



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 33 455 T2 2006.10.19

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 039 933 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 47/48 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 33 455.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/23957

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 958 518.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/024066

(86) PCT-Anmeldetag: 10.11.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 20.05.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 04.10.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 08.02.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 19.10.2006

(30) Unionspriorität:

65155 P 10.11.1997 US

75811 P 24.02.1998 US

107455 P 06.11.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Cytimmune Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(72) Erfinder:

TAMARKIN, Lawrence, Rockville, MD 20854, US;  
PACIOTTI, F., Giulio, Baltimore, MD 21075, US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR VERSTÄRKUNG DER IMMUNANTWORT UND  
ZUR IN-VITRO HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN (MABS)

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 eingelebt, 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****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf Immunologie. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die Verstärkung einer Immunantwort in einem Menschen oder Tier. So eine Verstärkung kann zur Stimulation oder Unterdrückung der Immunantwort führen. Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf zielgerichtete Bestandteil-stimulierende Zusammensetzungen, die einfach und wirkungsvoll bestimmten Immunzellen antigene Bestandteile präsentieren, um eine Immunantwort in einem Menschen oder einem Tier zu verstärken. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf die Verwendung von solchen in vitro Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung von antigen-spezifischen, art-spezifischen monoklonalen Antikörpern.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Das Einbringen gewünschter Wirkstoffe in bestimmte Zielzellen war für Wissenschaftler lange Zeit eine Herausforderung. Die Herausforderung Wirkstoffe auf bestimmte Ziele zu richten liegt darin eine angemessene Menge des Wirkstoffs oder des richtigen Wirkstoffs zu den Zielzellen eines Organismus zu bekommen, ohne sie zu sehr dem Rest des Organismus auszusetzen. Ein besonders erstrebenswertes Ziel bei der Abgabe von bestimmten Wirkstoffen ist die selektive Kontrolle des Immunsystems.

**[0003]** Das Immunsystem ist ein komplexes Antwortsystem des Körpers, das viele verschiedene Arten von Zellen, die unterschiedliche Aktivitäten besitzen, einschließt. Aktivierung eines Teils des Immunsystems verursacht gewöhnlich aufgrund der ungewollten Aktivierung von anderen verwandten Teilen des Systems viele verschiedene Antworten. Momentan gibt es keine Verfahren oder Zusammensetzungen zum Erzeugen der gewünschten Antwort durch das Targeting spezifischer Bestandteile des Immunsystems.

**[0004]** Ein Verfahren, das mit begrenztem Erfolg verwendet wurde, ist das Targeting von Zellen, die einen spezifischen Rezeptor tragen, und das Bereitstellen eines Antikörpers gegen diesen Rezeptor, der als ein Träger für einen Wirkstoff wirkt. Der Wirkstoff kann ein pharmazeutischer Wirkstoff sein, der ein Zellstimulans ist, oder der therapeutische Wirkstoff kann eine radioaktive Gruppe sein, die den Zelltod verursacht. Probleme, die mit diesen Techniken verbunden sind, sind die Isolierung des spezifischen Rezeptors, die Herstellung eines Antikörpers, der eine selektive Aktivität für diesen Rezeptor und keine Kreuzreaktivitäten mit anderen ähnlichen Epitopen besitzt und die Bindung des Wirkstoffs an den Antikörper. Ein Problem, das mit so einer begrenzten Abgabe zusammenhängt, ist, dass der Wirkstoff niemals intern in der Zielzelle freigesetzt wird, da der Wirkstoff nicht freisetzbar an die Antikörper gebunden ist, und daher nicht voll aktiv oder zu überhaupt keiner Aktivität in der Lage ist, wenn es einmal an den Ort abgegeben worden ist.

**[0005]** Das Immunsystem ist ein komplexes interaktives System des Körpers, das eine große Auswahl von Bestandteilen, einschließlich Zellen und zellulären Faktoren, die mit Stimuli sowohl innerhalb als auch außerhalb des Körpers interagieren, umfasst. Neben seiner direkten Wirkung wird die Antwort des Immunsystems ebenfalls durch andere Systeme des Körpers, einschließlich dem Nerven-, Atmungs-, Kreislauf- und Verdauungssystem, beeinflusst.

**[0006]** Einer der besser bekannten Aspekte des Immunsystems ist seine Fähigkeit auf fremde Antigene, die von eindringenden Organismen, durch zelluläre Veränderungen innerhalb des Körpers oder durch Impfung präsentiert werden, zu antworten. Einige der ersten Zellarten, die auf eine solche Aktivierung des Immunsystems reagieren, sind Phagozyten und natürliche Killerzellen. Phagozyten schließen neben anderen Zellen Monozyten, Makrophagen und polymorphonukleäre Neutrophile ein. Diese Zellen binden im Allgemeinen an das fremde Antigen, internalisieren es und können es zerstören. Sie produzieren ebenfalls lösliche Moleküle, die andere Immunantworten, wie zum Beispiel entzündliche Antworten, vermitteln. Natürliche Killerzellen können bestimmte vireninfizierte Embryo- und Tumorzellen erkennen und zerstören. Andere Faktoren der Immunantwort schließen beide Komplementsignalwege, die in der Lage sind unabhängig auf fremde Antigene zu reagieren oder im Einklang mit Zellen oder Antikörpern zu agieren, ein.

**[0007]** Einer der Aspekte des Immunsystems, der für die Impfung wichtig ist, ist die spezifische Antwort des Immunsystems auf ein bestimmtes Pathogen oder fremdes Antigen. Ein Teil der Antwort schließt die Anlage eines „Gedächtnisses“ für dieses fremde Antigen ein. Bei einer zweiten Exposition erlaubt die Gedächtnisfunktion eine schnellere und im Allgemeinen stärkere Antwort auf das Fremdantigen. Sowohl bei der Gedächtnisfunktion als auch der Antwort spielen Lymphozyten im Einklang mit anderen Zellen und Faktoren eine große

Rolle.

**[0008]** Allgemein wird angenommen, dass die Antigenantwort sowohl humorale als auch zelluläre Antworten einschließt.

**[0009]** Humorale Immunantworten werden durch nicht-zelluläre Faktoren, die durch Zellen freigesetzt werden, und die frei oder nicht frei im Plasma oder intrazellulären Flüssigkeiten gefunden werden können, vermittelt. Ein Hauptbestandteil der humoralen Antwort des Immunsystems wird durch Antikörper, die von B-Lymphozyten erzeugt werden, vermittelt. Zellvermittelte Immunantworten resultieren aus Interaktionen von Zellen, einschließlich Antigen-präsentierender Zellen, B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen).

**[0010]** Die Antwort wird durch die Erkennung von Fremdantigenen durch verschiedene Arten von Zellen, hauptsächlich Makrophagen oder andere Antigen-präsentierende Zellen, initiiert. Dies führt zu der Aktivierung von Lymphozyten, insbesondere den Lymphozyten, die spezifisch dieses besondere Fremdantigen erkennen, und führt zu der Entwicklung einer Immunantwort und möglicherweise der Beseitigung des Fremdantigens. Komplexe Interaktionen, die zu Helferfunktionen, Stimulatorfunktionen, Suppressorfunktionen und anderen Antworten führen, überlagern die Immunantwort, die sich auf die Beseitigung des Fremdantigens richtet. Die Stärke der Antworten des Immunsystems muss hinsichtlich der Stimulierung und Unterdrückung an einer Vielzahl von Stellen sorgfältig kontrolliert werden oder die Antwort wird entweder nicht auftreten, überreagieren oder nach der Beseitigung nicht nachlassen.

**[0011]** Die Erkennungsphase der Antwort auf Fremdantigene besteht aus der Bindung von Fremdantigenen an spezifische Rezeptoren auf Immunzellen. Diese Rezeptoren sind im Allgemeinen vor der Antigenexposition vorhanden. Die Erkennung kann ebenfalls die Interaktion mit dem Antigen über Makrophagen-ähnliche Zellen oder durch die Erkennung durch Faktoren im Serum oder Körperflüssigkeiten einschließen.

**[0012]** In der Aktivierungsphase durchlaufen die Lymphozyten mindestens zwei wesentliche Veränderungen. Sie proliferieren, was zu der Vermehrung der Klone von Antigenspezifischen Lymphozyten und der Verstärkung der Antwort führt, und die Nachkommen der Antigen-stimulierten Lymphozyten differenzieren entweder zu Effektorzellen oder Gedächtniszellen, die überleben und bereit sind, auf eine erneute Antigenexposition zu reagieren. Es gibt eine Vielzahl von Verstärkungsmechanismen, die diese Antwort verstärken.

**[0013]** In der Effektorphase führen die aktivierte Lymphozyten die Funktionen durch, die zu der Beseitigung des Antigens oder der Begründung einer Impfantwort führen können. Solche Funktionen schließen zelluläre Antworten, wie zum Beispiel regulatorische, Helfer-, stimulatorische, Suppressor- oder Gedächtnisfunktionen ein. Viele Effektorfunktionen erfordern die gemeinsame Teilnahme von Zellen und zellulären Faktoren. Zum Beispiel binden Antikörper an fremde Antigene und verstärken die Phagozytose durch Neutrophile und mononukleäre Phagozyten im Blut. Komplementsignalwege werden aktiviert und können zusätzlich zum Auslösen von anderen Körperfunktionen, wie zum Beispiel Fieber, an der Lyse und Phagozytose von Mikroben beteiligt sein.

**[0014]** Bei der Immunantwort auf Antigene interagieren Immunzellen miteinander durch direkte Zell-Zell Kontakte oder indirekte Zell-Zell (faktorvermittelte) Kommunikation. Zum Beispiel sind für eine wirksame Immunantwort Interaktionen zwischen T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen notwendig. B- und T-Zellen werden durch Signale von dendritischen Zellen oder Makrophagen, die antigenpräsentierende Zellen (APC) sind, die Antigene präsentieren und an ruhende Zellen Aktivierungssignale abgeben, aktiviert. Aktivierte T-Zellen helfen die Immunantworten zu kontrollieren und sind an der Beseitigung von fremden Organismen beteiligt. Die Helfer T-Zellen veranlassen Zellen bessere Effektorzellen zu werden, wie zum Beispiel cytotoxischen T-Zell-Vorläuferzellen dabei zu helfen sich zu Killerzellen zu entwickeln, B-Zellen dabei zu helfen, Antikörper zu produzieren, und dabei zu helfen, die Funktionen von anderen Zellen wie Makrophagen zu erhöhen. Aktivierte B-Zellen teilen sich und produzieren Antigen-spezifische Antikörper und Gedächtnis B-Zellen. Die Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, sekretieren auch zelluläre Faktoren oder Cytokine, die die Funktionen von Phagozyten verstärken, entzündliche Antworten stimulieren und eine Reihe von Zellen beeinflussen.

**[0015]** Die Reaktionen dieser Zellen schließen ebenfalls Feedback-Schleifen ein. Makrophagen und andere mononukleäre Phagozyten oder APCs phagocytieren aktiv Antigene für die Präsentation gegenüber B- und T-Zellen und so eine Aktivität kann durch zelluläre Lymphozyten-Faktoren verstärkt werden. Makrophagen produzieren ebenfalls Cytokine, die neben anderen Aktivitäten die T-Zell-Proliferation und Differenzierung stimulieren und andere inflammatorische Zellen, insbesondere Neutrophile, rekrutieren und für viele systemische Ef-

fekte der Entzündung, wie zum Beispiel Fieber, verantwortlich sind. Ein solches Cytokin, das Interleukin-12 genannt wird, ist besonders für die Entwicklung der zellvermittelten Immunität von Bedeutung.

**[0016]** Dendritische Zellen sind ebenfalls APCs, die eine Immunantwort auslösen. Es gibt eine Anzahl verschiedener Arten dendritischer Zellen, einschließlich lymphoider dendritischer Zellen und den Langerhans-Zellen der Haut. Sie können überall im Körper gefunden werden, insbesondere in der Milz, den Lymphknoten, den Mandeln, den Peyer-Drüsen und dem Thymus. Sie sind unregelmäßig geformte Zellen, die sich in dendritischen (baumähnlichen) Prozessen fortwährend ausdehnen und zusammenziehen. Eine ihrer Rollen im Immunsystem ist es, die B- und T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu regulieren und zu induzieren. Sie sind für die Entwicklung von cytotoxischen T-Zellen, Antikörperbildung durch B-Zellen und einige polyklonale Antworten, wie oxidative Mitogenese, potente akzessorische Zellen. Sie stimulieren ebenfalls T-Zellen das Cytokin Interleukin-2 freizusetzen.

**[0017]** Ein wichtiger Teil der Impfung ist die Antwort auf Antigene, die durch B-Lymphozyten oder B-Zellen bereitgestellt wird. B-Zellen machen ungefähr 5 bis 15% der zirkulierenden Lymphozyten aus. B-Zellen produzieren Immunglobuline, IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, die in Körperflüssigkeiten freigesetzt, mit angehefteten Proteinen sekretiert und in die Oberflächenmembran der B-Zellen insertiert werden können. Solche Immunglobuline wirken als spezifische Antigenrezeptoren. Als Antwort auf Antigene werden diese Immunglobulinrezeptoren quervernetzt, was als Capping bekannt ist, gefolgt von der Internalisierung und Abbau des Immunglobulins. Capping tritt ebenfalls bei Glykoproteinen, die auf der Oberflächenmembran der B-Zellen lokalisiert sind, auf.

**[0018]** Die B-Plasmazellen produzieren und sekretieren Antikörpermoleküle, die fremde Proteine, Polysaccharide, Lipide oder andere Chemikalien in extrazellulärer oder zell-assoziierten Form binden können. Die Antikörper, die von einer einzelnen Plasmazelle produziert werden, sind für ein Antigen spezifisch. Die sekretierten Antikörper binden das Antigen und lösen einen Mechanismus aus, der ihre Zerstörung ermöglicht.

#### Monoklonale Antikörper

**[0019]** Einer der bei den Möglichkeiten des Immunsystems am meisten verwendeten Aspekte ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Das Erscheinen der monoklonalen Antikörper- (Mab) Technologie Mitte der 1970er Jahre lieferte ein wertvolles neues therapeutisches und diagnostisches Werkzeug. Zum ersten Mal hatten Forscher und Kliniker Zugriff auf unbegrenzte Mengen von einheitlichen Antikörpern, die in der Lage sind, an eine festgelegte antigene Stelle zu binden und verschiedene immunologische Effektorfunktionen zu besitzen. Gegenwärtig sind Techniken zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Stand der Technik gut bekannt.

**[0020]** Es wurde erwartet, dass diese monoklonalen Antikörper für Medizin und Diagnostik sehr vielversprechend sein würden. Unglücklicherweise wurde die Entwicklung von therapeutischen Produkten, die auf diesen Proteinen basieren, durch Probleme beschränkt, die mit der Therapie mit monoklonalen Antikörpern verbunden sind. Zum Beispiel sind die meisten monoklonalen Antikörper von Mäusen abgeleitet und passen daher nicht gut zu dem menschlichen Komplementsystem. Bei Verwendung in Menschen fehlen ihnen ebenfalls andere wichtige funktionelle Eigenschaften von Immunglobulinen.

**[0021]** Der größte Nachteil bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern ist die Tatsache, dass nichtmenschliche monoklonale Antikörper immunogen sind, wenn sie einem menschlichen Patienten injiziert werden. Nach der Injektion eines fremden Antikörpers kann die Immunantwort, die in dem Patienten ausgelöst wird, ziemlich stark sein. Die Immunantwort führt zu der schnellen Beseitigung des fremden Antikörpers und beseitigt nach einer anfänglichen Behandlung im Wesentlichen den therapeutischen Nutzen des Antikörpers. Wenn das Immunsystem erst einmal vorbereitet ist, auf fremde Antikörper zu reagieren, können spätere Behandlungen mit dem gleichen oder anderen nichtmenschlichen Antikörpern aufgrund der Kreuzreaktivität ineffektiv oder sogar gefährlich sein.

**[0022]** Mäuse können einfach mit fremden Antigenen immunisiert werden, um ein breites Spektrum von hoch affinen Antikörpern zu erzeugen. Das Einbringen von Maus-Antikörpern in Menschen führt jedoch zu der Erzeugung einer Mensch-Anti-Maus Antikörper (HAMA) Antwort aufgrund der Präsentation eines Fremdproteins im Körper. Die Verwendung von Maus-Antikörpern ist bei einem Patienten im allgemeinen auf einen Zeitraum von Tagen oder Wochen beschränkt. Längere Behandlungszeiträume können zu Anaphylaxie führen. Außerdem wenn sich erst einmal HAMA in einem Patienten entwickelt hat, verhindert diese oftmals die zukünftige Verwendung von Maus-Antikörpern für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

**[0023]** Um das Problem der HAMA Antwort zu überwinden, haben Forscher verschiedene Ansätze probiert nichtmenschliche Antikörper zu modifizieren, um sie menschenähnlich zu machen. Diese Ansätze schließen Maus/Mensch-Chimären, Humanisierung und Primatisierung ein. Frühe Arbeiten bei der Herstellung von menschenähnlicheren Antikörpern verwendeten kombinierte Kaninchen- und Menschenantikörper. Die Proteinunterschiede der Antikörper, Kaninchen Fab Fragmente und humane Fc-Fragmente wurden über Proteindisulfidbrücken verbunden, um neue künstliche Proteinmoleküle oder chimäre Antikörper zu erzeugen.

**[0024]** Um chimäre Antikörper zu erzeugen, wurden rekombinante molekularbiologische Techniken verwendet. Rekombinante DNA Technologie wurde verwendet, um eine Genfusion zwischen DNA-Sequenzen, die die variablen Domänen von leichten und schweren Antikörperketten aus Mäusen und die konstanten Domänen von humanen leichten (LC) und schweren Antikörperketten (HC) kodieren, zu erstellen, um so die Expression von chimären Antikörpern zu erlauben. Diese chimären Antikörper enthalten eine große Anzahl von nichtmenschlichen Aminosäuresequenzen und sind für Menschen immunogen. Patienten, die diesen chimären Antikörpern ausgesetzt sind, erzeugen humane anti-Chimären Antikörper (HACA). HACA richtet sich gegen die murine V-Region und kann sich ebenfalls gegen neue V-Region/C-Region (konstante Region) Verbindungen richten, die in rekombinanten chimären Antikörpern vorhanden sind.

