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

(10) **DE 693 32 921 T2** 2004.05.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 600 591 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 32 921.1**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 307 816.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **01.10.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.06.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 5/10**
A61K 35/12, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:

956123	**02.10.1992**	**US**
6102	**15.01.1993**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Bristol-Myers Squibb Co., New York, N.Y., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Chen, Lieping, Seattle, US; Hellström, Ingegerd, Seattle, US; Hellström, Karl Erik, Seattle, US; Ledbetter, Jeffrey A., Seattle, US; Linsley, Peter S., Seattle, US

(54) Bezeichnung: **Hemmung des Tumorzellwachstums durch Verabreichung von B7-transfizierten Zellen**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Ein Fernziel der Krebsforschung war es, die immunologische Bekämpfung von Tumoren zu stimulieren. Dieses Ziel basiert auf der Hypothese, dass Tumore fremde Antigene zeigen, die potentiell als Ziel für das Immunsystem dienen können (Himmelweit (1957) The Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, Oxford, England). Obwohl es kontrovers bleibt, in welchem Ausmaß spontane Tumore Antigene zeigen, die in Immunisations- und Stimulationsexperimenten (Hewitt et al. (1976) Br. J. Cancer 33: 241–259) vom Immunsystem als fremd erkannt werden, ist gut dokumentiert, dass viele experimentelle Tumore Antigene zeigen, die die Bekämpfung des Tumors in solchen Experimenten vermitteln (Hellström und Hellström (1991) Principles of Tumor Immunity: Tumor Antigens, In: The Biologic Therapy of Cancer. DeVita, Jr. Et al., Hrsg., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, S. 35–52; Boon (1992) Adv. Cancer Res. 58: 177–211).

[0002] Zelluläre Immunität, im Wesentlichen durch T-Lymphocyten vermittelt, spielt die Schlüsselrolle bei der Zurückdrängung von Antigen zeigenden Tumoren. Sowohl T-Helferzellen (Th) als auch cytolytische T-Lymphocyten (CTL) sind daran beteiligt (Melief (1992) Adv. Cancer Res. 58: 143–175; Greenberg (1991) Adv. Immunol. 49: 281–355). Erkennung und Zerstörung von immunologischen Zielen erfordert Erkennung der Antigen-Peptide, die im Zusammenhang mit MHC-Molekülen präsentiert werden, durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Lymphocyten (Bjorkman et al. (1988) Nature 329: 512–518; Unanue (1984) Annu. Rev. Immunol. 2: 395; Townsend et al. (1986) Cell 44: 959–968). Obwohl T-Zell- Immunität gegen bestimmte Tumor-Antigene bei einigen Tieren und beim Menschen entdeckt wurde (van der Bruggen et al. (1991) Science 254: 1643–1647; van den Eynde et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 1373–1384; Anichini et al., (1987) Immunol. Today 8: 385–389), haben diese "imunogenen" Tumore im Allgemeinen ein progressives Wachstum und töten schließlich ihre Wirte.

[0003] Es gibt mehrere Gründe, weshalb selbst diese Tumore, die Antigene zu ihrer Bekämpfung zeigen, einer Zerstörung durch das Immunsystem entkommen können. Dazu gehört das Unvermögen der Tumore, Antigene adäquat herzustellen und den T-Zellen zu präsentieren, weil sie verminderte Spiegel von Klasse I-MHC-Expression aufweisen (Elliot et al. (1989) Adv. Cancer Res. 53: 181–244). Ein Problem, das durch Transfizierung mit Klasse I-MHC-Genen (Hui et al. (1984) Nature 311: 750–752; Tanaka et al. (1984) Science 228: 26–30; Wallich et al. (1985) Nature 315: 301–305) oder mit □-Interferon DNA, die Antigen-Herstellung verstärkt (Restifo et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 1423–1431) umgangen werden könnte. Das Ausbleiben einer wirksamen Anti-Tumor-Immunantwort kann auch an einer ungenügenden Funktion der T-Helferzellen in den Tumor tragenden Tieren liegen, die sowohl für die clonale Vermehrung der Tumor-spezifischen CTL (Fearon et al. (1990) Cell 60: 397– 403), als auch für die Aktivierung von Makrophagen und anderen entzündlichen Zellen, die Tumorzerstörung bewirken können, notwendig sind. Transfizierung von Tumorzellen mit IL-2- oder IL-4- cDNAs führt zur Paracrin-IL-2-Sekretion von Lymphokinen, die stellvertretend für T-Zell-Hilfe Tumor-spezifische CTL anregten und Bekämpfung des Tumors bewirken (Fearon et al., (1990) Cell 60: 397–403; Gansbacher et al. (1990) J. Exp. Med. 172: 1217–1224; Ley et al. (1991) Eur. J. Jmmunol. 21: 851–854; Golumbek et al. (1991) Science 254: 713–716). In ähnlicher Weise kann auch die Transfizierung von Tumoren mit IL-4-cDNA Bekämpfung des Tumors (Tepper et al. (1989) Cell 57: 503–512) und die Erzeugung von T-Zell-vermittelter Tumor-Immunität (Golumbek et al. (1991) Science 254: 713–716) bewirken.

[0004] Ein weiterer Mechanismus, der zur Erzeugung wirksamer Tumor-reaktiver T-Zellen beitragen kann, hängt mit den Zwei-Signal-Modellen zur Aktivierung von Immunzellen zusammen. Dieses Modell wurde ursprünglich für B-Lymphocyten (Bretscher and Cohn (1970) Science 169: 1042–1049) als eine Erklärung dafür aufgestellt, dass Antigene, die auf Zellen nichthämatopoetischen Ursprungs präsentiert werden, keine Transplantat-Abstoßung hervorrufen (Lafferty et al. (1983) Ann. Rev. Immunol. 1: 143). Die Zwei-Signal-Modelle sind inzwischen auf alle Lymphocyten ausgedehnt worden (Janeway (1989) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54: 1–13; Nossal (1989) Science 245: 147–153; Schwartz (1989) Cell 57: 1073–1081). Diese Modelle gehen davon aus, dass Lymphocyten zur optimalen Aktivierung sowohl ein Antigen-spezifisches Signal, geliefert durch den Antigen-Rezeptor, als auch ein zweites, nicht spezifisches Antigen- oder costimulatives Signal benötigen. Costimulative T-Cell-Reaktionswege bestimmen, ob die Aktivität des TCR-Komplexes in einer Aktivierung oder Inaktivierung der Immunzellen münden (Mueller et al. (1989) Annu. Rev. Immunol 7: 445; Schwartz (1989) Cell 57: 1073–1081), und Antigen-Präsentation ohne T-Zell-Stimulierung führt zu funktionaler Inaktivierung oder clonaler Anergie oder sogar zum Zelltod (Schwartz, (1989) Cell 57: 1073–1081).

[0005] Die molekulare Basis der T-Zell-Costimulierung ist noch unklar, kann aber mehrere Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) umfassen, die von T-Zell-Oberflächenrezeptoren erkannt werden (van Seventer et al. (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294–303). Ein wichtiges costimulatives Molekül ist B7, das auf aktivierten B-Zellen (Freeman et al. (1989) J. Immunol. 143: 2714) und andere APC (Freeman et al., 1989; Razi-Wolf et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4210–4214) exprimiert wird. B7 bindet an CD28 (Linsley et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5031–5035) und CTLA-4 (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 721–730) -Rezeptoren auf T-Zellen und costimuliert die Proliferation von menschlichen und mausstämmigen

$CD4^+$-T-Zellen (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569; Gimmi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575–6579; Kuolova et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 759–762; Damle et al. (1992) J. Immunol. 132: 1985–1992). In vitro-Experimente legen nahe, dass Signale die vom CD28-Rezeptor (Jupe et al. (1990) Immunol. Today 11: 211–216) übertragen werden, bestimmen können, ob TCR-Besetzung in einer produktiven Immunantwort oder in clonaler Anergy mündet (Jenkins et al. (1991) J. Immunol. 147: 2641–2466; Harding et al. (1992) Nature 356: 607–609). In vivo-Experimente weisen darauf hin, dass Blockierung der Costimulierung durch B7 humorale Antworten wirksam unterdrücken kann. (Linsley et al. (1992) Science 257: 792–795) und Langzeitakzeptanz von Fremdgewebe ermöglicht (Lenschow et al. (1992) Science 257: 792– 795).

[0006] Das B7-Molekül wird vorzugsweise auf hämatopoetischen Zellen exprimiert (Freeman et al. (1989) J. Immunol. 143: 2714) und ist, wenn überhaupt, bei vielen kultivierten menschlichen Tumor-Zelllinien nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Diese Befunde legen nahe, dass einer der Gründe, weshalb immunogene Tumore oft I der Zerstörung durch T-Zellen entkommen können, darin zu suchen ist, dass ihnen passende costimulatorische Moleküle fehlen. Eine Voraussage aus dieser Annahme ist, dass die Einbringung von costimulatorischen Molekülen in Tumore, die Antigene zur Bekämpfung des Tumors besitzen, deren Fähigkeit zur Induzierung spezifischer Anti-Tumor-Immunität verstärken würde, die zu einer Zerstörung des Tumors in immunkompetenten Wirten führen würde. Diese Annahme wurde mit Hilfe eines Maus-Modells für Tumore untersucht, die zwar „Bekämpfungs"-Antigene exprimieren, aber trotzdem progressives Wachstum in ihren Wirten aufweisen. In diesem Modell wurde das menschliche Papillomvirus 16 (HPV-16) -E7-Gen in das nur wenig immunogene K1735-M2-Melanom transfiziert (Fidler und Hart (1981) Cancer Res. 41: 3266–3267). Ein Tumor erzeugender Transfektant, E7C3, wurde ausgewählt, gegen den eine $CD8^+$ T-Zell-vermittelte und HPV-16 E7-spezifische Tumor-Immunität erzeugt werden kann, indem synegene C3H/HeN-Mäuse mit E7-exprimierenden Fibroblasten immunisiert werden (Chen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 110–114; Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621). Die vorliegende Endung zeigt, dass die Transfizierung von E7C3-Tumorzellen mit dem costimulatorischen Molekül B7 Antitumor-Immunität gegen $E7^+$-Tumore erzeugt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Endung betrifft eine neuartige Zusammensetzung und ein Verfahren zur wirksamen Hemmung von Tumorzellwachstum. In diesem Verfahren werden einem Tumor Zellen entnommen und dann mit einer DNA transfiziert, die ein immunogenes Teilstück des B7-Liganden von B-Zellen codiert. Die transfizierten Tumorzellen exprimieren B7 auf ihrer Oberfläche und werden dem Patienten dann wieder injiziert. Die B7-transfizierten Tumorzellen rufen eine wirksame Immunantwort hervor, die sowohl gegen die transfizierten als auch gegen die nicht transfizierten Tumorzellen gerichtet ist. Auf diese Weise stimuliert die vorliegende Erfindung eine Immunantwort gegen die ursprünglichen Tumorzellen und Metastasen. Die Anwesenheit von B7 auf den transfizierten Zellen dient als ein unerwarteter Katalysator oder als Stimulanz für diese verstärkte Antwort. Dieses Verfahren eröffnet die Möglichkeit zur Behandlung von verstreut metastasierenden Krebserkrankungen durch die Entnahme einiger Zellen aus den Hauptherden, Transfizierung oder Transduzierung dieser Zellen, so dass sie B7 exprimieren, und erneuter Verabreichung der transfizierten Zellen, um beim Patienten eine breite und spezifische Immunantwort gegen die verstreuten Tumorzellen zu stimulieren. Ein Arzneimittel, das entweder rekombinante Tumorzellen, die transfiziert wurden, um B7 zu exprimieren, oder Membranen dieser B7 exprimierenden Zellen enthält, ist ebenfalls in diese Erfindung eingeschlossen.

