

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/04918 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Februar 2000 (03.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02280 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Juli 1999 (21.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 32 840.0 21. Juli 1998 (21.07.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KERKMANN-TUCEK, Aida [DE/DE]; Karlsbaderstrasse 11, D-65451 Kelsterbach (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: AGENTS FOR THE IMMUNOTHERAPY OF TUMORAL DISEASES (54) Bezeichnung: MITTEL ZUR IMMUNTHERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN (57) Abstract The invention relates to agents suitable for the immunotherapy of tumoral diseases. These agents are tumour cells with a combination of MHC I and MHC II genes occurring in humans, which genes are expressed. The invention further relates to a tumour cell library comprising the above tumour cells and to vaccines containing said tumour cells. The invention also relates to a method for producing the tumour cells and to the use of said cells and of the vaccines and the tumour cell library. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel, die sich zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen eignen. Solche Mittel sind Tumorzellen mit einer in einem Menschen vorliegenden Kombination von MHC I- und MHC II-Genen, wobei die Gene exprimiert werden, eine die Tumorzellen enthaltende Tumorzell-Bibliothek und die Tumorzellen umfassende Vakzine. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Tumorzellen und die Verwendung dieser sowie der Vakzine und der Tumorzell-Bibliothek.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

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

Mittel zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel, die sich zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen eignen. Solche Mittel sind Tumorzellen, eine diese enthaltende Tumorzell-Bibliothek und die Tumorzellen umfassende Vakzine. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Tumorzellen und die Verwendung dieser sowie der Vakzine und der Tumorzell-Bibliothek.

Zur Behandlung von Tumorerkrankungen werden die verschiedensten Verfahren durchgeführt. Vielfach werden Primärtumoren chirurgisch entfernt und die Patienten einer Nachbehandlung in Form einer Chemo- und/oder Strahlentherapie unterzogen. Durch die Nachbehandlung soll erreicht werden, daß restliche Tumorzellen zerstört werden. Auch werden Immuntherapie-Verfahren versucht, in denen aus den Primärtumoren erhaltene Tumorzellen manipuliert und den Patienten wieder zurückgegeben werden. Damit soll eine Sensibilisierung des Immunsystems für die Tumorzellen erreicht werden, wodurch eine spätere Metastasenbildung verhindert werden soll. Die Immuntherapie-Verfahren zeigen allerdings noch nicht die gewünschten Erfolge. Vielfach reicht die Sensibilisierung des Immunsystems nicht aus, wodurch Tumorzellen unerkant bleiben und sich zu Metastasen ausbilden können. Auch fordern Immuntherapie-Verfahren, daß Patienteneigene Tumorzellen zur Behandlung verwendet werden. Dies bedeutet einen großen Kosten- und Zeitaufwand. Vielfach kann eine Immuntherapie überhaupt nicht durchgeführt werden, weil nicht genügend Tumorzellen aus dem einzelnen Patienten erhalten werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem eine Immuntherapie von Tumorerkrankungen durchgeführt werden kann, wobei die

vorstehenden Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders über den Zusammenhang zwischen der Expression von MHC ("major histocompatibility complex") I-, II-Genen in Tumorzellen und der Immunogenität dieser. MHC I-Gene werden auch mit HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Genen bezeichnet. Ferner werden MHC II-Gene auch mit HLA-Dr-, HLA-DQ- und HLA-DP-Genen bezeichnet. Der Anmelder hat erkannt, daß in Tumorzellen die Expression von MHC I- und/oder MHC II-Genen gestört ist. Insbesondere hat er gefunden, daß viele Tumorzellen keine MHC II-Gene exprimieren. Desweiteren hat er erkannt, daß durch die gestörte Expression der MHC I- und/oder MHC II-Gene und dem damit verbundenen Fehlen der entsprechenden Genprodukte auf der Oberfläche von Tumorzellen die dort vorliegenden Tumorantigene vom Immunsystem nicht als Fremd-Antigene erkannt und daher die Tumorzellen nicht zerstört werden. Andererseits hat der Anmelder gefunden, daß Tumorzellen, die eine in einem Menschen vorliegende Kombination von MHC I- und MHC II-Genen aufweisen und diese auch exprimieren, eine hohe Immunogenität aufweisen. Solche Kombinationen sind insbesondere jene, die in Tabelle I angegeben sind. Desweiteren hat er erkannt, daß die Immunogenität solcher Tumorzellen noch gesteigert werden kann, wenn sie ferner kostimulatorische Moleküle und/oder Zytokine exprimieren.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, Tumorzellen mit einer in einem Menschen vorliegenden Kombination von MHC I- und MHC II-Genen bereitzustellen, wobei die Gene exprimiert werden.