**[0025]** Um einige der Beschränkungen, die durch die Immunogenität von chimären Antikörpern verursacht werden, zu überwinden, werden molekularbiologische Techniken verwendet, um humanisierte oder umgeformte Antikörper zu schaffen. Die DNA-Sequenzen, die die Antigen bindenden Teile oder die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) der murinen monoklonalen Antikörper kodieren, werden mit molekularen Mitteln auf DNA-Sequenzen, die die Gerüstbereiche von humanen schweren und leichten Antikörperketten kodieren, übertragen. Die humanisierten Mabs enthalten einen größeren Prozentsatz humaner Antikörpersequenzen als chimäre Mabs. Das Endprodukt, das ungefähr 90% menschlichen Antikörpers und 10% Mausantikörper umfasst, enthält eine Mausbindungsstelle auf einem menschlichen Antikörper. Im Gerüstbereich des humanisierten Mab enthält es ebenfalls bestimmte Aminosäuresubstitutionen aus dem Maus Mab, um die korrekte Form und damit die Bindungsaaffinität für das Ziel-Antigen beizubehalten.

**[0026]** In der Praxis ist der einfache Austausch menschlicher CDRs durch murine CDRs nicht ausreichend, um wirksame humanisierte Antikörper zu erzeugen, die die Spezifität des ursprünglichen murinen Antikörpers beibehalten. Es ist ebenfalls erforderlich, eine kleine Anzahl von kritischen Resten des murinen Antikörpers in die humane variable Region einzuschließen. Die Identität dieser Reste hängt von der Struktur sowohl des ursprünglichen murinen Antikörpers als auch des menschlichen Akzeptorantikörpers ab. Es ist die Anwesenheit dieser murinen Antikörperreste, die dabei hilft, bei dem Patienten eine HACA-Antwort hervorzurufen, was zu der schnellen Beseitigung der monoklonalen Antikörper und der Angst vor Anaphylaxie führt.

**[0027]** Eine andere Technik, die Resurfacing-Technologie genannt wird, wird für die Humanisierung von Maus-Antikörpern verwendet. Resurfacing schließt den Austausch der Oberfläche des Maus-Antikörpers mit der Oberfläche eines humanen Antikörpers in einem Verfahren ein, das schneller und effizienter als andere Humanisierungstechniken ist. Diese Technik stellt ein Verfahren zum Umgestalten von murinen monoklonalen Antikörpern, um humanen Antikörpern zu ähneln, durch das Humanisieren nur der Aminosäuren, die auf der Oberfläche der V-Regionen des rekombinanten F<sub>v</sub> zugänglich sind, bereit. Das Resurfacing von murinen monoklonalen Antikörpern kann die Avidität des ursprünglichen monoklonalen Maus-Antikörpers in der umgeformten Version beibehalten, da die natürlichen Framework-CDR Interaktionen beibehalten werden. Diese Antikörper leiden wiederum an dem Problem, aufgrund ihres Mausursprungs antigen zu sein.

**[0028]** Andere Technologien verwenden statt Maus Primatensequenzen, um Mabs zu humanisieren. Der Grund dieses Ansatzes, der Primatisierung genannt wird, ist, dass die meisten der Sequenzen in den variablen Regionen von Primaten-Antikörpern von menschlichen Sequenzen nicht unterscheidbar sind. Primatisierte Anti-CD4 Mabs für die Behandlung von rheumatoider Arthritis und schwerem Asthma werden entwickelt. Diese Antikörper sind für das Immunsystem des Patienten jedoch immer noch fremde Proteine und rufen eine Immunantwort hervor.

**[0029]** Bei Bemühungen, eine Immunantwort auf Fremdproteine zu vermeiden, werden eine Reihe von Ansätzen entwickelt, um menschliche Mabs herzustellen, die nur Bestandteile von menschlichen Antikörpern enthalten. Ein Ansatz ist es, einen humanen B-Zell-Klon zu isolieren, der natürlicherweise ein Antikörper gegen das gewünschte Antigen herstellt und ihn in einem Triom Zellkultursystem wachsen zu lassen. Da humanoide Antikörper nur gegen Antigene, die für den Wirt fremd sind, hergestellt werden, wird keine menschlichen B-Zelle Antikörper gegen humanoide Antigene herstellen. Daher ist dieser Ansatz nicht nützlich, um Mabs gegen Antigene herzustellen, die humanoide Proteine sind.

**[0030]** Zwei andere Ansätze, um humane Mabs zu erzeugen, sind Phagendisplay und die Verwendung von transgenen Mäusen. Die Phagendisplaytechnik nutzt die Fähigkeit von Menschen aus, Antikörper gegen jede mögliche Struktur zu erzeugen. Diese Technik verwendet die Antikörnergene von vielen verschiedenen Einzelpersonen, um eine große Bibliothek von Phagenantikörpern zu erzeugen, von denen jeder eine funktionale variable Antikörperdomäne auf seiner Oberfläche präsentiert. Aus dieser Bibliothek werden einzelne variable Domänen hinsichtlich ihrer Fähigkeit an das gewünschte Antigen zu binden, ausgewählt. Der Mab wird über molekularbiologische Techniken durch das Kombinieren einer variablen Antikörperdomäne, die die gewünschten Bindungseigenschaften besitzt und einer konstanten Domäne, die am besten für das potentielle humantherapeutische Produkt geeignet ist, erzeugt. Diese Technik lässt wiederum Antigenspezifität vermissen. Die Phagenbibliothek kann nicht jede Bindungsregion für jedes und alle gewünschten Antigene enthalten. Sie kann ebenfalls Bindungsregionen enthalten, die die Spezifität vermissen lassen. Daher kann diese Technik beträchtliche Konstruktionsmaßnahmen erfordern, um die Antikörperaffinitäten auf einen nützlichen Level anzuheben.

**[0031]** Transgene Mäuse werden ebenfalls verwendet, um „humane“ Antikörper zu erzeugen. Die transgenen Mäuse werden durch das Ersetzen der Maus Immunglobulin Gen Loci mit humanen Immunglobulin Loci erzeugt. Dieser Ansatz kann Vorteile gegenüber den Phagendisplaytechniken bieten, da er die *in vivo* Affinitätsreifungsmaschinerie der Maus ausnutzt.

**[0032]** Alle gegenwärtigen Technologien zur Erzeugung von menschlichen oder menschenähnlichen Mabs sind unzureichend, um einen artspezifischen Antikörper bereitzustellen, der für ein beschriebenes Antigen antigenspezifisch ist. Chimäre Antikörper haben die Vorteile, die Spezifität des murinen Antikörpers beizubehalten und humane Fc-abhängige Komplementfixierung und zellvermittelte Cytotoxizität zu stimulieren. Die murinen variablen Regionen dieser chimären Antikörper können jedoch immer noch eine HAMA Antwort auslösen, wodurch der Nutzen chimärer Antikörper als diagnostische und therapeutische Mittel begrenzt wird.

**[0033]** Bemühungen menschliche B-Zellen zu immortalisieren oder menschliche Hybridome zu erzeugen, die in der Lage sind, Immunglobuline gegen ein gewünschtes Antigen zu erzeugen, waren im Allgemeinen, insbesondere mit menschlichen Antigenen, nicht erfolgreich. Zusätzlich verhindert die Immuntoleranz im Menschen die erfolgreiche Generierung von Antikörpern gegen Selbst-Antigene.

#### Impfstofftherapie

**[0034]** Impfstoffe können gegen jedes Fremdantigen gerichtet sein, unabhängig davon, ob es aus einem anderen Organismus, einer veränderten Zelle oder induzierten fremden Eigenschaften in einer normalen „eigenen“ Zelle stammt. Die Art der Verabreichung des Fremdantigens kann dabei helfen, die Art der Immunantwort, die erzeugt wird, festzulegen. Zum Beispiel stimuliert die Abgabe von Antigenen an Schleimhautoberflächen, wie zum Beispiel die orale Inokulation mit lebendem Poliovirus, das Immunsystem eine Immunantwort auf der Schleimhautoberfläche zu erzeugen. Die Injektion des Antigens im Muskelgewebe fördert oftmals die Erzeugung einer lang andauernden IgG Antwort.

**[0035]** Impfstoffe können im Allgemeinen in zwei Arten unterteilt werden, vollständige Impfstoffe und Impfstoffe, die aus Untereinheiten bestehen. Vollständige Impfstoffe können aus Viren oder Mikroorganismen hergestellt werden, die inaktiviert, attenuiert oder getötet wurden. Lebende attenuierte Impfstoffe haben den Vorteil, die natürliche Infektion genügend nachzuahmen, um eine Immunantwort auszulösen, die der Antwort auf den Wildtyporganismus ähnlich ist. Solche Impfstoffe bieten im Allgemeinen einen hohen Grad an Schutz, insbesondere wenn sie über einen natürlichen Weg verabreicht werden, und einige erfordern nur eine einzige Dosis, um Immunität zu verleihen. Ein anderer Vorteil von einigen attenuierten Impfstoffen ist, dass sie für eine Passage von Person-zu-Person zwischen Mitgliedern der Population sorgen. Diesen Vorteilen stehen jedoch mehrere Nachteile gegenüber. Einige attenuierte Impfstoffe haben eine begrenzte Lagerungszeit und können der Lagerung in tropischen Umgebungen nicht standhalten. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass der Impfstoff zu dem virulenten Wildtyp des Organismus zurückkehrt, was eine schädliche, sogar lebensbedrohende Erkrankung auslöst. Die Verwendung von attenuierten Impfstoffen ist bei immungeschwächten Zuständen, wie zum Beispiel Aids, und bei der Schwangerschaft kontraindiziert.

**[0036]** Abgetötete Impfstoffe sind deswegen sicherer, weil sie nicht wieder virulent werden können. Sie sind im Allgemeinen während dem Transport und der Lagerung stabiler und für die Verwendung bei immungeschwächten Patienten annehmbar. Sie sind jedoch weniger wirksam als die lebenden attenuierten Impfstoffe und erfordern gewöhnlich mehr als eine Dosis. Zusätzlich bieten sie nicht die Passage von Person-zu-Person zwischen Mitgliedern der Population.

**[0037]** Die Herstellung von Impfstoffen aus Untereinheiten erfordert Wissen über die Epitope der Mikroorganismen oder Zellen, gegen die der Impfstoff gerichtet sein soll. Andere Überlegungen beim Entwurf von Impfstoffen, die aus Untereinheiten bestehen, sind die Größe der Untereinheit und wie gut die Untereinheit alle Stämme des Mikroorganismus oder Zelle repräsentiert. Der gegenwärtige Schwerpunkt hat sich aufgrund der Probleme, denen bei der Herstellung von bakteriellen Gesamtmpfstoffen begegnet wird, und den Nebenwirkungen, die mit ihrer Verwendung verbunden sind, von der Entwicklung von bakteriellen Impfstoffen zu der Erzeugung von Impfstoffen, die aus Untereinheiten bestehen, verschoben. Solche Impfstoffe schließen einen Typhus-Impfstoff, der auf dem Vi Kapsel-Polysaccharid basiert, und den Hib-Impfstoff gegen Haemophilus influenzae ein.

**[0038]** Andere Impfstoffe, die entwickelt worden sind, schließen Kombinationsimpfstoffe und DNA-Impfstoffe ein. Ein Beispiel für einen Kombinationsimpfstoff ist das Bordetella pertussis Toxin und das Fimbrien-Hämagglutinin der Oberfläche. Bei der DNA-Impfung werden dem Patienten Nukleinsäuren verabreicht, die ein Protein Antigen kodieren, das dann transkribiert, translatiert und in einer Form exprimiert wird, um starke, langlebige humorale und zellvermittelte Immunantworten gegen das Antigen zu erzeugen. Die Nukleinsäuren können unter Verwendung von viralen Vektoren oder anderen Vektoren, wie zum Beispiel Liposomen, verabreicht werden.

**[0039]** Die Immunantwort, die durch Impfstoffe erzeugt wird, kann unspezifisch durch die Verwendung von Adjuvanten verstärkt werden. Diese sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen oder Trägerbestandteilen, wie zum Beispiel Liposomen, Emulsionen oder Mikrosphären, mit verschiedenen Wirkmechanismen.

**[0040]** Zusätzlich zu der üblichen Verwendung von Impfstoffen zum Schutz gegen Krankheiten wird die Impfung verwendet, um Krebs zu bekämpfen. Die Idee das Immunsystem unspezifisch zu stimulieren, um Tumore abzustoßen ist nahezu ein Jahrhundert alt. Coley, ein früher Forscher auf dem Gebiet, verwendete bakterielle Filtrate mit beträchtlichem Erfolg. Versuche mit gereinigten Cytokinen und Immunstimulantien gegen Krebs zu impfen, haben nur begrenzten Erfolg und sind nur für einige wenige Tumorarten wirksam.

**[0041]** Zusätzlich zu Krebs werden viele Krankheiten durch das Immunsystem vermittelt. Diese Krankheiten schließen ein: Allergien, Ekzeme, Rhinitis, Urticaria, Anaphylaxie, die Transplantatabstoßung, wie zum Beispiel von Nieren-, Herz-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Knochen- und Lebertransplantaten, rheumatische Krankheiten, systemischen Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, seronegative Spondylarthritis, Sjögren-Syndrom, systemische Sklerose, Polymyositis, Dermatomyositis, Diabetes mellitus Typ I, erworbene Immunschwäche, Hashimoto-Thyreoiditis, Graves-Krankheit, Addison-Krankheit, polyendokrine Autoimmunerkrankung, Hepatitis, sklerosierende Cholangitis, primäre biliäre Zirrhose, perniziöse Anämie, Zöliakie, Antikörper vermittelte Nephritis, Glomerulonephritis, Wegeners-Granulomatose, mikroskopische Polyarthritiden, Polyarthritis nodosa, Pemphingus, Dermatitis herpetiformis, Psoriasis, Vitiligo, multiple Sklerose, Encephalomyelitis, Guillain-Barre-Syndrom, Myasthenia gravis, Lambert-Eaton Syndrom, Sklera, Episklera, Uveitis, chronische mukokutane Candidiasis, Bruton-Syndrom, transiente Hypogammaglobulinämie in der Kindheit, Myelom, X-gekoppeltes Hyper IgM-Syndrom, Wiskott-Aldrich Syndrom, Ataxia teleangiectatica, autoimmune hämolytische Anämie, autoimmune Thrombocytopenie, autoimmune Neutropenie, Waldenstroms Makroglobulinämie, Amyloidose, chronische lymphozytische Leukämie und Non-Hodgkin Lymphom.

**[0042]** Aufgrund der Sicherheitsbedenken, die mit der Verwendung von attenuierten Impfstoffen verbunden sind, und der niedrigen Wirksamkeit von abgetöteten Impfstoffen, besteht auf dem Gebiet ein Bedarf für Zusammensetzungen und Verfahren, die die Wirksamkeit von Impfstoffen verstärken. Auf dem Gebiet besteht ebenfalls Bedarf für Zusammensetzungen und Verfahren zur Stärkung des Immunsystems, die sowohl humorale als auch zellvermittelte Antworten stimulieren. Auf dem Gebiet besteht ferner Bedarf für die selektive Regulierung einer Immunantwort und der Manipulation der verschiedenen Bestandteile des Immunsystems, um eine gewünschte Antwort zu erzeugen. Zusätzlich besteht Bedarf für Verfahren und Zusammensetzungen, die die Immunantwort für eine schnellere Antwort bei der Aktivierung beschleunigen und vergrößern können. Es besteht steigender Bedarf für die Möglichkeit, Bevölkerungen, sowohl von Menschen als auch Tieren, mit Impfstoffen zu impfen, die mit nur einer Dosis Schutz verleihen.

**[0043]** D.K. Peters und D.H. Norback (Blood 1990, 76, 97-104) berichten über die Bindung und Internalisierung von biotinyliertem rekombinannten Interleukin-2 (rIL-2) in aktivierte humane Lymphozyten. Dabei wurde an kolloidale Goldkügelchen absorbiertes Streptavidin verwendet, um das biotinierte rIL-2 innerhalb der Zellen zu verfolgen.

**[0044]** Die Internationale Anmeldung WO 94/21288 offenbart Zusammensetzungen, die eine Mischung aus

biologisch aktiven Faktoren, wie zum Beispiel Cytokinen und Wachstumsfaktoren, und einem kolloidalen Metall umfassen, die verwendet werden können, um ein Mensch oder ein Tier sicher zu impfen, während sie die Toxizität der Faktoren reduzieren oder beseitigen.

**[0045]** Die Europäische Patentanmeldung 0 667 398 A2 ist auf ein Verfahren und ein Gerät zum Nachweis einer Ziel-DNA-Sequenz ohne das Erfordernis, die DNAs mit chemischen Substanzen zu markieren, gerichtet. Dabei wird ein positiv geladenes Gold Kolloid in eine Lösung, die Einzelstrang (ss) DNAs, die die spezifische Basensequenz tragen, die nachgewiesen werden soll, enthält, gemischt, um eine DNA-Sonde zu bilden.

**[0046]** Die Internationale Anmeldung WO 96/04313 offenbart polyspezifische Immunkonjugate und Antikörperfzusammensetzungen, die für die Diagnose und Therapie von Krankheiten, die durch multiresistente Zellen verursacht werden, nützlich sind, während sie die wesentlichen toxischen Nebenwirkungen auf normale Organe vermeiden.

**[0047]** Dabei umfasst ein polyspezifisches Immunkonjugat mindestens einen Antikörperbestandteil, der an ein Multi-Medikament Transporterprotein bindet, mindestens ein Antikörperbestandteil, der an ein Tumor-assoziiertes Antigen oder das Antigen eines infektiösen Mittels bindet und mindestens ein diagnostisches oder therapeutisches Agens. Das diagnostische Agens kann kolloidales Gold sein.

**[0048]** Die Europäischen Patentanmeldungen 0 044 722 A1 bzw. 0 179 483 A2 offenbaren humane monoklonale Antikörper, die entsprechenden Hybridomzelllinien sowie Verfahren zum Erzeugen solcher Hybridomzellen.