[0008] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenso ein Verfahren zur Immunisierung eines Patienten gegen spezifische Tumorzellen, indem dem Patienten B7-transfizierte Tumorzellmembranen verabreicht werden, um eine Immunantwort hervorzurufen, die in der Lage ist, eine Bekämpfungsantwort oder Zelltötung bei fortgesetzter Tumorzellexposition zu stimulieren.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0009] In den Abbildungen:

[0010] **Fig.** 1 zeigt die Expression von B7 in transfizierten Zelllinien. Die Zellen wurden entweder mit CTLA4Ig (ausgezogene Linien) oder dem Kontroll- mAb Chimärer L6 (gepunktete Linien) gefärbt, gefolgt von FITC-konjugiertem anti-Mensch Ig-C□-Ziegenserum, wie in den experimentellen Verfahren beschrieben. Insgesamt 5000 Zellen wurden aus jeder Probe analysiert. Tafel A zeigt E7C3-Zellen und ihre B7-Transfektanten, und Tafel B zeigt K1735-M2-Zellen und ihre B7-Transfektanten.

[0011] **Fig.** 2 zeigt, dass die von $B7^+$ -E7C3-Zellen induzieren Tumore von immunkompetenten, syngenen C3H/HeN-Mäusen bekämpft wurden.

(A) Fotografie von Tumoren, die von $B7^-$- und $B7^+$-Zellen induziert worden waren. C3H/HeN-Mäusen wurden 5×10^6 E7C3-Zellen subkutan injiziert (drei Mäuse auf der linken Seite) oder $PB7^+$-Zellen (drei Mäuse auf der rechten Seite). Die Fotografie wurde 21 Tage nach der Injektion der Tumorzellen aufgenommen.

(B) Kinetik des Wachstums der von $B7^-$ und $B7^+$ -E7C3-Zellen induzierten Tumore. C3H/HeN-Mäusen wur-

den die angegebenen Zellen (5×10^6) subkutan injiziert. Die Größen der Tumore wurden wöchentlich untersucht, indem die lotrechten zueinander stehenden Durchmesser mit einer Schieblehre vermessen wurden. Die Ergebnisse sind in mittleren Durchmessern der Tumoren in Millimetern aus Gruppen von je fünf Mäusen angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert. In mindestens drei Experimenten mit jeder Zelllinie wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

[0012] **Fig.** 3 zeigt die Histologie von Tumoren, die von $B7^-$ oder $B7^+$-E7C3-Zellen induziert wurden. C3H/HeN-Mäusen wurden subkutan $PB7^-$-Zellen (Tafel A) oder $PB7^+$-Zellen (Tafeln B-D) injiziert. Zehn Tage nach der Injektion wurden die Tumore entnommen und für die histologische Untersuchung vorbereitet. (A) von $PB7^-$-Zellen induzierter Tumor. Beachten Sie die Anwesenheit von nicht verkapselten Tumorknoten, die in die überlagernde Dermis hineinragen. Man kann die Nekrose von neoplastischen Zellen im Brennpunkt sehen (66-fache Vergrößerung). (B) von $B7^+$-Zellen induzierter Tumor. Beachten Sie die Anwesenheit einer großen zentralen Zone der Tumornekrose und Einwanderung von Entzündungszellen zwischen die Tumorzellen (66-fache Vergrößerung). (C) stärkere Vergrößerung von (B). Beachten Sie die fortgeschrittenen Einwanderung von Entzündungszellen (660-fache Vergrößerung). (D) stärkere Vergrößerung von (B). Die Tumorzellen variieren in Größe und Form und weisen ein blasses eosinophiles Cytoplasma mit unscharfen Zellgrenzen auf.

[0013] **Fig.** 4 zeigt, dass CTLA4Ig die Bekämpfung von $B7^+$-E7C3-Zellen blockiert. C3H/HeN-Mäusen wurden 5×10^6 BC22-Zellen, die zuvor mit 50 µg CTLA4Ig vermischt worden waren, subkutan in den Rücken injiziert. Die Behandlung mit CTLA4Ig wurde insgesamt über 2 Wochen durch intravenöse Injektion an jedem zweiten Tag (50 µg pro Behandlung) fortgesetzt. Mäuse, die entweder mit Hanks gepufferter Salzlösung (HBSS) oder chimärem mAb L6 (ChiL6) behandelt wurden, dienten als Kontrollen. Das Tumorwachstum wurde wie in **Fig.** 2 beschrieben überwacht. Dieses Experiment wurde mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

[0014] **Fig.** 5 zeigt, dass die Bekämpfung von $B7^+$-E7C3-Tumoren von $CD8^+$-T-Zellen vermittelt wird. C3H/HeN-Mäusen wurden zweimal in wöchentlichen Intervallen gereinigte anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörper zu 1 mg/Maus intravenös injiziert. Die gleiche Menge des anti-menschlichen CDS-Antikörpers 10.2 wurde als eine Kontrolle injiziert. Die Mäuse wurden dann subkutan mit BC16-Zellen geimpft, und das Tumorwachstum wurde wie in **Fig.** 2 beschrieben überwacht. In einem anderen Experiment wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

[0015] **Fig.** 6 zeigt, dass CTL von Mäusen erzeugt werden, die mit $B7^+$-E7C3-Zellen geimpft wurden.

(A) Erzeugung von CTL, die Ziele lysieren, die die auf MHC Klasse I beschränkte Form des E7-Gens exprimieren. BC16-Zellen (5×10^6) wurden C3H/HeN-Mäusen subkutan injiziert. Die Milz wurde Tumor-freien Mäusen entnommen, und die Milzzellen wurden zusammen mit □-bestrahlten 16N7-Zellen kultiviert, und die CTL-Aktivität gegenüber ^{51}Cr-markierten Zielzellen wurde, wie im Abschnitt der experimentellen Verfahren beschrieben, gemessen. Diese und andere Experimente zur Cytotoxizität wurden 3–5 mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

(B) Cytotoxische Aktivität wird von $CD8^+$-T-Zellen vermittelt. Effektorzellen, die von mit BC22 geimpften Mäusen erzeugt wurden, wurden bei 37°C für 1 h mit anti-CD4, anti-CD8 oder anti-AsialoGMl Abs unter Anwesenheit von Komplement vorbehandelt und zweimal gewaschen, bevor sie mit ^{51}Cr-markierten 16N7-Zellen in unterschiedlichen E : T-Verhältnissen inkubiert wurden.

(C) CTL-Aktivität von Mäusen, denen unterschiedliche Tumore injiziert wurden. C3H/HeN-Mäusen wurden subkutan K1735-M2-, E7C3-, BC16- oder bestrahlte (10.000 rad) E7C3-Zellen injiziert. Nach 4 Wochen wurden den Mäusen Milzzellen entnommen und in vitro zusammen mit □-bestrahlten 16N7 Zellen für 6 Tage kultiviert. Dann wurde cytotoxische Aktivität gegenüber den ^{51}Cr-markierten 16N7-Zellen gemessen, wie in dem Abschnitt experimentelle Verfahren beschrieben.

[0016] **Fig.** 7 zeigt, dass $B7^+$-E7C3-Zellen Immunität gegen $B7^-$-E7C3-Tumore an entfernten Stellen hervorrufen. C3H/HeN-Mäusen wurden subkutan in ihre linke Flanke HBSS-, E7C3- oder BC22-Zellen (5×10^6) injiziert. Unmittelbar darauf wurden die Mäuse durch subkutane Injektion von E7C3-Zellen (obere Tafel) oder E6B2-Zellen (untere Tafel) (5×10^6 Zellen) in ihre rechte Flanke herausgefordert. Das Wachstum von Tumoren in der rechten Flanke wurde wie in **Fig.** 2 beschrieben gemessen. Vier von fünf Tieren, denen BC22-Zellen injiziert worden waren, drängten E7C3-Tumore vollständig zurück, während progressives E7C3-Tumorwachstum in allen anderen Gruppen beobachtet wurde. Dieses Experiment wurde mit ähnlichen Ergebnissen noch einmal wiederholt.

[0017] **Fig.** 8 zeigt, dass $B7^+$-E7C3-Zellen Immunität gegen bereits bestehende metastasierte Tumore hervorrufen. C3H/HeN-Mäusen (10 pro Gruppe) wurden intravenös 1×10^5 E7C3-(A), E6B2- (B) oder K1735-M2-Zellen (C) injiziert. Vier Tage später wurden die Mäuse mit intravenöser Injektion von BC16-Zellen (1×10^6) behandelt. Die Behandlung wurde im Folgenden noch zweimal in Intervallen von fünf Tagen wiederholt. Die Überlebensrate der Tiere mit Tumoren wurde festgehalten. Das Überleben von Tieren ohne E7C3-Tumore wurde von der Behandlung mit BC16-Zellen nicht beeinträchtigt.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung und Hemmung von Tumorwachstum durch die Verabreichung von Tumorzellen, die mit DNA transfiziert sind, die das in B-Lymphocyten vorkommende B7-Protein codiert. Diese Transfizierung stimuliert das Immunsystem zum Aufbau einer Abwehrreaktion gegen die Tumorzellen, sowohl gegen B7-transfizierte als auch gegen nicht transfizierte.

[0019] Wir haben gezeigt, dass Transfizierung des costimulativen T-Zell-Moleküls B7 in mausstämmige Tumorzellen, die den HPV-16E7 offenen Leserahmen exprimieren, zu ihrer Bekämpfung führt, wenn sie in immunkompetente syngene Wirte transplantiert werden. Bekämpfung erforderte sowohl E7- als auch B7-Expression, da $B7^+$- und $B7^-$-Tumore gleich gut in nackten Mäusen wuchsen. Die die Bekämpfung hervorrufende Immunantwort war B7-abhängig, denn Behandlung der Mäuse mit CTLA4Ig, einem löslichen Rezeptor für B7 mit hoher Affinität, blockierte die Bekämpfung von $B7^+E7^+$-Tumorzellen (**Fig.** 4). Bekämpfung von $B7^+$-Tumoren führte auch zur Bekämpfung von $B7^-E7^+$ -Tumorzellen an entfernten Stellen.

[0020] Es gibt viele Beweise, dass B7 in vitro T-Zell-Aktivierung costimulieren kann (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569; Gimmi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575– 6579; Kuolova et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 759–762; Damle et al. (1992) J. Immunol. 148: 1985–1992). In der vorliegenden Erfindung werden diese Beobachtungen dadurch erweitert, dass eine Funktion von B7 sowohl bei der Stimulierung der T-Zell-Aktivierung in vivo, als auch bei der Regulierung der Tumorimmunität direkt gezeigt wird. Diese Daten unterstützen daher ein „Zwei-Signal"-Modell zur Aktivierung der Lymphocyten. Übereinstimmend mit diesem Modell liefert das tansfizierte E7-Tumor-Antigen, wie es über MHC Klasse I-Moleküle präsentiert wird, ein Antigen-spezifisches „Signal Eins", das den TCR-Komplex auf reaktiven T-Zellen erregt. Auf Tumorzellen exprimiertes B7 liefert ein nicht Antigen-spezifisches „Signal Zwei", indem es CD28 und CTLA-4 der T-Zellen an seine Rezeptoren bindet und damit die Immunantwort auf $E7^+$-Tumore costimuliert.