Der Ausdruck "Tumorzellen" umfaßt Tumorzellen jeglichen Tumors des Menschen. Beispiele von Tumoren umfassen Mamakarzinom, Anogenitalkarzinom, Lungenkarzinom, Colonkarzinom, Hirntumor, Magenkarzinom, Blasenkarzinom, Leberzellkarzinom und Melanom.

Die Tumorzellen können frisch isoliert sein oder in Kultur vorliegen. Auch können sie als solche oder in einem Zellverband, z.B. (Primär)Tumor oder Metastase, vorliegen.

Der Ausdruck "Kombination von MHC I- und MHC II-Genen" umfaßt jegliche Kombination von MHC I- und MHC II-Genen, die in einem Menschen vorliegen kann. Insbesondere ist die Kombination aus den in Tabelle I angegebenen Kombinationen ausgewählt.

Der Ausdruck "exprimierte Gene" weist darauf hin, daß die Kombination von MHC I- und MHC II-Gene exprimiert wird. Dies kann durch übliche Verfahren erreicht werden. Günstig ist es, die Tumorzellen und ggfs. andere Zellen, z.B. Lymphozyten, des gleichen Patienten, zunächst einer Gewebetypisierung zu unterziehen um festzustellen, welche der MHC I- und/oder MHC II-Gene eine gestörte Expression aufweisen. Die Gewebetypisierung kann z.B. durch serologische Verfahren, wie sie von dem "11th International Histocompatibility Workshop" bekannt sind, erfolgen. Die gestörte Expression der MHC I- und/oder MHC II-Gene kann dann durch Transfektion von entsprechenden exogenen, ggfs. auf Expressionsvektoren vorliegenden Genen in die Tumorzellen kompensiert werden. Beispiele von Expressionsvektoren umfassen pUHD10-I, pRcRSV, pBSK, RSV.5 hygromycin, pBJ und B45-neo, Beispiele von Transfektionsverfahren umfassen Calciumphosphat-Coprecipitation, Elektroporation, Lipofektion, DOTAP-Liposome und retrovirale Transfektion. Die Expression von transfizierten MHC I- und/oder MHC II-Genen kann stabil oder transient sein, wobei stabil bevorzugt ist. Der Nachweis der Expression kann durch übliche Verfahren, z.B. serologische Verfahren, vgl. vorstehend, erfolgen.

In bevorzugter Ausführungsform weisen vorstehende Tumorzellen auch ein oder mehrere für kostimulatorische Moleküle und/oder Zytokine kodierende Gene auf, die exprimiert werden. Beispiele von kostimulatorischen Molekülen umfassen B7, wie B7-1 oder B7-2, und CD44. Beispiele von Zytokinen umfassen Interleukine, wie IL-2, GM-CSF, TNF- α und Interferon- γ . Das Vorliegen der

angesprochenen Gene in den Tumorzellen und die Expression der Gene können in üblicher Weise erreicht werden. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung vorstehender Tumorzellen. Ein solches Verfahren umfaßt die folgenden Verfahrensschritte:

- (a) Gewebetypisierung von Tumorzellen,
- (b) Transfektion der Tumorzellen mit MHC I- und/oder MHC II-Genen, wodurch eine in einem Menschen vorliegende Kombination dieser Gene erhalten wird, und
- (c) Selektion auf jene Tumorzellen, welche die MHC I- und MHC II-Gene exprimieren.

