



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 32 261 T2 2005.04.14

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 857 068 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 32 261.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/14558

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 930 819.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/010002

(86) PCT-Anmeldetag: 11.09.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 20.03.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.08.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 21.04.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 14.04.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: C12N 5/06

A61K 39/00, A61K 38/19, A61P 31/00,  
A61P 35/00, A61P 37/00

(30) Unionspriorität:

527546 13.09.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Fordham University, Bronx, N.Y., US

(72) Erfinder:

SRIVASTAVA, K., Pramod, Riverdale, US

(74) Vertreter:

Andrae Flach Haug, 81541 München

(54) Bezeichnung: KREBS UND INFektiöSE KRANKHEITEN IMMUNTHERAPIE UNTER ANWENDUNG VON ANTI-GEN -PRÄSENTIERENDEN ZELLEN SENSIBILISIERT MIT HITZESCHOCK - PROTEIN - ANTIGEN - KOMPLEXEN

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****1. EINLEITUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren einer adoptiven Immuntherapie zur Prävention und/oder Behandlung von primärem und metastatischem Krebs und anderen immunologischen Erkrankungen oder Infektionserkrankungen des Menschen unter Einsatz von Makrophagen, die mit nicht-kovalenten Komplexen aus Heat-Shock-Protein-Molekülen (HSP-Molekülen) und antigenen Molekülen sensibilisiert wurden. Bei der Durchführung der adoptiven Immuntherapie als erfindungsgemäßem Verfahren werden Zusammensetzungen von HSPs, zu denen, ohne auf sie beschränkt zu sein, HSP70, HSP90 und gp96, allein oder miteinander kombiniert und nicht-kovalent an antigene Moleküle gebunden, zur Sensibilisierung von Makrophagen *in vitro* eingesetzt, um nach einer Infusion in den Patienten Immunreaktionen gegen Tumoren und infektiöse Agenzien *in vivo* zu verstärken. Bei der Durchführung der Verfahren zur Prävention und Behandlung infektiöser Erkrankungen und von Krebs werden Komplexe aus antigenen Molekülen und Heat-Shock-/Stress-Proteinen (HSPs), zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, HSP70, HSP90 und gp96, allein oder miteinander kombiniert, gehören, zur Verstärkung der Immunreaktion gegen genotoxische und nicht-genotoxische Faktoren, Tumoren und Infektionen eingesetzt.

**2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Die adoptive Immuntherapie von Krebs bezieht sich auf einen therapeutischen Ansatz, bei dem Immunzellen mit einer Antitumor-Reaktivität einem Wirt, der einen Tumor trägt, verabreicht werden, mit dem Ziel, dass die Zellen entweder direkt oder indirekt die Regression eines bestehenden Tumors vermitteln. Die Transfusion von Lymphozyten, insbesondere von T-Lymphozyten, fällt in diese Kategorie, und Forscher am National Cancer Institute (NCI) haben die autologe Reinfusion von Lymphozyten des peripheren Blutes oder von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL), T-Zell-Kulturen aus Biopsien subkutaner Lymphknoten, dazu verwendet, verschiedene Krebsformen des Menschen zu behandeln (Rosenberg, S. A., US-Patent Nr. 4 690 914, erteilt am 1. September 1987; Rosenberg, S. A. et al., 1988, N. England J. Med. 319: 1676–1680). Zum Beispiel wurden TIL, die *in vitro* in Gegenwart von Interleukin-2 (IL-2) vermehrt wurden, adoptiv in Krebspatienten übertragen, was bei bestimmten Patienten mit metastatischem Melanom zur Tumorregression führte. Melanom-TIL, die mit IL-2 kultiviert wurden, wurden als aktivierte T-Lymphozyten CD3<sup>+</sup> NLA-DR<sup>+</sup> identifiziert, die in erster Linie CD8<sup>+</sup>-Zellen mit einzigartigen Antitumoreigenschaften *in vitro* sind. Viele Langzell-Melanom-TIL-Kulturen lysieren autologe Tumo-

ren auf eine spezifische, vom MHC der Klasse I und vom T-Zell-Antigenrezeptor abhängige Weise (Topalian, S. L. et al., 1989, J. Immunol. 142: 3714). Allerdings haben Studien an TIL, die von anderen Tumortypen stammten, nur schwache Hinweise auf eine zytolytische oder proliferative Antitumorimmunspezifität gezeigt (Topalian, S. L. et al., 1990, in Important Advances in Oncology, V. T. DeVita, S. A. Hellman und S. A. Rosenberg, Hrsg., J. B. Lippincott, Philadelphia, S. 19–41). Außerdem war die Toxizität der Behandlung mit IL-2 in hoher Dosis und mit aktivierten Lymphozyten, die von der NCI-Gruppe befürwortet wurde, beträchtlich, und sie schloss hohes Fieber, schweren Rigor, einen Blutdruckabfall, eine Schädigung der Endothelwände aufgrund eines „Capillary leakage syndrome“ sowie verschiedene Nebenwirkungen auf das Herz, wie Arrhythmien und Myokardinfarkt, ein (Rosenberg, S. A. et al., 1988, N. England J. Med. 319: 1676–1680).

## 2.1. Tumorspezifische Immunogenitäten der Heat-Shock-/Stress-Proteine HSP70, HSP90 und gp96

**[0003]** Srivastava et al. wiesen eine Immunreaktion gegen syngene Zellen oder Krebs bei Methylcholanthren-induzierten Sarkomen von Inzuchtmäusen nach (1988, Immunol. Today 9: 78–83). In diesen Untersuchungen wurde gefunden, dass die Moleküle, die für die individuell unterschiedliche Immunogenität dieser Tumoren verantwortlich waren, als Zelloberflächen-Glycoproteine von 96 kDa (gp96) und intrazelluläre Proteine von 84 bis 86 kDa identifiziert wurden (Srivastava, P. K. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3407–3411; Ullrich, S. J. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3121–3125). Die Immunisierung von Mäusen mit gp96 oder p84/86, die aus einem bestimmten Tumor isoliert worden waren, machte die Mäuse immun gegen den jeweiligen Tumor, aber nicht gegen Tumoren mit anderen antigenen Eigenschaften. Die Isolierung und Charakterisierung von Genen, die für gp96 und p84/86 codieren, deckte eine signifikante Homologie zwischen diesen auf, und sie zeigte, dass gp96 und p84/86 die im endoplasmatischen Retikulum bzw. im Cytosol vorhandenen Gegenstücke des gleichen Heat-Shock-Proteins waren (Srivastava, P. K. et al., 1988, Immunogenetics 28: 205–207; Srivastava, P. K. et al., 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167: 109–123). Ferner wurde für HSP70 gezeigt, dass es eine Immunität gegen den Tumor hervorrief, aus dem es isoliert worden war, aber nicht gegen Tumoren mit anderen antigenen Eigenschaften. Für HSP70, das von Peptiden befreit worden war, wurde jedoch gefunden, dass es seine immunogene Aktivität verloren hatte (Udono, M. und Srivastava, P. K., 1993, J. Exp. Med. 178: 1391–1396). Diese Beobachtungen legten nahe, dass die Heat-Shock-Proteine nicht per se immunogen sind, sondern dass sie Träger antigener Peptide sind, die eine spezifische Immunität gegen Krebsformen hervorrufen (Srivastava, P. K., 1993, Adv. Can-

cer Res. 62: 153–177).

## 2.2. Zellen, die an Immunreaktionen beteiligt sind

**[0004]** Die Zellen des Immunsystems entstehen aus pluripotenten Stammzellen über zwei Hauptwege der Differenzierung: a) die lymphoide Entwicklungslinie, die Lymphozyten erzeugt (T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen), und b) die myeloide Entwicklungslinie, die Phagozyten (Monozyten, Makrophagen und Neutrophile) sowie andere akzessorische Zellen (antigenpräsentierende Zellen, Blutplättchen, Mastzellen und Endothelzellen) erzeugt (Roitt I., Brostoff J. und Male D. (Hrsg.), 1993, Immunology, Kap. 11, Mosby, London).

**[0005]** Bei der myeloiden Entwicklungslinie erzeugen die pluripotenten Stammzellen Colony-forming units (CFU), die zu Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten (CFU-GEMM) führen können. Interleukin-3 und der Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) werden für die weitere Reifung von Granulozyten und Monozyten benötigt. Somit können Monozyten, die in Leukozyten der peripheren Blutes vorhanden sind, mit GM-CSF in vitro aktiviert werden, und sie sind imstande, Makrophagen zu werden (Gradstein, K. H. et al., 1986, Science 232: 506–508). Andere Cytokine, z. B. IL-1, IL-4 und IL-6, fördern die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Clark, S. C. und Kamen, R., 1987, Science 236: 1229–1237).

**[0006]** Somit stammen Makrophagen im Knochenmark von myeloiden Stammzellen ab. Sie zirkulieren im Blut als Monozyten und durchlaufen zum Schluss eine Differenzierung zu reifen Gewebemakrophagen in, neben anderen Geweben, der Leber, der Milz und der Lunge. Makrophagen sind offenbar die Hauptfaktorzellen, und Leukozyten, wie T-Lymphozyten und NK-Zellen, spielen ebenfalls eine Rolle bei der zellvermittelten Zytotoxizität.

## 3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0007]** Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen bereit, die Makrophagen und/oder andere antigenpräsentierende Zellen (APC) umfassen, die mit Komplexen aus Heat-Shock-Proteinen (HSPs), die nicht-kovalent an antigene Moleküle gebunden sind, sensibilisiert wurden, sowie Verfahren, die das Verabreichen derartiger Zusammensetzungen in pharmazeutisch annehmbaren Trägern an menschliche Individuen mit Krebs oder Infektionskrankheiten umfassen. Zu den bevorzugten HSPs, die in den Komplexen, die für die Sensibilisierung der Makrophagen geeignet sind, enthalten sind, gehören, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, HSP70, HSP90 und gp160 oder eine Kombination von diesen. Solche Zellen, die durch Komplexe aus HSPs und antigenen Molekülen sensibilisiert wurden, werden hier als

„HSP-sensibilisierte“ Zellen bezeichnet.

**[0008]** Die vorliegende Erfindung umfasst Verfahren für die adoptive Immuntherapie von Krebs und Infektionskrankheiten über eine Verstärkung der Immunkompetenz des Wirts und der Aktivität von Immunfaktorzellen. Die adoptive Immuntherapie mit HSP-sensibilisierten Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (APC), z. B. dendritischen Zellen und B-Zellen (B-Lymphozyten) induziert eine spezifische Immunität gegen Tumorzellen und/oder antigene Komponenten, wodurch die Regression der Tumormasse gefördert oder, je nachdem, die Behandlung immunologischer Erkrankungen oder Infektionskrankheiten unterstützt wird.

**[0009]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren zur Prävention von Krebs, von Infektionskrankheiten und von immunologischen Erkrankungen mittels der erfindungsgemäßen Verfahren der adoptiven Immuntherapie.

**[0010]** Bei einer weiteren Ausführungsform umfassen die Verfahren gegebenenfalls ferner die Verabreichung von Modifikatoren biologischer Reaktionen, z. B. von Cytokinen wie Interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, des Tumornekrose-Faktors (TNF) oder anderer Cytokin-Wachstumsfaktoren.