[0021] Es ist gut untersucht, dass anti-CD28 mAbs die Produktion verschiedener Lymphokine während der T-Zell-Aktivierung stimulieren können (Jupe et al. (1990) Immunol. Today 11: 211–216), und in neuerer Zeit wurde gezeigt, dass die Bindung von CD28 durch seinen Gegenrezeptor, B7, die T-Zell-Produktion von IL-2 anregt (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569; Gimmi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci: USA, 88: 6575–6579). Zusammen genommen legen diese Studien nahe, dass CD28 die Funktion eines wichtigen Regulators für die Lymphokinproduktion der T-Zellen hat. Es ist zur Zeit nicht bekannt, ob CTLA-4 eine ähnliche Funktion hat. Ergebnisse aus Experimenten, die sich mit der Transfizierung von Lymphokin-Genen in Tumoren befassen (Tepper et al. (1989) Cell 57: 503–512; Fearon et al. (1990) Cell 60: 397–403; Gansbacher et al. (1990) Cancer Res. 50: 7820–7825; Gansbacher et al. (1990) J. Exp. Med. 172: 1217–1224; Ley et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21: 851–854; Golumbek et al. (1991) Science 254: 713–716), legen nahe, dass Tumor-reaktive Lymphocyten manchmal in Tumor tragenden Tieren vorkommen, aber wegen der ungenügenden Verfügbarkeit von T-Zell-Lymphokinen nicht zu einer Bekämpfung in der Lage sind. Die vorliegende Studie schlägt vor, dass Mangel an Erregung des CD28-Rezeptors ein wesentlicher Faktor für die ungenügende Produktion von T-Zell-Lymphokinen bei Tumor tragenden Tieren sein kann.

[0022] Die anti-Tumor Immunität wurde in vivo und in vitro durch anti-CD8, nicht aber anti-CD4 mAbs aufgehoben, und $CD8^+$-CTL wurden von Mäusen, die $B7^+$ $E7^+$ -Tumore bekämpft hatten, ausreichend erzeugt. $CD8^+$-CTL sind auch für die Bekämpfung von $B7^+E7^+$ -Tumoren (Chen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 110–114; Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621) in Immunisierungs- und Reaktionsexperimenten verantwortlich. Bekämpfung eines Tumors in vivo und Cytolyse in vitro erforderten keine Expression von B7 auf Zielzellen (**Fig.** 6 und 7), was darauf hinweist, dass die die Ergebnisse nicht mit der Wirkungen von B7 auf die cytolytische Effektorphase (Azuma et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 353–360) erklärt werden konnte. Vielmehr schien die Rolle von B7 in diesen Experimenten darin zu bestehen, direkt die Lymphokin-Produktion und die Expansion von $CD8^+$-CTL auszulösen. $CD4^+$Th-Zellen schienen keine größere Rolle bei der Erzeugung dieser CTL zu spielen, denn die Entfernung von >95% der $CD4^+$-T-Zellen in vivo behinderte die Tumorbekämpfung nicht (**Fig.** 5). Neue Studien haben gezeigt, dass B7 Produktion von Lymphokinen und clonale Expansion von $CD8^+$-T-Zellen stimuliert, die ein transgenes TRC, spezifisch für anti-männliches (H-Y) Antigen, in Abwesenheit von $CD4^+$-T-Zellen exprimieren, und es wird ebenso deutlich, dass die Erregung von CD28 mit Hilfe spezifischer mAbs CTL-Aktivität hervorruft (Jung et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 4611; Nijuis et al. (1990) Cancer Immunol. Immunother. 32: 245–250). Die Stimulation von Lymphokin-Freisetzung durch CD28-Reizung hat möglicherweise auch durch Aufregulierung der Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen in vivo oder durch die Einbeziehung von Entzündungszellen (**Fig.** 3), die bei der Tumorzerstörung helfen, zur Bekämpfung des Tumors beigetragen.

[0023] Blockierende Interaktionen zwischen CD28/CTLA-4 und B7 in vivo kann zu langanhaltendem Überleben von Donor-spezifischem Transplantat führen (Lenschow et al. (1992) Science 257: 789–792), was anzeigt, dass Blockieren der Costimulation des CD28-Rezeptors bei fortgesetzter Anwesenheit fremder Antigene zu T-Zell-Untätigkeit führt. Da zirkulierende Tumor-Antigene und Immunkomplexe dazu beitragen, dass Tumore der immunologischen Bekämpfung entkommen (Hellström and Hellström (1991) Principles of Tumor Immunity:

Tumor Antigens, in: The Biologic Therapy of Cancer. DeVita, Jr. et al., Hrsg., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, S. 35–52), ist es verlockend, anzunehmen, dass die fortgesetzte TCR-Stimulierung durch fremde Antigene, die bei Abwesenheit geeigneter Costimulation durch Moleküle wie etwa B7 von Tumoren präsentiert oder freigesetzt werden, die Antitumor-Immunität unterdrücken.

[0024] Das Unvermögen vieler Tumore in Experimenten zur Immunisierung und Herausforderung, eine Bekämpfungsantwort hervorzurufen, wurde so interpretiert, dass diese Tumore offensichtlich nicht in der Lage sind, fremde antigene Determinanten zu exprimieren (Hewitt et al. (1976) Br. J. Cancer 33: 241–259). Es könnte sein, dass das Unvermögen von Tumoren, eine Immunantwort hervorzurufen, nicht darauf beruht, dass ihnen fremde antigene Determinanten fehlen, sondern dass sie keine costimulatorischen Signale für T-Zellen aussenden oder hervorrufen können. Möglicherweise sind solche Tumore nicht in der Lage, geeignete T-costimulatorische Moleküle zur direkten Stimulation der Expansion von $CD8^+$-T-Zellen, die intern hergestellte Tumor-Antigene erkennen, zu exprimieren. Alternativ können auch $B7^+$APC nicht in der Lage sein, geeignete Mengen antigener Peptide zum Hervorrufen einer $CD4^+$-T-Zell Antwort zu präsentieren. Mit anderen Worten, Tumore können nicht-immunogen sein, weil „Signal eins" oder „Signal zwei" nicht vorhanden ist.

[0025] Nicht-immunogene K1735-M2-Zellen wurden sogar nach Transfizierung mit B7 nicht bekämpft, so dass der hier verwendete Ansatz das Fehlen der Immunogenizität einiger Tumore nicht überwinden konnte. Es könnten allerdings auch weitere Moleküle neben B7 notwendig sein, um optimale Costimulation von T-Zellen in vitro zu erreichen (van Seventer et al. (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294–303). Ob Moleküle wie etwa ICAM-1, LFA-3, VCAM-1 (van Seventer et al. (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294–303) oder das hitzestabile Antigen (Liu, Y. et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2855–2859) in der Lage sind, Antitumor-Immunität zu stimulieren, ist zur Zeit nicht bekannt. Der hier dargelegte experimentelle Ansatz schlägt die Möglichkeit vor, dass die Bekämpfung von „nicht-immunogenen" Tumoren, wie etwa K1735-M2, durch ihre Transfizierung mit costimulatorischen Molekülen, anderen oder zusätzlich zu B7, ausgelöst werden kann.

[0026] Schließlich legen diese Daten nahe, dass Antitumor-Immunantworten bei Krebspatienten durch Stimulierung des CD28-Rezeptors in vivo gesteigert werden könnten. Es kann möglich sein, Expression von B7 auf Tumoren (oder B7-Aufbringung auf die Oberfläche der Tumorzelle) in vivo, oder auf APC, die potentiell antigene Peptide aus Tumorzellen präsentieren, zu steigern.

[0027] Es kann ebenso möglich sein, B7 in vitro in Tumorzellen zu übertragen, und Populationen von Tumor-reaktiven Lymphocyten für die Infusion in vivo dadurch zu vermehren, dass die Lymphocyten des Patienten ihren $B7^+$ -Tumorzellen ausgesetzt werden. Ein Fernziel wäre, systemische Immunität gegen ein Tumor-Antigen zu erzeugen, indem B7 direkt in vivo in Tumorzellen eingeführt wird. Da $B7^+E7^+$-Tumorzellen Immunität gegen $B7^+E7^+$-Tumore an entfernten Stellen stimulierten (**Fig.** 7), könnte die Erzeugung einer therapeutisch nützlichen Abstoßungsreaktion lediglich die Einführung von B7 in einige Tumorzellen in vivo erfordern.

[0028] Nach der allgemeinen Beschreibung der Erfindung kann ein tieferes Verständnis durch die speziellen Beispiele erhalten werden, die hierin nur zum Zweck der Erläuterung angeführt werden; sie dienen, soweit nicht anders angegeben, nicht der Eingrenzung.

[0029] Zum Zweck der Durchführung der Studien, die mit den hierin beschriebenen Beispielen verdeutlicht werden, wurden die folgenden experimentellen Verfahren und Protokolle verwendet.

EXPERIMENTELLE VERFAHREN

Mäuse

[0030] Weibliche C3H/HeN-Mäuse, 6–8 Wochen alt, wurden von Charles River Breeding Laboratories (Wilmington, MA) gekauft. Weibliche BALB/c (nu/nu) Mäuse, 4–8 Wochen alt, wurden von Harlan Sprague Dawley Co. (Indianapolis, IN) gekauft.

Zelllinien

[0031] K1735-M2-Zellen stammten von C3H/Hen ($H\text{-}2^k$) Mäusen (Fidler und Hart, 1981). E7C3 und E6B2 sind Transfektanten von K1735-M2, die das HPV-16 E7- oder entsprechend das E6-Gen exprimieren (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621). Die Linien p2555 and 16N7 stammen von einem Fibrosarkom NCTC2555 ($H\text{-}2^k$) (American Type Culture Collection, Rockville, MD) und wurden mit parentalem pLXSN Retrovirus oder entprechend mit Retroviren, die das HPV-16 E7-Gen enthielten, transfusioniert (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621). Das p815E7 ist ein von DBA/2 abstammendes Mastocytom ($H\text{-}2^d$) (ATCC), transduziert mit retroviralem HPV-16 E7 (Halbert et al. (1991) J. Virol. 65: 4417). Alle Zellen wurden bei 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) gehalten, das 10% fötales Kälberserum enthielt (Sterile System, HyClone, Logan, UT).