Der Ausdruck "Gewebetypisierung von Tumorzellen" umfaßt jegliches Verfahren, mit dem die Expression von MHC I- und MHC II-Genen bestimmt werden kann. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Günstig kann es sein, daß von dem gleichen Patienten, von dem die Tumorzellen stammen, auch andere Zellen, z.B. Lymphozyten, einer Gewebetypisierung unterzogen werden. Damit wird die Feststellung der für diesen Patienten geeigneten Kombination von MHC I- und MHC II-Genen noch erleichtert.

Der Ausdruck "Transfektion von Tumorzellen" umfaßt jegliches Verfahren, mit dem MHC I- und/oder MHC II-Gene, in Tumorzellen transfiziert werden können. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Der Ausdruck "Selektion auf Tumorzellen" umfaßt jegliches Verfahren, mit dem auf Tumorzellen selektioniert werden kann, die MHC I- und MHC II-Gene exprimieren. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

In bevorzugter Ausführungsform werden die Tumorzellen auch mit ein oder mehreren für kostimulatorische Moleküle und/oder Zytokine kodierenden Gene transfiziert und auf die Expression

dieser Gene selektioniert. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Tumorzell-Bibliothek, die vorstehende Tumorzellen umfaßt. Bevorzugt ist es, wenn die Tumorzellen von jeglichem Tumor des Menschen stammen und jegliche in einem Menschen vorliegende Kombination von MHC I- und MHC II-Genen umfassen. Besonders bevorzugt umfassen die Tumorzellen die in Tabelle I angegebenen Kombinationen von MHC I- und MHC II-Genen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vakzine, die vorstehende Tumorzellen und übliche Hilfsstoffe, z.B. Puffer, Trägermittel und Verdünnungsmittel, umfaßt. Bevorzugt ist es, wenn die Vakzine, Tumorzellen verschiedener Tumoren mit jeweils gleicher Kombination von MHC I- und MHC II-Genen umfaßt.

Die vorliegende Erfindung stellt Tumorzellen bereit, in denen eine Kombination von MHC I- und MHC II-Genen exprimiert wird, wobei die Kombination in einem Menschen vorliegt. Insbesondere ist die Kombination eine solche, die bei vielen Menschen vorliegt. Somit stellen die erfindungsgemäßen Tumorzellen ein Mittel dar, das nicht nur einem bestimmten Menschen, sondern vielen Menschen verabreicht werden kann. Ferner stammen die Tumorzellen von jeglichem Tumor des Menschen. Insofern ist die vorliegende Erfindung auch nicht auf die Behandlung eines bestimmten Tumors beschränkt, sondern kann für ein beliebig großes Spektrum von Tumoren verwendet werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Patienten, die an einer Tumorerkrankung leiden, eine Immuntherapie anzubieten. Diese hat den großen Vorteil, daß sie rasch erfolgen kann. Nach Feststellung der Tumorart und seiner Typisierung bzw. von anderen aus dem gleichen Patienten stammenden Zellen, können geeignete erfindungsgemäße Tumorzellen, z.B. aus der Tumorzell-Bibliothek, ausgewählt und dem Patienten verabreicht werden. Günstig ist es, wenn vor

Verabreichung der Tumorzellen diese durch Maßnahmen, wie Bestrahlung, an einer Replikation gehindert werden.

Desweiteren ermöglicht es die vorliegende Erfindung, prophylaktisch gegen alle möglichen Tumoren vorzugehen. Hierzu ist es nur notwendig, eine Gewebetypisierung von Zellen des zu behandelnden Menschen durchzuführen und diesem dann eine geeignete erfindungsgemäße Vakzine zu verabreichen.

Somit stellt die vorliegende Erfindung einen Durchbruch auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumorerkrankungen dar.

Die Erfindung wird durch das nachstehende Beispiel erläutert.