## 4. KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0011]** **Fig. 1.** PEC, die mit gp96-Präparationen, die von N1-Zellen stammten, sensibilisiert wurden, werden von VSV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) auf eine Kb-beschränkte, CD8-vermittelte Weise erkannt, aber PEC, die mit gp96 gepulst wurden, das von EL4-Zellen stammte, werden es nicht. (A) Pristan-induzierte PEC ( $1 \times 10^4$ ) von C57BL/6-Mäusen und für das VSV-Peptid spezifische CTL ( $5 \times 10^4$ ) von C57BL/6-Mäusen und für das VSV-Peptid spezifische CTL ( $5 \times 10^4$ ) wurden in Gegenwart von gp96 (2 oder 10  $\mu\text{g/ml}$ ), das aus N1- oder EL4-Zellen gewonnen wurde, in 96-Well-Platten mit U-Boden bei 37°C kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen, und die Produktion von TNF- $\alpha$  wurde in einem Bioassay mittels eines Zytotoxizitätstests unter Verwendung von WEHI164-Zellen bestimmt. Die WEHI164-Zellen wurden in 96-Well-Platten mit flachem Boden (2500/Well) ausgesät. Seriell verdünnte Überstände der PEC-CTL-Kokultur wurden zugesetzt.  $\gamma$ -TNF- $\alpha$  wurde mit WEHI164 in separaten Wells als Kontrolle kultiviert. Nach einer Kulturdauer von 4 Stunden bei 37°C wurden 50  $\mu\text{l}$  MTT (1 mg/ml) zugesetzt, es wurde 4 Stunden inkubiert, und dann wurden 100  $\mu\text{l}$  Propanol/0,05 M HCl zugegeben. Es wurde sofort die Extinktion ( $E_{590}$  nm) gemessen. Die Konzentrationen der Probe wurden über einen Vergleich mit den Verdünnungspunkten berechnet, die zu einer Abtötung von 50% der WEHI164-Zellen führten. (B) Es wurde

die Fähigkeit von gp96-sensibilisierten Makrophagen getestet, als Targets in CTL-Assays zu wirken. PEC ( $5 \times 10^6$ /ml) wurden 2 Stunden bei 37° mit gp96 (10 µg/ml), das aus N1-Zellen (ausgefüllte Kreise) oder EL4-Zellen (offene Kreise) stammte, gepulst, oder mit dem VSV-Nukleokapsid-K<sup>b</sup>-Epitop-Peptid (10 µM) (ausgefüllte Dreiecke) als Positivkontrolle oder mit einer Mediumkontrolle (offene Dreiecke) für C, gefolgt von einer Markierung mit <sup>51</sup>Cr für 1,5 Stunden. Diese Zellen wurden als Targets in einem 4-stündigen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest mit VSV-spezifischen CTL eingesetzt. (C) Anti-CD4-mAb (GK1.5), Ascites (offene Kreise), anti-CD8-mAb (YTS1694) (ausgefüllte Quadrate), anti-N-2K<sup>b</sup>-mAb (Y3) (ausgefüllte Kreise), anti-H-2D<sup>b</sup>-mAb (B22.249) (offene Dreiecke) (bezogen von der American Type Culture Collection, Washington, D. C.) oder eine RPMI-Kontrolle (\*) wurden dem CTL-Assay zur gleichen Zeit wie die Effektorzellen und <sup>51</sup>Cr-markierte PEC, die mit N1-gp96 gepulst worden waren, zugesetzt (E/T-Verhältnis = 10).

**[0012]** Fig. 2. Tumorwachstum, gemessen als durchschnittlicher Tumordurchmesser in 5 Gruppen von Mäusen, die mit  $1 \times 10^5$  Zellen von Methylcholanthren (Meth)-A-induzierten Tumorzellen vorbehandelt worden waren und wie folgt behandelt wurden: A. subkutane Injektion einer Pufferlösung; B. subkutane Injektion von 9 µg gp96-Peptid-Komplexen, die aus Lebergewebe stammten; C. intraperitoneale Injektion von  $5 \times 10^6$  Zellen des peritonealen Exudats (PEC), die mit 9 µg gp96-Peptid-Komplexen, die aus normaler Leber stammten, sensibilisiert worden waren (Leber-gp96 + PEC); D. subkutane Injektion von 9 µg gp96-Peptid-Komplexen, die von Meth-A-Tumorzellen stammten; und E. intraperitoneale Injektion von  $5 \times 10^6$  PEC, die mit 9 µg gp96-Peptid-Komplexen sensibilisiert worden waren, die von Meth-A-Tumorzellen stammten (Meth A gp96 + PEC).

## 5. DETAILIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die antigenpräsentierende Zellen (APC) umfassen, die mit Komplexen aus Heat-Shock-Proteinen (HSPs), die nicht-kovalent an antigene Moleküle gebunden sind, sensibilisiert wurden, sowie therapeutische und prophylaktische Verfahren, die das Verabreichen derartiger Zusammensetzungen in pharmazeutisch annehmbaren Trägern an Individuen, vorzugsweise Menschen, die unter Krebs, Infektionskrankheiten oder immunologischen Erkrankungen leiden, umfassen. Die APC können aus denjenigen antigenpräsentierenden Zellen, die man auf diesem Gebiet kennt, ausgewählt werden, zu denen, ohne auf sie beschränkt zu sein, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten und eine Kombination von diesen gehören, und vorzugsweise sind sie Makrophagen. Zu den bevorzugten HSPs, die in den Komplexen, die für die Sensibilisie-

itung der Makrophagen und/oder APC geeignet sind, enthalten sind, gehören, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, HSP70, HSP90, gp96 und gp100 oder eine Kombination von diesen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die sensibilisierten Zellen humane Zellen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die Komplexe, die zur Sensibilisierung der Zellen verwendet werden, humane HSPs und humane antigene Moleküle. Die HSP-sensibilisierten Zellen können autolog oder nicht-autolog (z. B. allogen) für den Patienten sein.

**[0014]** Bei der bevorzugten Verwendung von Zellen, die autolog für das Individuum sind, umgeht die Verwendung autologer Immunzellen, wie Lymphozyten, Makrophagen oder anderer APC, in der adoptiven Immuntherapie ein ethisches Hauptproblem, und zwar die Frage, wer als Donor für die Immunzellen für den adoptiven Transfer ausgewählt werden soll. Man kann keine normalen Individuen und auch nicht Krebspatienten immunisieren, um Immunzellen zu erhalten, und zwar wegen der Gefahr, dass der inaktivierte antigene Tumor im Individuum, das der immunisierte Donor sein soll, wachsen könnte. Ein weiteres Problem, das durch die Verwendung autologer Immunzellen umgangen wird, ist die Transplantat-Wirt-Abstoßungserkrankung, die tödlich sein kann, wenn sie nicht erfolgreich behandelt wird.

**[0015]** Die erfindungsgemäße adoptive Immuntherapie ermöglicht die Aktivierung von Immunzellen durch eine Inkubation mit Komplexen aus HSP und antigenen Molekülen und die Messung der Reaktivität gegenüber dem Tumor oder dem infektiösen Agens *in vitro*. Diese *In-vitro*-Boosterung, an die sich eine klonale Selektion und/oder Expansion und die Infusion in den Patienten anschließt, stellt eine nützliche therapeutische/prophylaktische Strategie dar.

**[0016]** „Antigene Moleküle“, wie der Begriff hier verwendet wird, bezieht sich auf die Peptide, mit denen die HSPs *in vivo* endogen assoziiert sind (z. B. in infizierten Zellen oder präkanzerösem oder kanzerösem Gewebe) sowie auf exogene Antigene/Immunoogene (d. h. mit denen die HSPs *in vivo* nicht komplexiert sind) sowie auf antigene/immunogene Fragmente und Derivate von diesen.

**[0017]** Heat-Shock-Proteine, die hier austauschbar auch als Stressproteine bezeichnet werden, und die für die Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können aus beliebigen zellulären Proteinen ausgewählt werden, die ein beliebiges der folgenden Kriterien erfüllen. Es ist ein Protein, dessen intrazelluläre Konzentration ansteigt, wenn eine Zelle einem Stress-Stimulus ausgesetzt ist, es ist fähig, an andere Proteine oder Peptide zu binden, und es ist fähig, die gebundenen Proteine oder Peptide in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) oder bei niedrigem pH freizusetzen, oder es ist ein Protein,

das wenigstens eine 35%ige Homologie mit einem beliebigen anderen zellulären Protein aufweist, das eine beliebige der obigen Eigenschaften besitzt.

**[0018]** Die ersten Stressproteine, die identifiziert wurden, waren die Heat-Shock-Proteine (HSPs). Wie ihr Name impliziert, werden HSPs von einer Zelle als Reaktion auf einen Hitzeschock synthetisiert. Bis heute wurden drei Hauptfamilien von HSPs auf der Basis ihres Molekulargewichtes identifiziert. Die Familien wurden HSP60, HSP70 und HSP90 genannt, wobei die Zahlen das ungefähre Molekulargewicht der Stressproteine in Kilotonnen wiedergeben. Von vielen Mitgliedern dieser Familien wurde anschließend gefunden, dass sie als Reaktion auf andere Stress-Stimuli induziert werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, ein Nährstoffmangel, eine Störung des Metabolismus, Sauerstoffradikale und eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen gehören (siehe Welch, Mai 1993, Scientific American 56–64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol. 8: 401–420; Craig, 1993, Science 260: 1902–1903; Gething et al., 1992, Nature 355: 33–45; und Lindquist et al., 1988, Annu. Rev. Genetics 22: 631–677). Man stellt sich vor, dass HSPs/Stressproteine aus allen drei dieser Familien bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können.

**[0019]** Die Haupt-HSPs können in sehr großen Mengen in gestressten Zellen akkumulieren, aber sie kommen in niedriger bis mäßiger Menge in Zellen, die gestresst worden sind, vor. Zum Beispiel ist das stark induzierbare Säugetier-HSP70 bei normalen Temperaturen kaum nachweisbar, aber es wird als Folge eines Hitzeschockes eines der am aktivsten synthetisierten Proteine in der Zelle (Welch et al., 1985, J. Cell. Biol. 101: 1198–1211). Im Gegensatz dazu kommen HSP90 und HSP60 bei normalen Temperaturen in den meisten, aber nicht in allen Säugерzellen in großer Menge vor, und sie werden durch Hitze weiter induziert (Lai et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 4: 2802–10; van Bergen en Henegouwen et al., 1987, Genes Dev. 1: 525–31).

**[0020]** Heat-Shock-Proteine gehören zu den am stärksten konservierten existierenden Proteinen. Zum Beispiel weist DnaK, das HSP70 von *E. coli*, eine ungefähr 50%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit derjenigen der HSP70-Proteine von *Excoriatae* auf (Bardwell et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848–852). Die HSP60- und HSP90-Familien zeigen ebenfalls eine ähnlich hohe Konservierung innerhalb der Familien (Hickey et al., 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2615–2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2279–2283). Außerdem wurde entdeckt, dass die HSP60-, HSP70- und HSP90-Familien aus Proteinen bestehen, die bezüglich der Sequenz mit den Stressproteinen verwandt sind und z. B. eine Übereinstimmung der Aminosäuren von über 35% zeigen, wobei ihr Expressionsniveau aber nicht durch Stress verän-

dert wird. Es wird deshalb in Betracht gezogen, dass die Definition eines Stressproteins, wie sie hier verwendet wird, andere Proteine, Muteine, Analoge und Varianten von diesen einschließt, die wenigstens 35 bis 55%, vorzugsweise 55 bis 75%, und am bevorzugtesten 75 bis 85% Übereinstimmung bezüglich der Aminosäuren mit Mitgliedern der drei Familien zeigen, deren Expressionsniveaus in einer Zelle als Reaktion auf einen Stress-Stimulus erhöht werden. Die Reinigung von Stressproteinen, die zu diesen drei Familien gehören, wird unten beschrieben.

**[0021]** Die Komplexe aus HSPs und antigenen Molekülen, die zur Sensibilisierung von APCs gemäß der Erfindung verwendet werden, können jeden beliebigen Komplex, der ein HSP und ein Molekül enthält, umfassen, der imstande ist, in einem Säugetier eine Immunreaktion zu induzieren. Die antigenen/immunogenen Moleküle sind nicht-kovalent mit dem HSP assoziiert. Zu bevorzugten Komplexen gehören, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, HSP60-Peptid-, HSP70-Peptid- und HSP90-Peptid-Komplexe, bei denen der HSP-Peptid-Komplex *in vivo* vorhanden ist und aus Zellen isoliert wird. Bei einer spezifischen Ausführungsform umfasst der Komplex ein HSP, das als gp96 bezeichnet wird, das im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen vorhanden ist und mit den zytoplasmatischen HSP90 verwandt ist.

**[0022]** Die HSPs können zwar, allogen für den Patienten sein, aber bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die HSPs autolog für den (stammen ab von dem) Patienten, dem sie verabreicht werden. Die HSPs und/oder antigenen Moleküle können aus natürlichen Quellen gereinigt werden, sie können chemisch synthetisiert werden, oder sie können gentechnologisch erzeugt werden.

**[0023]** Die vorliegende Erfindung umfasst Verfahren für die adoptive Immuntherapie von Krebs, Infektionskrankheiten und immunologischen Erkrankungen über die Verstärkung der Immunkompetenz-Aktivität von Immuneffektorzellen des Wirts. Die adoptive Immuntherapie mit Makrophagen und anderen APC, zum Beispiel dendritischen Zellen und B-Zellen, die mit HSPs und antigenen Molekülen sensibilisiert wurden, induziert eine spezifische Immunität gegen Tumorzellen und/oder infektiöse Agenzen (in Abhängigkeit von der Identität des antigenen Moleküls) und führt zur Regression der Tumormasse und/oder der Infektionskrankheit.