Clonierung und Transfizierung von mausstämmigem B7

[0032] Ein DNA-Fragment, das mausstämmiges B7 codiert (Freeman et al. (1991) J. Immunol. 143: 2714–2722), wurde mittels PCR wie beschrieben amplifiziert (Liu et al. (1992) Eur. J. Immunol. In Press) und in einen pLN-Expressionsplasmidvektor cloniert (freundlicherweise überlassen von A. Aruffo vom Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA). Die resultierende Expressionskonstruktion (pmurB7) wurde in E7C3-Zellen mit einer exprimierbaren Mutante, die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-cDNA enthielt (DR/pic, eine Spende von S. Yarnold und P. Fell, Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA), unter Verwendung von Lipofections Reagenz (Gibco BRL, Grand Island, NY) cotransferiert. Die Transfectanten wurden in DMEM mit 10% fötalem Rinderserum (FBS), das 0.33 μM MTX enthielt, selektiert. Einzelne MTX-resistente Kolonien wurden herausgelesen und auf ihre B7-Expression mit Hilfe von CTLA-4Ig-Bindung analysiert (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569). Gemeinsam kultivierte Kolonien (~25) wurden ebenso durch zwei Sortierungsrunden mittels Flusscytometrie in B7-positive ($PB7^+$) and B7-negative ($PB7^-$) Populationen aufgeteilt. K1735-M2-Zellen wurden ebenfalls mit pmur B7 und PCMIpola (Stratagene, La Jolla,CA) cotransfiziert und in DMEM mit 10% FBS, das 1 mg/ml G418 (Gibco, Grand Island, NY) enthielt, selektiert.

Antikörper

[0033] Von ATCC wurden Hybride erworben, die anti-Maus CD4 (L3T4) mAb GK1.5 von Ratten, anti-Maus CD8 (Lyt2.1) mAb 116-13.1 von Ratten, und mausstämmige anti-H- $2K^kD^k$ mAb 15-3-1S produzierten. Der anti-Mensch CDS mAb 10.2 von Ratten wurde als Kontrolle verwendet (Chen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 110–114). Die Hybride wurden Pristan-behandelten nackten Mäusen intraperitoneal injiziert, und die Antikörper wurden mit Hilfe der Affinitätschromatografie auf Protein A, gebunden an Sepharose CL-4B(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NI) gereinigt. Anti-AsialoGM1-Seren von Kaninchen wurden von Wako Chemicals USA. Inc. (Richmond, VA) erworben. CTLA-4Ig, ein lösliches Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne von menschlichem CTLA-4 und einer menschlichen Ig C□-Kette, war beschrieben (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569). Gereinigter Mensch-Maus chimärer mAB L6 Ig (mit menschlichem C□1 Fc Anteil) wurde hergestellt wie beschrieben (Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439–3443).

Immunfärbung und flusscytometrische Analyse

[0034] Die Verfahren zur Immunfärbung von B7-Expression sind beschrieben worden (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569). Kürzlich wurden transfizierte Zellen zunächst entweder mit chimärem L6 oder CTLA-4Ig mit 10 μg/ml in DMEM, das 10% FBS enthielt, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann gewaschen und für eine weitere Stunde bei 4°C mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Ziegen-anti-Mensch-Ig C□-Serum (Tago Corp., Burlingame, CA) inkubiert. Zur Analyse der CD4- und CD8-Expression auf Milzzellen wurden einzelne Zellsuspensionen mit anti-CD4 (GF1,5) oder anti-CD8 (53,6) mAb, konjugiert mit FITC, bei 4°C für 30 min inkubiert und zweimal mit Medium gewaschen. Insgesamt 10.000 Zellen wurden dann mittels Flusscytometrie analysiert (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA).

In vivo Tumorbekämpfung

[0035] Mäusen, in Gruppen zu fünf oder zehn Tieren, wurden jeweils eine subkutane Injektion von 5×10^6 Zellen in die rasierte Flanke verabreicht. Die Tumorgröße wurde durch Messung von zwei lotrechten Durchmessern in Millimetern (mm) mittels einer Schublehre wöchentlich bei jedem Tier untersucht. Die Ergebnisse wurden als mittlere Durchmesser von Tumoren dargestellt.

In vivo-Depletion von T-Zellen

[0036] Für die in vivo-Experimente zur Depletion wurden Mäusen zweimal gereinigte mAbs für CD4 (GK1,5) oder CD8 (116-13,1) in Dosierungen von 1 mg/Maus 7 Tage vor und am Tag der Tumorimpfung intravenös injiziert. Die gleiche Menge von anti-Mensch CDS mAb 10,2 wurde als Kontrolle verwendet. Vier bis fünf Wochen später wurden die Mäuse getötet, und Milzzellsuspensionen wurden angefertigt und mittels Flusscytometrie durch FITC-markierte anti-CD4- und CD8-Antikörper auf die Wirksamkeit der Depletion untersucht. Mehr als 95 %ige Depletion spezifischer T-Zell-Einheiten wurde durchgehend erreicht, ohne andere Einheiten zu beeinträchtigen.

Histologische Untersuchung

[0037] 10 Tage nach der Injektion wurden Gewebe von der Stelle der Tumorzell-Impfung entnommen, in 10% Formalin fixiert, in Paraffin eingeschlossen, in Dünnschnitte zu 4–6 μm zerschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte wie in **Fig.** 4 beschrieben.

CTL-Untersuchungen

[0038] Experimentelle Verfahren zur Messung der CTL-Aktivität wurden beschrieben (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2612). In Kürze, die Milz wurde den Mäusen 4–10 Wochen nach der Tumorimpfung entnommen, und die Milzzellen (5×10^6) wurden zusammen mit □-bestrahlten (10.000 rad) 16N7-Zellen (1×10^5) in 2 ml Medium pro Vertiefung auf einer Platte mit 24 Vertiefungen (Costar, Cambridge. MA) kultiviert. Sechs Tage später wurden die Zellen geerntet und als Effektorzellen gezählt. Zwei Millionen Zielzellen wurden mit 250 μCi ^{51}Cr (New England Nuclear, Boston, MA) für 45 min (bei p815E7) oder über Nacht (bei p2555 und 16N7-Zellen) markiert, worauf die markierten Zielzellen (5.000 Zellen/Vertiefung) zusammen mit den Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen von Effektor/Zielzelle (E:%) für 4 h kultiviert wurden. Die Überstände wurden eingesammelt und mit einem □-Zähler gezählt. Der prozentuale Anteil spezifischer Lyse wurde wie folgt berechnet:

100 × {(experimentelle cpm – spontane cpm)/(maximale cpm – spontane cpm)}.

[0039] Spontane Freisetzung bei Abwesenheit von CTL lag zwischen 5%–20% der maximalen Freisetzung durch Triton X-100 (1 : 100) in allen Experimenten. In Untersuchungen zur Zell-Depletion wurden die Effektorzellen zu 1×10^6/ml für 60 min bei 37°C mit 30 μg/ml mAbs wie angegeben bei Anwesenheit von 1/10 verdünntem Kaninchen-Komplement (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada) vorbehandelt und vor Gebrauch dreimal gewaschen.

BEISPIEL 1

Transfizierung und Expression von mausstämmigem B7 in E7C3- und K1735-M2- Tumorzelllinien

[0040] Die mausstämmige Melanom-Zelllinie E7C3 ($B7^-E7^+$) wurde durch die Transfizierung des E7-Gens von HPV-16 (Chen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 110–114) in die K1735-M2-Linie (Fidler und Hart, 1981) erhalten. E7C3-Zellen wurden mit pmB7 und DR/pic, wie im Abschnitt experimentelle Verfahren beschrieben, cotransfiziert, und die Transfektanten wurden auf Methotrexat (MTX) -Resistenz selektiert. K1735-M2-Zellen wurden mit pmB7 und pCMIneoPolyA cotransferiert und auf Neomycin-Resistenz selektiert. Die Medikament-resistenten Clone wurden mit Flusscytometrie auf die Expression von B7 untersucht, nachdem eine indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit CTLA4Ig, einer löslichen Form der extrazellulären Domäne von CTLA-4, die menschliches (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 721–730) und mausstämmiges (Liu et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2855–2859) B7 mit hoher Affinität bindet. Drei E7C3-Transfektanten wurden für weitere Studien ausgewählt; zwei von ihnen (BC16 und BC22) reagierten positiv auf B7, und einer (BC13) reagierte negativ. Eine Gesamtheit von ˜25 MTX-resistenten Clonen der E7C3-Transfizierung wurde ebenfalls mit Hilfe der Flusscytometrie in B7-positive ($PB7^+$) und B7-negative ($PB7^-$) Populationen aufgeteilt. Aus der K1735-M2-Transfizierung wurden zwei B7-positive Clone (K/18,2 und K/P12) ausgewählt. Die Mengen der B7-Expressionen auf diesen Zellen wurden mit Hilfe der Flusscytometrie verglichen (**Fig.** 1). In anderen Experimenten zeigten alle ausgewählten Zelllinien in etwa gleiche Mengen der HPV-16 E7-Genexpression in der semiquantitativen, an reverse Transkriptase gekoppelten Polymerase-Kettenreaktionsuntersuchung. Alle Linien exprimierten niedrige Spiegel an MHC Klasse I-Molekülen, wie mit Hilfe der Flusscytometrie ermittelt, und zeigten ebenfalls ähnliche Induktion der MHC Klasse I-Moleküle auf die Behandlung mit γ-Interferon.

BEISPIEL 2

$B7^+$ E7C3 -Tumorregression in vivo

[0041] Um zu untersuchen, ob B7-Expression die T-Zell-Immunität gegen E7C3-Tumoren verstärkt, wurden C3H/HeN-Mäusen und nackten Mäusen ohne T-Zellen (BALB/c nu/nu) $B7^+$und $B7^-$-Transfektanten subkutan injiziert, um ihre Tumorgenizität zu testen (Tabelle 1). E7C3-Zellen waren in jungen C3H/HeN-Mäusen weniger tumorgen als ursprüngliche K1735-M2-Zellen, beide Linien zeigten jedoch ähnliche Tumorgenizität in nackten Mäusen (Tabelle 1). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch den E7C3-Tumor eine über T-Zellen vermittelte Immunantwort in den immunkompetenten Mäusen ausgelöst wurde, deren Tumorwachstum sich verlangsam-

te, in den meisten Mäusen jedoch nicht zu einer Auslöschung des Tumors führte, da nur 2/15 Mäuse (~13%) ihre Tumoren zurückdrängten.

[0042] Im Gegensatz dazu führte die Impfung von C3H/HeN-Mäusen mit BC16-, BC22- oder $PB7^+$ -Zellen zu kurzzeitigem Tumorwachstum, gefolgt von einer Regression bei 100% der Tiere innnerhalb von 2–3 Wochen (Tabelle 1). Clon BC13 und die $PB7^-$-Population bildeten Tumore, die ähnlich wie die ursprünglichen B7C3-Zellen wuchsen (10% beziehungsweise 0% Regression). Eine FotograHe der mit E7C3 und $PB7^+$ injizierten C3H/HeN-Mäuse ist in **Fig.** 2A abgebildet, und die jeweilige Kinetik des Tumorwachstums von E7C3 und mehreren transfizierten Derivaten wird in **Fig.** 2B dargestellt. Alle von E7C3 abstammenden Zellen bildeten Tumore in nackten Mäusen (Tabelle 1). Während die Expression von B7 in E7C3-Zellen bei C3H/HeN-Mäusen zur Bekämpfung des Tumors führte, war dies bei der Expression von B7 durch zwei von K1735-M2 abstammenden, E7-negativen Clonen (K/18,2 und K/P12) nicht der Fall.