**[0049]** Schließlich stellt das US-Patent 5,126,253 eine neue Zelllinie bereit für die Verwendung als Ausgangspunkt für die Herstellung von Hybridomzellen, nämlich Colo 38 humane Melanomzellen. Durch die Fusion zwischen Maus B-Zellen, die mit dem entsprechenden Antigen immunisiert wurden, und 8-Azaguanosin resistenten Colo 38 Zellen wird ein monoklonaler Antikörper erzeugt.

**[0050]** Was benötigt wird, sind Zusammensetzungen und in vitro Verfahren, um die spezifische Abgabe von Wirkstoffen nur auf die Zielzellen zu richten. Für einige Verabreichungen und Behandlungen wird bevorzugt, wenn der Wirkstoff von den Zielzellen internalisiert wird. Wenn er sich einmal innerhalb der Zelle befindet, sollte der Wirkstoff in ausreichendem Masse von dem Transportsystem freigegeben werden, so dass der Wirkstoff aktiv ist. Solche Zusammensetzungen und in vitro Verfahren sollten in der Lage sein, wirksam therapeutische Wirkstoffe an die Zielzellen abzugeben.

**[0051]** Es besteht ebenfalls ein allgemeiner Bedarf für Zusammensetzungen aus antigen-spezifischen, artspezifischen Antikörpern und verbesserten in vitro Verfahren zu ihrer Erzeugung. Es besteht insbesondere ein Bedarf für in vitro Verfahren zur Erzeugung vollständig humarer Antikörper, die eine Affinität für ein bestimmtes Antigen besitzen. Diese humanen Immunglobuline sollten in einer Weise, die für die therapeutische und diagnostische Formulierung geeignet ist, einfach und ökonomisch herstellbar sein.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0052]** Die vorliegende Erfindung umfasst in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die zielgerichtete Abgabe von komponentenspezifischen immunstimulierenden Molekülen an einzelne Immunzellen. Diese komponentenspezifischen immunstimulierenden Moleküle binden und stimulieren aufgrund der spezifischen Rezeptoren auf den Zellen spezifische Immunzellen. Daher werden in einer Mischung von verschiedenen Zellarten die komponentenspezifischen immunstimulierenden Moleküle nur von denjenigen Zellen gebunden, die den ausgewählten Rezeptor besitzen, während Zellen, denen der Rezeptor fehlt, unbeeinflusst bleiben. In einigen Populationen von Immunzellen enthält nur ein Zelltyp Rezeptoren, die ein gegebenes komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens binden. In anderen Zellpopulationen können eine Vielzahl von Immunzellen den Rezeptor, der das komponentenspezifische immunstimulierende Agens bindet, enthalten. Es ist ebenfalls möglich, dass eine gegebene Zellart Rezeptoren für viele komponentenspezifische immunstimulierende Agens enthält.

**[0053]** Die Verfahren zur zielgerichteten Abgabe an Immunzellen sind solche Verfahren, die für in vitro Techniken, wie zum Beispiel Zugabe zu Zellkulturen oder Medien, verwendet werden.

**[0054]** In einer Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die gleichzeitige und/oder sequentielle zielgerichtete Stimulation von spezifischen Einzelbestandteilen

des Immunsystems durch ein vermeintliches Antigen oder Impfstoffmolekül, um die Immunantwort auf das Antigen/den Impfstoff zu verstärken, zu verändern oder zu unterdrücken. Ein anderer Aspekt der Erfindung ermöglicht es, die Wirksamkeit, mit der Antigene und Impfstoffe eine Immunantwort auslösen, zu verstärken. In einer Ausführungsform sind die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung in der Lage, viele unterschiedliche Einzelimmunbestandteile durch die Präsentation von spezifischen komponentenstimulierenden Zusammensetzungen zu stimulieren.

**[0055]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls Zusammensetzungen und in vitro Verfahren für die sequentielle Stimulation des Immunsystems durch das Bereitstellen von komponentenstimulierenden Zusammensetzungen in einem oder mehreren Schritten einer Immunantwortkaskade von interagierenden Faktoren und Zellen. In einer offenbarten Ausführungsform sind die spezifischen Immunbestandteile die stimuliert werden, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen.

**[0056]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die in vitro Verfahren die sequentielle Verabreichung von komponentenstimulierenden Zusammensetzungen. Die Zusammensetzungen können dasselbe komponentenspezifische immunstimulierende Agens umfassen, das zu verschiedenen Zeiten oder über verschiedene Verabreichungsverfahren gegeben wird. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen die in vitro Verfahren die sequentielle Verabreichung von verschiedenen komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien. Zum Beispiel stimuliert ein erstes komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens die Initiierung der Immunantwort, gefolgt von der späteren Verabreichung eines zweiten komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens, um einen späteren Schritt der Immunantwort zu stimulieren. Die folgende Erfindung beabsichtigt die Verabreichung von vielen komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien, um verschiedene Signalwege des Immunsystems zu initiieren, gefolgt von der späteren Verabreichung von denselben oder anderen komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien, um die Immunantwort fortzusetzen und zu verstärken.

**[0057]** Zusätzlich wird in der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, dass die Zusammensetzungen und in vitro Verfahren, die hierin beschrieben werden, für die Stimulation einer Immunantwort oder die Unterdrückung einer Immunantwort verwendet werden können. Die Verabreichung von komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien zur Unterdrückung von Immunantworten kann verwendet werden, um Autoimmunkrankheiten oder die Abstoßung eines Organs zu kontrollieren.

**[0058]** In einer anderen Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die Herstellung von antigenspezifischen, art-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Diese in vitro Verfahren und Zusammensetzungen stützen sich auf die Umwandlung von Immunzellen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen die in vitro Umwandlung von zirkulierenden Immunzellen. Diese Zellen lösen eine erste Antwort auf das Antigen aus, was zu der Herstellung von antigen-spezifischen Antikörpern führt. Diese ausgewählten Primärklone werden dann immortalisiert, um Zellen zu erzeugen, die Antikörper sekretieren, die ausschließlich aus Proteinen der ausgewählten Art bestehen.

**[0059]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die hergestellten Antikörper vollständig humane monoklonale Antikörper, die durch die in vitro Kultivierung von humanen peripheren Blutzellen erzeugt werden. Ein Schlüsselement dieser Erfindung ist die Antigenerkennung von „Selbst“-Molekülen. Solche Selbst-Moleküle schließen die Moleküle ein, die nativ oder natürlicherweise in einem Individuum auftreten, sowie jedes Molekül, das eine Struktur besitzt, die dieselbe ist, wie die, die natürlicherweise in einer bestimmten Art auftritt. Diese Erkennung verringert die Immunogenität, weil die Antikörper nur Proteine dieser einen Art enthalten.

**[0060]** Diese Antikörper können jedoch immer noch zu etwas Immunogenität führen, da das Protein, das in dem Antikörper enthalten ist, obwohl von der gleichen Art, für das Individuum fremd ist. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind die in vitro hergestellten monoklonalen Antikörper aus dem Blut eines Menschen oder Tieres hergestellt und werden dann demselben Individuum injiziert. In solchen Situationen erzeugen die Antikörper wenig oder keine Immunogenität, da die Antikörper vollständig aus Protein dieses Individuums bestehen.

**[0061]** Sobald diese Primärkulturen zur Erzeugung von antigenspezifischen Antikörpern umgewandelt worden sind, werden sie zum Beispiel durch das Fusionieren mit immobilisierten menschlichen Krebszellen oder durch das Transfizieren der antikörper-produzierenden Zellen mit Onkogenen, wie zum Beispiel Ras, oder mit Viren, wie zum Beispiel dem Epstein-Barr Virus, immobilisiert. Die resultierenden Hybridome werden hinsicht-

lich der Sekretion des spezifischen Antikörpers gescreent und dann zum Beispiel durch Verfahren der limitierten Verdünnung aufgearbeitet, um eine einzelne monoklonale Antikörper produzierende Zelle zu isolieren.

**[0062]** Der resultierende humane monoklonale Antikörper enthält nur humanes Protein. Kein tierisches Protein gelangt in die Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers. Die Abwesenheit von sämtlichen tierischen Proteinen stellt sicher, dass aus der therapeutischen Anwendung dieser Antikörper kein Mensch-An-ti-Tier Antikörper entsteht.

**[0063]** Die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung stellen einen neuen und vielseitigen Ansatz für Systeme zur gezielten Stimulation einer Immunantwort bereit. In einer offebarten Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung komponenten-stimulierende Zusammensetzungen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die komponentenstimulierenden Zusammensetzungen komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen die komponentenstimulierenden Zusammensetzungen komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen, assoziert mit kolloidalem Metall. In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen solche Zusammensetzungen ein Antigen in Verbindung mit einem komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens, und in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind ein Antigen und ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens an ein kolloidales Metall, wie zum Beispiel kolloidales Gold, gebunden und das resultierende chimäre Molekül wird der Immunkomponente präsentiert.

**[0064]** In einer anderen offebarten Ausführungsform umfassen die komponentenstimulierenden Zusammensetzungen der Erfindung eine Abgabe-Struktur oder -Plattform, an die ein Teil einer Bindungsgruppe gebunden ist, und wobei der komplementäre Teil der Bindungsgruppe an ein Antigen oder ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens gebunden ist. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist einer der komplementären Teile der Bindungsgruppe an ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens gebunden, und ein anderer der komplementären Teile der Bindungsgruppe ist an ein vermeintliches Antigen/einen vermeintlichen Impfstoff gebunden. Die Teile der Bindungsgruppe können aus allen bekannten gepaarten Bindungsgruppen ausgewählt werden, einschließlich Antikörper/Antigen, Enzym/Substrat und Streptavidin/Biotin.

**[0065]** Eine Ausführungsform so einer Zusammensetzung umfasst eine Abgabe-Struktur oder -Plattform mit einem Teil einer Bindungsgruppe, der reversibel daran gebunden ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst kolloidales Gold als Plattform, die in der Lage ist, ein Teil einer Bindungsgruppe, an das komponentenspezifische immunstimulierende Moleküle und Antigen-/Impfstoffmoleküle gebunden sind, zu binden, um eine komponentenstimulierende Zusammensetzung zu erzeugen. In einer bevorzugteren Ausführungsform ist die Bindungsgruppe Streptavidin/Biotin und das komponentenspezifische immunstimulierende Molekül ist ein Cytokin. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls die Bindung von komponentenspezifischen immunstimulierenden Molekülen oder Antigenen/Impfstoffen in einem weniger spezifischen Verfahren, wie zum Beispiel der Verwendung von Polykationen, umfassen.

**[0066]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls die Präsentation von Antigenen und komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen in einer Reihe von verschiedenen Trägerkombinationen. Zum Beispiel schließt eine bevorzugte Ausführungsform die Verabreichung eines Antigens in Kombination mit komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen und kolloidalem Gold in einem Liposom als Träger ein. Zusätzliche Kombinationen sind kolloidale Goldpartikel, die mit viralen Partikeln, die Kandidaten für einen aktiven Impfstoff sind, besetzt sind oder die gepackt sind, um die DNA für einen vermeintlichen Impfstoff zu enthalten. Das Goldpartikel kann ebenfalls ein Cytokin enthalten, das verwendet werden kann, um den Virus auf spezifische Immunzellen zu richten. Solche Ausführungsformen bieten ein internes Impfstoffpräparat, das für eine verlängerte Antwort das Antigen langsam an das Immunsystem abgibt. Dieser Typ von Impfstoff ist insbesondere für die einmalige Verabreichung von Impfstoffen vorteilhaft. Alle Arten von Trägern, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Liposomen und Mikrokapseln werden in der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

**[0067]** Daher ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, verlässliche und einfache in vitro Verfahren zur Verstärkung einer Immunantwort bereitzustellen.

**[0068]** Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, in vitro Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit von Impfstoffen bereitzustellen.

**[0069]** Ein anderes Ziel der Erfindung ist es, Impfstoffe bereitzustellen, die mit der Verabreichung von nur einer Dosis einen wirksamen Schutz ergeben.

[0070] Noch ein anderes Ziel der Erfindung ist es, in vitro Verfahren für die gezielte Stimulation von einzelnen Immunbestandteilen auf spezifische Art und Weise bereitzustellen.

[0071] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, in vitro Verfahren für die gleichzeitige Präsentation eines Antigens und eines komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien gegenüber Einzelkomponenten des Immunsystems bereitzustellen.

[0072] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, Zusammensetzungen bereitzustellen, die komponentenspezifische immunstimulierende Agenzien, die in der Lage sind, eine bestimmte Komponente des Immunsystems zu beeinflussen, umfassen.

[0073] Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die Unterdrückung von Immunantworten bereitzustellen.

[0074] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, Zusammensetzungen für die gleichzeitige/sequentielle Verwendung von komponentenspezifischen Agenzien die nicht nur in der Lage sind, die Immunantwort auf dem Primärtumor zu verstärken, sondern ebenfalls eine systemische Immunantwort auf die Resterkrankung auslösen, bereitzustellen, um eine Immunantwort gegen Primärkrebs auszulösen.

[0075] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, die Antigenität/Immunogenität eines Moleküls zu erhöhen.

[0076] Noch ein anderes Ziel der Erfindung ist es, einen antigen-spezifischen art-spezifischen monoklonalen Antikörper in vitro zu erzeugen.

[0077] Noch ein anderes Ziel der Erfindung ist es, einen vollständig humanen monoklonalen Antikörper durch die in vitro Kultivierung von humanen peripheren Blutzymphozyten zu erzeugen.

[0078] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, das Problem antigen-spezifisch und art-spezifisch induzierter Immunität durch das Bereitstellen einer Behandlung von Erkrankungen mit menschlichen antigen-spezifischen Antikörpern zu beseitigen.

[0079] Ein anderes Ziel der Erfindung ist es, einen monoklonalen Antikörper zu erzeugen, der personenspezifisch ist und dadurch eine Fremdimmunantwort ausschließt.

[0080] Noch ein anderes Ziel der Erfindung ist es, verlässliche und vielseitige in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die zielgerichtete Abgabe von immunverstärkenden Agenzien an Immunzellen bereitzustellen.

[0081] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die zielgerichtete Abgabe von komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien bereitzustellen.

[0082] Noch ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung sind in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die zielgerichtete Abgabe von komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien an Zellen, die einen spezifischen Rezeptor dafür besitzen.

[0083] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, in vitro Verfahren und Zusammensetzungen bereitzustellen, die ein zielgerichtetes Abgabesystem, dass unter Verwendung eines komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens in der Lage ist, ein vermeintliches Antigen/einen vermeintlichen Impfstoff zu binden und abzugeben, umfassen.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0084] [Fig. 1](#) zeigt die in vitro Internalisierung eines EGF/CG/IL-1 $\beta$  Komplex durch Makrophagen.

[0085] [Fig. 2](#) zeigt die in vitro Internalisierung eines EGF/CG/TNF- $\alpha$  Komplexes durch dendritische Zellen.

[0086] [Fig. 3](#) zeigt die in vitro Internalisierung eines EGF/CG/IL-6 Komplexes durch B-Zellen.

[0087] [Fig. 4](#) zeigt die in vitro Internalisierung eines EGF/CG/IL-2 Komplexes durch T-Zellen.

[0088] [Fig. 5](#) zeigt die Herstellung menschlicher Anti-human TNF- $\alpha$  Antikörpern durch das erfindungsgemäße Verfahren.

[0089] [Fig. 6a](#) ist eine 200x Hellfeldaufnahme, die die Riesenzellenbildung, die durch diese Langzeitinkubation von isolierten humanen Lymphozyten mit kolloidalem Gold/TNF- $\alpha$  induziert wird, zeigt. [Fig. 6b](#) ist eine 200x Phasenkontrastabbildung Hellfeldmonographie derselben Zellen.

[0090] [Fig. 7](#) zeigt die Notwendigkeit von kolloidalem Gold, um eine Antikörperantwort gegen Selbstproteine zu erzeugen.

[0091] [Fig. 8](#) zeigt, dass die Goldfärbung mit freischwimmenden Anhäufungen von aktivierte B-Zellen, nicht Makrophagen oder dendritischen Zellen, assoziiert ist.

[0092] [Fig. 9](#) ist eine schematische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

[0093] [Fig. 10](#) ist ein Diagramm, das die gesättigten Bindungskinetiken der Abgabeplattform mit TNF- $\alpha$  zeigt.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER OFFENBARTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

##### Verstärkung einer Immunantwort

[0094] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen und in vitro Verfahren zum Verstärken einer Immunantwort und zur Erhöhung der Wirksamkeit von Impfstoffen durch das gleichzeitige oder sequentielle Targeting von spezifischen Immunkomponenten. Insbesondere schließen spezifische Immunkomponenten antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen, und Lymphozyten, wie zum Beispiel B-Zellen und T-Zellen, ein, die durch ein oder mehrere komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen einzeln beeinflusst werden. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform erlaubt die Aktivierung der Immunantwort unter Verwendung eines spezifischen Antigens in Verbindung mit den komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen. Wie hierin verwendet, meint ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens ein Agens, das für eine Komponente des Immunsystems spezifisch ist, und das in der Lage ist, diese Komponente zu beeinflussen, so dass die Komponente in der Immunantwort aktiviert wird. Das Agens kann in der Lage sein, mehrere verschiedene Komponenten des Immunsystems zu beeinflussen, und diese Fähigkeit kann in den Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Das Agens kann natürlich auftretend sein oder kann durch molekularbiologische Techniken oder Proteinrezeptormanipulierung erzeugt und manipuliert werden.

[0095] Die Aktivierung der Komponente in der Immunantwort kann zu der Stimulierung oder Unterdrückung von anderen Komponenten der Immunantwort führen, was zu einer Gesamtstimulierung oder -unterdrückung der Immunantwort führt. Aus Gründen der Einfachheit wird hierin die Stimulierung von Immunkomponenten beschrieben, aber es ist selbstverständlich, dass durch den Ausdruck Stimulierung alle Antworten von Immunkomponenten in Betracht gezogen werden, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Stimulierung, Suppression, Abstoßungs- und Feedback-Aktivitäten.