**[0024]** Zu Krebstypen, die auf die erfindungsgemäße adoptive Immuntherapie mittels der mit dem HSP-Komplex sensibilisierten Makrophagen und/oder APC ansprechen, gehören, ohne jedoch auf die beschränkt zu sein, humane Sarkome und Karzinome, z. B. das Fibrosarkom, das Myxosarkom, das Liposarkom, das Chondrosarkom, das osteo-

ne Sarkom, das Chordom, das Angiosarkom, das Endothelsarkom, das Lymphangiosarkom, das Lymphangioendothelsarkom, das Synoviom, das Mesotheliom, Ewings-Tumor, das Leiomyosarkom, das Rhabdomyosarkom, das Dickdarmkarzinom, der Pankreaskrebs, der Brustkrebs, der Ovarialkrebs, der Prostatakrebs, das Plattenepithelkarzinom, das Basalzellkarzinom, das Adenokarzinom, das Schweißdrüsenskarzinom, das Talgdrüsenskarzinom, die papilläre Karzinom, papilläre Adenokarzinome, das Cystadenokarzinom, das medulläre Karzinom, das bronchogene Karzinom, das Nierenzellkarzinom, das Hepatom, das Gallengangskarzinom, das Chorionkarzinom, das Seminom, das Embryonalkarzinom, Wilms Tumor, Zervixkrebs, Hodenkrebs, das Lungenkarzinom, das kleinzellige Lungenkarzinom, das Blasenkarzinom, das Epithelkarzinom, das Gliom, das Astrozytom, das Medulloblastom, das Craniopharyngiom, das Ependymom, das Pinealom, das Hämangioblastom, das Akustikusneurom, das Oligodendrogiom, das Meningiom, das Melanom, das Neuroblastom, das Retinoblastom; Leukämien, z. B. die akute lymphozytische Leukämie und die akute myelozytische Leukämie (myeloblastisch, promyelozytisch, myelomonozytisch, monozytisch und erythroleukämisch); die chronische Leukämie (chronische myelozytische (granulozytische) Leukämie und chronische lymphozytische Leukämie) und Polycythaemia vera, das Lymphom (Hodgkin-Krankheit und Non-Hodgkin-Lymphome), das multiple Myelom, Waldenströms Makroglobulinämie und die Hy<sup>-2</sup>-Kettenkrankheit.

**[0025]** Die Erfindung stellt auch einen Kit bereit, der einen Komplex eines HSP, das nicht-kovalent an ein exogenes antigenes Molekül gebunden ist, in einem Behälter umfasst. Der Kit kann ferner in einem zweiten Behälter humanes APC umfassen.

### 5.1. Komplexe für die Sensibilisierung von APC

**[0026]** Gemäß den hier beschriebenen Verfahren werden APC mit einem HSP sensibilisiert, das mit immunogenen oder antigenen Molekülen, die endogen mit HSPs oder MHC-Antigenen komplexiert sind und als antigene Molekül verwendet werden können, komplexiert ist. Zum Beispiel können solche Peptide präpariert werden, die Reaktionen zytotoxischer T-Zellen gegen verschiedene tumorspezifische Antigene (z. B. Tyrosinase, gp100, Melan-A, gp75, Mucine etc.) und gegen virale Proteine stimulieren, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Proteine des Human immunodeficiency virus vom Typ I (HIV-I), des Human immunodeficiency virus vom Typ II (HIV-II), des Hepatitis-A-Virus, des Hepatitis-B-Virus, des Hepatitis-C-Virus, des Grippe-Virus, des Varicella-Virus, des Adenovirus, des Herpes-simplex-Virus vom Typ I (HSV-I), des Herpes-simplex-Virus vom Typ II (HSV-II), des Rinderpest-Virus, des Rhinovirus, des Echovirus, des Rotavirus, des Respiratory syncytial virus, des Papillomvirus, des Papova-

virus, des Cytomegalovirus, des Echinovirus, des Arbovirus, des Huntavirus, des Coxsackie-Virus, des Mumpsvirus, des Masernvirus, des Rubellavirus und des Poliovirus gehören. Bei der Ausführungsform, bei der die antigenen Moleküle Peptide sind, die in vivo nicht-kovalent als Komplex an HSPs gebunden sind, können die Komplexe aus Zellen isoliert werden, oder sie können alternativ in vitro aus gereinigten Präparationen von HSPs und solchen von antigenen Molekülen erzeugt werden.

**[0027]** Bei einer weiteren spezifischen Ausführungsform können Antigene von Krebstypen (z. B. Tumoren) oder infektiösen Agenzien (z. B. virale Antigene, bakterielle Antigene etc.) durch eine Aufreinigung aus natürlichen Quellen, über eine chemische Synthese oder über gentechnologische Verfahren erhalten werden, und sie können mittels In-vitro-Verfahren wie denjenigen, die unten beschrieben werden, nicht-kovalent mit HSPs komplexiert werden.

**[0028]** Bei einer Ausführungsform, bei der der Komplex aus dem HSP und dem antigenen Molekül, der verwendet werden soll, ein Komplex ist, der in vivo in Zellen erzeugt wird, können beispielhafte Reinigungsverfahren wie diejenigen, wie sie in den Abschnitten 5.1.1–5.1.3 unten beschrieben werden, eingesetzt werden. Alternativ kann bei einer Ausführungsform, bei der man die antigenen Moleküle einsetzen möchte, indem man sie in vitro an HSPs als Komplex bindet, können HSPs für diese Verwendung aus den endogenen HSP-Peptid-Komplexen in Gegenwart von ATP oder bei niedrigem pH gereinigt werden (oder chemisch synthetisiert oder gentechnologisch erzeugt werden). Die hier beschriebenen Protokolle können dazu verwendet werden, die HSP-Peptid-Komplexe, oder die HSPs alleine, aus beliebigen eukaryotischen Zellen zu isolieren, z. B. aus Geweben, isolierten Zellen oder immortalisierten eukaryotischen Zelllinien, die mit einem ausgewählten intrazellulären Pathogen infiziert wurden, aus Tumorzellen oder aus Tumorzelllinien.

### 5.1.1. Präparation und Reinigung von HSP-70-Peptid-Komplexen

**[0029]** Die Reinigung von HSP-70-Peptid-Komplexen ist beschrieben worden, siehe z. B. Udon et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 1391–1396. Ein Verfahren, das verwendet werden kann, und das lediglich als Beispiel und nicht als Einschränkung gebracht wird, sieht folgendermaßen aus: Zunächst werden Tumorzellen in 3 Volumina eines 1X-Lysispuffers suspendiert, der 5 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthält. Dann wird das Pellet auf Eis sonifiziert, bis > 99% der Zellen lysiert sind, wie unter dem Mikroskop kontrolliert wird. Als Alternative zur Sonifizierung können die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, und

bei diesem Ansatz werden die Zellen typischerweise in 30 mM Natriumbicarbonat, pH 7,5, und 1 mM PMSF resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und dann in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert, bis > 95% der Zellen lysiert sind.

**[0030]** Dann wird das Lysat bei 1000 g 10 Minuten zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Zelltrümmer zu entfernen. Der resultierende Überstand wird erneut 90 Minuten bei 100 000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und dann mit Con-A-Sepharose, die mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS), die 2 mM Ca<sup>2+</sup> und 2 mM Mg<sup>2+</sup> enthielt, äquilibriert wurde, gemischt. Wenn die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, wird der Überstand vor dem Mischen mit Con-A-Sepharose mit dem gleichen Volumen eines 2X-Lysis-puffers verdünnt. Man lässt den Überstand dann 2–3 Stunden bei 4°C an die Con-A-Sepharose binden. Das Material, das nicht bindet, wird abgenommen und 36 Stunden gegen 10 mM Tris-Aacetat, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10 mM NaCl und 1 mM PMSF dialysiert (dreimal, jedes Mal 100 Volumina). Dann wird das Dialysat bei 17 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) 20 Minuten zentrifugiert. Dann wird der resultierende Überstand abgenommen und auf eine Mono-Q-FPLC-Säule aufgetragen, die mit 20 mM Tris-Aacetat, pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol äquilibriert wurde. Die Säule wird dann mit einem NaCl-Gradienten (20 mM bis 500 mM) entwickelt, und die eluierten Fraktionen werden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) fraktioniert und durch ein Immunblotting unter Verwendung eines geeigneten Anti-HSP70-Antikörpers (beispielsweise vom Klon N27F3-4 von StressGen) charakterisiert.

**[0031]** Fraktionen, die eine starke Immunreaktivität mit dem Anti-HSP70-Antikörper zeigen, werden gepoolt, und die HSP70-Peptid-Komplexe werden mit Ammoniumsulfat gefällt, spezifisch in einem Bereich von 50% bis 70% Ammoniumsulfat. Das resultierende Präzipitat wird dann durch Zentrifugation bei 17 000 Upm (Sorvall-Rotor-SS34) gesammelt und mit 70% Ammoniumsulfat gewaschen. Das gewaschene Präzipitat wird dann gelöst, und eventuell vorhandenes restliches Ammoniumsulfat wird durch Gelfiltration über eine Sephadex®-G25-Säule (Pharmacia) entfernt. Falls erforderlich kann die so erhaltene HSP70-Präparation erneut wie oben beschrieben über die Mono-Q-FPLC-Säule gereinigt werden.

**[0032]** Der HSP70-Peptid-Komplex kann mittels dieses Verfahrens bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Typischerweise kann 1 mg des HSP70-Peptid-Komplexes aus 1 g Zellen/Gewebe gereinigt werden.

**[0033]** Die vorliegende Erfindung beschreibt ferner ein neues und schnelles Verfahren zur Reinigung von

HSP70-Peptid-Komplexen. Dieses verbesserte Verfahren setzt eine Chromatographie mit ADP, das an einen festen Träger gebunden ist, ein (z. B. ADP-Agarose). Die resultierenden HSP70-Präparationen haben eine höhere Reinheit und sind frei von Peptiden. Die Ausbeuten an HSP70 sind auch beträchtlich, um mehr als das 10-fache, erhöht. Alternativ kann eine Chromatographie mit nicht-hydrolysierbaren Analogen von ATP anstelle von ADP bei der Chromatographie zur Reinigung von HSP70-Peptid-Komplexen eingesetzt werden. Die Reinigung von HSP70-Peptid-Komplexen über eine ADP-Agarose-Chromatographie wurde beispielsweise, ohne dass die Technik als Einschränkung verstanden werden soll, wie folgt durchgeführt: Meth-A-Sarkomzellen (500 Millionen Zellen) wurden in hypotonischem Puffer homogenisiert, und das Lysat wurde 90 Minuten bei 4°C und 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Teile aufgeteilt und auf eine ADP-Agarose- oder eine ATP-Agarose-Säule aufgetragen. Die Säulen wurden mit Puffer gewaschen und mit 3 mM ADP bzw. 3 mM ATP eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert: In beiden Fällen wurden anscheinend homogene Präparationen von HSP70 erhalten. Wenn jedoch beide Präparationen auf die Anwesenheit von Peptiden getestet wurden, dann zeigte sich, dass die ADP-gebundene/eluierte HSP70-Präparation mit Peptiden assoziiert war, die ATP-gebundene/eluierte HSP70-Präparation dagegen nicht.

#### 5.1.2. Präparation und Reinigung von HSP90-Peptid-Komplexen

**[0034]** Ein Verfahren, das verwendet werden kann, und das lediglich als Beispiel und nicht als Einschränkung gebracht wird, sieht folgendermaßen aus:

**[0035]** Zunächst werden Tumorzellen in 3 Volumina eines 1X-Lysispuffers suspendiert, der aus 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Phenylmethylenfluorid (PMSF) besteht. Dann wird das Pellet auf Eis sonifiziert, bis > 99% der Zellen lysiert sind, wie unter dem Mikroskop kontrolliert wird. Als Alternative zur Sonifizierung können die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, und bei diesem Ansatz werden die Zellen typischerweise in 30 mM Natriumbicarbonat, pH 7,5, und 1 mM PMSF resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und dann in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert, bis > 95% der Zellen lysiert sind.

**[0036]** Dann wird das Lysat bei 1000 g 10 Minuten zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Zelltrümmer zu entfernen. Der resultierende Überstand wird erneut 90 Minuten bei 100 000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und dann mit Con-A-Sepharose, die mit PBS, die 2 mM Ca<sup>2+</sup> und 2 mM Mg<sup>2+</sup> enthielt, äquilibriert wurde, ge-

mischt. Wenn die Zellen über ein mechanisches Scheren lysiert werden, wird der Überstand vor dem Mischen mit Con-A-Sepharose mit dem gleichen Volumen eines 2×-Lysispuffers verdünnt. Man lässt den Überstand dann 2–3 Stunden bei 4°C an die Con-A-Sepharose binden. Das Material, das nicht bindet, wird abgenommen und 36 Stunden gegen 10 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10 mM NaCl und 1 mM PMSF dialysiert (dreimal, jedes Mal 100 Volumina). Dann wird das Dialysat bei 17 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) 20 Minuten zentrifugiert. Dann wird der resultierende Überstand abgenommen und auf eine Mono-Q-FPLC-Säule aufgetragen, die mit Lysispuffer äquilibriert wurde. Die Proteine werden dann mit einem Salzgradienten (200 mM bis 600 mM NaCl) eluiert.