[0043] Histologische Schnitte von wachsenden 7^--Tumoren und $B7^+$-Tumoren während der Bekämpfung werden in **Fig.** 3 dargestellt. Ein Tumor, der von $PB7^-$-Zellen induziert wurde, zeigte 10 Tage nach der Injektion progressiv wachsende neoplastische Zellen, die von der tiefen Dermis bis in die darüber liegende Dermis reichten. Histologische Schnitte von E7C3-induzierten Tumoren schienen ähnlich zu sein. Die Untersuchung eines $PB7^+$-Zell-Tumors zeigte einen stark nekrotischen Kern, wie in **Fig.** 3B dargestellt, umgeben von einem dünnen Ring von neoplastischen Zellen, die von Entzündungszellen durchsetzt waren (**Fig.** 3B–D). Ähnliche Ergebnisse wurden mit BC16-Tumoren erhalten.

TABELLE 1
Zusammenfassung von tumorgenen Kennzeichen von B7+ E7C3-Zelllinien in immunkompetenten und nackten Mäusen
Tumorstatus 21 Tage nach subkutaner Impfung in Mäuse

			C3H/HeN		BALB/c (nu/nu)	
Zelllinien	E7	B7	Tumorbildung (%) [1]	Bereich mittlerer Tumordurchmesser (mm) [2]	Tumorbildung (%)	Bereich mittlerer Tumordurchmesser (mm)
E7C3	+	-	13/15 (87)	0 - 12	15/15 (100)	14 - 19
PB7-	+	-	9/10 (90)	0 - 7	10/10 (100)	15 - 20
BC13	+	-	10/10 (100)	4 - 8	10/10 (100)	18 - 24
PB7+	+	+	0/10 (0)	0	10/10 (100)	14 - 21
BC16	+	+	0/9. (0)	0	10/10 (100)	16 - 21
BC22	+	-	0/15 (0)	0	10/10 (100)	5 - 10
K1735-M2	-	-	10/10 (100)	15 - 23	15/15 (100)	16 - 26
K/18.2	-	+	10/10 (100)	12 - 24	ND[3]	ND[3]
K/P12	-	+	9/9 (100)	13 - 21	ND[3]	ND[3]

[1] Aliquots von 5 x 10^6 Zellen in 0,1 ml HBSS wurden C3H/HeN-Mäusen oder BALB/c (nu/nu) Mäusen im Alter von 6-8 Wochen subkutan injiziert. Die Tumorgröße wurde durch Messen zweier lotrecht zueinander stehender Durchmesser in mm mittels einer Schieblehre wöchentlich bei jedem Tier untersucht. Mäuse mit Tumoren < 2 mm im Durchmesser wurden als negativ in Bezug auf das Tumorvorkommen bewertet.

[2] Die Ergebnisse wurden als mittlere Durchmesser der Tumoren dargestellt. Der Bereich der mittleren Durchmesser der Tumoren bei der angegebenen Anzahl der Mäuse wird dargestellt.

[3] nicht durchgeführt.

BEISPIEL 3

Zurückdrängung von B7+ -E7C3-Zellen wird von einer B7-abhängigen Immunantwort vermittelt

[0044] Um zu bestimmen, ob die Zurückdrängung von E7+ -Tumorzellen durch eine B7-vermittelte Immunantwort verursacht wird, untersuchten wir, ob die Tumorbekämpfung durch in vivo-Behandlung mit CTLA4Ig, das B7-Bindung sowohl an CD28 als auch an CTLA-4 blockiert und damit die Immunantwort in vitro und in vivo unterdrückt, blockiert wird (Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 721–730, Linsley et al. (1992) Science 257: 792–795; Lenschow et al. (1992) Science 257: 792–795). BC22-Zellen wurden vor der Injektion in C3H/HeN-Mäuse mit 50 µg CTLA4Ig vermischt, worauf die intravenöse Injektion von 50 µg CTLA4Ig jeden zweiten Tag über 12 Tage erfolgte. Diese Art der CTLA4Ig-Behandlung wurde zuvor eingesetzt, um die Abstoßung von Transplantaten von Pankreas-Inselzellen bei Mäusen zu unterbinden (Lenschow et al. (1992) Science 257: 792–795). Als eine Kontrolle wurden gleiche Mengen eines dem Isotyp entsprechenden chimären monoclonalen Antikörper (mAb) L6 verwendet (Fell et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 15552–15558). Wie in **Fig.** 4 dargestellt, verhinderte die Behandlung mit CTLA4Ig die Zurückdrängung der durch BC22-Zellen her-

vorgerufenen Tumoren, wohingegen die Kontroll-mAb dies nicht taten. Ähnliche Ergebnisse wurden mit BC16-Zellen erhalten. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Zurückdrängung von $B7^+$-E7C3-Zellen in einem immunkompetenten syngenen Wirt durch die Wechselwirkungen von B7 mit seinen Rezeptoren vermittelt wird.

BEISPIEL 4

[0045] B7-Expression induziert eine $CD8^+$T-Zell-Antwort auf $E7^+$-Tumore Zur Analyse der Rolle der T-Zell-Einheiten bei der Bekämpfung von $B7^+$ -E7C3-Tumorzellen wurden Mäusen mAbs gegen entweder $CD4^+$- oder $CD8^+$-T-Zellen injiziert, um spezifisch diese Zellen in vivo funktionsunfähig zu machen. Dieses Verfahren entfernte 95% der jeweiligen T-Zell-Population, ohne Auswirkungen auf andere Zellpopulationen zu haben, was mit Hilfe der Flusscytometrie überprüft wurde. Das Entfernen der $CD8^+$-T-Zellen unterbrach die Bekämpfung von $B7^+$-E7C3-Zellen vollständig, sowohl BC16 (**Fig.** 5), als auch BC22 eingeschlossen. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Injektion von anti-CD4-mAb oder des Kontroll-Abs die Bekämpfung des Tumors nicht (**Fig.** 5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bekämpfung von $B7^+$-E7C3-Zellen im Wesentlichen durch $CD8^+$ T-Zellen vermittelt wurde.

[0046] Injektion von $B7^+$ $E7^+$ -Tumorzellen führte zu CTL-Erzeugung (**Fig.** 6). Tumorzellen wurden Mäusen subkutan injiziert, die Milz wurde entnommen, und Milzzellen wurden einer zweiten Stimulierung mit $E7^+$-Tumorzellen in vitro unterzogen, um polyclonale CTL zu erzeugen (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621). Die Cytotoxizität wurde gegen ^{51}Cr-markierten 16N7-Zielzellen ermittelt; diese sind MHC Klasse I ($H\text{-}2^k$) -positive, E7-positive Fibrosarkomzellen (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621), die beständigere Ergebnisse bei den in vitro-Untersuchungen zur Cytotoxizität lieferten als die E7C3-Zellen. Starke CTL-Aktivität wurde mit Milzzellen entdeckt, die von Tieren stammten, denen BC16-Zellen nach Restimulierung mit 16N7-Zellen in vitro injiziert worden waren (**Fig.** 6A). Die CTL lysierten keine Kontroll-Fibrosarkomzellen, die nicht E7 exprimierten (p2555-Zellen) oder E7 exprimierende Zellen (p815E7) eines anderen MHC-Halotyps (**Fig.** 6A), was nahe legt, dass Lysierung der Zielzellen Antigen-spezifisch und auf MHC Klasse I-beschränkt war. Die cytolytische Aktivität war stark eingeschränkt, wenn die Effektorzellen mit einem anti-CD8-mAb bei Anwesenheit von Komplement vorbehandelt waren, nicht jedoch bei Behandlung mit anti-CD4 oder anti-NK-Zell-Antikörpern (**Fig.** 6B). Spiegel der cytolytischen Aktivität wurden in Milzzellen von Mäusen gemessen, denen E7C3-, BC16-oder bestrahlte E7C3-Zellen injiziert worden waren, und die einer zweiten Stimulation mit 16N7-Zellen in vitro unterworfen worden waren (**Fig.** 6C). Lediglich Milzzellen von Mäusen, denen BC16-Zellen injiziert worden waren, zeigten signifikante CTL-Aktivität. Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse an, dass die Expression von B7 auf E7C3-Zellen die Induktion von $CD8^+$-CTL unterstützt, die für $E7^+$-Tumorzellen spezifisch sind, unabhängig von der Expression von B7.

BEISPIEL 5

Induktion von Antitumor-Immunität gegen BT^- -E7C3-Tumoren an einer entfernten Stelle durch $B7^+$ -E7C3-Zellen

[0047] Um zu untersuchen, ob T-Zell-Immunität, die durch $B7^+$ -E7C3-Zellen induziert worden war, gegenüber $B7^-$-E7C3-Zellen wirksam war, die an eine entfernte Stelle transplantiert worden waren, wurden C3H/HeN-Mäusen BC22-Zellen, E7C3-Zellen oder Medium allein in eine Flanke injiziert, und das Wachstum der gleichzeitig in die andere Flanke injizierten E7C3-Tumorzellen wurde überwacht. Das Wachstum von E7C3-Tumoren war bei Tieren, die mit BC22-Zellen in die andere Flanke geimpft worden waren, signifikant gehemmt; 4/5 dieser Mäuse drängten ihren Tumor vollständig zurück. Das Wachstum von E7C3-Tumoren war bei Tieren, die mit Medium oder mit $B7^-$ -E7C3-Tumoren geimpft worden waren, nicht beeinträchtigt (**Fig.** 7A). Bestrahlte E7C3-Tumore beeinflussten das Wachstum von E7C3-Tumoren, die in die gegenüberliegende Flanke geimpft wurden (Daten nicht gezeigt). BC22-Injektion hemmte das Wachstum des auf der gegenüberliegenden Flanke injizierten E6B2-Tumors, eines von K1735-M2 abstammenden HPV-16 E6-Transfektanten nicht (Chen et al. (1992) J. Immunol. 148: 2617–2621) (**Fig.** 7B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transplantation von $B7^+E7^+$-Zellen eine systemische Antwort zur Tumor-Bekämpfung gegen ursprüngliche $B7^-$-E7C3-Tumore hervorruft, und dass die Bekämpfung spezifisch für $E7^+$-Tumorzellen war.

[0048] Weitere Studien wurden dann unter Verwendung von BC16-Zellen zur Behandlung von etablierten metastatischen Tumoren durchgeführt. C3H/HeN-Mäuse wurden in Gruppen von je 10 Mäusen aufgeteilt, und jeder Maus wurden intravenös entweder × 10^5 Zellen E7C3-Zellen (**Fig.** 8A), E6B2-Zellen (**Fig.** 8B) oder K1735-M2-Zellen (**Fig.** 8C) injiziert. Vier Tage später erhielt jede Maus eine intravenöse Injektion von 1 × 10^6 BC16-Zellen; diese Impfung mit BC16-Zellen wurde zweimal in Intervallen von fünf Tagen wiederholt. Die Überlebensrate der Tiere wurde überwacht und ist in **Fig.** 8 dargestellt, die zeigt, dass die Verabreichung von BC16-Zellen das Überleben von Mäusen mit E7C3-Tumoren signifikant verbesserte und das Überleben von Mäusen mit anderen Tumoren nicht beeinflusste.

BEISPIEL 6

Vergleich von Tumor-Induktion durch B7-translizierte und nicht transfizierte Zellen

[0049] Verschiedene Tumorzelllinien wurden jeweils in zwei Hauptgruppen unterteilt. Die erste Gruppe war nicht genetisch verändert (Kontrolle); während die zweite Gruppe der Zellen mit B7 codierender DNA transfiziert wurde ($B7^+$ -Zellen), so dass die transfizierten Tumorzellen B7 exprimierten.

