstellt.		
Kategorie ⁷	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
Y	W 1996/034005 A1 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 31. Oktober 1996 (31.10.1996) <i>insbesondere Ansprüche 10, 11, 14, 26</i> --	1-31
Y	WO 2005/004809 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 20. Jänner 2005 (20.01.2005) <i>insbesondere Seite 123, Zeile 27 - Seite 152</i> --	1-31
Y	EP 674907 A2 (CIBA-GEIGY AG) 4. Oktober 1995 (04.10.1995) <i>das ganze Dokument</i> --	1-31
Y	WO 2003/097663 A2 (IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE FORSCHUNGS UND ENTWICKLUNGS-AG) 27. November 2003 (27.11.2003) <i>insbesondere Ansprüche 1, 7, 8</i> ----	1-31
Datum der Beendigung der Recherche: 31. Mai 2007		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER
⁷ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		