**[0037]** Die eluierten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE fraktioniert, und Fraktionen, die die HSP90-Peptid-Komplexe enthalten, werden durch ein Immunblotting unter Verwendung eines Anti-HSP90-Antikörpers wie 3G3 (Affinity Bioreagents) identifiziert. HSP90-Peptid-Komplexe können mittels dieses Verfahrens bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Typischerweise können 150–200 µg des HSP90-Peptid-Komplexes aus 1 g Zellen/Gebebe gereinigt werden.

#### 5.1.3. Präparation und Reinigung von gp96-Peptid-Komplexen

**[0038]** Ein Verfahren, das eingesetzt werden kann, und das als Beispiel und nicht als Einschränkung gebracht wird, sieht folgendermaßen aus:

**[0039]** Ein Tumorpellet wird in 3 Volumina eines Puffers aus 30 mM Natriumbicarbonat (pH 7,5) und 1 mM PMSF resuspendiert, und dann lässt man die Zellen auf Eis 20 Minuten schwellen. Das Zellpellet wird dann mit einem Dounce-Homogenisator (die geeignete Clearance des Homogenisators hängt vom jeweils verwendeten Zelltyp ab) auf Eis homogenisiert bis > 95% der Zellen lysiert sind.

**[0040]** Das Lysat wird bei 1 000 g 10 Minuten zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Zellen, Kerne und andere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wird dann 90 Minuten bei 100 000 g erneut zentrifugiert. Der gp96-Peptid-Komplex kann entweder aus dem 100 000-g-Pellet oder aus dem Überstand gereinigt werden.

**[0041]** Wenn er aus dem Überstand gereinigt wird, dann wird der Überstand mit dem gleichen Volumen eines 2×-Lysis-Puffers verdünnt, und der Überstand wird 2–3 Stunden bei 4°C mit Con-A-Sepharose gemischt, die mit PBS, die 2 mM Ca<sup>2+</sup> und 2 mM Mg<sup>2+</sup> enthält, äquilibriert. Dann wird die Aufschämmung in eine Säule gepackt und mit 1× Lysispuffer gewaschen, bis der E<sub>280</sub>-Wert auf den Ausgangswert abge-

fallen ist. Dann wird die Säule mit 1/3 des Säulenvolumens an 10% α-Methylmannosid (α-MM), gelöst in PBS, das 2 mM Ca<sup>2+</sup> und 2 mM Mg<sup>2+</sup> enthält, gewaschen, die Säule wird mit einem Stück Parafilm verschlossen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird die Säule auf Raumtemperatur abgekühlt, und der Parafilm wird vom unteren Ende der Säule entfernt. Es werden fünf Säulenvolumina des α-MM-Puffers auf die Säule aufgetragen, und das Eluat wird mittels SDS-PAGE analysiert. Typischerweise ist das resultierende Material zu ungefähr 60–95% rein; das hängt jedoch vom Zelltyp und dem eingesetzten Verhältnis von Gewebe zu Lysispuffer ab. Dann wird die Probe auf eine Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit einem Puffer äquilibriert wurde, der 5 mM Natriumphosphat, pH 7, enthält. Die Proteine werden dann mit einem NaCl-Gradienten (0–1 M) von der Säule eluiert, wobei die gp96-Fraktion zwischen 400 mM und 550 mM NaCl eluiert.

**[0042]** Das Verfahren kann jedoch durch zwei zusätzliche Schritt modifiziert werden, die entweder allein oder gemeinsam eingesetzt werden, um reproduzierbar gp96-Peptid-Komplexe von apparenter Homogenität zu erzeugen. Ein optionaler Schritt beinhaltet eine Ammoniumsulfat-Fällung vor dem Schritt der Con-A-Reinigung, und der andere optionale Schritt beinhaltet eine DEAE-Sepharose-Reinigung nach dem Schritt der Con-A-Reinigung, aber vor dem Mono-Q-FPLC-Schritt.

**[0043]** Beim ersten optionalen Schritt wird der Überstand, der aus dem Schritt der 100 000-g-Zentrifugation resultiert, durch die Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 50% Ammoniumsulfat gebracht. Das Ammoniumsulfat wird langsam zugegeben, wobei die Lösung in einem Becher, der im Eiswasserbad steht, gerührt wird. Die Lösung wird ungefähr 1/2 Stunde bis 12 Stunden bei 4°C gerührt, und die resultierende Lösung wird bei 6 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert. Der aus diesem Schritt resultierende Überstand wird entnommen, durch die Zugabe einer Ammoniumsulfat-Lösung auf 70% der Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht und bei 6000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert. Das aus diesem Schritt resultierende Pellet wird entnommen und in PBS, das 70% Ammoniumsulfat enthält, suspendiert, um das Pellet zu waschen. Diese Mischung wird bei 6 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) zentrifugiert, und das Pellet wird in PBS gelöst, das 2 mM Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> enthält. Nicht-gelöstes Material wird durch eine kurze Zentrifugation bei 15 000 Upm (Sorvall-Rotor SS34) entfernt. Dann wird die Lösung mit Con-A-Sepharose gemischt, und es wird wie oben beschrieben weiter verfahren.

**[0044]** Beim zweiten optionalen Schritt werden die gp96-haltigen Fraktionen, die von der Con-A-Säule eluiert wurden, gepoolt, und der Puffer wird gegen 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, mit 300 mM NaCl

durch Dialyse ausgetauscht oder vorzugsweise durch einen Pufferaustausch auf einer Sephadex-G25-Säule. Nach dem Pufferaustausch wird die Lösung mit DEAE-Sepharose gemischt, die zuvor mit 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, mit 300 mM NaCl äquilibriert wurde. Die Proteinlösung und die Beads werden sanft eine Stunde lang gemischt und in eine Säule gegossen. Dann wird die Säule mit 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, mit 300 mM NaCl gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm auf den Ausgangswert abfällt. Dann wird das gebundene Protein mit 5 Volumina 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, mit 700 mM NaCl von der Säule eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gepoolt und mit 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, verdünnt, um die Salzkonzentration auf 175 mM abzusenken. Das resultierende Material wird dann auf die Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit 5 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, äquilibriert wurde, und das Protein, das an die Mono-Q-FPLC-Säule (Pharmacia) bindet, wird wie zuvor beschrieben eluiert.

**[0045]** Es dürfte allerdings klar sein, dass ein Fachmann auf diesem Gebiet den Nutzen der Aufnahme des zweiten optionalen Schrittes in das Reinigungsprotokoll mittels Routineexperimenten überprüfen kann. Außerdem dürfte auch klar sein, dass der Nutzen der Aufnahme eines der beiden optionalen Schritte von der Quelle des Ausgangsmaterials abhängt.

**[0046]** Wenn die gp96-Faktion aus dem 100 000-g-Pellet isoliert wird, dann wird das Pellet in 5 Volumina PBS suspendiert, das entweder 1% Natriumdesoxycholat oder 1% Octylglucopyranosid (aber ohne das Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) enthält, und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Suspension wird 30 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert, und der resultierende Überstand wird gegen verschiedene Wechsel von PBS (auch ohne das Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) dialysiert, um das Detergens zu entfernen. Das Dialysat wird 90 Minuten bei 100 000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen, und es werden Calcium und Magnesium dem Überstand zugesetzt, so dass Endkonzentrationen von jeweils 2 mM erhalten werden. Dann wird die Probe entweder mittels des unmodifizierten oder mittels des modifizierten Verfahrens zur Isolierung des gp96-Peptid-Komplexes aus dem 100 000-g-Überstand, siehe oben, gereinigt.

**[0047]** Die gp96-Peptid-Komplexe können mittels dieses Verfahrens bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Es können ungefähr 10–20 µg gp96 aus 1 g Zellen/Gewebe isoliert werden.

#### Infektionskrankheiten

**[0048]** Bei einer alternativen Ausführungsform, bei der es gewünscht wird, einen Patienten, der unter ei-

ner Infektionskrankheit leidet, zu behandeln oder eine Infektionskrankheit zu verhindern, werden die in den Abschnitten 5.1.1–5.1.3 oben beschriebenen Verfahren verwendet, um HSP-Peptid-Komplexe aus Zellen zu isolieren, die mit einem infektiösen Organismus infiziert sind, z. B. aus einer Zelllinie oder aus Zellen eines Patienten. Zu solchen infektiösen Organismen gehören, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze und Parasiten, wie sie detailliert unten beschrieben werden.

#### 5.1.4. Isolierung antigener Moleküle aus endogenen Komplexen von HSPs oder MHC-Antigenen

**[0049]** Es wurde gefunden, dass antigene Peptide und/oder Komponenten aus endogenen, in vivo vorliegenden HSP-Komplexen entweder in Gegenwart von ATP oder bei niedrigem pH eluiert werden können. Diese experimentellen Bedingungen können eingesetzt werden, um Peptide und/oder antigene Komponenten aus Zellen zu isolieren, die potentiell nützliche antigene Determinanten enthalten können. Nach der Isolierung kann die Aminosäuresequenz eines jeden antigenen Peptids mittels herkömmlicher Techniken zur Bestimmung der Aminosäuresequenz analysiert werden. Solche antigenen Moleküle können dann über eine chemische Synthese oder mittels gentechnologischer Verfahren erzeugt, gereinigt und in vitro mit HSPs komplexiert werden.

**[0050]** Ähnlich wurde gefunden, dass potentiell immunogene Peptide aus MHC-Peptid-Komplexen mittels Techniken, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, eluiert werden können (Falk K. et al., 1990, Nature 348: 248–251; Elliott T. et al., 1990, Nature 348: 195–197; Falk, K. et al., 1991, Nature 351: 290–296).

**[0051]** Somit können potentiell immunogene oder antigene Peptide entweder aus endogenen Komplexen aus Stressproteinen und Peptiden oder aus endogenen Komplexen aus MHC und Peptiden für die anschließende Verwendung als antigene Moleküle, bei der sie in vitro an HSPs komplexiert werden, isoliert werden. Beispielhafte Protokolle zur Isolierung von Peptiden und/oder antigenen Komponenten aus diesen beiden Komplexen werden im folgenden dargelegt.

##### 5.1.4.1. Peptide aus Komplexen aus Stressprotein und Peptid

**[0052]** Es können zwei Verfahren eingesetzt werden, um das Peptid aus einem Komplex aus Stressprotein und Peptid zu eluieren. Ein Ansatz beinhaltet die Inkubation des Komplexes aus Stressprotein und Peptid in Gegenwart von ATP. Der andere Ansatz beinhaltet die Inkubation des Komplexes in einem Puffer mit niedrigem pH.

**[0053]** Es wird, um das ganze kurz zusammenzu-

fassen, der interessierende Komplex durch eine Centricon-10-Einheit (Millipore) zentrifugiert, um möglicherweise vorhandenes Material mit niedrigem Molekulargewicht, das locker mit dem Komplex assoziiert ist, zu entfernen. Die Fraktion mit dem hohen Molekulargewicht kann entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert werden, während die mit dem niedrigem Molekulargewicht wie unten beschrieben mittels HPLC analysiert werden kann. Beim Protokoll mit der ATP-Inkubation wird der Komplex aus Stressprotein und Peptid in der Fraktion mit dem hohen Molekulargewicht 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mM ATP inkubiert. Beim Protokoll mit dem niedrigen pH wird dem Komplex aus dem Stressprotein und dem Peptid Essigsäure oder Trifluoressigsäure zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 10% (Vol./Vol.) erreicht wird, und die Mischung wird bei Raumtemperatur, in einem Bad mit kochendem Wasser oder bei einer beliebigen Temperatur dazwischen 10 min inkubiert (siehe van Bleek et al., 1990, Nature 348: 213–216; und Li et al., 1993, EMBO Journal 12: 3143–3151).

**[0054]** Die resultierenden Proben werden durch eine Centricon-10-Einheit wie oben erwähnt zentrifugiert. Die Fraktionen mit dem hohen und dem niedrigen Molekulargewicht werden gesammelt. Die noch vorhandenen hochmolekularen Komplexe aus Stressprotein und Peptid können erneut mit ATP oder bei niedrigem pH inkubiert werden, um alle noch vorhandenen Peptide zu entfernen.