[0050] Mäuse wurden dann mit einer Tumor erzeugenden Zellmenge (im Bereich von 1×10^5 bis 5×10^6 Zellen pro Maus) von einer der beiden Gruppen der verschiedenen Tumorzelllinien geimpft, und die Tumorbildung wurde vier Wochen nach der Impfung untersucht. Die Ergebnisse der Studien sind in Tabelle 2 dargestellt und zeigen, dass Tumorentwicklung durch die B7-transfizierten Zellen, im Vergleich mit der Tumorbildung durch die nicht transfizierten Tumorzelllinien, entweder eliminiert oder signifikant gehemmt worden war.

[0051] Wie vorstehend gezeigt, war die durch die E7-positiven, B7-positiven Zellen erzeugte Immunität bei der Behandlung von etablierten Tumoren wirksam. Mäusen wurden intravenös E7C3-Zellen injiziert, die zur Bildung von verstreuten Metastasen in den Lungen in der Lage waren. Die Injektion von E7-positiven/B7-positiven Zellen vier Tage nach der Etablierung von E7C3-Tumoren verlängerte das Überleben aller behandelten Mäuse und führte zu einer Langzeit-Überlebensrate von 40%.

[0052] In einer weiteren Studie wurden immunkompetente Mäuse mit mausstämmigen K1735-M2-Metanomzellen geimpft, in welche das Gen für das p97-gebundene Antigen für Tumorbekämpfung inseriert worden war (c162) und gut wachsende, produzierende Tumore erzeugt. Wenn diese Zellen mit B7 transfiziert wurden, und immunkompetente Mäuse mit diesen B7-positiven c162-Zellen geimpft wurden, trat keine Tumorentwicklung auf.

Zusammenfassung der Tumor erzeugenden Eigenschaften von Zelllinien, die das T-Zell-costimutierende Molekül B7 exprimieren

				Tumorbildung #	
Tumor	Typ	Stamm	Immunogenizität*	Kontrolle	B7+-Zellen
E7C3 (E7+)	Melanom	C3H/HeN	++	18/20	0/30
E6B2 (E6+)	Melanom	C3H/HeN	++	20/20	0/10
c162 (p97+)	Melanom	C3H/HeN	++	19/20	0/10
K1735-M2	Melanom	C3H/HeN	-	20/20	20/20**
EL-4	Lymphom	C57BL/6	+	20/20	1/10
B16	Melanom	C57BL/6	-	15/15	2/10
p815	Mastocytom	DBA/2	+	15/15	0/5

* Beurteilung aus Standardexperimenten zur Immunisierung und Herausforderung.

Entwicklung eines Tumors in Woche 4 nach Tumorimpfung

** kleinere Tumore

[0053] Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien mit anderen Tumor-Zelllinien erhalten, wie etwa dem EL-4-T-Zell-Lymphom der Maus, B16-Melanom und p815-Mastocytom.

[0054] Die vorangehende Beschreibung und die Beispiele sollen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung dienen, sie aber nicht eingrenzen. Zahlreiche Variationen und Modifikationen können durchgeführt werden, ohne den Geist und den Umfang der vorliegenden Erfindung zu verletzen.

Patentansprüche

1. Rekombinante Tumorzelle transfiziert mit einem DNA-Vektor, der eine B7-Oberflächenantigen codierende DNA umfasst, so dass die Zelle das B7-Oberflächenantigen exprimiert, zur therapeutischen Verwendung.

2. Rekombinante Tumorzelle nach Anspruch 1, die einen extrazellulären Teil von B7 exprimiert.

3. Rekombinante Tumorzelle nach Anspruch 1 oder 2, die eine HPV-infizierte Zelle ist.

4. Verwendung einer rekombinanten Tumorzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3 für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung bei der Hemmung des Tumorzellwachstums in einem Patienten.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die rekombinanten Tumorzellen und die Tumorzellen in dem Patienten abgestoßen werden.

6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Zellen sich als Metastasen in dem Körper eines Patienten ausbreiten.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Metastasen abgestoßen werden.

8. Zellmembran, die von einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3 stammt, zur therapeutischen Verwendung.

9. Zusammensetzung umfassend eine Membran nach Anspruch 8 zur Verwendung als Impfstoff.

10. Arzneimittel zur Verwendung bei der Hemmung des Tumorzellwachstums, umfassend eine Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder eine Membran nach Anspruch B.

11. Arzneimittel zur Verwendung bei der Hemmung des Tumorzellwachstums, umfassend rekombinante Tumorzellen transfiziert mit einem DNA-Vektor, der eine B7-Oberflächenantigen codierende DNA umfasst, so dass die Zellen das B7-Oberflächenantigen exprimieren, oder Zell-Membranen, die von den rekombinanten Tumorzellen stammen, wobei die rekombinanten Zellen oder Membranen einem Patienten verabreicht werden können, um eine verstärkte Immunantwort gegen die Tumorzellen zu stimulieren.

12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Tumors, umfassend Tumorzellen, die aus einem Patienten entfernt wurden, und Transfektion der Tumorzellen mit einer Nucleinsäure, um ein B7-Oberflächenantigen zu exprimieren.

13. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, umfassend Aliquots von Tumorzellen, die aus einem Tumor tragenden Patienten entfernt wurden, und Transfektion oder Transduktion der Tumorzellen mit einem retroviralen Vektor mit DNA, die das B7 B-Zelloberflächenprotein codiert, so dass die Tumorzellen B7 exprimieren.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

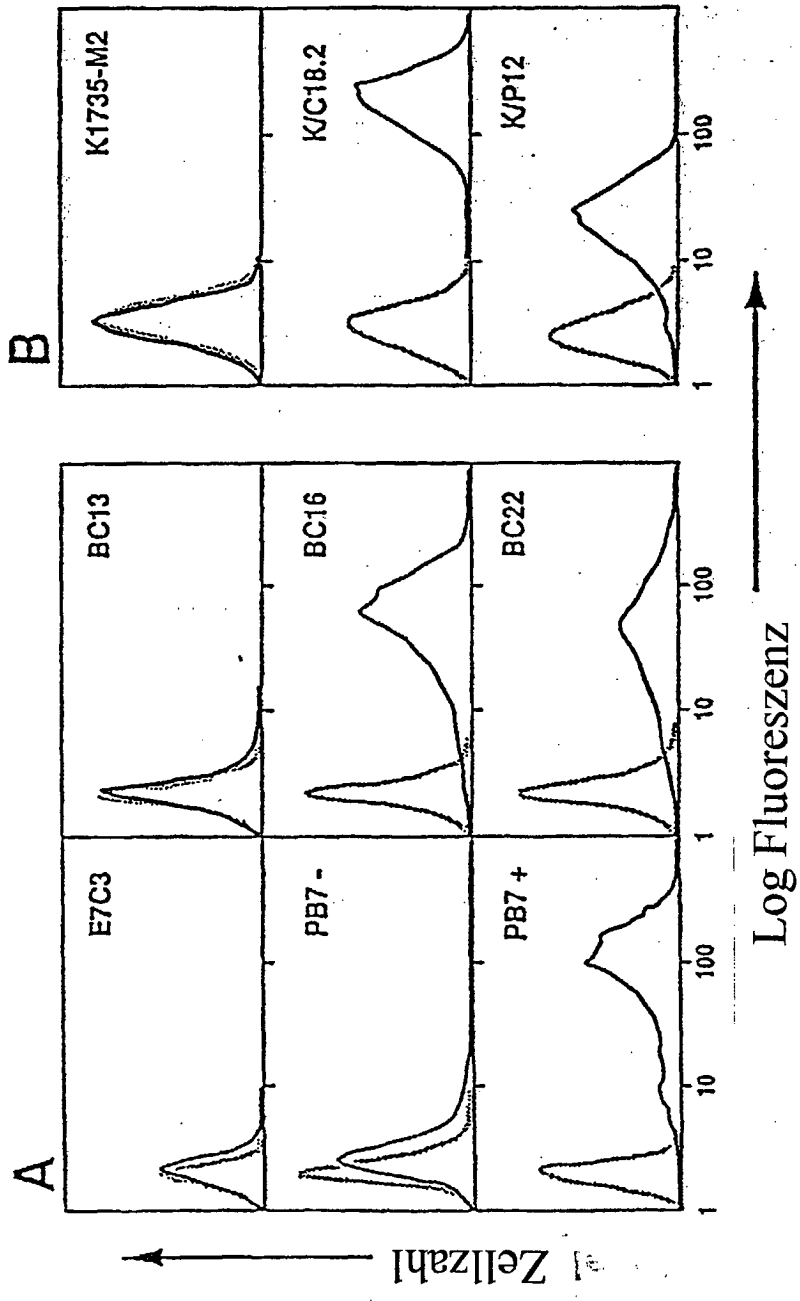


FIG. 1

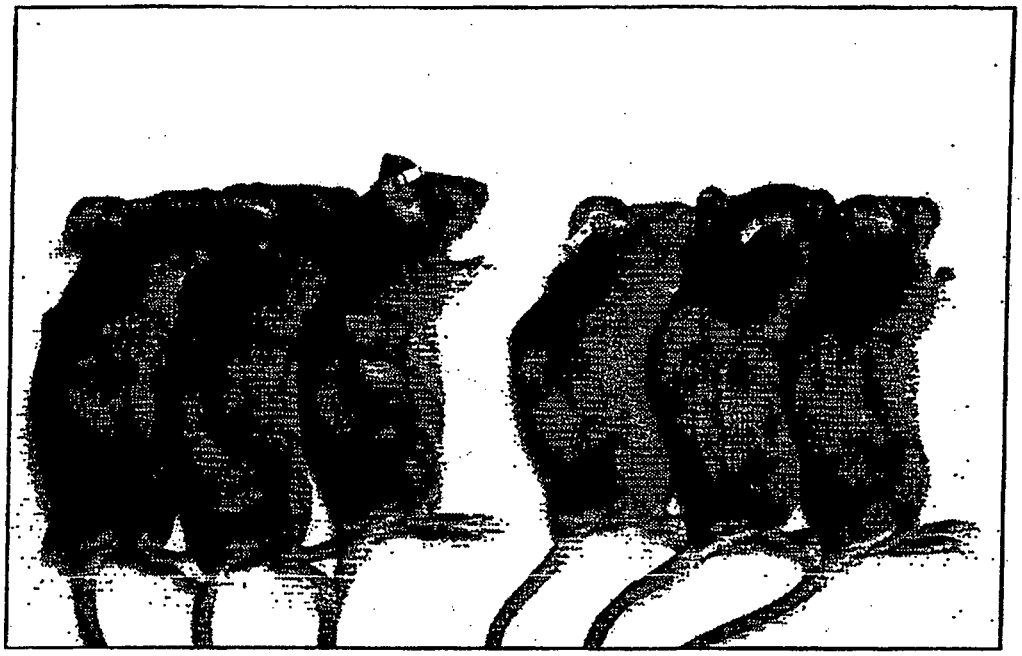
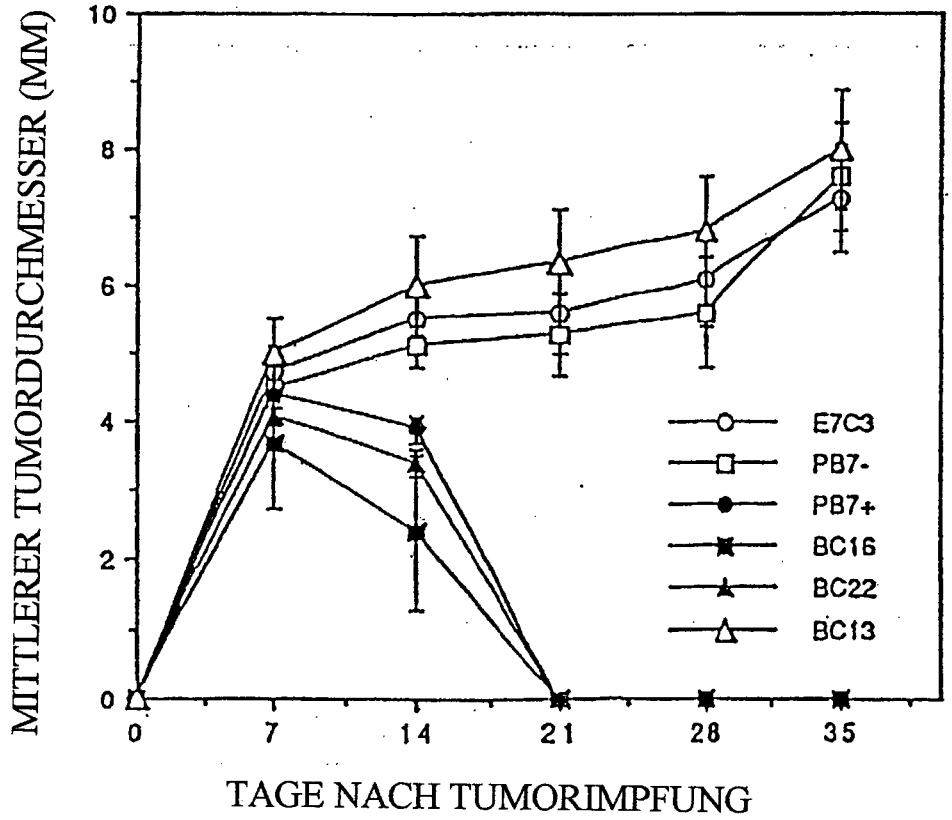