[0096] Die Immunkomponente, die beeinflusst wird, kann vielfältige Aktivitäten besitzen, was sowohl zur Suppression als auch zur Stimulation oder Initiation oder Suppression von Feedbackmechanismen führt. Die vorliegende Erfindung ist nicht durch die Beispiele hierin genau beschriebener immunologischer Antworten begrenzt, sondern schließt komponentenspezifische Wirkungen in allen Aspekten des Immunsystems ein.

[0097] Die Aktivierung jedes Bestandteils des Immunsystems kann simultan, sequentiell oder in jeder Kombination davon erfolgen. In einer Ausführungsform eines in vitro Verfahrens der vorliegenden Erfindung werden viele komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen gleichzeitig verabreicht. In diesem in vitro Verfahren werden die Immunzellen gleichzeitig mit vier verschiedenen Präparaten stimuliert, wobei jedes eine Zusammensetzung enthält, die ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens umfasst. Vorzugsweise umfasst die Zusammensetzung das komponentenspezifische immunstimulierende Agens assoziiert mit einem kolloidalen Metall. Noch bevorzugter umfasst die Zusammensetzung das komponentenspezifische immunstimulierende Agens assoziiert mit einem kolloidalen Metall mit einem Partikel einer Größe oder Partikeln verschiedener Größe und einem Antigen. Am bevorzugtesten umfasst die Zusammensetzung das komponentenspezifische immunstimulierende Agens assoziiert mit kolloidalem Metall einer Partikelgröße und einem Antigen oder mit unterschiedlich großen Partikeln und Antigen.

**[0098]** Die Erfinder haben gefunden, dass sie bestimmte komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen verwenden können, um einen spezifischen stimulatorischen, hochregulierenden Effekt auf einzelne Immunbestandteile bereitzustellen. Zum Beispiel stimuliert Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) spezifisch Makrophagen, während TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrosefaktor Alpha) und der Flt-3 Ligand spezifisch dendritische Zellen stimulieren. Hitzeabgetötetes Mycobacterium butyricum und Interleukin-6 (IL-6) sind spezifische Stimulatoren von B-Zellen und Interleukin-2 (IL-2) ist ein spezifischer Stimulator von T-Zellen. Zusammensetzungen, die solche komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen umfassen, erlauben die spezifische Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen bzw. T-Zellen. Zum Beispiel werden Makrophagen aktiviert, wenn eine Zusammensetzung, die das komponentenspezifische immunstimulierende Agens IL-1 $\beta$  umfasst, verabreicht wird. Eine bevorzugte Zusammensetzung ist IL-1 $\beta$  in Verbindung mit einem kolloidalen Metall, und eine besonders bevorzugte Zusammensetzung ist IL-1 $\beta$  in Verbindung mit einem kolloidalen Metall und einem Antigen, um eine spezifische Makrophagenantwort gegen dieses Antigen auszulösen.

**[0099]** Für eine wirksame Impfung sind viele Elemente der Immunantwort notwendig. Eine Ausführungsform eines Verfahrens einer gleichzeitigen Stimulation ist es, vier getrennte Präparate von Zusammensetzungen eines komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens zu verabreichen, das 1) IL-1 $\beta$  für Makrophagen, 2) TNF- $\alpha$  und den Flt-3 Liganden für dendritische Zellen, 3) IL-6 für B-Zellen und 4) IL-2 für T-Zellen umfasst. Die komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens enthaltenden Zusammensetzungen können über jeden Weg, der dem Durchschnittsfachmann bekannt ist, verabreicht werden und können abhängig von der gewünschten Immunantwort denselben oder verschiedene Wege verwenden.

**[0100]** In einer anderen Ausführungsform der in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden die einzelnen Immunbestandteile sequentiell aktiviert. Zum Beispiel kann diese sequentielle Aktivierung in zwei Phasen aufgeteilt werden, die Primerphase und die Immunisierungsphase. Die Primerphase umfasst die Stimulation von APCs, vorzugsweise Makrophagen und dendritischen Zellen, während die Immunisierungsphase das Stimulieren von Lymphozyten, vorzugsweise B-Zellen und T-Zellen umfasst. Innerhalb jeder der beiden Phasen kann die Aktivierung der einzelnen Immunbestandteile simultan oder sequentiell sein. Für die sequentielle Aktivierung ist ein bevorzugter Aktivierungsmechanismus die Aktivierung von Makrophagen gefolgt von dendritischen Zellen, gefolgt von B-Zellen, gefolgt von T-Zellen. Ein besonders bevorzugtes Verfahren ist eine kombinierte sequentielle Aktivierung, wobei es eine gleichzeitige Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen gibt, gefolgt von der gleichzeitigen Aktivierung von B-Zellen und T-Zellen. Dies ist ein Beispiel von in vitro Verfahren und Zusammensetzungen von multiplen komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen, um mehrere Signalwege des Immunsystems zu initiieren.

**[0101]** Die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um die Wirksamkeit von jeder Art von Impfstoff zu erhöhen. Die vorliegenden in vitro Verfahren erhöhen die Wirksamkeit eines Impfstoffes durch die zielgerichtete Aktivierung von spezifischen Immunbestandteilen. Zusammensetzungen, die komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen in Verbindung mit kolloidalem Metall und Antigen umfassen, werden zur Verbesserung des Kontaktes zwischen Antigen und spezifischer Immunkomponente verwendet. Beispiele von Krankheiten, für die zur Zeit Impfstoffe erhältlich sind, schließen ein Cholera, Diphtherie, Haemophilus, Hepatitis A, Hepatitis B, Influenza, Masern, Meningitis, Mumps, Pertussis, Pocken, Pneumokokken Pneumonie, Polio, Tollwut, Röteln, Tetanus, Tuberkulose, Typhus, Varicella zoster, Keuchhusten und Gelbfieber.

**[0102]** Die Kombination von Verabreichungsweg und Verpackung, die verwendet wird, um das Antigen an die Immunzellen abzugeben, ist bei der Planung der gewünschten Immunantwort ein leistungsfähiges Werkzeug. Die folgende Erfindung umfasst in vitro Verfahren und Zusammensetzungen, umfassend verschiedene Verpackungsverfahren, wie zum Beispiel Liposomen, Mikrokapseln oder Mikrosphären, die für eine Freisetzung von immunstimulierenden Zusammensetzungen über einen langen Zeitraum sorgen können. Diese Verpackungssysteme wirken wie interne Depots zur Aufnahme von Antigenen und setzen die Antigene für die Aktivierung des Immunsystems langsam frei. Zum Beispiel kann ein Liposom mit einer Zusammensetzung, die ein Antigen und komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen assoziiert mit kolloidalem Metall umfasst, gefüllt werden. Zusätzliche Kombinationen sind kolloidale Goldpartikel, die mit viralen Partikeln, die der aktive Impfstoffkandidat sind, bedeckt sind oder die so gepackt sind, dass sie DNA für einen vermeintlichen Impfstoff enthalten. Das Goldpartikel kann ebenfalls ein Cytokin enthalten, das dann verwendet werden kann, um das Virus auf spezifische Immunzellen zu richten. Ferner kann man ein Fusionsprotein-Impfstoff erzeugen, der zwei oder mehr potentielle Impfstoffkandidaten abdeckt und einen Impfstoff für zwei oder mehr Anwendungsmöglichkeiten erzeugt. Die Partikel können ebenfalls Immunogene einschließen, die durch die Zugabe von Polyethylen-glykol, das das Material langsam abgibt, chemisch modifiziert sein können.

**[0103]** Der Komplex aus Antigen/komponentenspezifischem immunstimulierendem Agens/Metall wird von dem Liposom langsam abgegeben, von den Immunzellen als fremd erkannt und die spezifische Komponente, gegen die das komponentenspezifische immunstimulierende Agens gerichtet ist, aktiviert die Immunzellen. Die Kaskade der Immunantwort wird durch die Gegenwart des komponentenspezifischen immunstimulierenden Agens schneller aktiviert und die Immunantwort wird schneller und spezifischer erzeugt.

**[0104]** Andere in vitro Verfahren und Zusammensetzungen, die in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden, schließen die Verwendung von Komplexen aus Antigen/komponentenspezifischem immunstimulierendem Agens/kolloidalem Metall, in denen die kolloidalen Metallpartikel unterschiedliche Größen haben, ein. Die sequentielle Verabreichung von komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien kann in einer Einzeldosis Verabreichung durch die Verwendung von diesen verschiedenen großen kolloidalen Metallpartikeln erreicht werden. Eine Dosis würde vier unabhängige komponentenspezifische immunstimulierende Agenzien komplexiert mit einem Antigen und jedes mit einem unterschiedlich großen kolloidalen Metallpartikel einschließen. So würde die gleichzeitige Verabreichung die sequentielle Aktivierung der Immunkomponenten hervorrufen, um einen wirksameren Impfstoff und einen höheren Schutz für die Population zu erzeugen. Andere Arten so einer Einzeldosisverabreichung mit sequentieller Aktivierung können durch die Kombinationen von verschiedenen großen kolloidalen Metallpartikeln und Liposomen oder Liposomen, die mit unterschiedlich großen kolloidalen Metallpartikeln gefüllt sind, bereitgestellt werden.

**[0105]** Die Verwendung von solchen Impfstoffsystmen, wie sie oben beschrieben sind, ist bei der Bereitstellung von Impfstoffen, die in einer Dosis verabreicht werden können, sehr wichtig. Die Verabreichung in einer Dosis ist bei der Behandlung von Tierpopulationen, wie zum Beispiel Vieh oder Wildtierbeständen wichtig. Die Verabreichung in einer Dosis ist bei der Behandlung von Populationen, die sich der Gesundheitsfürsorge widersetzen, wie zum Beispiel Arme, Obdachlose, Bewohner ländlicher Gebiete oder Personen in Entwicklungsländern, die nur eine ungenügende Gesundheitsversorgung besitzen, entscheidend. In allen Ländern haben viele Personen keinen Zugang zu Präventivformen der Gesundheitsfürsorge, wie Impfung. Das Wiederauftreten von infektiösen Krankheiten, wie zum Beispiel Tuberkulose, hat den Bedarf an Impfstoffen, die einmal verabreicht werden und trotzdem einen langandauernden wirksamen Schutz verleihen, erhöht. Die Zusammensetzungen und in vitro Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen einen solch wirksamen Schutz bereit.

**[0106]** Die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls verwendet werden, um Krankheiten, in denen eine Immunantwort auftritt, durch das Stimulieren oder Unterdrücken von Komponenten, die Teil dieser Immunantwort sind, zu behandeln. Beispiele von solchen Krankheiten schließen ein Addison-Krankheit, Allergien, Anaphylaxie, Brutons-Syndrom, Krebs, einschließlich feste und Bluttumore, Ekzeme, Hashimoto Thyreoiditis, Polymyositis, Dermatomyositis, Diabetes mellitus Typ 1, erworbene Immunschwächesyndrom, Transplantatabstoßung, wie zum Beispiel von Nieren-, Herz-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Knochen- und Lebertransplantaten, Graves-Krankheit, polyendokrine Autoimmunerkrankung, Hepatitis, mikroskopische Polyarthritis, Polyarthritis nodosa, Pemphingus, primäre biliäre Zirrhose, perniziöse Anämie, Zöliakie, Antikörper vermittelte Nephritis, Glomerulonephritis, rheumatische Krankheiten, systemischer Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, seronegative Spondylarthritis, Sjögren-Syndrom, systemische Sklerose, sklerosierende Cholangitis, Wegeners Granulomatose, Dermatitis herpetiformis, Psoriasis, Vitiligo, multiple Sklerose, Encephalomyelitis, Guillain-Barre-Syndrom, Myasthenia gravis, Lambert-Eaton Syndrom, Sklera, Episklera, Uveitis, chronische mukokutane Candidiasis, Urtikaria, transiente Hypogammaglobulinämie in der Kindheit, Myelom, X-gekoppeltes Hyper IgM-Syndrom, Wiskott-Aldrich Syndrom, Ataxia teleangiectatica, autoimmune hämolytische Anämie, autoimmune Thrombocytopenie, autoimmune Neutropenie, Waldenstroms Makroglobulinämie, Amyloidose, chronische lymphozytische Leukämie und Non-Hodgkin Lymphom.

#### Herstellung von monoklonalen Antikörpern in vitro

**[0107]** Die in vitro Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können ferner verwendet werden, um antigen-spezifische, art-spezifische monoklonale Antikörper zu erzeugen, die die Immunantwort verstärken. Diese Antikörper werden zum Beispiel durch das in vitro Inkontaktbringen eines Antigens, antigen-präsentierender Zellen (APCs), Immunzellen, wie zum Beispiel B-Zellen, und optional einem oder mehreren komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien erzeugt. Wenn erst einmal antigen-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, werden die aktivierte Immunzellen immortalisiert, zum Beispiel durch das Fusionieren mit immobilisierten menschlichen Krebszellen. Die resultierenden Hybriden können dann hinsichtlich der Sekretion eines spezifischen Antikörpers gescreent und einzelne monoklonale Antikörper produzierende Zellen isoliert werden.

**[0108]** Das Antigen, die APCs, die Immunzellen und das komponentenspezifische immunstimulierende Agens können alle zur gleichen Zeit in die in vitro Kultur eingebracht werden. Optional können diese verschiedenen Bestandteile sequentiell in jeder Reihenfolge oder Kombination zugegeben werden. Das Antigen und das komponentenspezifische immunstimulierende Agens können zwei verschiedene Moleküle sein, oder können in Form eines Komplexes vorhanden sein. Zum Beispiel kann ein Antigen mit verschiedenen Cytokinen komplexiert sein, so dass es, wenn es in einer sequentiellen Art zugegeben würde, spezifische Zellen in der Kultur in einer vorhersagbaren, schrittweisen Art stimulieren würde.

**[0109]** Zellen, wie zum Beispiel APCs und B-Zellen, können aus jeder Quelle erhalten werden, vorzugsweise aus peripherem Blut. Peripheres Blut aus jeder Quelle kann verwendet werden, um die antigen-spezifischen, art-spezifischen Antikörper der Erfindung zu erzeugen. Obwohl die wichtigste Verwendung der vorliegenden Erfindung die Herstellung von menschlichen Anti-Mensch Antikörpern ist, ist es möglich, das Verfahren der Erfindung zu verwenden, um antigen-spezifische art-spezifische Antikörper auch für andere Tierarten zu entwickeln. Für die Herstellung von menschlichen Anti-Mensch Antikörpern kann das Blut in geeigneter Weise vom amerikanischen Roten Kreuz erhalten werden.

**[0110]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist es wünschenswert, den Buffy Coat von dem Rest des Gesamtbluts zu trennen. Im Buffy Coat gibt es zwei verschiedene Bestandteile, die für die Ausführung der vorliegenden Erfindung wichtig sind. Dies sind die antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie zum Beispiel Makrophagen, Lymphozyten, Langhans-Zellen und dendritische Zellen, und die B-Zellen. B-Zellen sind ebenfalls antigenpräsentierende Zellen, aber bei Antigen Aussetzung erzeugen sie eine Antikörperantwort. Einmal getrennt von dem Gesamtblut kann der gesamte Buffy Coat verwendet werden, oder die APCs und B-Zellen können getrennt und einzeln verwendet werden. Jeder dieser Bestandteile kann gemäß Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind, wie zum Beispiel Durchflusszytometrie, magnetischer Zelltrennung und Kryokonservierung isoliert und eingefroren werden und zu einem späteren Zeitpunkt ohne die Herstellung von Antikörpern zu beeinflussen, verwendet werden.

**[0111]** Obwohl jede Kombination von Antigen, antigen-präsentierenden Zellen (APCs), komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen und B-Zellen in der vorliegenden Erfindung in jeder Weise in vitro verwendet werden kann, verwendet ein bevorzugtes Präparat ein an ein kolloidales Metall gebundenes Antigen. In dieser Ausführungsform werden der Buffy Coat oder die APCs in einem Gefäß platziert. Ein an kolloidales Metall gebundenes Antigen wird dann zu dem Gefäß zugegeben und mit dem Buffy Coat oder den APCs inkubiert.

**[0112]** Die Zusammensetzung mit an kolloidales Metall gebundenem Antigen kann durch das unten beschriebene Verfahren hergestellt werden. Das an kolloidales Metall gebundene Antigen kann zu dem Buffy Coat oder zu den APCs allein oder in Gegenwart eines Adjuvans, immunogener Proteine, Nukleotide oder akzessorischer Cytokine/Immunstimulatoren, die bei der Entwicklung einer Th2/B-Zellantwort helfen, zugegeben werden. Optional können diese Adjuvantien, immunogenen Proteine, Nukleotide und akzessorische Cytokine/Immunostimulatoren in einer Art an das kolloidale Metall gebunden sein, die ähnlich der ist, mit der das Antigen vor der Inkubation des an kolloidales Metall gebundenen Antigens mit dem Buffy coat oder den APCs gebunden war.

**[0113]** Wenn zu Beginn B-Zellen vorhanden sind, wie wenn der gesamte Buffy Coat verwendet wird, kann ihre Anzahl während der Inkubation mit dem an kolloidales Metall gebundenen Antigen abnehmen. Daher werden nach der Inkubation optional zusätzliche B-Zellen zu dem Gefäß zugegeben. Diese B-Zellen können frisch erhalten, gefroren oder solche sein, die von dem Buffy Coat derselben Probe abgetrennt wurden. Als Antwort auf das spezifische Antigen, das an das kolloidale Metall gebunden ist, aktivieren die APCs in dem Gefäß die B-Zellen Antikörper zu produzieren.

**[0114]** Sobald die Serokonversion in vitro bestätigt ist, werden die Zellen immortalisiert. Die Zellen können mittels mehrerer verschiedener Verfahren immortalisiert werden, zum Beispiel durch Fusion mit immobilisierten Krebszellen, um Hybridome zu erzeugen, oder durch das Transfizieren der antikörper-produzierenden Zellen mit Onkogenen, wie zum Beispiel Ras, oder mit Viren, wie zum Beispiel dem Epstein-Barr-Virus.

**[0115]** Es wird jedoch jedes Verfahren, das immobilisierte Zellen erzeugt, von der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen. Beispiele von immobilisierten Krebszelllinien, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind K6H6/B5-Zellen, HUNS-1 (US-Patent 4,720,459), KR-12 (US-Patent 4,693,975), WIL2-S, WI-L2-729HF2 (US-Patent 4,594,325), UC 729-6 (US-Patent 4,451,570), SKO-007, Klon J3 von SKO-007, GK5 und LTR-228 (US-Patent 4,624,921).