**[0055]** Die resultierenden niedermolekularen Fraktionen werden gepoolt, durch Eindampfen konzentriert und in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Das gelöste Material wird dann mittels Reverse-Phase-Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) T unter Einsatz von beispielsweise einer VYDAC-CIB-Reverse-Phase-Säule, die mit 0,1% TFA äquilibriert wurde, fraktioniert. Das gebundene Material wird dann bei einer Flussgeschwindigkeit von ungefähr 0,8 ml/min durch das Entwickeln der Säule mit einem linearen Gradienten von 0 bis 80% Acetonitril in 0,1% TFA eluiert. Die Elution der Peptide kann über die Bestimmung der  $E_{210}$  verfolgt werden, und die Fraktionen, die die Peptide enthalten, werden gesammelt.

#### 5.1.4.2. Peptide aus MHC-Peptic-Komplexen

**[0056]** Die Isolierung potentiell immunogener Peptide aus MHC-Molekülen ist in diesem Fachgebiet gut bekannt, und deshalb wird sie hier nicht detailliert beschrieben (siehe Falk et al., 1990, Nature 348: 248–251; Rotzsche et al., 1990, Nature 348: 252–254; Elliott et al., 1990, Nature 348: 191–197; Falk et al., 1991, Nature 351: 290–296; Demotz et al., 1989, Nature 343: 682–684; Rotzsche et al., 1990, Science 249: 283–287).

**[0057]** Es können, um das ganze kurz zusammen-

zufassen, MHC-Peptid-Komplexe über ein herkömmliches Immunaffinitäts-Verfahren isoliert werden. Die Peptide können dann aus dem MHC-Peptid-Komplex über das Inkubieren des Komplexes in Gegenwart von ungefähr 0,1% TFA in Acetonitril eluiert werden. Die eluierten Peptide können fraktioniert werden und wie oben über eine Reverse-Phase-HPLC gereinigt werden.

**[0058]** Die Aminosäuresequenzen der eluierten Peptide können entweder über manuelle oder über automatisierte Techniken der Aminosäuresequenzierung, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, bestimmt werden. Sobald die Aminosäuresequenz eines potentiell schützenden Peptids bestimmt worden ist, kann das Peptid in jeder gewünschten Menge mittels herkömmlicher Peptidsyntheseprotokolle oder anderer Protokolle, die in diesem Gebiet gut bekannt sind, synthetisiert werden.

**[0059]** Peptide, die die gleiche Aminosäuresequenz wie diejenigen aufweisen, die oben isoliert wurden, können mittels Festphasenpeptidsynthesen unter Einsatz von Verfahren, die denjenigen ähnlich sind, die von Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 beschrieben wurden, synthetisiert werden. Während der Synthese werden N- $\alpha$ -geschützte Aminosäuren, die geschützte Seitenketten aufweisen, schrittweise zu einer wachsenden Polypeptidkette gegeben, die über ihr C-terminales Ende an einen unlöslichen polymeren Träger, d. h. an Polystyrolkugelchen, geknüpft ist. Die Peptide werden synthetisiert, indem eine Aminogruppe einer Aminosäure mit abgespalterner N- $\alpha$ -Schutzgruppe an eine  $\alpha$ -Carboxygruppe einer N- $\alpha$ -geschützten Aminosäure geknüpft wird, die durch die Reaktion mit einem Reagens wie Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wurde. Die Befestigung einer freien Aminogruppe an der aktivierte Carboxygruppe führt zur Bildung einer Peptidbindung. Zu den am häufigsten eingesetzten N- $\alpha$ -Schutzgruppen gehört Boc, das säurelabil ist, und Fmoc, das alkalilabil ist.

**[0060]** Es wird, um das ganze kurz zusammenzufassen, zuerst die C-terminale, N- $\alpha$ -geschützte Aminosäure an den Polystyrolkugelchen befestigt. Die N- $\alpha$ -Schutzgruppe wird dann entfernt. Die nicht mehr geschützte  $\alpha$ -Aminogruppe wird an die aktivierte  $\alpha$ -Carboxylatgruppe der nächsten N- $\alpha$ -geschützten Aminosäure gekoppelt. Der Prozess wird wiederholt, bis das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist. Die resultierenden Peptide werden dann vom unlöslichen Polymerträger abgespalten, und die Schutzgruppen werden von den Seitenketten abgespalten. Längere Peptide können über die Kondensation geschützter Peptidfragmente erhalten werden. Details bezüglich geeigneter Chemien, Harze, Schutzgruppen, geschützter Aminosäuren und Reagenzien sind in diesem Fachgebiet gut bekannt, und sie werden deshalb hier nicht detailliert diskutiert (siehe Atherton

et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, und Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2. Auflage, Springer-Verlag).

**[0061]** Die Reinigung der resultierenden Peptide wird mittels herkömmlicher Verfahren erreicht, wie einer präparativen HPLC mittels Gelpermeation, Verteilungs- und/oder Ionenaustausch-Chromatographie. Die Wahl der geeigneten Matrices und Puffer ist in diesem Fachgebiet gut bekannt und wird deshalb hier nicht detailliert beschrieben.

#### 5.1.5. Exogene antigene Moleküle

**[0062]** Antigene oder antigenen Teile von diesen können für die Verwendung als antigenen Moleküle für die Komplexierung mit HSPs aus denjenigen, die in diesem Gebiet bekannt sind, oder von denen mittels Immunoassay bestimmt wurde, dass sie fähig sind, an Antikörper oder MHC-Moleküle zu binden (Antigenität) oder Immunreaktionen zu erzeugen (Immunogenität), ausgewählt werden. Zur Bestimmung der Immunogenität oder Antigenität über den Nachweis der Bindung an einen Antikörper können verschiedene Immunoassays, die in diesem Gebiet bekannt sind, verwendet werden, zu denen, ohne auf sie beschränkt zu sein, kompetitive und nicht-kompetitive Assaysysteme gehören, wie Radioimmunoassays, ELISA (Enzym linked immunosorbent assay), „Sandwich“-Immunoassays, immunradiometrische Assays, Geldiffusion-Präzipitin-Reaktionen, Immundiffusionsassays, In-vivo-Immunoassays (unter Verwendung von beispielsweise kolloidalem Gold, Enzym- oder Radioisotopmarkierungen), Western Blots, Immunpräzipitationsreaktionen, Agglutinierungsassays (z. B. Gelagglutinierungsassays, Hämagglutinierungsassays), Komplementfixierungsassays, Immunfluoreszenzassays, Protein-A-Assays und Immunelektrophoreseassays etc. Bei einer Ausführungsform wird die Antikörperbindung über den Nachweis einer Markierung auf dem primären Antikörper nachgewiesen. Bei einer weiteren Ausführungsform wird der primäre Antikörper über den Nachweis der Bindung eines sekundären Antikörpers oder eines Reagens an den primären Antikörper nachgewiesen. Bei noch einer weiteren Ausführungsform ist der sekundäre Antikörper markiert. Zahlreiche Verfahren sind in diesem Gebiet für den Nachweis der Bindung in einem Immunoassay bekannt und werden für den Einsatz in Betracht gezogen. Bei einer Ausführungsform zum Nachweis der Immunogenität können T-Zell-vermittelte Reaktionen mittels Standardverfahren getestet werden, z. B. mit In-vitro-Zytotoxizitätstests oder In-vivo-Assays auf eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp.

**[0063]** Potentiell nützliche Antigene oder Derivate von diesen für die Verwendung als antigenen Moleküle können auch über verschiedene Kriterien identifiziert

werden, wie die Beteiligung des Antigens an der Neutralisierung der Infektiosität eines Pathogens (wobei es gewünscht wird, eine Infektion durch ein derartiges Pathogen zu behandeln oder zu verhindern (Norrby, 1985, Summary, in Vaccines 85, Lerner et al. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, S. 388–389), die Typ- oder Gruppenspezifität, die Erkennung durch Antiseren oder Immunzellen von Patienten und/oder den Nachweis von Schutzwirkungen von Antiseren oder Immunzellen, die für das Antigen spezifisch sind. Außerdem sollte, wenn es gewünscht wird, eine Krankheit, die durch ein Pathogen verursacht wird, zu behandeln oder zu verhindern, das vom Antigen codierte Epitop vorzugsweise nur eine geringe oder keine Veränderung der Antigenität mit der Zeit oder bezüglich verschiedener Isolate des gleichen Pathogens zeigen.

**[0064]** Vorzugsweise werden, wenn es gewünscht wird, Krebs zu behandeln oder zu verhindern, bekannte tumorspezifische Antigene oder Fragmente oder Derivate von diesen verwendet. Zum Beispiel gehören zu derartigen tumorspezifischen oder tumrossozierten Antigenen, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, das KS-1/4-Pan-Karzinom-Antigen (Perez und Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662–3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407–415); das Ovarialkarzinom-Antigen (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51 (2): 468–475); das saure Phosphat der Prostata (Tailer et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18 (16): 4928); das prostataspezifische Antigen (Henttu und Vihko, 1989; Biochem. Biophys. Res. Comm. 160 (2): 903–910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53: 227–230); das Melanom-assoziierte Antigen p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81 (6): 445–446); das Melanom-Antigen gp75 (Vijayasar-dahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171 (4): 1675–1380); das hochmolekulare Melanom-Antigen (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55–63) und das prostataspezifische Membranantigen gehören.

**[0065]** Bei einer spezifischen Ausführungsform wird ein Antigen oder ein Fragment oder Derivat davon, das spezifisch für einen bestimmten Tumor ist, für die Komplexierung mit HSP und die anschließende Sensibilisierung von APC ausgewählt.

**[0066]** Vorzugsweise werden, wenn es gewünscht wird, Viruserkrankungen zu behandeln oder zu verhindern, Moleküle als antigenen Moleküle ausgewählt, die Epitope bekannter Viren aufweisen. Zum Beispiel können derartige antigenen Epitope aus Viren präpariert werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, das Hepatitis-A-Virus, das Hepatitis-B-Virus, das Hepatitis-C-Virus, das Grippe-Virus, das Varicella-Virus, das Adenovirus, das Herpes-Simplex-Virus vom Typ I (HSV-1), das Herpes-Simplex-Virus vom Typ II (HSV-II), das Rinderpest-Virus, das Rhinovirus, das Echovirus, das Rotavirus, das Respiratory syncytial virus, das Papillomvi-

rus, das Papovavirus, das Cytomegalovirus, das Echinovirus, das Arbovirus, das Huntavirus, das Coxackie-Virus, das Mumpsvirus, das Masernvirus, das Rubellavirus, das Poliovirus, das Human immunodeficiency virus vom Typ I (HIV-I) und das Human immunodeficiency virus vom Typ II (HIV-II) gehören. Vorzugsweise werden, wenn es gewünscht wird, bakterielle Infektionen zu behandeln oder zu verhindern, Moleküle verwendet, die Epitope bekannter Bakterien aufweisen. Zum Beispiel können derartige antigene Epitope aus Bakterien ausgewählt werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Mycobacteria rickettsia, Mycoplasma, Neisseria und Legionella gehören.

**[0067]** Vorzugsweise werden, wenn es gewünscht wird, Protozoeninfektionen zu behandeln oder zu verhindern, Moleküle als antigene Moleküle verwendet, die Epitope bekannter Protozoen aufweisen. Zum Beispiel können derartige antigene Epitope aus Protozoen präpariert werden, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Leishmanien, Kokzidien und Trypanosomen gehören.

**[0068]** Vorzugsweise werden, wenn es gewünscht wird, Parasiteninfektionen zu behandeln oder zu verhindern, Moleküle als antigene Moleküle verwendet, die Epitope bekannter Parasiten aufweisen. Zum Beispiel können derartige antigene Epitope von Parasiten stammen, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Chlamydia und Rickettsia gehören.

## 5.2. In-vitro-Erzeugung von Komplexen aus Stressproteinen und antigenen Molekülen

**[0069]** Bei einer Ausführungsform, bei der Komplexe von HSPs und den Peptiden, mit denen sie endogen in vivo assoziiert sind, nicht eingesetzt werden, werden Komplexe von HSPs mit antigenen Molekülen in vitro erzeugt. Wie es für einen Fachmann auf diesem Gebiet klar sein dürfte, können die Peptide, die entweder mittels der zuvor erwähnten Verfahren isoliert oder chemisch synthetisiert oder gentechnologisch erzeugt wurden, mit einer Vielzahl natürlicher gereinigter oder rekombinanter Stressproteine in vitro rekonstituiert werden, so dass immunogene, nicht-kovalente Komplexe von Stressproteinen und antigenen Molekülen erzeugt werden. Alternativ können exogene Antigene oder antigenen/immunogene Fragmente oder Derivate von diesen für die Verwendung in den immuntherapeutischen oder prophylaktischen Impfstoffen der Erfindung nicht-kovalent mit Stressproteinen komplexiert werden. Ein bevorzugtes, beispielhafte Protokoll für die nicht-kovalente Komplexierung eines Stressproteins mit einem antigenen Molekül in vitro wird unten diskutiert.