FIG. 2A

FIG. 2B


MITTLERER TUMORDURCHMESSER (MM)
10
8
6
4
2
0
0
7
14
21
28
35
TAGE NACH TUMORIMPFUNG
E7C3
PB7-
PB7+
BC16
BC22
BC13

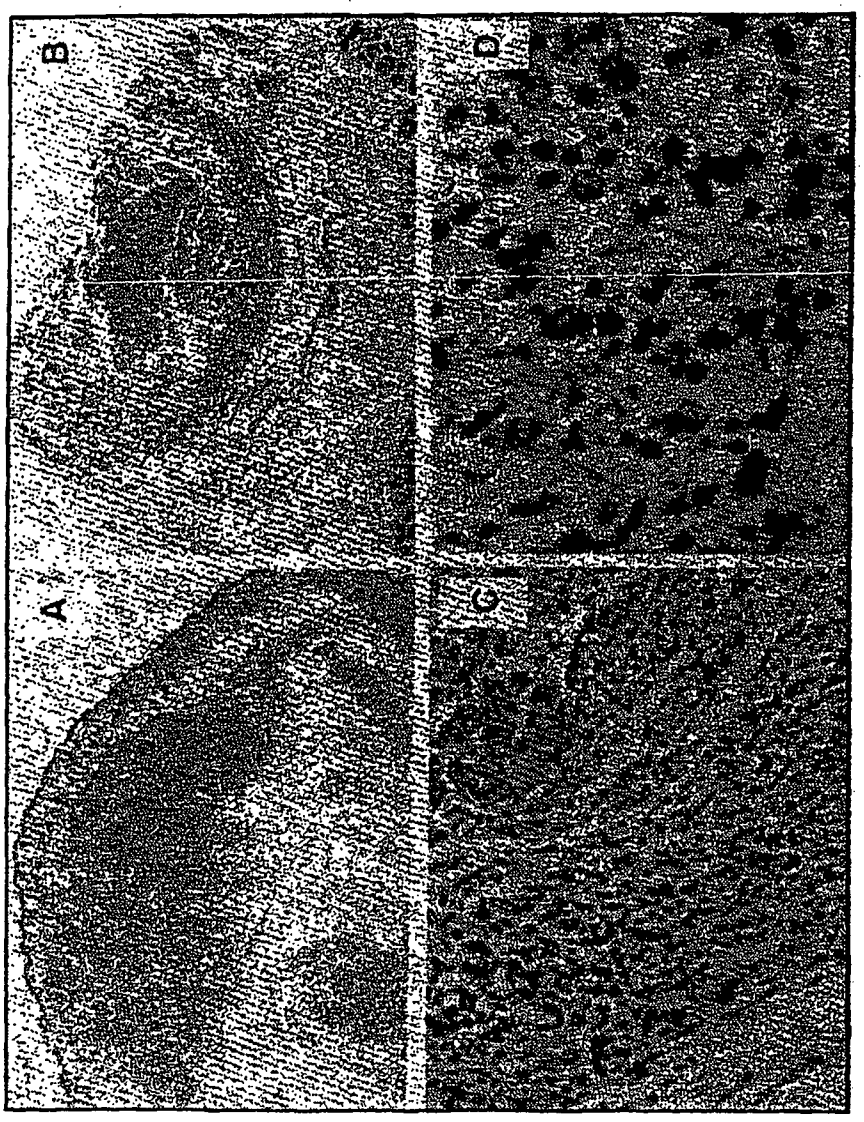


FIG. 3

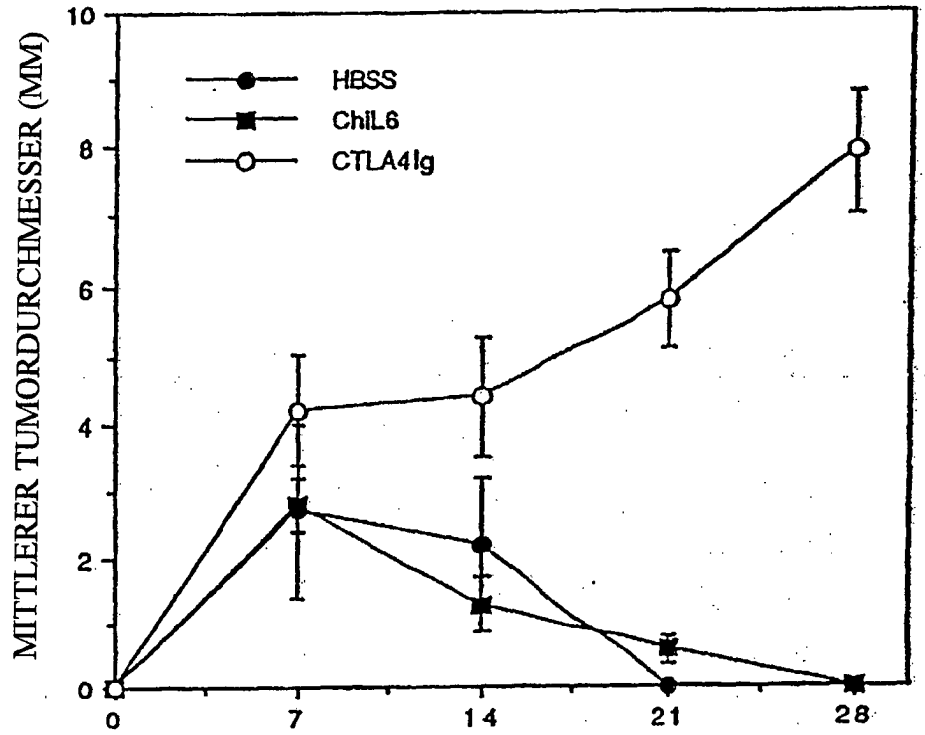

MITTLERER TUMORDURCHMESSER (MM)
10
8
6
4
2
0
HBSS
ChiL6
CTLA4Ig
0
7
14
21
28
TAGE NACH TUMORIMPFUNG

FIG. 4

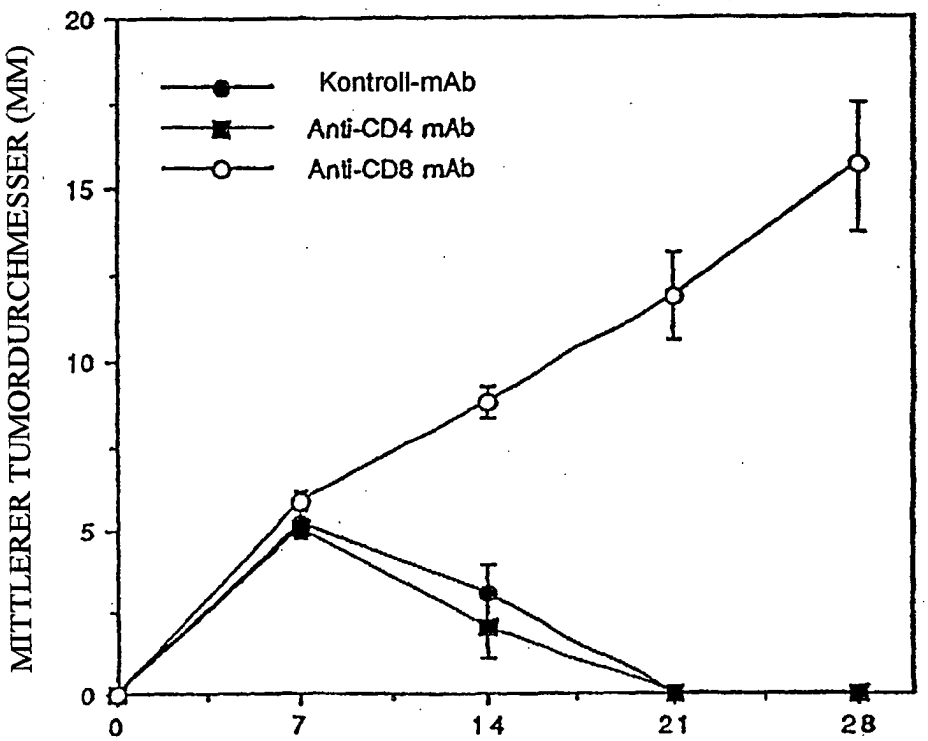

MITTLERER TUMORDURCHMESSER (MM)
20
15
10
5
0
Kontroll-mAb
Anti-CD4 mAb
Anti-CD8 mAb
0
7
14
21
28
TAGE NACH TUMORIMPFUNG