**[0116]** Obwohl die Immortalisierung der Primärklone auf jede Weise erreicht werden kann, ist das folgende ein bevorzugtes Verfahren. Immortalisierte Krebszellen werden direkt zu dem Gefäß, das die serokonvertierten Zellen enthält, zugegeben. Nach der Inkubation werden die Zellen in serumfreiem DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium), PBS (Phosphat gepufferter Salzlösung) oder jedem anderen serumfreien physiologischen Puffer gewaschen. Die Zellen können dann zum Beispiel unter Verwendung einer 40% bis 100%-igen PEG-Lösung, die mit serumfreien DMEM verdünnt ist, fusioniert werden. Die fusionierten Zellen können dann gewaschen und das Pellet in einem 50% DMEM/RPMI-Medium, das 10% fötales Kälberserum (FBS), 10% Origentm, den oben erwähnten Antigen-Cocktail und ein Selektionsmittel, wie zum Beispiel das Hybridom-selektierende Agens HAT, mit einer Endkonzentration von 10% enthält, rekonstituiert werden. Die Zellen werden in 96 well Gewebekulturplatten in 150 µl Aliquots ausgesät. Um die Proliferation der Klone zu erhöhen, können die Zellen optional durch die Zugabe des anfänglichen Antigens oder der Mischung aus Antigen/komponentenspezifischem immunstimulierendem Agens, wie zum Beispiel denen, die in der anfänglichen Immunisierung verwendet wurden, stimuliert werden.

**[0117]** Die Zellen können in Medium, das HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) enthält, für ungefähr zwei Wochen wachsen gelassen werden. Dann wird das HAT als Selektionsmittel durch ein nichtselektives Medium, wie zum Beispiel HT (Hypoxanthin, Thymidin), ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von ungefähr zwei Wochen werden die Zellen in einem Wachstumsmedium, wie zum Beispiel 50% DMEM/RPMI ergänzt mit dem Antigen-Cocktail, 10% Origentm und 10% FBS wachsen gelassen.

**[0118]** Die Proben können während jeder der Wachstumsphasen auf die Anwesenheit von antigen-spezifischen Antikörpern getestet werden und werden vorzugsweise während allen Wachstumsphasen getestet. Dieses Testen kann mittels jedes üblichen immunologischen Verfahrens, wie zum Beispiel RIA, EIA, ELISA, RID oder Ouchterlony-Test erfolgen. Der Produktionsmaßstab positiver Klone werden dann von 96 well Platten zum Beispiel auf 6 well Platten vergrößert. An diesem Punkt können die Klone für die spätere Verwendung eingefroren werden.

**[0119]** Die Aktivität der Klone kann über Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, getestet werden, wie zum Beispiel durch das Erzeugen einer Aszites in Pristin „primed“ Mäusen. Die Aszitesflüssigkeit wird gereinigt und dann wird der Antikörper auf seine Fähigkeit getestet, die Bioaktivität einer gut charakterisierten Zelllinie, zum Beispiel der TNF sensitiven Zelllinie WEHI 164, zu neutralisieren. Klone die neutralisierende Fähigkeiten zeigen, werden dann in größerem Maßstab kultiviert, um größere Mengen an gereinigtem Antikörper zu erzeugen.

**[0120]** In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Buffy Coat oder die APCs gleichzeitig mit dem an kolloidalem Metall gebundenen Antigen und optional einem Adjuvans inkubiert. Es wurde gefunden, dass diese Art der Inkubation die Art der ausgelösten Immunantwort von einer Th1-ähnlichen Antwort, in der das Antigen, das an kolloidalem Metall gebunden ist, mit APCs, die zelluläre Elemente enthalten oder nicht enthalten können, assoziiert ist, zu einer Th2-Art Antwort, in der das an kolloidalem Metall gebundene Antigen mit freischwimmenden Ansammlungen von B-Zellen assoziiert ist, verändert.

#### Bestandteil-stimulierende Zusammensetzungen

**[0121]** Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen. So eine Zusammensetzung kann ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens oder viele komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen in Verbindung mit kolloidalen Metallen. Bevorzugter umfassen die Zusammensetzungen komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen in Verbindung mit kolloidalen Metallen und anderen Elementen zum spezifischen Targeting der Wirkung der komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen, einschließlich Antigenen, Rezeptormolekülen, Nukleinsäuren, Pharmazeutika, Chemotherapeutika und Trägerstoffen.

**[0122]** Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auf jede Art und Weise an die Immunkomponenten abgegeben werden. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden ein Antigen und ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens an ein kolloidales Metall in so einer Art und Weise gebunden, dass ein einzelnes kolloidales Metallpartikel sowohl an das Antigen als auch an das immunstimulierende Agens gebunden ist. In einer anderen Ausführungsform werden viele Antigene und/oder viele komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen an ein einzelnes kolloidales Metallpartikel gebunden. Die Kombinationen von Antigenen und komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen und anderen Elementen mit einem oder mehreren kolloidalen Metallpartikeln werden durch die vorliegende Erfindung in Er-

wägung gezogen. Die Verabreichung von einem oder mehreren dieser komplexierten Metallpartikel ist in den in vitro Verfahren der vorliegenden Erfindung enthalten.

**[0123]** In einer anderen Ausführungsform umfassen die komponentenspezifischen immunstimulierenden Moleküle der vorliegenden Erfindung eine Abgabe-Struktur oder -Plattform. Das komponentenspezifische immunstimulierende Molekül und/oder das Antigen/der Impfstoff kann/können direkt an die Plattform gebunden sein oder kann/können über Teile einer Bindungsgruppe an die Plattform gebunden sein. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein kolloidales Metall als Plattform, die in der Lage ist, ein Teil einer Bindungsgruppe, an den die komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien und die vermeintlichen Antigene/Impfstoffe gebunden sind, um ein zielgerichtetes immunverstärkendes Agens zu erzeugen, zu binden. In der bevorzugtesten Ausführungsform ist die Bindungsgruppe Streptavidin/Biotin und das komponentenspezifische immunstimulierende Agens ein Cytokin. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können ebenfalls die Bindung des Antigens/Impfstoffes in einem weniger spezifischen Verfahren ohne die Verwendung von Bindungspartnern, wie zum Beispiel durch die Verwendung von Polykationen oder Proteinen, umfassen.

**[0124]** Die vorliegende Erfindung umfasst in vitro Verfahren und Zusammensetzungen für die zielgerichtete Abgabe von komponentenspezifischen immunstimulierenden Molekülen, die kolloidale Metalle als Plattform verwenden. Solche kolloidalen Metalle binden, entweder reversibel oder irreversibel, Moleküle, die mit entweder einem Antigen/Impfstoff oder komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien oder Antigenen/Impfstoffen interagieren. Die interagierenden Moleküle können weder spezifische Bindungsmoleküle, wie zum Beispiel Teile eines Bindungspaares, oder ziemlich unspezifische Interaktionsmoleküle, die weniger spezifisch binden, sein. Die folgende Erfindung zieht die Verwendung von interagierenden Molekülen, wie zum Beispiel polykationischen Elementen, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, einschließlich Polylysin, Protaminsulfat, Histonen oder Asialoglykoproteinen, in Erwägung.

**[0125]** Die Mitglieder des Bindungspaares umfassen jedes Bindungspaar, das dem Durchschnittsfachmann bekannt ist, einschließlich Antikörper-Antigen-Paaren, Enzym-Substrat-Paaren, Rezeptor-Liganden-Paaren und Streptavidin-Biotin. Neue Bindungspartner können spezifisch entworfen werden. Ein essentielles Element der Bindungspartner ist die spezifische Bindung zwischen einem Teil des Bindungspaares mit dem anderen Teil des Bindungspaares, so dass die Bindungspartner in der Lage sind, spezifisch verbunden zu werden. Ein anderes beabsichtigtes Element der Bindungsteile ist, dass jeder Teil in der Lage ist, entweder an ein Effektor-molekül oder ein Targetingmolekül zu binden oder gebunden zu werden.

**[0126]** Die Zusammensetzungen und in vitro Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen Variationen und Kombinationen von Mischungen mit den oben beschriebenen Bindungsfähigkeiten und Verfahren. Zum Beispiel umfasst eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung komponentenspezifische immunstimulierende Moleküle, die direkt an die metallische Plattform gebunden sind und ein Antigen/einen Impfstoff, das/der entweder über spezifische oder weniger spezifische Bindung über Bindungsmoleküle, wie zum Beispiel durch Bindung an die oben beschriebenen Bindungspaire, an die metallische Plattform gebunden ist. Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst, dass das Antigen oder der Impfstoff direkt an die Plattform des kolloidalen Metalls gebunden ist, und das komponentenspezifische immunstimulierende Molekül entweder spezifisch oder weniger spezifisch durch Verbindungsmoleküle gebunden ist. In noch einer anderen Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung die Bindung von sowohl komponentenspezifischen immunstimulierenden Molekülen als dem Antigen/Impfstoff an die metallische Plattform über spezifische oder weniger spezifische Bindung mittels Bindungsmolekülen oder direkte Bindung der komponentenspezifischen immunstimulierenden Moleküle und des Antigens/Impfstoffes an die metallische Plattform. Eine noch weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Bindung der komponentenspezifischen immunstimulierenden Moleküle, die über eine weniger spezifische Bindungsmolekülbindung an die metallische Plattform gebunden sind, und des Antigens/Impfstoffes, das/der über die Bindung von komplementären Bindungsmitgliedern an die metallische Plattform gebunden ist. Andere Kombinationen und Variationen solcher Ausführungsformen werden als Teil der vorliegenden Erfindung betrachtet.

#### Verfahren für die Bindung von Bestandteilen der Zusammensetzung an die Plattform

**[0127]** Jeder Bestandteil der Zusammensetzungen kann einzeln oder in Kombinationen über jedes in vitro Verfahren an das kolloidale Metall gebunden werden. Ein bevorzugtes in vitro Verfahren für die Bindung der Elemente an das kolloidale Metall ist jedoch das folgende. In diesem Beispiel umfasst die Zusammensetzung ein Antigen und ein komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens, obwohl das Verfahren nicht auf diese Ausführungsform begrenzt ist. Das Antigen wird in Wasser rekonstituiert. Ungefähr 50 bis 100 µg werden

dann mit dem kolloidalen Metall inkubiert.

**[0128]** Der pH der kolloidalen Antigenmischung muss ggf. so eingestellt werden, dass er 1-3 pH Einheiten über dem pI des komponentenspezifischen Agens liegt. Danach werden 50-100 µg des komponentenspezifischen Agens zu der kolloidalen Antigenmischung zugegeben und für zusätzliche 24 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit wird das zielgerichtete komponentenspezifische Agens in den Komplex aus Antigen und Gold eingebunden, was ein Abgabesystem ergibt, das auf eine Immunkomponente gerichtet ist. Die Erfinder haben solche Experimente erfolgreich durchgeführt und haben tatsächlich bis zu 3 unterschiedliche Gruppen an das-selbe kolloidale Metallpartikel gebunden.

**[0129]** Nach der Bindung des komponentenspezifischen Agens an das Antigen/Au wird die Mischung durch die Zugabe einer 1% v/v Lösung 1-100% Polyethylenglykol stabilisiert. Andere Stabilisierungsmittel können Brij 58 und Cystein, andere Sulfhydryl enthaltende Verbindungen, Phospholipide, Polyvinylpyrrolidon, Poly-L-Lysin und/oder Poly-L-Prolin einschließen. Die Mischung wird über Nacht stabilisiert und danach zentrifugiert, um das gebundene Antigen und das komponentenspezifische Agens von dem ungebundenen Material zu trennen. Die Mischung wird bei 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in Wasser, das 1% Albumin enthält, resuspendiert. Dieses Vorgehen hat bei der Kopplung des Antigens und des Targetingbestandteils eine relativ hohe Wirksamkeit, da 75-95% beider Gruppen gebunden werden. Ferner wird freies Material, das nicht an das Kolloid gebunden ist, durch die Zentrifugation abgetrennt.

#### Beispielhafte Bestandteile

**[0130]** Der Ausdruck „kolloidales Metall“ wie hierin verwendet, schließt jedes wasserunlösliche Metallpartikel oder jede metallische Verbindung sowie Kolloide nichtmetallischen Ursprungs, wie zum Beispiel kolloidalen Kohlenstoff, der in Flüssigkeit oder Wasser (ein Hydrosol) dispergiert ist, ein. Beispiele von kolloidalen Metallen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen Metalle in den Gruppen IIA, IB, IIB und IIIB des Periodensystems, sowie die Übergangsmetalle, insbesondere die der Gruppe VIII, ein. Bevorzugte Metalle schließen Gold, Silber, Aluminium, Ruthenium, Zink, Eisen, Nickel und Calcium ein. Andere geeignete Metalle können auch folgende in allen verschiedenen Oxidationsstufen einschließen: Lithium, Natrium, Magnesium, Kalium, Scandium, Titan, Vanadium, Chrom, Mangan, Kobalt, Kupfer, Gallium, Strontium, Niob, Molybdän, Palladium, Indium, Zinn, Wolfram, Rhenium, Platin und Gadolinium. Die Metalle werden vorzugsweise in ionischer Form (vorzugsweise abgeleitet von einer entsprechenden Metallverbindung) bereitgestellt, zum Beispiel als  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen. Ein bevorzugtes Metall ist Gold, insbesondere in der Form  $\text{Au}^{3+}$ . Eine besonders bevorzugte Form von kolloidalem Gold ist  $\text{HAuCl}_4$  (E-Y Laboratorien, Inc., San Mateo, Kalifornien). Ein anderes bevorzugtes Metall ist Silber, insbesondere in einem Natriumboratpuffer, mit einer Konzentration zwischen ungefähr 0,1% und 0,001 und am bevorzugtesten als ungefähr 0,01%-ige Lösung. Die Farbe so einer kolloidalen Silberlösung ist gelb und die kolloidalen Partikel haben eine Größe von 1 bis 40 Nanometern. Solche Metallionen können in dem Komplex allein oder mit anderen anorganischen Ionen vorhanden sein.

**[0131]** In der vorliegenden Erfindung kann jedes Antigen verwendet werden. Beispiele von Antigenen, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind schließen ein: Interleukin-1 („IL-1“), Interleukin-2 („IL-2“), Interleukin-3 („IL-3“), Interleukin-4 („IL-4“), Interleukin-5 („IL-5“), Interleukin-6 („IL-6“), Interleukin-7 („IL-7“), Interleukin-8 („IL-8“), Interleukin-9 („IL-9“), Interleukin-10 („IL-10“), Interleukin-11 („IL-11“), Interleukin-12 („IL-12“), Interleukin-13 („IL-13“), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxine, Staphylokokken Enterotoxin B und andere Toxine, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor Nekrosefaktor („TNF-α“), transformierender Wachstumsfaktor-β („TGF-β“), Lymphotoxin, Migrationsinhibitionsfaktor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („CSF“), Monozyten-Makrophagen CSF, Granulozyten CSF, vaskulärer epithelialer Wachstumsfaktor („VEGF“), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor („TGF-α“), Hitzeschockproteine, Kohlenhydratgruppen von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastenwachstumsfaktor, und andere inflammatorische und immunregulatorische Proteine, Nukleotide, DNA, RNA, mRNA, Sense, Antisense, krebszellspezifische Antigene, wie zum Beispiel MART, MAGE, BAGE und Hitzeschockproteine (HSPs), mutiertes p53, Tyrosinase, Autoimmunantigene, Immuntherapeutika, wie zum Beispiel AZT und angiogene und anti-angiogene Medikamente, wie zum Beispiel Angiostatin, Endostatin, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF).

**[0132]** Das komponentenspezifische immunstimulierende Agens kann jedes Molekül oder Verbindung sein, die die Fähigkeit der APCs die B-Zell-Produktion von Antikörpern zu stimulieren erhöht. Beispiele von komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien schließen ein: Antigene, kolloidale Metalle, Adjuvantien, Rezeptormoleküle, Nukleinsäuren, immunogene Proteine und akzessorische Cytokine/Immunostimulatoren,

Pharmazeutika, Chemotherapeutika und Trägerstoffe. Diese komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien können einzeln oder in Kombinationen verwendet werden. Sie können im freien Zustand oder in Komplexen, wie zum Beispiel in Kombination mit einem kolloidalen Metall verwendet werden.

**[0133]** Adjuvantien, die in der Erfindung nützlich sind, schließen hitzeabgetötetes *M. butyricum* und *M. tuberculosis* ein. Beispiele von Nukleotiden sind DNA, RNA, mRNA, Sense und Antisense. Beispiele von immuno-genen Proteinen schließen KLH (Keyhole Limpet Cyanin), Thyroglobulin und Fusionsproteine, die in ihrem Gen Adjuvans- und Antigengruppen kodiert, ein.

**[0134]** Akzessorische Cytokin/Immunstimulatoren schließen ein: Interleukin-1 („IL-1“), Interleukin-2 („IL-2“), Interleukin-3 („IL-3“), Interleukin-4 („IL-4“), Interleukin-5 („IL-5“), Interleukin-6 („IL-6“), Interleukin-7 („IL-7“), Interleukin-8 („IL-8“), Interleukin-9 („IL-9“), Interleukin-10 („IL-10“), Interleukin-11 („IL-11“), Interleukin-12 („IL-12“), Interleukin-13 („IL-13“), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxine, Staphylokokken Enterotoxin B und andere Toxine, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor Nekrosefaktor („TNF- $\alpha$ “), transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  („TGF- $\beta$ “), Lymphotoxin, Migrationsinhibitionsfaktor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („CSF“), Monozyten-Makrophagen CSF, Granulozyten CSF, vaskulärer epithelialer Wachstumsfaktor („VEGF“), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor („TGF- $\alpha$ “), Hitzeschockproteine, Kohlenhydratgruppen von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastenwachstumsfaktor, und andere inflammatorische und immunregulatorische Proteine, Nukleotide, DNA, RNA, mRNA, Sense, Antisense, krebszellspezifische Antigene, wie zum Beispiel MART, MAGE, BAGE und HSPs, das flt3 Ligand/Rezeptorsystem, die B7 Familie von Molekülen und Rezeptoren, den CD 40 Ligand/Rezeptor und Immuntherapeutika, wie zum Beispiel AZT, und angiogene und anti-angiogene Medikamente, wie zum Beispiel Angiostatin, Endostatin und basischen Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF).