**[0070]** Vor der Komplexierung werden die HSPs mit ATP oder niedrigem pH vorbehandelt, um möglicherweise vorhandene Peptide, die mit dem interessie-

renden HSP assoziiert sein könnten, zu entfernen. Wenn das ATP-Verfahren verwendet wird, dann wird überschüssiges ATP durch die Zugabe von Apyranase aus der Präparation entfernt, wie es von Levy et al., 1991, Cell 67: 265–274 beschrieben wurde. Wenn das Verfahren des niedrigen pH verwendet wird, dann wird der Puffer durch den Zusatz von pH-modifizierenden Reagenzien auf einen neutralen pH-Wert eingestellt.

**[0071]** Die antigenen Moleküle (1 µg) und das vorbehandelte HSP (9 µg) werden so gemischt, dass ein Molverhältnis von antigenem Molekül zu Stressprotein von ungefähr 5 : 1 erhalten wird. Dann wird die Mischung 15 Minuten bis 3 Stunden bei 4–45°C in einem geeigneten Bindungspuffer inkubiert, beispielsweise einem, der 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 350 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthält. Die Präparationen werden durch eine Centricon-10-Anordnung (Millipore) zentrifugiert, um möglicherweise vorhandene ungebundene Peptide zu entfernen. Die Assoziation der Peptide mit den Stressproteinen kann mittels SDS-PAGE geprüft werden. Das ist das bevorzugte Verfahren für die In-vitro-Komplexierung von Peptiden, die aus MHC-Peptid-Komplexen von Peptiden isoliert wurden, die von endogenen HSP-Peptid-Komplexen abstammten.

**[0072]** Bei einer alternativen Ausführungsform der Erfindung, die für die Erzeugung von Komplexen von HSP70 mit exogenen antigenen Molekülen, wie Proteinen, bevorzugt wird, werden 5–10 µg gereinigtes HSP mit äquimolaren Mengen des antigenen Moleküls in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ADP in einem Volumen von 10 µl 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationsmischung wird weiter mit Phosphatgepufferter Saline auf 1 ml verdünnt.

**[0073]** Bei einer alternativen Ausführungsform der Erfindung, die für die Erzeugung von Komplexen von gp96 oder HSP90 mit Peptiden bevorzugt wird, werden 5–10 µg gereinigtes gp96 oder HSP90 mit äquimolaren oder größeren Mengen des antigenen Peptids in einem geeigneten Puffer, beispielsweise einem, der 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, 0,5 M NaCl und 3 mM MgCl<sub>2</sub> enthält, 5–20 Minuten bei 60–65°C inkubiert. Diese Inkubationsmischung lässt man auf Raumtemperatur abkühlen, und dann wird sie mehr als einmal, wenn es erforderlich ist, durch eine Centricon-10-Einheit (Millipore) zentrifugiert, um möglicherweise vorhandenes, nicht-gebundenes Peptid zu entfernen.

**[0074]** Nach der Komplexierung können die Komplexe aus dem Stressprotein und dem antigenen Molekül gegebenenfalls in vitro bezüglich ihrer Immunogenität getestet werden, wozu z. B. der Mixed lymphocyte target cell assay (MLTC), der unten be-

schrieben wird, verwendet wird.

#### 5.2.1. Bestimmung der Immunogenität von Komplexen aus Stressprotein und Peptid

**[0075]** Die gereinigten Komplexe aus dem Stressprotein und dem antigenen Molekül können gegebenenfalls vor ihrem Einsatz zur Sensibilisierung von APC mittels des Mixed lymphocyte target culture assay (MLTC), der in diesem Fachgebiet gut bekannt ist, bezüglich ihrer Immunogenität getestet werden. Es sollte klar sein, dass dieses Verfahren vollkommen optional und für die Durchführung der Erfindung nicht notwendig ist.

**[0076]** Es kann beispielsweise, ohne dass es als Einschränkung verstanden werden sollte, das folgende Verfahren verwendet werden. Es werden, um das ganze kurz zusammenzufassen, die zu testenden Komplexe aus dem Stressprotein und dem antigenen Molekül Mäusen subkutan injiziert. Anderen Mäusen werden entweder anderen Komplexe aus Stressprotein und Peptid oder ganze infizierte Zellen injiziert, und sie dienen als Positivkontrollen für den Test. Die Injektionen werden zweimal im Abstand von 7–10 Tagen verabreicht. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung werden die Milzen entnommen und die Lymphozyten freigesetzt. Die freigesetzten Lymphozyten können anschließend erneut in vitro durch den Zusatz von toten Zellen, die den interessierenden Komplex exprimierten, stimuliert werden.

**[0077]** Zum Beispiel können  $8 \times 10^6$  Immun-Milzzellen mit  $4 \times 10^4$  Mitomycin-C-behandelten oder  $\gamma$ -bestrahlten (5–10 000 rad) infizierten Zellen (oder, je nachdem, Zellen, die mit einem geeigneten Gen transfiziert wurden) in 3 ml RPMI-Medium, das 10% fötales Kälberserum enthält, stimuliert werden. In bestimmten Fällen können im Kulturmedium als Quelle für T-Zell-Wachstumsfaktoren 33% eines Überstandes sekundärer gemischter Lymphozytenkulturen enthalten sein (siehe Glasebrook et al., 1980, J. Exp. Med. 151: 876). Zur Testung der primären Reaktion der zytotoxischen T-Zellen nach der Immunisierung können Milzzellen ohne Stimulierung kultiviert werden. Bei bestimmten Experimenten können Milzzellen der immunisierten Mäuse auch mit Zellen, die bezüglich ihrer Antigenität anders sind, restimuliert werden, um die Spezifität der Reaktion der zytotoxischen T-Zellen zu bestimmen.

**[0078]** Sechs Tage später werden die Kulturen in einem 4-stündigen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay bezüglich der Zytotoxizität getestet (siehe Palladino et al., 1987, Cancer Res. 47: 5074–5079 und Blachere et al., 1993, J. Immunotherapy 14: 352–356). Bei diesem Test wird die gemischte Lymphozytenkultur einer Suspension von Targetzellen so zugesetzt, dass unterschiedliche Verhältnisse von Effektor : Target (E : T) (üblicherweise 1 : 1 bis 40 : 1) erhalten werden.

Die Targetzellen werden durch das Inkubieren von  $1 \times 10^6$  Targetzellen in Kulturmedium, das 200 mCi  $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$  enthält, eine Stunde bei 37°C vormarkiert. Die Zellen werden nach der Markierung dreimal gewaschen. Jeder Testpunkt (E : T-Verhältnis) wird dreifach bestimmt, und es werden die geeigneten Kontrollen mitgeführt, um die spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (kein Zusatz von Lymphozyten zum Test) und die 100%ige Freisetzung (Zellen mit Detergens lysiert) zu bestimmen. Nach der Inkubation der Zellmischungen für 4 Stunden werden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 200 g pelletiert. Die Menge des in den Überstand freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  wird mit einem Gamma-Zähler bestimmt. Die prozentuale Zytotoxizität wird als cpm in der Testprobe minus der spontan freigesetzten cpm, geteilt durch die gesamten, durch das Detergens freigesetzten cpm minus der spontan freigesetzten cpm gemessen.

**[0079]** Zur Blockierung der MHC-Klasse-I-Kaskade wird ein konzentrierter Hybridom-Überstand, der von K-44-Hybridomzellen (einen Anti-MHC-Klasse-I-Hybridom) gewonnen wurde, den Testproben in einer Endkonzentration von 12,5% zugesetzt.

#### 5.3. Gewinnung von Markophagen und antigenpräsentierenden Zellen

**[0080]** Die antigenpräsentierenden Zellen, zu denen, ohne auf sie beschränkt zu sein, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen gehören, werden vorzugsweise in vitro über eine Erzeugung aus Stammzellen und Vorläuferzellen aus menschlichem peripherem Blut oder Knochenmark erhalten, wie es von Inaba, K. et al., 1992, J. Exp. Med. 176: 1693–1702, beschrieben wurde.

**[0081]** APC können mittels einer beliebigen der verschiedenen in diesem Gebiet bekannten Techniken erhalten werden. Bei einem bevorzugten Aspekt werden humane Makrophagen verwendet, die aus menschlichen Blutzellen erhalten werden. Beispielsweise können, ohne dass es als Einschränkung verstanden werden soll, Makrophagen wie folgt erhalten werden:

Mononukleäre Zellen werden aus dem peripheren Blut eines Patienten (vorzugsweise des Patienten, der behandelt werden soll) durch eine Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation isoliert.

**[0082]** Gewebekulturplatten werden mit dem eigenen Serum des Patienten oder mit einem anderen humanen AB<sup>+</sup>-Serum vorbeschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die nicht-anhaftenden Zellen werden mit einer Pipette entfernt. Zu den anhaften Zellen, die auf der Platte übrig bleiben, wird kaltes (4°C) 1 mM EDTA in Phosphat-gepufferter Saline gegeben, und die Platten werden 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen werden geerntet, mit RPMI-Puffer gewaschen und in RP-

MI-Puffer suspendiert. Höhere Zahlen von Makrophagen können durch das Inkubieren bei 37°C mit dem Macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) erhalten werden; höhere Zahlen von dendritischen Zellen können durch das Inkubieren mit dem Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) erhalten werden, wie es detailliert von Inaba, I. et al., 1992, J. Exp. Med. 176: 1693–1702, beschrieben wurde.

#### 5.4. Sensibilisierung von Makrophagen und antigen-präsentierenden Zellen mit HSP-Komplexen

**[0083]** APC werden mit HSP, das nicht-kovalent an antigene Moleküle gebunden ist, sensibilisiert, indem die Zellen in vitro mit den Komplexen inkubiert werden. Die APC werden mit Komplexen von HSPs und antigenen Molekülen sensibilisiert, indem sie in vitro mit dem HSP-Komplex 15 Minuten bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Beispielsweise können, ohne dass es als Einschränkung verstanden werden soll,  $4 \times 10^7$  Makrophagen mit 10 Mikrogramm gp96-Peptid-Komplexen pro ml oder 100 Mikrogramm HSP90-Peptid-Komplexen pro ml für 15 Minuten bis 24 Stunden bei 37°C in 1 ml reinem RPMI-Medium inkubiert werden. Die Zellen werden dreimal gewaschen und in einem vorzugsweise sterilen physiologischen Medium in einer passenden Konzentration (z. B.  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) für die Infusion in einen Patienten resuspendiert. Vorzugsweise ist der Patient, dem die sensibilisierten ACPs infundiert werden, der Patient, aus dem die APC ursprünglich isoliert wurden (autologe Ausführungsform).

**[0084]** Gegebenenfalls kann die Fähigkeit der sensibilisierten APC zur Stimulierung z. B. der antigenspezifischen, auf die Klasse I beschränkten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) über ihre Fähigkeit, die CTLs zur Freisetzung des Tumornekrosefaktors zu stimulieren, und über ihre Fähigkeit, als Targets derartiger CTLs zu dienen, verfolgt werden, wie es im Beispiel 6 unten beschrieben wird.

#### 5.5. Reinfusion sensibilisierter APC

**[0085]** Die HSP-sensibilisierten Makrophagen und andere APC werden dem Patienten systemisch, vorzugsweise intravenös, mittels herkömmlicher klinischer Verfahren reinfundiert. Diese aktivierte Zellen werden reinfundiert, vorzugsweise über die systemische Verabreichung an den autologen Patienten. Die Patienten erhalten im allgemeinen ungefähr  $10^6$  bis ungefähr  $10^{12}$  sensibilisierte Makrophagen, in Abhängigkeit vom Zustand des Patienten. Bei einigen Verabreichungsschemata können die Patienten gegebenenfalls zusätzlich eine geeignete Dosis eines Modifikators der biologischen Reaktion, zu denen, ohne auf sie beschränkt zu sein, die Cytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF oder andere Cytokin-Wachstumsfaktoren gehören, erhalten.

#### 5.6. Infektionskrankheiten als Targets

**[0086]** Infektionskrankheiten, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, werden durch infektiöse Agenzen hervorgerufen, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Parasiten gehören.

**[0087]** Zu Viruserkrankungen, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, gehören, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, diejenigen, die durch das Hepatitis-A-Virus, das Hepatitis-B-Virus, das Hepatitis-C-Virus, das Grippe-Virus, das Varicella-Virus, das Adenovirus, das Herpes-Simplex-Virus vom Typ I (HSV-I), das Herpes-Simplex-Virus vom Typ II (HSV-II), das Rinderpest-Virus, das Rhinovirus, das Echovirus, das Rotavirus, das Respiratory syncytial virus, das Papillomvirus, das Papovavirus, das Cytomegalovirus, das Echinovirus, das Arbovirus, das Huntavirus, das Coxsackie-Virus, das Mumpsvirus, das Masernvirus, das Rubellavirus, das Poliovirus, das Human immunodeficiency virus vom Typ I (HIV-I) und das Human immunodeficiency virus vom Typ II (HIV-II) verursacht werden.