Beispiel: Herstellung erfindungsgemäßer Tumorzellen

(A) Etablierung von Tumorzellen eines Melanom-Patienten

Aus einem Melanom-Patienten wird der Tumor entfernt, zerkleinert und in mehrere Zellkulturflaschen mit DMEM-Medium gegeben. Nach 48 Stunden Kultivierung (37°C, 5 % CO₂) wird das Medium gewechselt. Nach 1-2 Wochen werden fünf Zellkulturflaschen ausgewählt, die unabhängig voneinander behandelt werden.

(B) Gewebetypisierung von Lymphozyten und Tumorzellen eines Melanom-Patienten

1. Vorbereitung von Lymphozyten und Tumorzellen für die Gewebetypisierung.

Melanom-Patienten von (A) wird Blut entnommen. Dieses wird mit einem Anti-Koagulantium versehen und mit gleichem Volumen an HBSS-Lösung verdünnt. Das Blut wird in Röhrchen gegeben, in denen Fikol vorgelegt ist. Die Röhrchen werden 20 min bei 800 g zentrifugiert. Die erhaltene Zwischenphase wird entnommen, in HBSS-Lösung resuspendiert und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die erhaltenen Lymphozyten werden gezählt und für die

Gewebetypisierung als Lösung mit einer Konzentration von $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ standardisiert.

Die etablierten Tumorzellen von (A) werden in gleicher Konzentration standardisiert.

2. Serologische Bestimmung von HLA-Molekülen auf Lymphozyten und Tumorzellen

Es werden Polystyren-Platten verwendet, die mit Antiseren gegen HLA-A, HLA-C, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ bzw. HLA-DP beschichtet sind. Diesen Platten wird jeweils $1 \mu\text{l}$ der Lymphozyten-Lösung bzw. Tumorzell-Lösung von (B) 1. zugegeben. Die Platten werden 30 min bei 22°C inkubiert, bevor jeweils $5 \mu\text{l}$ frisches Komplement zugegeben werden. Anschließend werden die Platten 60 min bei 22°C inkubiert, bevor jeweils $1 \mu\text{l}$ eines Acridinorange/Ethidiumbromid-Cocktail und $1 \mu\text{l}$ Quentscher-Lösung zugegeben werden. Die Platten werden bei Raumtemperatur 4 Stunden stehengelassen. Positive Proben werden durch die Entwicklung der fluoreszierenden Färbung ausgewiesen.

Es zeigt sich, daß die Lymphozyten folgende HLA-Moleküle aufweisen:

A*01; Cw*07; B*08; DRB1*03; DQA1*02; DQB1*02; DPA1*02; DPB1*02.

Die Tumorzellen weisen dagegen nur folgende HLA-Moleküle auf:
A*01; Cw*07; B*08.

3. Bestimmung der HLA-Gene von Lymphozyten

Aus den Lymphozyten von (B) 1. wird RNA isoliert und einer reversen Transkription unterzogen. Die erhaltene cDNA wird einem PCR-Verfahren unterworfen, bei dem Primer-Gruppen verwendet werden, die entsprechend der HLA-Moleküle von (B) 2. ausgewählt sind. Insbesondere werden folgende Primer verwendet:

A*01: forward: CGA CGC CGC GAG CCA GAA
reverse: AGC CCG TCC ACG CAC CG

Cw*07: forward: GGA CCG GGA GAC ACA GAA C
reverse: CGC ACG GGC CGC CTC CA

B*08: forward: GAC CGG AAC ACA CAG ATC TT
reverse: CCG CGC GCT CCA GCG TG

DRB1*03: forward: GAC GGA GCG GGT GCG GTA
reverse: CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA

DQA1*02: forward: CGA GTT TTA CGG TCC CTC TGG C
reverse: CTC ATT GGT AGC AGC GGT AGA GTT GG

DQB1*02: forward: GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG
reverse: CGT GCG GAG CTC CAA CTG

DPA1*02: forward: CCC GCT CTG GTT TGA TTT AT
reverse: CAC TTC GCA TCT ATG CGA

DPB1*02: forward: AGG ACA GAA CTC GGT ACT AGG A
reverse: TGA ATC CCC AAC CCA AAG TCC CC

Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: 24 Zyklen: 1 min, 94°C; 45 sec, 65°C; 2 min, 72°C. Endzyklus: 1 min, 94°C; 45 sec, 65°C; 10 min, 72°C.