**[0135]** In vitro Verfahren und Zusammensetzungen, die kein kolloidales Metall verwenden, können verwendet werden, um die komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien allein oder in Kombination mit Antigenen oder anderen Elementen abzugeben. Zum Beispiel können die Zusammensetzungen in einem Liposom oder einer Mikrosphäre eingekapselt sein oder können über andere Trägerstoffe zur Zellabgabe, wie zum Beispiel virale Vektoren, abgegeben werden. Zusätzliche Kombinationen sind kolloidale Goldpartikel, die mit viralen Partikeln, die der aktive Impfstoffkandidat sind, bedeckt sind oder die so gepackt sind, dass sie die DNA für einen vermeintlichen Impfstoff enthalten. Das Goldpartikel würde ebenfalls ein Cytokin enthalten, das dann verwendet werden könnte, um das Virus gegen spezifische Immunzellen zu richten. Ferner könnte man einen Fusionsprotein-Impfstoff erzeugen, der auf ein oder mehrere potentielle Impfstoffkandidaten abzielt und einen Impfstoff für zwei oder mehr Anwendungsgebiete erzeugt. Die Partikel können ebenfalls Immunogene einschließen, die durch die Zugabe von Polyethylenglykol, das das Material langsam freigibt, chemisch modifiziert sein können.

**[0136]** Die komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien können der Form ihrer Nukleinsäure unter Verwendung bekannter Verfahren der Gentherapie abgegeben werden und erzeugen ihre Wirkung nach der Translation. Zusätzliche Elemente für die Aktivierung von Immunbestandteilen, wie zum Beispiel Antigene, können gleichzeitig oder sequentiell abgegeben werden, so dass die zellulär translatierten komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzien und die extern zugegebenen Elemente im Einklang wirken, um sich spezifisch auf die Immunantwort zu richten.

## EXPERIMENTELLE DATEN

### BEISPIEL 1

**[0137]** Das folgende ist das allgemeine experimentelle Protokoll, das zur Bindung eines Moleküls, gleich ob Antigen oder komponentenspezifisches immunstimulierendes Agens, an kolloidales Gold befolgt wurde. Das Molekül wurde in Wasser rekonstituiert. 200 µg des Moleküls wurden mit 25 ml kolloidalem Gold für 24 Stunden inkubiert. Die Lösung des Komplexes aus dem Molekül/dem kolloidalen Gold wurde dann bei 14.000 rpm für 20 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde von dem Pellet entfernt.

### BEISPIEL 2

**[0138]** 50 µg epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) wurden bei einem pH von 11,0 an 25 ml 40nm kolloidale Goldpartikel gebunden. Die Lösung wurde auf einem Schüttler für 24 Stunden geschüttelt. 50 µg (zugegeben als 50 µl) Targeting Cytokin (d.h. IL-1 $\beta$ , um auf Makrophagen abzuzielen, IL-2, um auf T-Zellen abzuzielen,

IL-6, um auf B-Zellen abzuzielen und entweder TNF Alpha oder F1t-3 Ligand, um auf dendritische Zellen abzuzielen) wurde zu der EGF/Au Lösung zugegeben und für zusätzliche 24 Stunden geschüttelt. Um das an kolloidales Gold gebundene und ungebundenes Material zu trennen, wurde die Lösung dann bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml Wasser, das 1% humanes Serum Albumin enthielt, rekonstituiert.

#### BEISPIEL 3

**[0139]** EGF wurde unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 2 an kolloidales Gold (CG) gebunden. Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wurde dann unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 1 an den EGF/CG Komplex gebunden, um eine EGF/CG/TNF- $\alpha$  Chimäre zu erzeugen.

#### BEISPIEL 4

**[0140]** EGF wurde unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 2 an kolloidales Gold (CG) gebunden. Interleukin-6 (IL-6) wurde dann unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 1 an den EGF/CG-Komplex gebunden, um eine EGF/CG/IL-6 Chimäre zu erzeugen.

#### BEISPIEL 5

**[0141]** EGF wurde unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 2 an kolloidales Gold (CG) gebunden. Interleukin-2 (IL-2) wurde dann unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 1 an den EGF/CG-Komplex gebunden, um eine EGF/CG/IL-2 Chimäre zu erzeugen.

#### BEISPIEL 6

**[0142]** Der Buffy Coat wurde von einer Probe Gesamtblut wie im Stand der Technik gut bekannt getrennt. 100-500 ml Gesamtblut wurden auf Heparin gesammelt. Das Blut wurde vorsichtig auf eine 50% (v/v) Ficoll-Hyque-Lösung geschichtet und bei 2700 rpm für 7 Minuten zentrifugiert. Der Buffy Coat, die Ansammlung von weißen Blutzellen an der Serum/Ficoll Grenze, wurde mit einer Pasteur Pipette gesammelt und in 10 ml PBS, das 0,5 mg/ml Heparin enthielt, gegeben. Er wurde bei 1500 rpm zentrifugiert, das Pellet gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden 2x in der PBS-Lösung gewaschen und noch einmal zentrifugiert.

**[0143]** Die Zellen wurden in RPMI, das entweder 10% Kälberserum oder normales Menschenserum enthielt, resuspendiert und in 6 well Platten mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/well kultiviert. Die Zellen wurden dann mit 50-100  $\mu$ l einer oder aller Antigen/Cytokinmischungen stimuliert.

**[0144]** Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, internalisierten nur Makrophagen die EGF/CG/IL-1 $\beta$  Chimären, während nur dendritische Zellen die EGF/CG/TNF- $\alpha$  Chimären internalisierten ([Fig. 2](#)). In ähnlicher Weise internalisierten nur B-Zellen die EGF/CG/IL-6 Chimären ([Fig. 3](#)) und nur T-Zellen internalisierten die EGF/CG/IL-2 Chimären ([Fig. 4](#)).

**[0145]** Wie durch dieses Experiment gezeigt wird, sind bestimmte komponentenspezifische immunstimulierende Agenzen für bestimmte Immunkomponenten spezifisch. Daher ist es möglich, mit komponentenspezifischen immunstimulierenden Agenzen spezifische Immunkomponenten anzusteuern und dadurch ihre Immunantwort zu verstärken, was zu einer erhöhten Aktivität der gesamten Immunantwort führt.

#### BEISPIEL 7

**[0146]** Für dieses Beispiel wurde Staphylokokken Enterotoxin B als das vermeintliche Antigen/Impfstoffmolekül verwendet, da es Beweise gibt, dass die Bindung des Toxins an kolloidales Gold seine Toxizität verringert. Zu Beginn wurden 500  $\mu$ g des Toxins an 250 ml 40 nm kolloidale Goldpartikel gebunden. Die kolloidale Lösung wurde dann aliquotiert. 50  $\mu$ g eines Targeting Cytokins (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) wurde zu einem der Aliquots zugegeben und erneut für 24 Stunden inkubiert. Das Toxin-Au-Cytokin Kolloid wurde bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml Wasser rekonstituiert. Die Cytokin-Konzentration des Pellets wurde entweder mittels Sandwich oder kompetitiven ELISA bestimmt. Dies wurde durchgeführt, um die Menge an unverdünntem Cytokin (ungebunden) zu bestimmen, das in Kontrolltiere, die Salzlösung oder Toxin allein erhielten, injiziert werden sollte.

**[0147]** Die Strategie zur Immunisierung schloss die gleichzeitige oder sequentielle Verabreichung unverdünnt-

ter Toxin/Cytokin-Mischung (als Kontrollen der Zusammensetzungen) oder der Toxin-Au-Cytokin Chimäre ein. 5 Mäuse/Gruppe bekamen an den Tagen 1, 5 & 9 entweder 2,5 µg unverdünntes Toxin oder dieselbe Dosis Toxin/Cytokin-Mischung gebunden an kolloidales Gold injiziert. Während des 14-tägigen Immunisierungszeitraumes erhielten zwei zusätzliche Gruppen von Mäusen das unverdünnte Toxin/Cytokin oder Toxin-Au-Cytokin gemäß dem Schema, das in Tabelle 1 bereitgestellt wird.

Tabelle 1

Tag	Gruppentyp	Injizierte Behandlung
1	Kontrolle	Unverdünntes Toxin + unverdünntes IL-1β + unverdünntes TNFα
	Gold	Toxin-Au-IL-1β + Toxin-Au-TNFα
5	Kontrolle	Unverdünntes Toxin + unverdünntes IL-6
	Gold	Toxin-Au-IL-6
9	Kontrolle	Unverdünntes Toxin + unverdünntes IL-2
	Gold	Toxin-AU-IL-2

**[0148]** Alle Gruppen wurden am Tag 30 erneut mit 1 µg des unverdünnten Toxins allein gereizt. Die schützende Immunisierung wurde durch die reduzierte oder fehlende Fähigkeit des unverdünnten Toxins Morbidität zu induzieren gezeigt. Die Schlüsselbeobachtung ist, dass das Toxin, das an kolloidales Gold gebunden ist, die Toxizität des Toxins stark verringert. Zweitens waren die Titer der Serumantikörper gegen das Toxin 10× höher als die der Tiere, die die unverdünnte Behandlung allein erhielten. Die Titer der Serumantikörper von Tieren, die die sequentielle Behandlung erhielten, waren jedoch 100-fach größer als die der Tiere, die die unverdünnte Behandlung erhielten. Schließlich starben bei der erneuten Reizung mit dem unverdünnten Toxin 100% der Tiere, die mit dem Toxin behandelt waren, während nur 20% Sterblichkeit in der gleichzeitigen Gruppe beobachtet wurde.

**[0149]** Daher können die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die Wirksamkeit eines Impfstoffes zu erhöhen.

#### BEISPIEL 8

##### Bindung von einem Cytokin an kolloidales Gold

**[0150]** Humanes TNF-α wurde in Wasser bei einem pH von 11 mit einer finalen Konzentration von 1 µg/ml rekonstituiert. 300 µg rekombinantes humanes TNF-α wurde über Nacht mit 25 ml 30-40 nm kolloidalen Goldpartikeln während dem Mischen auf einem Wipptisch inkubiert.

**[0151]** Die 25 ml an kolloidales Gold gebundene TNF-α Lösung wurde in zwei Hälften geteilt. Ein Aliquot wurde mit 125 µl 100% PEG Lösung geblockt. Das andere Aliquot wurde nicht geblockt. Beide Aliquots wurden wieder auf dem Wipptisch platziert und zusätzliche 1 bis 5 Tage inkubiert.

**[0152]** Die beiden Aliquots wurden dann für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde von dem Pellet entfernt. Die Pellets wurden durch die Rekonstitution mit 10 ml einer 1% Lösung von humanem Serumalbumin (HSA) in Wasser bei einem pH von 11 blockiert.

**[0153]** Die Aliquots wurden auf einem Wipptisch für 6 Stunden gemischt. Die Aliquots wurden dann bei 14.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und in 3,5 ml 1%-igem HSA in Wasser bei einem pH von 11 rekonstituiert.

## BEISPIEL 9

Herstellung von menschlichen Anti-human TNF- $\alpha$  Antikörpern

**[0154]** Der Buffy Coat wurde durch Ficollieren von peripherem Blut getrennt und mit PBS, das 0,5 mg/ml Heparin und EDTA enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden in eine 10-T-75 Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden für zwei Wochen in RPMI mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 10% Origen™ und 100 ng/ml Cytokin-Cocktail, der aus den folgenden Cytokinen bestand: IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, Stammzellfaktor („SCF“), GMCSF und GSF, sowohl allein als auch an kolloidales Gold gebunden inkubiert.

## BEISPIEL 10

ELISA Assay für menschliche Anti-human TNF- $\alpha$  Antikörper

**[0155]** 1 ml Aliquots wurden aus drei Flaschen mit Zellen, die wie in Beispiel 9 gezeigt behandelt wurden, entnommen und bei 1500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei –20°C gelagert.

**[0156]** Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden in einem Carbonat-/Bicarbonatpuffer mit rekombinantem humanen TNF beschichtet. Die Platte wurde vier Mal mit TBS, das 2,0 ml/l Tween 20 enthielt, gewaschen. 100  $\mu$ l des Überstandes wurden zu jedem well zugegeben. Kontrollvertiefungen erhielten ungebrauchtes Wachstumsmedium. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

**[0157]** Die Platten wurden dann gewaschen und 100  $\mu$ l eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten 1:1000 (in TBS + 0,1% BSA) verdünnten Ziege-Anti-Human IgGs mit den wells für 1 Stunde inkubiert. Die Platten wurden dann erneut gewaschen und 100  $\mu$ l des alkalischen Phosphatase-Substrats (pNPP) wurde mit den Vertiefungen inkubiert, bis sich die entsprechende Farbe entwickelte.

**[0158]** Die Ergebnisse dieses Assays sind in [Fig. 5](#) gezeigt. Diese Figur zeigt, dass durch das Verfahren der Erfindung, wie in den Beispielen 8 und 9 beschrieben, menschliche Anti-human TNF- $\alpha$  Antikörper erzeugt wurden.

## BEISPIEL 11

## Zellfusion und Hybridomselektion

**[0159]** Wenn die in vitro Serokonversion der Zellen in Beispiel 9 bestätigt war, wurden  $10^6$  bis  $10^7$  K6H6/B5 Myelomzellen direkt in das Gefäß, in denen die serokonvertierten Zellen nachgewiesen wurden, gegeben. Die Zellen wurden sanft gemischt, gesammelt und bei 1200 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in serumfreien DMEM gewaschen. Die Zellen wurden ein letztes Mal zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Das Pellet wurde sanft losgeschüttelt und die Zellen durch die Zugabe einer 53% PEG 1450 Lösung gemäß der Strategie, die in der Tabelle unten beschrieben wird, fusioniert.

**[0160]** Die PEG-Lösung wurde während dem Schütteln der Zellen bei 37°C unter Verwendung des folgenden Verfahrens und der folgenden Inkubationszeiten zu den Zellen zugegeben:

Zeit	Volumen von zugegebenem PEG (tropfenweise)
0 min	0,5 ml über 30 Sekunden und 30 Sekunden warten
1 min	0,5 ml über 30 Sekunden und 30 Sekunden warten
2 min	1,0 ml über 60 Sekunden und 60 Sekunden warten

**[0161]** Als nächstes wurde unter Verwendung des folgenden Schemas serumfreies DMEM zu den Zellen zugegeben.

Zeit	Volumen von zugegebenem DMEM (tropfenweise)
0 min	1,0 ml über 30 Sekunden und 30 Sekunden warten
4 min	1,0 ml über 30 Sekunden und 30 Sekunden warten

5 min	8,0 ml über 60 Sekunden und 60 Sekunden warten
7 min	15,0 ml über 60 Sekunden und Inkubation für 1 Minute

**[0162]** Die Zellen wurden danach bei 1200 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde in 50% DMEM/RPMI Medium, das 10% FBS, 10% Origen™, den oben erwähnten Cytokin-Cocktail und das Hybridom Selektionsmittel HAT mit der Endkonzentration 10% enthielt, rekonstituiert. Die Zellen wurden anfänglich in fünf 96 well Gewebekulturplatten in 150 µl Aliquots ausgesät. Um die Proliferation der Klone zu erhöhen, wurden die Zellen ebenfalls mit 25 µl kolloidalem Gold gebundenen TNF-α, das bei der anfänglichen Immunisierung verwendet wurde, stimuliert.

**[0163]** Die Zellen wurden in Medium, das HAT enthielt, für zwei Wochen wachsen gelassen, wonach HAT als Selektionsmittel durch HT ersetzt wurde. In den folgenden zwei Wachstumswochen wurden die Zellen in 50% DMEM/RPMI-Medium, ergänzt mit dem Cytokin-Cocktail, 10% Origen™ und 10% FBS wachsen gelassen.

#### BEISPIEL 12

##### Testen der Überstände auf positive Antikörperfunktion

**[0164]** Die Anwesenheit von TNF-α spezifischen Antikörpern in den Proben in Beispiel 13 wurde während allen Wachstumsphasen getestet. Die Überstände wurden anfänglich durch direkten EIA getestet und dann durch einen *in vitro* Assay, der die Inhibition der Proliferation von WEHI-Zellen durch TNF-α in einer dosisabhängigen Weise misst. Der Herstellungmaßstab positiver Klone wurden aus den ursprünglichen Platten mit 96 Vertiefungen auf Platten mit 6 Vertiefungen vergrößert.

**[0165]** Danach wurde der Herstellungsmaßstab für alle positiv getesteten Klone sowohl für die Kryoaufbewahrung als auch die Erzeugung von 5 ml Aszitesflüssigkeit in Pristin „primed“ Mäusen vergrößert. Die Aszitesflüssigkeit wurde gereinigt und die Antikörper auf ihre Fähigkeit getestet, die Inhibition der Proliferation von WEHI-Zellen durch TNF-α zu verhindern. Die Fähigkeit des gereinigten Antikörpers, die Bioaktivität zu blockieren, zeigte seine neutralisierende Aktivität.

**[0166]** Der Herstellungsmaßstab von Klonen, die neutralisierende Aktivität zeigten, wurde vergrößert, um 10-100 mg gereinigten Antikörper zu erzeugen. Diese Antikörper wurden anfänglich auf die *in vivo* Neutralisation von exogen verabreichtem TNF-α durchmustert.

#### BEISPIEL 13

##### Wirkung von an kolloidalem Gold gebundenem TNF-α auf Zelloberflächenmarker wie mittels Durchflußcytometrie bestimmt

**[0167]** Buffy coats wurden vom amerikanischen Roten Kreuz erhalten und wurden unter Verwendung von Ficol getrennt. Die Lymphozyten wurden 3 Mal mit PBS, das 0,2 mg/ml Heparin enthielt, gewaschen und wieder mit Ficol behandelt. Nach dem Waschen wurden in 9-12 well tissue culture cluster pro Vertiefung 1-5 Millionen Zellen in DMEM ergänzt mit 10% FBS ausgesät.