FIG. 5

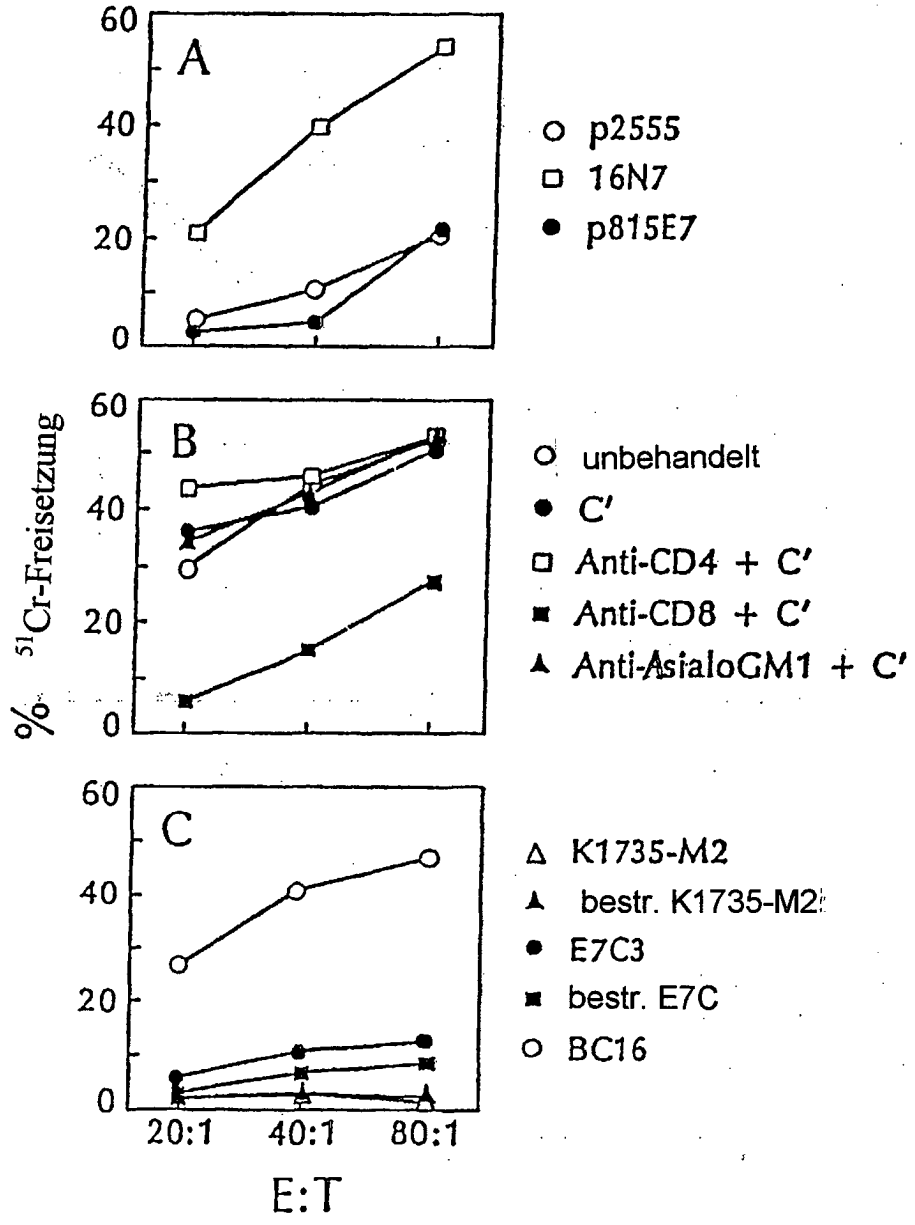

A
B
C
60
40
20
0
% ^{51}Cr-Freisetzung
20:1
40:1
80:1
E:T
p2555
16N7
p815E7
unbehandelt
C'
Anti-CD4 + C'
Anti-CD8 + C'
Anti-AsialoGM1 + C'
K1735-M2
bestr. K1735-M2
E7C3
bestr. E7C
BC16

FIG. 6

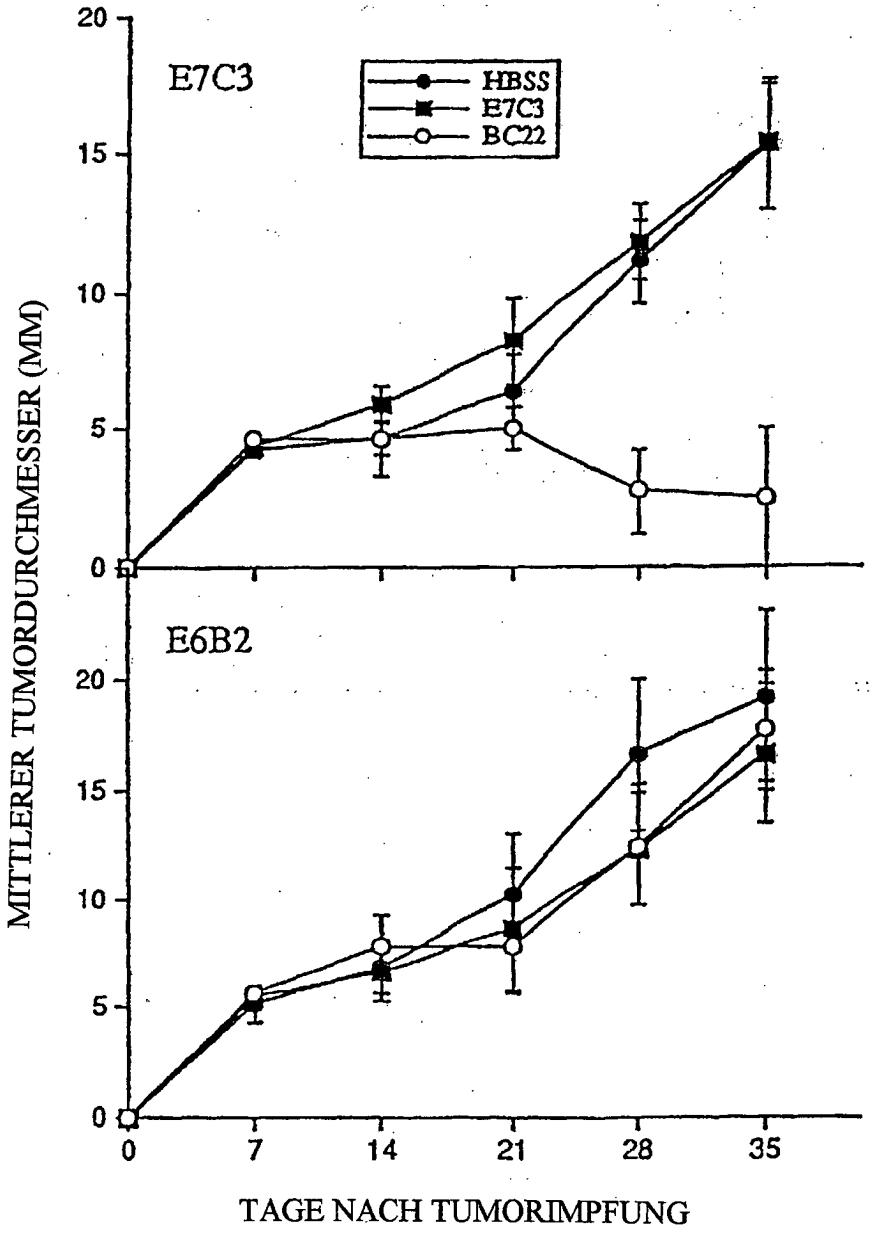

E7C3
HBSS
E7C3
BC22
E6B2
MITTLERER TUMORDURCHMESSER (MM)
TAGE NACH TUMORIMPFUNG
0
5
10
15
20
0
7
14
21
28
35

FIG. 7

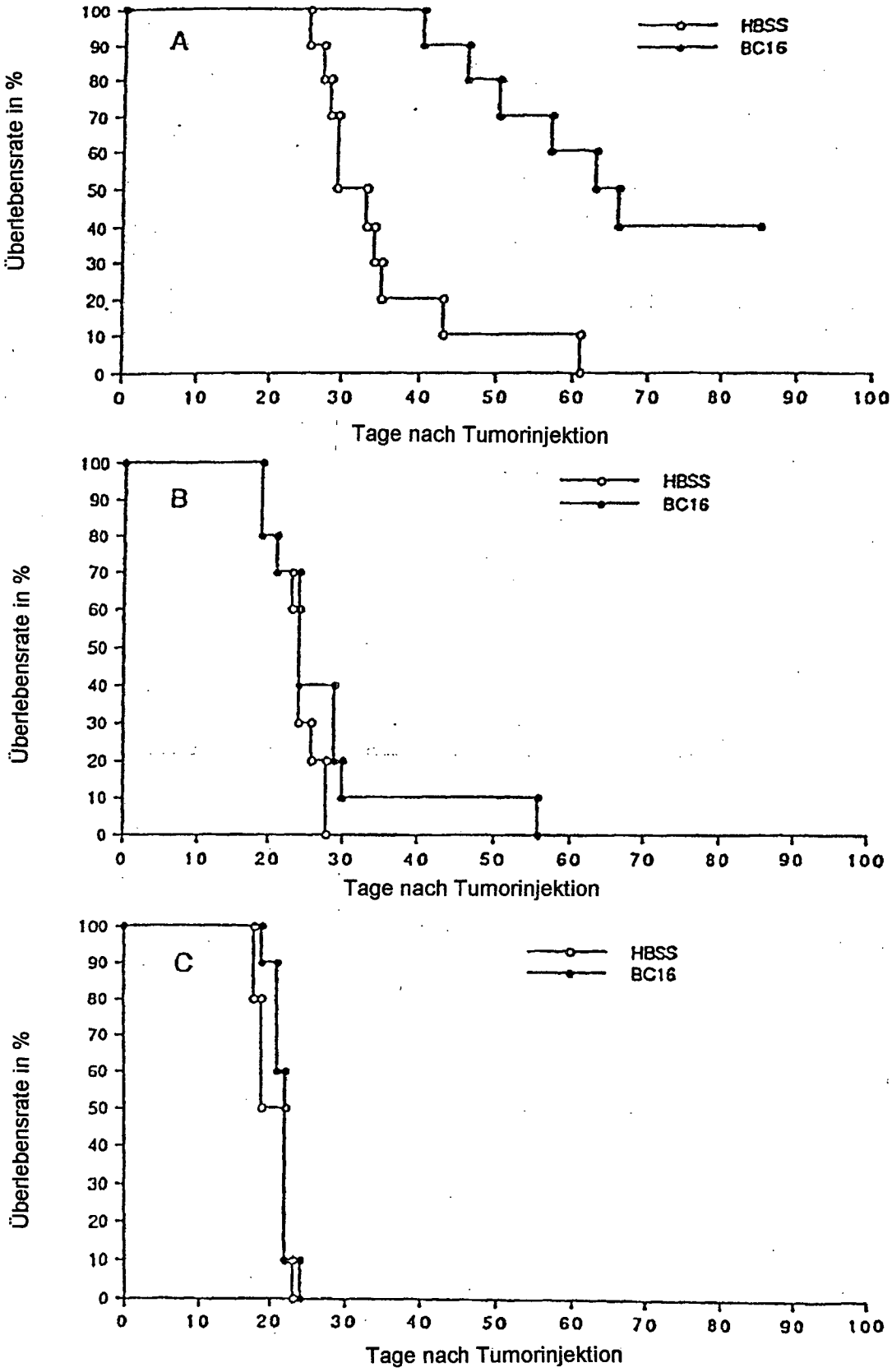

A
HBSS
BC16
Überlebensrate in %
Tage nach Tumorinjektion
B
HBSS
BC16
Überlebensrate in %
Tage nach Tumorinjektion
C
HBSS
BC16
Überlebensrate in %
Tage nach Tumorinjektion

FIG. 8