**[0088]** Bakterielle Erkrankungen, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, werden von Bakterien verursacht, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Mycobacteria rickettsia, Mycoplasma, Neisseria und Legionella gehören.

**[0089]** Protozoenerkrankungen, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, werden von Protozoen verursacht, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Leishmanien, Kokzidien und Trypanosomen gehören.

**[0090]** Parasitenerkrankungen, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, werden von Parasiten verursacht, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Chlamydia und Rickettsia gehören.

#### 5.7. Krebsformen als Targets

**[0091]** Zu Krebsformen, die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt oder verhindert werden können, gehören, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, humane Sarkome und Karzinome, z. B. das Fibrosarkom, das Myxosarkom, das Liposarkom, das Chondrosarkom, das osteogene Sarcoma, das Chordom, das Angiosarkom, das Endothelsarkom, das Lymphangiosarkom, das Lymphangiomyoendothelsarkom, das Synoviom, das Mesotheliom, Ewings-Tumor, das Leiomyosarkom, das Rhabdomyosarkom, das Dickdarmkarzinom, der Pankre-

askrebs, der Brustkrebs, der Ovarialkrebs, der Prostatakrebs, das Plattenepithelkarzinom, das Basalzellkarzinom, das Adenokarzinom, das Schweißdrüsencarcinom, das Talgdrüsencarcinom, die papilläre Karzinom, papilläre Adenokarzinome, das Cystadenokarzinom, das medulläre Karzinom, das bronchogene Karzinom, das Nierenzellkarzinom, das Hepatom, das Gallengangskarzinom, das Chorionkarzinom, das Seminom, das Embryonalkarzinom, Wilms Tumor, Zervixkrebs, Hodenkrebs, das Lungenkarzinom, das kleinzellige Lungenkarzinom, das Blasenkarzinom, das Epithelkarzinom, das Gliom, das Astrozytom, das Medulloblastom, das Craniopharyngiom, das Ependymom, das Pinealom, das Hämangioblastom, das Akustikusneurom, das Oligodendroglom, das Meningiom, das Melanom, das Neuroblastom, das Retinoblastom; Leukämien, z. B. die akute lymphozytische Leukämie und die akute myelozytische Leukämie (myeloblastisch, promyelozytisch, myelomonozytisch, monozytisch und erythroleukämisch); die chronische Leukämie (chronische myelozytische (granulozytische) Leukämie und chronische lymphozytische Leukämie) und Polycythaemia vera, das Lymphom (Hodgkin-Krankheit und Non-Hodgkin-Lymphome), das multiple Myelom, Waldenströms Makroglobulinämie und die Hy<sup>-2</sup>-Kettenkrankheit. Spezifische Beispiele derartiger Krebsformen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 5.7.1. Kolorektaler Krebs mit Metastasen in der Leber

**[0092]** 1992 wurde bei ungefähr 150 000 Amerikanern die Diagnose kolorektaler Krebs gestellt, und mehr als 60 000 starben als Folge von kolorektalen Metastasen. Zum Zeitpunkt ihres Todes haben 80% der Patienten mit kolorektalem Krebs eine metastatische Erkrankung, die die Leber betrifft, und die Hälfte dieser Patienten zeigt keine Anzeichen weiterer (extrahepatischer) Metastasen. Die meisten metastatischen Tumoren der Leber stammen von gastrointestinalen Primärtumoren ab. Uglücklicherweise ist die Prognose bei metastatischen Leberschäden ernst, und systemische chemotherapeutische Behandlungsschemata haben sich als unfähig zur Bewirkung einer signifikanten Ansprechhäufigkeit oder zur Änderung der Überlebensdauer erwiesen (Drebin, J. A. et al., in Current Therapy in Oncology, Hrsg. J. E. Niederhuber, B. C. Decker, Mosby, 1993, S. 426).

**[0093]** Der kolorektale Krebs breitet sich zunächst auf regionale Lymphknoten und dann über die portale venöse Zirkulation auf die Leber aus, die das häufigsten viszerale Organ für Metastasen darstellt. Die Symptome, die dazu führen, dass Patienten mit kolorektalem Krebs einen Arzt aufsuchen, hängen von der anatomischen Lokalisation des Schadens ab. Beispielsweise führen Schäden im aufsteigenden Dickdarm häufig zu Geschwüren, was zu einem chronischen Blutverlust in den Stuhl führt.

**[0094]** Eine radikale Resektion bietet bei Patienten mit invasivem kolorektalem Krebs das größte Heilungspotential. Vor dem chirurgischen Eingriff wird der CEA-Titer bestimmt. Eine Strahlentherapie und eine Chemotherapie werden bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Krebs eingesetzt. Die Ergebnisse mit chemotherapeutischen Mitteln (z. B. 5-Fluoruracil) sind gemischt, und bei weniger als 25% der Patienten kommt es zu einer mehr als 50%igen Reduktion der Tumormasse (Richards, 2d., F. et al., 1986, J. Clin. Oncol. 4: 565).

**[0095]** Patienten mit weitverbreiteten Metastasen haben schlechte Überlebenschancen, und eine systemische Chemotherapie zeigt bei dieser Gruppe von Patienten nur geringe Wirkungen. Außerdem ist eine systemisch verabreichte Chemotherapie häufig durch die Schwere der toxischen Wirkungen, die mit den verschiedenen Mitteln assoziiert sind, beispielsweise schwerer Durchfall, Mucositis und/oder Myelosuppression, begrenzt. Andere Techniken, zu denen eine Bestrahlung der Leber, eine systemische Chemotherapie, eine hepatische arterielle Ligation, eine Tumorembolezierung und eine Immuntherapie gehören, wurden alle untersucht, aber sie haben sich zum größten Teil als ineffektiv bezüglich der Verlängerung des Überlebens der Patienten erwiesen.

**[0096]** Bei einer spezifischen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Verstärkung der tumorspezifischen Immunität bei Individuen, die unter kolorektalem Krebs, der Lebermetastasen gebildet hat, leiden, zur Hemmung der Progression der neoplastischen Erkrankung bereit. Bevorzugte Verfahren zur Behandlung dieser neoplastischen Erkrankungen umfassen die Verabreichung einer Zusammensetzung aus autologen Makrophagen, die mit HSP, das nicht-kovalent an Peptid-Komplexe gebunden ist, stimuliert wurden, was eine tumorspezifische Immunität gegen die Tumorzellen hervorruft. Bei einer spezifischen Ausführungsform werden die erfindungsgemäß HSP-stimulierten APC dazu verwendet, das Wachstum von Leberkrebs bei Krebspatienten zu hemmen, ohne dass eine Toxizität verursacht wird.

**[0097]** Dementsprechend werden als ein Beispiel für das erfindungsgemäß Verfahren einem Patienten, für den die Diagnose kolorektaler Krebs, mit oder ohne Lebermetastasen, gestellt wurde, über eine intravenöse Injektion HSP-stimulierte APC verabreicht.

#### 5.7.2. Hepatozelluläres Karzinom

**[0098]** Das hepatzelluläre Karzinom ist in den Vereinigten Staaten im allgemeinen eine Erkrankung älterer Menschen. Zwar können viele Faktoren zum hepatzellulären Karzinom führen, aber üblicherweise ist die Erkrankung auf Personen mit einer bereits bestehenden Lebererkrankung beschränkt. Ungefähr

60 bis 80% der Patienten in den Vereinigten Staaten mit hepatzellulärem Karzinom haben eine zirrhotische Leber, und ungefähr 4% der Individuen mit einer zirrhotischen Leber entwickeln schließlich ein hepatzelluläres Karzinom (Niederhuber, J. E. (Hrsg.), 1993, Current Therapy in Oncology, B. C. Decker, Mosby). Das Risiko ist am höchsten bei Patienten, deren Lebererkrankung durch eine vererbte Hämochromatose oder über eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verursacht ist (Bradbear, R. A. et al., 1985, J. Natl. Cancer Inst. 75: 81; Beasley, R. P. et al., 1981, Lancet 2: 1129). Zu weiteren Ursachen für eine Leberzirrhose, die zu einem hepatzellulären Karzinom führen können, gehören ein Alkoholmissbrauch und eine Leberfibrose, die durch die chronische Verabreichung von Methotrexat verursacht wird. Die häufigsten Symptome bei einem hepatzellulären Karzinom sind die Entwicklung einer schmerzenden Masse im rechten oberen Quadranten oder Epigastrium, die von einem Gewichtsverlust begleitet ist. Bei Patienten mit einer Zirrhose geht der Entwicklung eines hepatzellulären Karzinoms ein Aszites, ein portaler Bluthochdruck und eine relativ abrupte klinische Verschlechterung voran. In den meisten Fällen werden anormale Werte bei Standard-Leberfunktions-tests, z. B. der Serum-Aminotransferase und der alkalischen Phosphatase, beobachtet.

**[0099]** CT-Scans der Leber werden zur Bestimmung der anatomischen Lokalisation des hepatzellulären Karzinoms eingesetzt, und sie liefern auch eine Orientierung für eine perkutane Nadelbiopsie. Ungefähr 70% der Patienten mit einem hepatzellulären Karzinom haben einer erhöhte Konzentration des alpha-Fötoproteins im Serum (McIntire, K. R. et al, 1975, Cancer Res. 35: 991), und dessen Konzentration korreliert mit dem Ausmaß der Erkrankung.

**[0100]** Eine radikale Resektion bietet die einzige Heilungschance bei Patienten mit einem hepatzellulären Karzinom. Derartige Operationsverfahren sind mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 12 bis 30% assoziiert. Eine Lebertransplantation kann das Überleben bei einigen jüngeren Individuen verbessern. Jedoch sind die meisten Patienten wegen eines extensiven zirrhotischen multifokalen Tumormusters oder wegen der Knappheit kompatibler Spenderorgane keine Kandidaten für diesen chirurgischen Eingriff. Chemotherapeutische Mittel werden entweder auf dem intravenösen Weg oder über einen intrahepatischen arteriellen Katheter verabreicht. Eine derartige Therapie wird manchmal mit einer Bestrahlung der Leber kombiniert. Verringerungen der Größe der messbaren Tumoren um 50% oder mehr wurden für einige Patienten berichtet, die entweder mit systemischem Doxorubicin oder 5-Fluoruracil behandelt wurden. Die Chemotherapie induziert jedoch häufig eine Immunsuppression, sie führt nur selten dazu, dass der Tumor vollständig verschwindet, und die Dauer des Ansprechens ist kurz. Die Prognose für Patienten

mit einem hepatzellulären Karzinom ist negativ mit einer Zirrhose und Metastasen in der Luge oder den Knochen assoziiert. Das mittlere Überleben der Patienten liegt bei nur 4 bis 6 Monaten. Bei einer weiteren spezifischen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Verstärkung der spezifischen Immunität bei Individuen, die an einem hepatzellulären Karzinom leiden, bereit, um die Progression der neoplastischen Erkrankung zu hemmen und letztlich alle präneoplastischen und neoplastischen Zellen zu eliminieren.

### 5.7.3. Brustkrebs

**[0101]** Ein weiterer spezifischer Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung von Brustkrebs. Die American Cancer Society schätzte, dass 1992 bei 180 000 amerikanischen Frauen eine Brustkrebsdiagnose gestellt wurde, und dass 46 000 der Krankheit erlagen (Niederhuber, J. E., Hrsg., Current Therapy in Oncology, B. C. Decker, Mosby, 1993). Das macht Brustkrebs zur zweithäufigsten Krebstodesursache bei Frauen, gleich nach dem Lungenkrebs. Eine beunruhigende Tatsache ist die Beobachtung, dass der Brustkrebs seit 1980 um 3% pro Jahr ansteigt (Niederhuber, J. E., Hrsg. Current Therapy in Oncology, B. C. Decker, Mosby (1993)).