**[0168]** Jede Vertiefung enthielt entweder 2 ml (1) Medium allein, (2) 0,5 µg/ml des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) (für die Induktion einer T-Zell Antwort), (3) 1,0 µg/ml des Mitogens Lipopolysaccharid (LPS) (für die Induktion einer entzündlichen Antwort) oder (4) eine Kombination der Mitogene LPS und PHA jedes mit einer Endkonzentration von 0,5 bzw. 1,0 µg/ml. Es ist anzumerken, dass es möglich ist, andere Mitogene, wie zum Beispiel Kermesbeeren Mitogene sowie andere Agenzien, einschließlich Superantigene, wie zum Beispiel Staphylokokken Enterotoxin A und B in diesem Assay zu verwenden. Die Zellen wurden mit jedem Mitogen (PHA oder LPS) allein oder den Mitogenen in Anwesenheit von entweder Gold/TNF-α, das mit Polyethylenglykol

(PEG) in HSA (humanem Serumalbumin) stabilisiert worden war, oder Gold/TNF- $\alpha$ , das mit HSA alleine behandelt worden war, stimuliert. Die Kulturplatten wurden für die cytometrische Durchflussanalyse der Zelloberfläche, der Zellaktivierungsmarker und der Cytokinexpression geerntet.

**[0169]** Die Zellen wurden auf Änderungen in ihren CD4, CD8 und CD19-Spiegeln sowie des Aktivierungsmarkers CD69 unter Verwendung eines Beckton Dickinson Facscalibur und dem Becton Dickinson Tritest MAB-Set analysiert. Das wurde durch Sammeln der Zellen, Zentrifugieren und Entfernen von 1,8 ml des Überstandes durchgeführt. Die Zellen wurden tituriert, d.h. das zelluläre Pellet wurde resuspendiert, und 25  $\mu$ l Proben wurden mit dem entsprechenden MAB gemäß den Herstellerinstruktionen inkubiert. Obwohl die Durchfluscytometrie zwischen der Kontrolle und den Gold behandelten Zellen keine Unterschiede in den CD4, CD8 und CD19 Leveln 24-48 Stunden nach der Behandlung nachwies, zeigte die visuelle Inspektion der Platten, dass sich cluster-ähnliche Formationen sowohl in naiven als auch Gold behandelten Zellen gebildet hatten. In den Zellen, die mit dem mit kolloidalem Gold konjugiertem TNF- $\alpha$  behandelt worden waren, erschien die Anzahl von Clustern jedoch größer und in größerer Häufigkeit und Zeldichte. Interessanterweise schienen die umgebenden Zellen zu den goldbehandelten Clustern zu wandern. Das kann auf TNF- $\alpha$ , das von dem Gold abgespalten hindeuten, da es eine klare Abstufung bei der Zellmigration gab. Zusätzlich war die zelluläre Migration bei Zellen, die mit PEG stabilisiertem goldgebundenem TNF- $\alpha$  behandelt waren nicht so auffällig, was anzeigt, dass TNF nicht von dem Gold abgespalten wird oder zu einem viel geringeren Grad abgespalten wird.

**[0170]** Achtundvierzig Stunden nach der Behandlung mit dem Mitogen wurde, induziert durch die Stimulation der weißen Blutzellen mit PHA, die typische Veränderung des Mediums beobachtet. Die Zellen in den Vertiefungen, die mit Gold gebundenem TNF- $\alpha$ , das mit PEG stabilisiert oder das nicht stabilisiert ist, behandelt wurden, zeigten deutlich weniger Veränderung des Mediums, was darauf hindeutet, dass das Gold/TNF- $\alpha$  die PHA-induzierte Mitogenese blockierte. Das kann anzeigen, dass das kolloidale Gold eine Th1-ähnliche T-Zell-Antwort blockiert.

**[0171]** Obwohl die Durchfluscytometrieanalyse keine signifikanten Änderungen der CD4, CD8 oder CD19 Zellpopulationen innerhalb von 24-48 Stunden nach der Stimulation zeigte, wurde das Eindringen von an kolloidalem Gold gebundenem TNF- $\alpha$  in mehrere Zellarten beobachtet. Während Kontrollzellen einen normalen transparenten Phänotyp besaßen, besaßen die stabilisierten und nicht stabilisierten goldbehandelten Zellen Konzentrationen der Goldfärbung an mehreren Stellen auf den Zellen sowie Zellanhäufungen. Die Verteilung des Goldes variierte von zentraler intrazellulärer Lokalisierung bis zur Zelloberfläche. Das Material erschien ebenfalls in vielen Zellarten, einschließlich abgerundeten sowie dendritischen Zellen. In abgerundeten Zellen war die Lokalisierung des Goldmaterials entweder im Nukleus oder an einer Stelle der Zelloberfläche. Obwohl nicht über Zelloberflächenmarker identifiziert, wird angenommen, dass die abgerundeten Zellen differenzierende Monozyten/Makrophagen sind, weil sie die Fähigkeit besitzen, Riesenzellen zu bilden. ([Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#)). Die kolloidale Goldfärbung verschwand mit der Zeit und scheint daher nicht dauerhaft zu sein. Das zeigt an, dass die kolloidale Gold-/TNF- $\alpha$  Mischung metabolisiert wurde, wenn sie einmal in die Zelle gelangt war. Die Zellen behielten jedoch ihre Fähigkeit, kolloidales Gold aufzunehmen, da die Färbung bei der erneuten Stimulation mit an kolloidalem Gold gebundenem TNF- $\alpha$  wieder auftrat.

**[0172]** [Fig. 6a](#) ist eine 200x Hellfeldaufnahme, die die Riesenzellenbildung, die durch diese Langzeitinkubation von isolierten humanen Lymphozyten mit kolloidalem Gold/TNF- $\alpha$  induziert wird, zeigt. [Fig. 6b](#) ist eine 200x Phasenkontrastabbildung Hellfeldmonographie derselben Zellen.

#### BEISPIEL 14

**[0173]** Lymphozyten wurden aus den Buffy Coats von humanen peripherem Blut, das vom amerikanischen Roten Kreuz erhalten worden war, isoliert. Die Lymphozyten wurden entweder mit (1) kolloidalem Gold alleine, (2) kolloidalem Gold gebunden an humanes Serumalbumin (HSA), oder (3) kolloidalem Gold gebunden an TNF- $\alpha$  behandelt. Jede Gruppe wurde in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 1% PEG blockiert und das andere blieb unbehandelt.

**[0174]** Der primäre Zelltyp, der das Gold oder Gold/HSA aufnahm, war der Makrophage. Das wurde durch Riesenzellbildung bestätigt. Wie jedoch in [Fig. 7](#) gezeigt, hatte der hauptsächliche Zelltyp, der das Gold in der TNF- $\alpha$ /Goldgruppe aufnahm, die gestreckte Form dendritischer Zellen.

**[0175]** Dieses Resultat zeigt die rezeptorvermittelte Bindung des an kolloidalem Gold gebundenen TNF- $\alpha$  an. Zusätzlich lässt das Erfordernis von TNF- $\alpha$  für die Differenzierung von dendritischen Zellen vermuten, dass das an kolloidalem Gold gebundene TNF- $\alpha$  seine biologische Aktivität beibehält.

## BEISPIEL 15

**[0176]** Dieses Experiment wurde entworfen, um die Wirkung von Adjuvansbestandteilen auf die Aufnahme von kolloidalem Gold durch isolierte Lymphozyten zu bestimmen. Das Experiment wurde in derselben Weise wie die Beispiele 6 und 7 durchgeführt, außer dass eine zusätzliche Gruppe von Zellen eingeschlossen war. Diese Zellen erhielten 100 µl einer 1.0 mg/ml Suspension von hitzeabgetötetem Mycobacterium butyricum. Dieses Bakterium wird routinemäßig in der Adjuvansherstellung für die Antikörpererzeugung verwendet.

**[0177]** Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, war die Goldfärbung nicht länger mit entweder den Makrophagen oder dendritischen Zellen assoziiert, sondern war mit frei schwimmenden Ansammlungen von Zellen assoziiert, die aktivierte B-Zellen sein können. Zurzeit laufen Phänotyp-Studien, um diese Hypothese zu bestätigen.

## BEISPIEL 16

**[0178]** Streptavidin, an kolloidalem Gold gebunden, zeigte sättigungsfähige Bindungskinetiken. Für dieses Experiment wurden 500 µg Streptavidin an 50 ml 32 nm kolloidalem Gold für 1 Stunde gebunden. Danach wurden 5 ml einer stabilisierenden Lösung (5% PEG 1450, 0,1% BSA) zu dem Röhrchen zugegeben und für zusätzliche 30 Minuten gemischt. Das Sol wurde zentrifugiert, um ungebundenes Streptavidin zu entfernen und 2-mal mit 5 ml der Stabilisierungslösung gewaschen. Nach einem abschließenden Zentrifugierschritt wurde das Pellet mit der Stabilisierungslösung auf ein Volumen von 5 ml rekonstituiert. 1 ml Aliquots wurden auf Mikrozentrifugenröhrchen verteilt. Zu diesen Röhrchen wurden ansteigende Mengen von biotinyliertem humanem TNF-α zugegeben. Das biotinylierte Cytokin wurde mit dem Streptavidin-Gold für 1 Stunde inkubiert. Das Material wurde bei 10000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde gesammelt und für die TNF-Bestimmung aufbewahrt. Die Pellets von jedem Röhrchen wurden 1-mal mit Stabilisierungslösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Stabilisierungslösung rekonstituiert und sowohl das Pellet als auch der anfängliche Überstand wurden unter Verwendung unsers CYTELISA™ TNF Kits auf die TNF-Konzentration hin untersucht. Man kann sehen, dass mehr als 90% der biotinylierten TNF-Immunreaktivität in dem Pellet gefunden wurden ([Fig. 10](#)), was anzeigt, dass das biotinylierte TNF durch das an das Gold gebundene Streptavidin abgefangen wurde.

## BEISPIEL 17

**[0179]** Dieses Experiment sollte die Eignung des Streptavidin Goldkomplexes als zielgerichtetes Medikamentenabgabesystem bewerten. Damit dies auftritt, muss das an kolloidalem Gold konjugierte Streptavidin sowohl einen biotinylierten Targeting-Liganden als auch ein biotinyliertes Therapeutikum binden. Um das zu untersuchen, führten wir das folgende Experiment durch.

**[0180]** 100 ml einer 32 nm kolloidalen Goldlösung wurden mit einer sättigenden Konzentration von Streptavidin gebunden. Nach 1 Stunde wurde das Sol zentrifugiert und wie oben beschrieben gewaschen. Das an kolloidalem Gold gebundene Streptavidin wurde dann mit Konzentrationen von biotinyliertem Cytokin unter der Sättigungskonzentration gebunden. Das Material wurde gevortext und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Sol zentrifugiert und das Pellet mit einer Lösung von biotinyliertem Polylysin inkubiert. Nach 1 Stunde Inkubation wurde das Sol erneut zentrifugiert und gewaschen. Nach einem letzten Zentifugierschritt und der Resuspension (das Endvolumen des Sols betrug ungefähr 1 ml) wurden 50 µg β-Galaktosidase Reporteren mit der konzentrierten Streptavidin/biotinyliertem Cytokin/Polylysin Chimäre für 1 Stunde inkubiert. Das Material wurde zentrifugiert, um ungebundene Plasmid-DNA zu entfernen. Das Endkonstrukt (Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin-DNA) wurde mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Anwesenheit von DNA durch Bestimmung der OD bei 260 nm untersucht. Wir beobachteten eine Abnahme in der OD des Überstandes bei 260 nm von 0,95 auf 0,25 nach der Inkubation der Plasmid-DNA mit dem Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin Konstrukt. Die DNA wurde durch das Biotin EGF-SAP-Au-Biotin Polylysin-DNA gebunden und aus dem Sol in das Pellet zentrifugiert. Diese Daten zeigen, dass durch die Verwendung der Avidinbindung an kolloidalem Gold ein neues System zur Abgabe von Medikamenten entwickelt wurde. Die Biotinylierung der Targeting- und Abgabe-Beladung wurde dann als Verfahren für die Bindung dieser Moleküle an das kolloidale goldbasierte Medikament-/Gen-Abgabesystem verwendet.

## Patentansprüche

1. Ein Verfahren für die in vitro Stimulation von Immunzellen, um antigen- und art-spezifische monoklonale Antikörper herzustellen, das umfasst:
  - (a) Stimulieren von Immunzellen eines Menschen oder eines Tieres in vitro, um die Zellen anzuregen, eine Er-

stantwort gegen ein Antigen auszulösen, wobei das Antigen ein Antigen ist, das an ein kolloidales Metall gebunden ist;

(b) Immortalisieren der aktivierten Immunzellen; und

(c) Auswählen einer Zelle, die monoklonale Antikörper herstellt.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die stimulierten Immunzellen, die in Schritt (a) hergestellt wurden, gelagert und zu späterer Zeit verwendet werden.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Art eine Säugetierart ist.

4. Das Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die Art ein Mensch ist.

5. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Antigen aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, Lipid A, Phospholipase A2 Endotoxinen, Staphylokokken Enterotoxin B und anderen Toxinen, Typ I Interferon, Typ II Interferon, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Lymphotoxin, Migrationsinhibitionsfaktor, CSF, Monocyten-Makrophagen CSF, Granulozyten CSF, VEGF, Angiotensin, Hitzeschockproteinen, Kohlenhydratgruppen von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastenwachstumsfaktor, entzündungs- und immunregulierenden Proteinen, Nukleotiden, DNA, RNA, mRNA, Sense, Antisense, Polynukleotiden, krebszellspezifischen Antigenen, mutiertem p53, Tyrosinase, Autoimmunantigenen, Immuntherapie-medikamenten und angiogenen und anti-angiogenen Medikamenten besteht.

6. Ein Verfahren für die in vitro Herstellung von antigen- und art-spezifischen monoklonalen Antikörpern, das umfasst:

(a) Inkubieren eines Antigens und einer Antigen-präsentierenden Zelle in vitro, um die Antigen-präsentierende Zelle zu aktivieren, wobei das Antigen ein Antigen ist, das an ein kolloidales Metall gebunden ist;

(b) Zugeben von B-Zellen zu den aktivierte Antigen-präsentierenden Zellen, um primäre Klone zu erzeugen;

(c) Immortalisieren der primären Klone; und

(d) Auswählen einer Zelle, die monoklonale Antikörper herstellt.

7. Ein Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die stimulierten Immunzellen, die in Schritt (a) produziert wurden, gelagert und zu späterer Zeit verwendet werden.

8. Das Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die Schritte (a) und (b) in einem Schritt durchgeführt werden.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die Aktivierung mindestens ein immunstimulierendes Molekül umfasst.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei das Antigen aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, Lipid A, Phospholipase A2 Endotoxinen, Staphylokokken Enterotoxin B und anderen Toxinen, Typ I Interferon, Typ II Interferon, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Lymphotoxin, Migrationsinhibitionsfaktor, CSF, Monocyten-Makrophagen CSF, Granulozyten CSF, VEGF, Angiotensin, Hitzeschockproteinen, Kohlenhydratgruppen von Blutgruppen, Rh-Faktoren, Fibroblastenwachstumsfaktor, entzündungs- und immunregulierenden Proteinen, Nukleotiden, DNA, RNA, mRNA, Sense, Antisense, Polynukleotiden, krebszellspezifischen Antigenen, mutiertem p53, Tyrosinase, Autoimmunantigenen, Immuntherapie-medikamenten und angiogenen und anti-angiogenen Medikamenten besteht.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

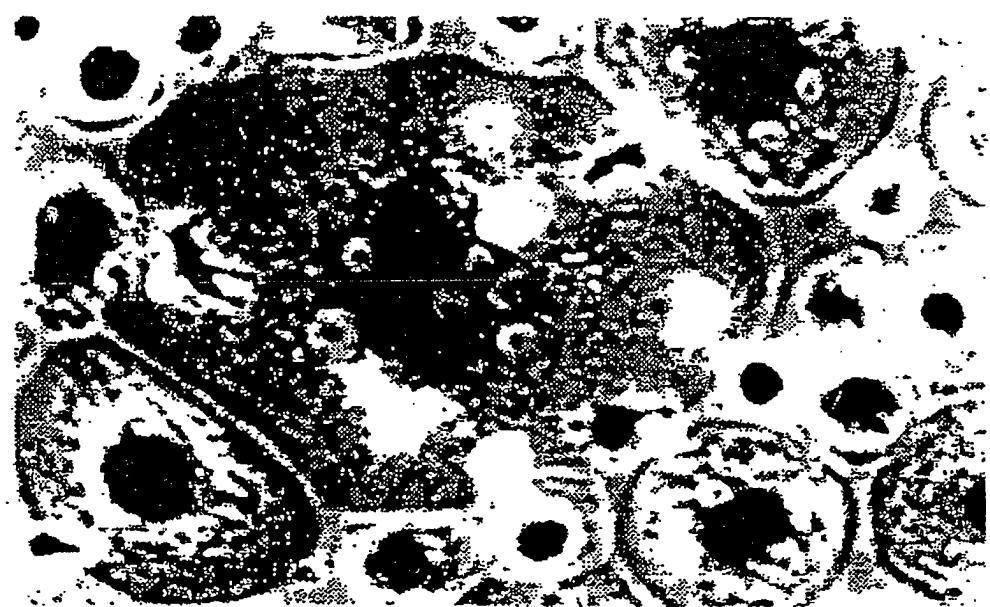
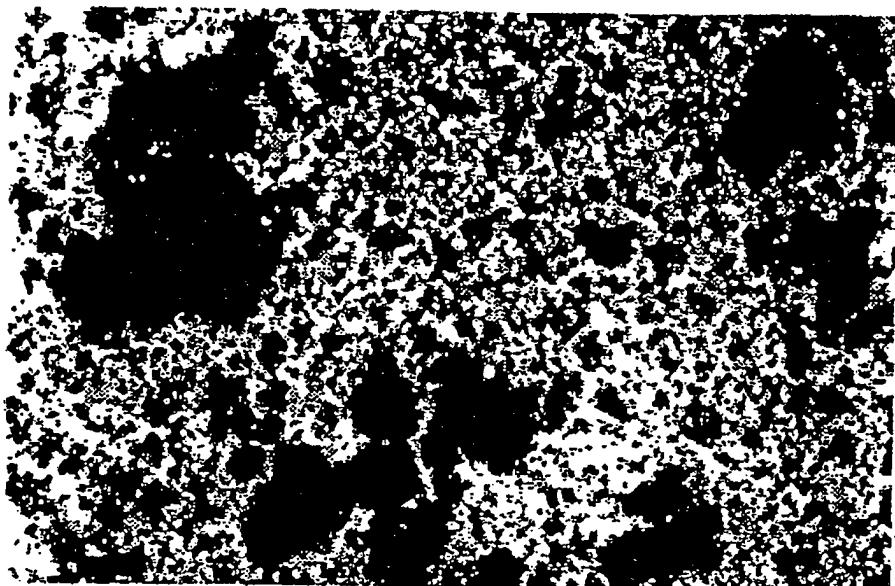