Die amplifizierte DNA wird mit den Restriktionsenzymen SalI und HindIII gespalten und in den entsprechend gespaltenen Vektor M13 mp18 bzw. M13 mp19 inseriert. Rekombinante DNA-Moleküle werden zur Transformation von E. coli. JM109 verwendet. Erhaltene Klone werden einem Screening-Verfahren mittels Hybridisierung mit der amplifizierten DNA unterzogen. Positive Klone werden einer Sequenzierung unterworfen.

Es zeigt sich, daß die HLA-Moleküle von (B) 2. durch folgende HLA-Gene kodiert sind:

A*0101; Cw*0701; B*0801; DRB1*0301; DQA1*0201; DQB1*0201;
DPA1*0201; DPB1*0201.

4. Isolierung von HLA-D Genen aus Lymphozyten und Transfektion dieser in Tumorzellen

Dem Melanom-Patienten von (A) wird Blut entnommen. Dieses wird mit einem Anti-Koagulantium versehen und mit achtfachem Überschuß an RCL-Puffer verdünnt. Das Blut wird 30 sec in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird mit RCL-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Schrittes wird das Pellet in NLB-Puffer gelöst und mit Proteinase K 1 h bei 63-65°C und 10 min bei 95°C inkubiert. Die Lösung wird 60 sec in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand enthält die DNA aus den Lymphozyten.

Diese DNA wird einem PCR-Verfahren unterzogen bei dem jene Primer verwendet werden, die in (B) 2. für die HLA-D Gene, DRB1*03, DQA1*02, DQB1*02, DPA1*02 bzw. DPB1*02 eingesetzt worden sind.

Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: 30 Zyklen; 30 sec, 98°C; 60 sec, 55°C; 105 sec, 72°C. Endzyklus: 7 min, 72°C.

Proben der amplifizierten DNA werden auf einem 1 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es werden Fragmente von 216 bp für DRB1*03, von 219 bp für DQA1*02/DQB1*02, und von 245 bp für DPA*02/DPB1*02 erhalten.

Die amplifizierte DNA wird mit den Restriktionsenzymen SalI und HindIII gespalten und in den entsprechend gespaltenen Expressionsvektor B45-neo inseriert. Rekombinante DNA-Moleküle werden zur Transformation von E. coli JM109 oder DH5F'α verwendet. Erhaltene Klone werden einem Screening-Verfahren mittels Hybridisierung mit der amplifizierten DNA unterzogen. Positive Klone werden durch Sequenzierung bestätigt.

Diese Klone werden zur Transfektion der Tumorzellen von (A) verwendet. Die Tumorzellen werden trypsiniert und es wird eine Elektroporation bei 400 V und 490µ FD durchgeführt. Die Tumorzellen werden mit G418 (400 - 1000µg/ml) 4 Wochen selektioniert, bevor sie einem "Fluorescence-Activating-Cell-Sorting" (FACS) unterzogen werden. Es werden Tumorzellen erhalten, die folgende HLA-Moleküle exprimieren:

A*0101; Cw*0701; B*0801; DRB1*0301; DQA1*0201; DQB1*0201; DPA1*0201; DPB1*0201.

5. Transfektion von Tumorzellen mit Genen, die für kostimulatorische Moleküle bzw. Zytokine kodieren.

cDNAs, die für CD44, IFN-γ bzw. GM-CSF kodieren, werden von Invitrogen erhalten. Die cDNAs werden in die Expressionsvektoren RSV.5 hygro (blunt/BamHI), pUHD10-1 (XmnI) bzw. pBSK (BamHI) inseriert. Rekombinante DNA-Moleküle werden zur Transformation von E. coli JM109 oder DH5'α verwendet. Erhaltene Klone werden einem Screening-Verfahren mittels Hybridisierung mit den cDNAs unterzogen. Positive Klone werden durch Sequenzierung bestätigt.