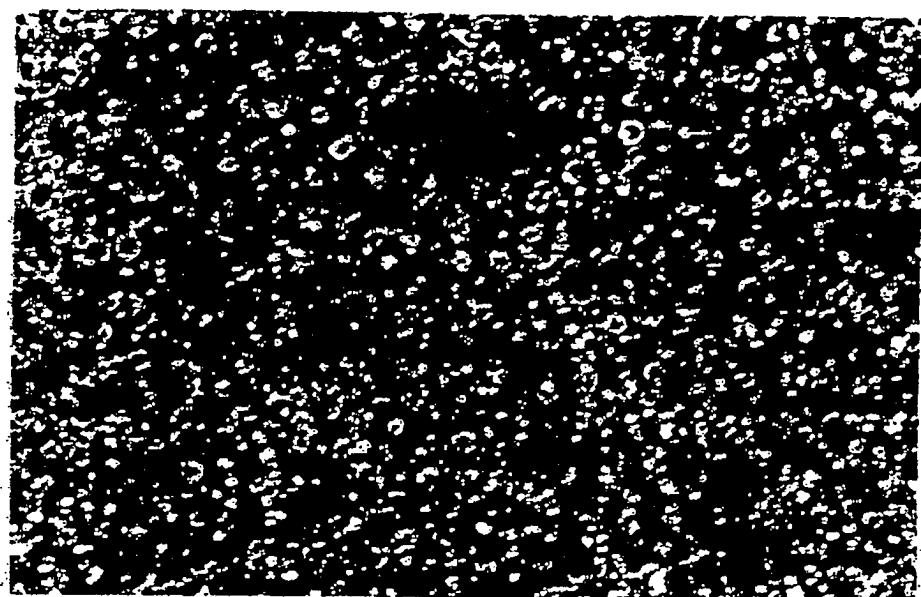
Fig - 1



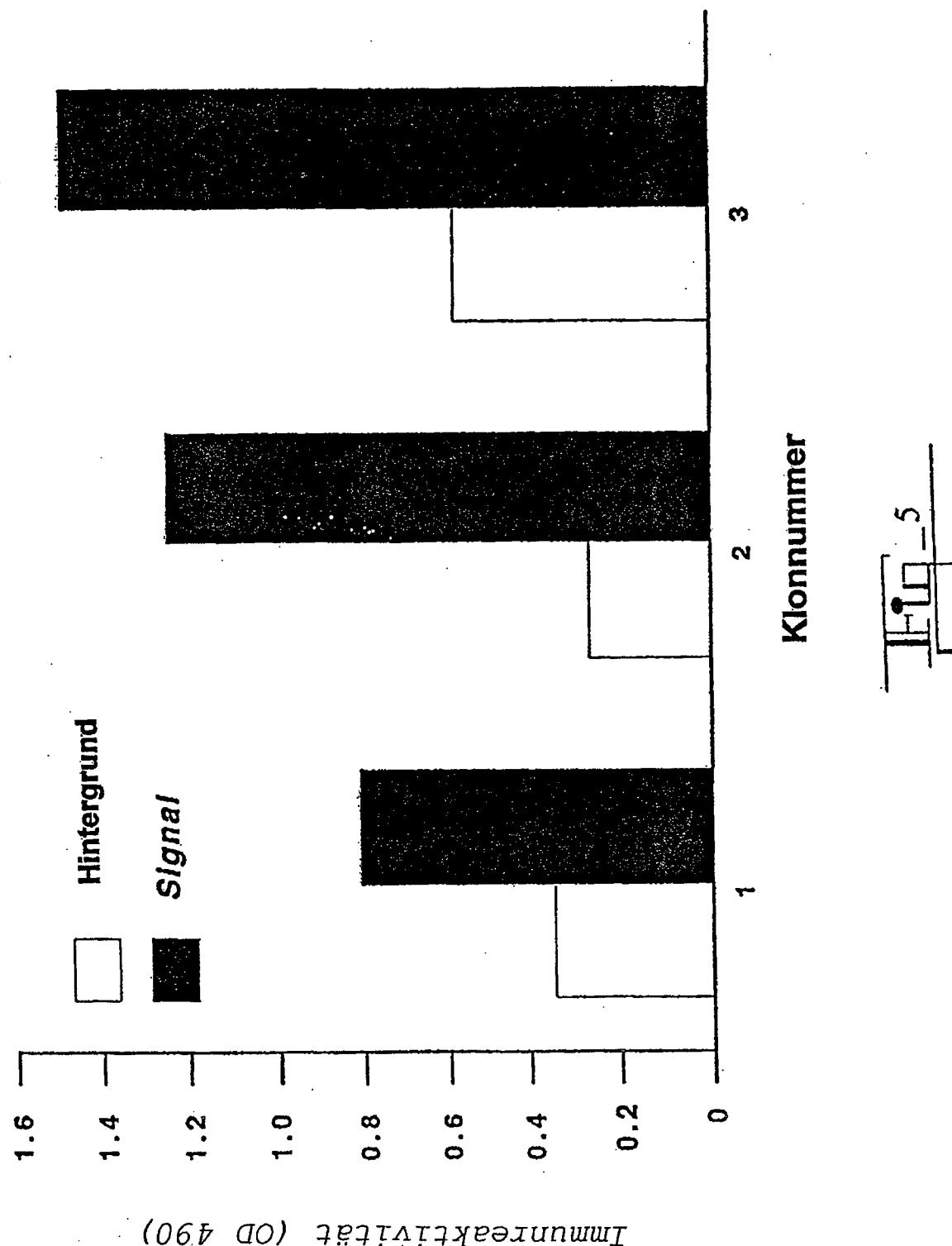
— 2 —

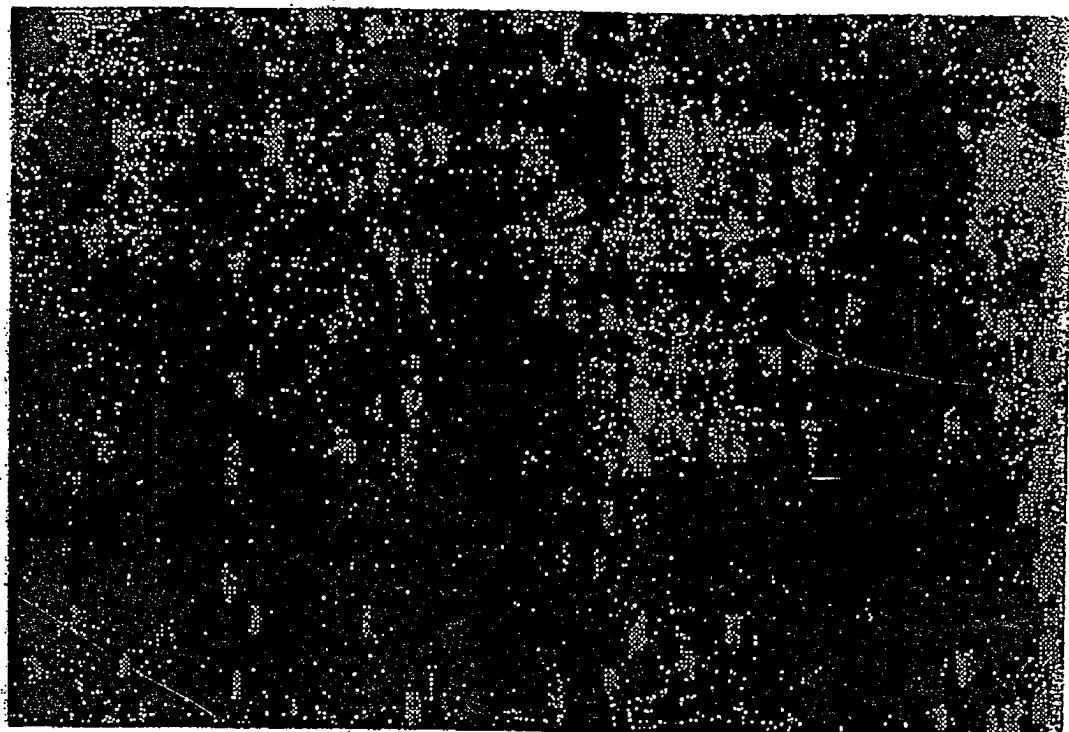


— 3



— 4 —





— 6a

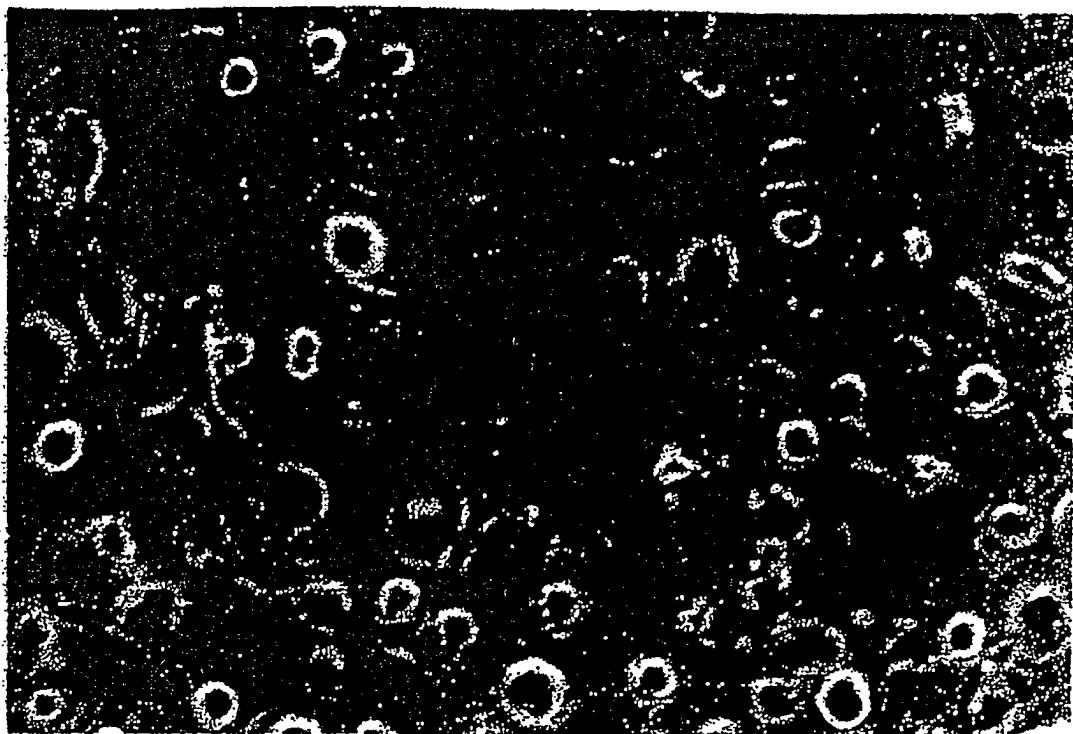
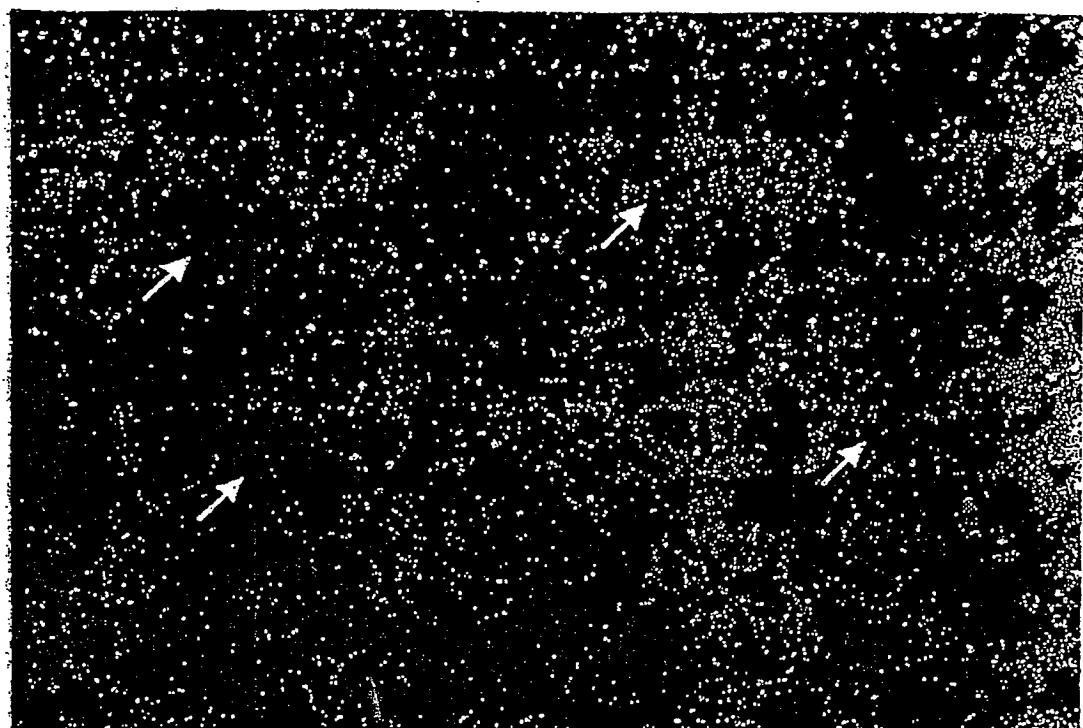
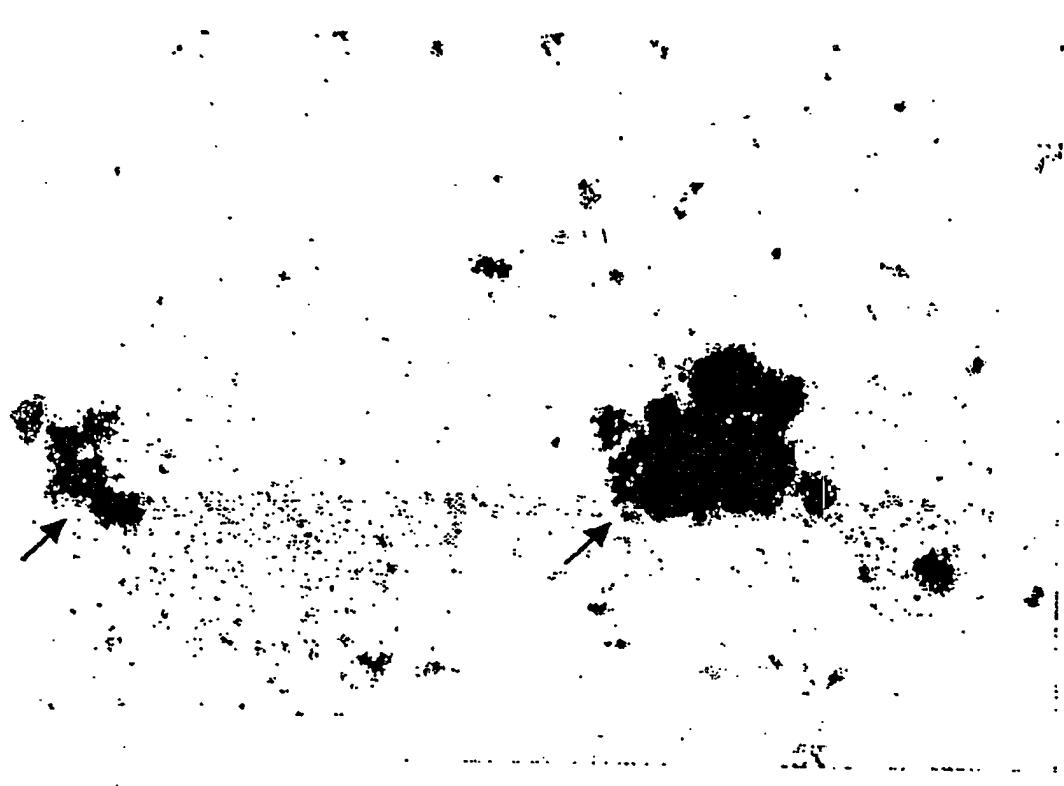


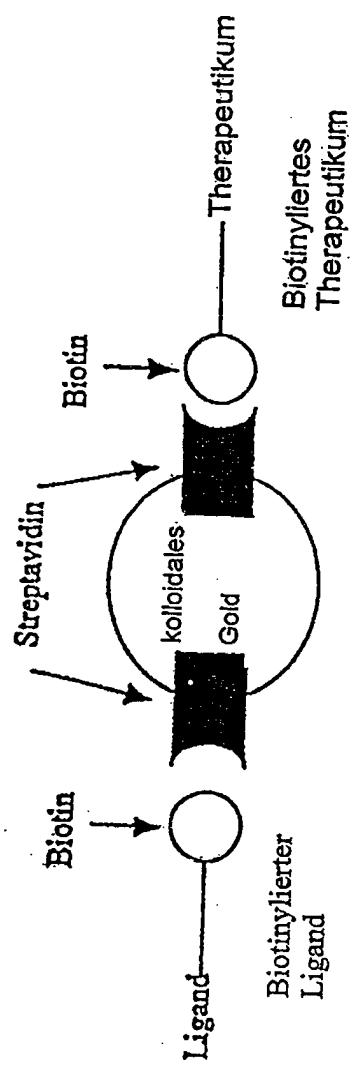
Fig - 6b

DE 698 33 455 T2 2006.10.19



—  
Edu - 7  
—





11-9