Diese Klone werden zur Transfektion der in (B) 4. erhaltenen Tumorzellen verwendet. Die Transfektion wird mit DOTAP-Liposomen nach Anleitung des Herstellers Boehringer Mannheim durchgeführt. Die transfizierten Tumorzellen werden durch FACS bzw. RT-PCR gescreent. Es werden Tumorzellen erhalten, die folgende HLA-Moleküle und kostimulatorische Moleküle sowie Zytokine exprimieren:

A*0101; Cw*0701; B*0801; DRB1*0301; DQA1*0201; DQB1*0201; DPA1*0201; DPB1*0201; IFN-γ; CD44; GM-CSF.

Tabelle I
Häufige HLA Kombinationen

Völ- ker- grup- pe	HLA-A	HLA-C	HLA-B	HLA- DR	HLA- DQ	HLA- DP	Häu- fig- keit
Cor- nish (Kel- ten)	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	8,4%
Ger- man	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0401	4,8%
Ger- man	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0701	DR*- 1501	DQ*- 0101	DP*- 0401	2,5%
USA	A*- 1001	Cw*- 0701	B*- 0801	CR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0401	4,3%
Can- adian	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	5,1%
Au- stra- lian	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	7,6%
Japa- nese	A*- 2401	CBL	B*- 5201	DR*- 1501	DQ*- 0101	DP*- 0901	8,2%
Japa- nese	A*- 3301	CBL	B*- 4401	DR*- 1302	DQ*- 0101	DP*- 0401	4,9%
Indi- an	A*- 2401	CBL	B*- 6101	DR*- 1501	DQ*- 0101	DP*- 0402	4,1%
Thais	A*- 0201	Cw*- 1101	B*- 4601	DR*- 0901	DQ*- 0301	DP*- 0401	4,5%
Tai- wan	A*- 2401	Cw*- 0701	B*- 3901	DR*- 1201	DQ*- 0701	DP*- 1301	10,4%
Inuit	A*- 2401	CBL	B*- 4801	DR*- 0401	DQ*- 0701	DP*- 0201	9,4%
Sin- ga- pore	A*- 0201	Cw*- 1101	B*- 4601	DR*- 0901	DQ*- 0301	DP*- 0401	7,2%
Maori	A*- 0201	Cw*- 0101	B*- 5501	DR*- 1201	DQ*- 0701	DP*- 0101	8,1%
Bush- man	A*- 3001	CW*- 0401	B*- 5801	DR*- 1301	DQ*- 0101	DP*- 0401	8,2%
North Am.- Ne- groid	A*- 3601	CW*- 0401	B*- 5301	DR*- 1101	DQ*- 0101	DP*- 0101	1,1%

Bas- que	A*- 2901	CBL	B*- 4401	DR*- 0701	DQ*- 0201	DP*- 0201	5,4%
Java- nese	ABL	CBL	B*- 6201	DR*- 1201	DQ*- 0701	DP*- 0401	8,2%
Mon- goli- an	A*- 3001	Cw*- 0601	B*- 1301	DR*- 0701	DQ*- 0201	DP*- 0201	4,0%
Ura- lic	A*- 1101	CW*- 0401	B*- 3501	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	3,1%

Patentansprüche

1. Tumorzellen mit einer in einem Menschen vorliegenden Kombination von MHC I- und MHC II-Genen, wobei die Gene exprimiert werden.
2. Tumorzellen nach Anspruch 1, wobei ferner ein oder mehrere Gene für kostimulatorische Moleküle exprimiert werden.
3. Tumorzellen nach Anspruch 2, wobei die kostimulatorischen Moleküle B7 und CD44 umfassen.
4. Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1-3, wobei ferner ein oder mehrere Gene für Zytokine exprimiert werden.
5. Tumorzellen nach Anspruch 4, wobei die Zytokine Interleukine, GM-CSF, TNF- α und Interferon- γ umfassen.
6. Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Kombination von MHC I- und MHC II-Genen ausgewählt ist aus:

Völ- ker- grup- pe	HLA-A	HLA-C	HLA-B	HLA- DR	HLA- DQ	HLA- DP	Häu- fig- keit
Cor- nish (Kel- ten)	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	8,4%
Ger- man	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0401	4,8%
Ger- man	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0701	DR*- 1501	DQ*- 0101	DP*- 0401	2,5%
USA	A*- 1001	Cw*- 0701	B*- 0801	CR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0401	4,3%
Can- adian	A*- 0101	Cw*- 0701	B*- 0801	DR*- 0301	DQ*- 0201	DP*- 0101	5,1%

5	Au-stra-lian	A*-0101	Cw*-0701	B*-0801	DR*-0301	DQ*-0201	DP*-0101	7,6%
	Japa-nese	A*-2401	CBL	B*-5201	DR*-1501	DQ*-0101	DP*-0901	8,2%
	Japa-nese	A*-3301	CBL	B*-4401	DR*-1302	DQ*-0101	DP*-0401	4,9%
	Indi-an	A*-2401	CBL	B*-6101	DR*-1501	DQ*-0101	DP*-0402	4,1%
10	Thais	A*-0201	Cw*-1101	B*-4601	DR*-0901	DQ*-0301	DP*-0401	4,5%
	Tai-wan	A*-2401	Cw*-0701	B*-3901	DR*-1201	DQ*-0701	DP*-1301	10,4%
	Inuit	A*-2401	CBL	B*-4801	DR*-0401	DQ*-0701	DP*-0201	9,4%
15	Sin-ga-pore	A*-0201	Cw*-1101	B*-4601	DR*-0901	DQ*-0301	DP*-0401	7,2%
	Maori	A*-0201	Cw*-0101	B*-5501	DR*-1201	DQ*-0701	DP*-0101	8,1%
	Bush-man	A*-3001	CW*-0401	B*-5801	DR*-1301	DQ*-0101	DP*-0401	8,2%
20	North Am.-Ne-groid	A*-3601	CW*-0401	B*-5301	DR*-1101	DQ*-0101	DP*-0101	1,1%
	Bas-que	A*-2901	CBL	B*-4401	DR*-0701	DQ*-0201	DP*-0201	5,4%
25	Java-nese	ABL	CBL	B*-6201	DR*-1201	DQ*-0701	DP*-0401	8,2%
	Mon-goli-an	A*-3001	Cw*-0601	B*-1301	DR*-0701	DQ*-0201	DP*-0201	4,0%
	Ura-lic	A*-1101	CW*-0401	B*-3501	DR*-0301	DQ*-0201	DP*-0101	3,1%

7. Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1 - 6, umfassend die folgende Kombination von MHC I- und MHC II-Genen:

A*0101; Cw*0701; B*0801; DRB1*0301; DQA1*0201; DQB1*0201; DPA1*0201; DPB1*0201.

8. Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1 - 7, umfassend die folgende Kombination von MHC I-/II-Genen und Genen für IFN- γ , CD44 sowie GM-CSF:
A*0101; Cw*0701; B*0801; DRB1*0301; DQA1*0201; DQB1*0201; DPA1*0201; DPB1*0201; IFN- γ ; CD44; GM-CSF.
9. Verfahren zur Herstellung der Tumorzellen nach Anspruch 1, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
- (a) Gewebetypisierung von Tumorzellen,
 - (b) Transfektion der Tumorzellen mit MHC I- und/oder MHC II-Genen, wodurch eine in einem Menschen vorliegende Kombination dieser Gene erhalten wird, und
 - (c) Selektion auf jene Tumorzellen, welche die MHC I- und MHC II-Gene exprimieren.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei ferner die Tumorzellen mit ein oder mehreren für kostimulatorische Moleküle und/oder Zytokine kodierenden Genen transfiziert und auf die Expression dieser Gene selektioniert werden.
11. Tumorzell-Bibliothek, umfassend die Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1-8.
12. Vakzine, umfassend die Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1-8 und übliche Hilfsstoffe.
13. Verwendung der Tumorzellen nach einem der Ansprüche 1-8, der Tumorzell-Bibliothek nach Anspruch 11 oder der Vakzine nach Anspruch 12 zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Tumorerkrankungen.