**[0102]** Die Behandlung von Brustkrebs umfasst derzeit chirurgische Eingriffe, eine Bestrahlung, eine Hormontherapie und/oder eine Chemotherapie. Die Erwägung von zwei Brustkrebs-Charakteristika, nämlich der Hormonrezeptoren und des Ausmaßes der Erkrankung, hat bisher bestimmt, wie Hormontherapien und eine Standarddosis-Chemotherapie aufeinander abgestimmt werden, um das Überleben zu verbessern und die Lebensqualität aufrecht zu erhalten oder zu verbessern. Viele unterschiedliche Behandlungsschemata mit mehreren Arzneimitteln werden als unterstützende Therapie bei Brustkrebspatienten eingesetzt, wobei zu diesen Schemata Kombinationen von 2-Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vinristin, Methotrexat, 5-Fluoruracil und/oder Leucovorin gehören, ohne dass sie jedoch auf diese beschränkt sind. Bei einer spezifischen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung HSP-Zusammensetzungen und Verfahren zur Verstärkung der spezifischen Immunität gegen präneoplastische und neoplastische Brustzellen bei Frauen bereit. Die vorliegende Erfindung stellt auch Zusammensetzungen und Verfahren zur Verhinderung der Entwicklung neoplastischer Zellen bei Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko und zur Hemmung der Proliferation von Krebszellen und von Metastasen bereit. Diese Zusammensetzungen können allein oder in Kombination miteinander oder mit Modifikatoren der biologischen Reaktion eingesetzt werden.

## 5.8. Autologe Ausführungsform

**[0103]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, die darauf abzielt, autologe APC, die mit autologen Komplexen aus HSP und Peptiden stimuliert wurden, zur Behandlung oder Prävention von Krebs einzusetzen, werden zwei der hartnäckigsten Hindernisse für eine Krebsimmuntherapie umgangen. Das erste ist die Möglichkeit, dass menschliche Krebsformen, wie Krebsformen bei Versuchstieren, unterschiedlich bezüglich ihrer Antigenität sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung chaperonieren HSPs antigenen Peptide der Krebszellen, von denen sie abstammen, und umgehen dieses Hindernis. Das zweite besteht darin, dass die meisten derzeitigen Ansätze für eine Krebsimmuntherapie auf die Bestimmung der von den CTL erkannten Epitopen von Krebszelllinien ausgerichtet sind. Dieser Ansatz erfordert die Verfügbarkeit von Zelllinien und CTLs gegen Krebsformen. Diese Reagenzien sind für den größten Teil der Krebskrankungen des Menschen nicht verfügbar. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, die darauf abzielt, autologe Makrophagen einzusetzen, die mit autologen Komplexen, die HSPs und Peptide umfassen, stimuliert wurden, hängt die Krebsimmuntherapie nicht von der Verfügbarkeit von Zelllinien oder CTLs ab, und sie erfordert auch nicht die Definition der antigenen Epitope auf Krebszellen. Diese Vorteile machen autologe, HSP-stimulierte APC zu attraktiven und neuartigen Immunogenen gegen Krebs.

## 5.9. Prävention und Behandlung primärer und metastatischer neoplastischer Erkrankungen

**[0104]** Es gibt viele Gründe, warum eine Immuntherapie, wie sie durch die vorliegende Erfindung bereit gestellt wird, für eine Anwendung an Krebspatienten wünschenswert ist. Erstens kann, wenn Krebspatienten immunsupprimiert sind und ein chirurgischer Eingriff unter Anästhesie mit nachfolgender Chemotherapie die Immunsuppression verschlimmern kann, diese Immunsuppression dann bei geeigneter Immuntherapie im präoperativen Zeitraum verhindert oder umgekehrt werden. Das könnte zu weniger Komplikationen durch Infektionen und zu einer beschleunigten Wundheilung führen. Zweitens ist nach einem chirurgischen Eingriff die Tumormasse minimal, und eine Immuntherapie ist in dieser Situation mit großer Wahrscheinlichkeit wirksam. Ein dritter Grund ist die Möglichkeit, dass Tumorzellen während des chirurgischen Eingriffes in die Zirkulation verstreut werden, und dass eine effektive Immuntherapie, die zu diesem Zeitpunkt eingesetzt wird, diese Zellen eliminieren kann.

**[0105]** Bei einer spezifischen Ausführungsform ziehen die erfindungsgemäß präventiven und therapeutischen Verfahren darauf ab, die Immunkompe-

tenz des Krebspatienten entweder vor dem chirurgischen Eingriff, bei oder nach dem chirurgischen Eingriff zu verstärken und eine tumorspezifische Immunität gegen Krebszellen zu induzieren, wobei das Ziel eine Hemmung des Krebses ist, und wobei das letztendliche klinische Ziel die vollständige Regression und das vollständige Verschwinden des Krebses ist.

## 5.10. Verfolgen von Wirkungen nach der adoptiven Immuntherapie

**[0106]** Die Auswirkungen der Immuntherapie mit HSP-stimulierten APC auf die Entwicklung und die Progression neoplastischer Erkrankungen kann mit beliebigen Verfahren, die Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, verfolgt werden, und die einschließen, ohne darauf beschränkt zu sein, das Messen a) einer verzögerten Überempfindlichkeit als Maß der zellulären Immunität, b) der Aktivität zytolytischer T-Lymphozyten in vitro, c) der Spiegel tumorspezifischer Antigene, z. B. karzinoembryonaler Antigene (CEA), d) von Veränderungen der Morphologie von Tumoren mittels Techniken wie der Computertomographie (CT), e) von Veränderungen der Spiegel vermutlicher Biomarker für das Risiko eines bestimmten Krebses bei Individuen mit hohem Risiko, und f) von Veränderungen der Morphologie von Tumoren unter Einsatz eines Sonogramms.

### 5.10.1. Hauttests auf verzögerte Überempfindlichkeit

**[0107]** Hauttests auf verzögerte Überempfindlichkeit sind bei der gesamten Immunkompetenz und der zellulären Immunität gegen ein Antigen von großem Wert. Die Unfähigkeit, auf eine Batterie üblicher Hautantigene zu reagieren, wird als Anergie bezeichnet (Sato, T. et al., 1995, Clin. Immunol. Pathol. 74: 35–43).

**[0108]** Die richtige Technik der Hauttestung erfordert, dass die Antigene steril und lichtgeschützt bei 4°C gelagert und kurz vor dem Einsatz rekonstituiert werden. Eine Nadel von 25 oder 27 Gauge stellt eine intradermale anstelle einer subkutanen Verabreichung des Antigens sicher. Vierundzwanzig und 48 Stunden nach der intradermalen Verabreichung des Antigens werden die größten Abmessungen sowohl des Erythems als auch der Verhärtung mit einem Lineal gemessen. Eine Hypoaktivität gegenüber einem beliebigen Antigen oder einer beliebigen Gruppe von Antigenen wird durch eine Testung mit höheren Konzentrationen des Antigens oder, im Zweifelsfalle, über eine Wiederholung des Testes mit einem Zwischentest bestätigt.

### 5.10.2. Aktivität zytolytischer T-Lymphozyten in vitro

**[0109]**  $8 \times 10^6$  T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut, die mittels der Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugationstechnik isoliert wurden, werden mit  $4 \times 10^4$

Mitomycin-C-behandelten Tumorzellen in 3 ml RPMI-Medium, das 10% fötales Kälberserum enthält, restimuliert. Bei einigen Experimenten besteht das Kulturmödium zu 33% aus einem Überstand einer sekundären gemischten Lymphozytenkultur, oder es enthält IL-2 als Quelle für T-Zell-Wachstumfaktoren.

**[0110]** Um die primäre Reaktion zytolytischer T-Lymphozyten nach der Immunisierung zu messen, werden die T-Zellen ohne die stimulierenden Tumorzellen kultiviert. Bei anderen Experimenten werden die T-Zellen mit Zellen, die bezüglich ihrer Antigenität anders sind, restimuliert. Nach 6 Tagen werden die Kulturen in einem 4-stündigem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssay bezüglich der Zytotoxizität getestet. Die spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung der Targets sollte ein Ausmaß von unter 20% erreichen. Für die Aktivität bezüglich der Blockierung der Anti-MCH-Klasse-I wird ein 10-fach konzentrierter Überstand des Hybridoms W6/32 dem Test in einer Endkonzentration von 12,5% zugesetzt (Heike M. et al., J. Immunotherapy 15: 165–174).

#### 5.10.3. Spiegel tumorspezifischer Antigene

**[0111]** Es ist zwar vielleicht nicht möglich, auf allen Tumoren einzigartige Tumorantigene zu finden, aber viele Tumoren weisen doch Antigene auf, die sie von normalen Zellen unterscheiden. Die monoklonalen Antikörper-Reagenzien haben die Isolierung und die biochemische Charakterisierung der Antigene ermöglicht, und sie sind diagnostisch für die Unterscheidung transformierter von nicht-transformierter Zellen und für die Definition der zellulären Entwicklungsline transformierter Zellen von unschätzbarem Wert. Die am besten charakterisierten humanen Tumor-assoziierten Antigene sind die onkofötalen Antigene. Diese Antigene werden während der Embryogenese exprimiert, aber in normalem adultem Gewebe fehlen sie oder können nur sehr schwer nachgewiesen werden. Das prototypische Antigen ist das karzinoembryonale Antigen (CEA), ein Glycoprotein, das auf dem fötalen Darm und in humanen Dickdarmkrebszellen gefunden wird, aber nicht auf normalen adulten Dickdarmzellen. Da das CEA von Dickdarmkarzinomzellen abgegeben wird und im Serum gefunden wird, hat man ursprünglich angenommen, dass das Vorkommen dieses Antigens im Serum dazu verwendet werden könnte, Patienten auf Dickdarmkrebs zu screenen. Jedoch haben auch Patienten mit anderen Tumoren, beispielsweise mit Pankreaskrebs und Brustkrebs, erhöhte Serumspiegel an CEA. Deshalb hat sich das Verfolgen des Abfallens und des Ansteigens der CEA-Spiegel bei Krebspatienten, die eine Therapie durchlaufen, als nützlich für die Vorhersage der Tumorprogression und der Reaktionen auf die Behandlung erwiesen.

**[0112]** Es haben sich weitere onkofötale Antigene als nützlich für die Diagnose und die Verfolgung hu-

maner Tumoren erwiesen; z. B. findet sich das alpha-Fötoprotein, ein alpha-Globulin, das natürlicherweise von fötaler Leber und Zellen des Dottersackes sekretiert wird, im Serum von Patienten mit Leber- und Keimzelltumoren und kann als ein Indikator für den Krankheitszustand verwendet werden.

#### 5.10.4. Computertomographie-Scans (CT-Scans)

**[0113]** Die CT bleibt die Methode der Wahl für das genaue Staging von Krebsformen. Die CT hat sich als empfindlicher und spezifischer als jede andere Imaging-Technik zum Nachweis von Metastasen erwiesen.

#### 5.10.5. Messung vermutlicher Biomarker

**[0114]** Die Spiegel eines vermutlichen Biomarkers für ein spezifisches Krebsrisiko werden gemessen, um die Wirkung des HSP, das nicht-kovalent an Peptid-Komplexe gebunden ist, zu verfolgen. Zum Beispiel wird bei Individuen mit erhöhtem Risiko für Prostatakrebs das prostataspezifische Antigen (PSA) im Serum mittels des Verfahrens gemessen, das von Brawer, M. K. et al., 1992, J. Urol. 147: 841–845, und Catalona, W. J. et al., 1993, JAMA 270: 948–958 beschrieben wurde; oder bei Individuen mit erhöhtem Risiko für kolorektalen Krebs wird das CEA wie oben im Abschnitt 4.5.3. gemessen; und bei Individuen mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs wird die 16- $\alpha$ -Hydroxylierung von Östradiol mittels des von Schneider, J. et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3047–3051 beschriebenen Verfahrens gemessen.

#### 5.10.6. Sonogramm

**[0115]** Ein Sonogramm bleibt eine alternative Methode der Wahl für das genaue Staging von Krebsformen.

### 6. BEISPIELE: EXOGENE, MIT HEAT-SHOCK-PROTEIN ASSOZIIERTE PEPTIDE WERDEN DURCH MHC-I-MOLEKÜLE VON Makrophagen erneut präsentiert

**[0116]** Die Möglichkeit einer erneuten Präsentierung von HSP-chaperonierten Peptiden durch phagozytierende Zellen wurde direkt unter Verwendung eines Modells mit dem Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), z. B. der VSV-infizierten Zelllinie EL4, getestet.

#### 6.1. Methoden und Materialien

**[0117]** gp96 wurde bis zur apparenten Homogenität aus EL4-Zellen, die mit dem Gen transfiziert waren, das für das Nucleocapsid-Protein des VS1 codiert (N1-Zellen), sowie aus nicht-transfizierten EL4-Zellen (Negativkontrolle) gereinigt, und zwar gemäß Verfahren, die oben im Abschnitt 5 beschrieben wur-

den.

**[0118]** Makrophagen wurden aus mit 0,2 ml Pristan induzierten Zellen des Peritonealexudats von C57BL/6-Mäusen präpariert.

## 6.2. Fähigkeit sensibilisierter Makrophagen zur Stimulierung der TNF-Freisetzung durch CTLs

**[0119]**  $1 \times 10^4$  Makrophagen wurden in Gegenwart von gp96 (2 oder 10 µg/ml aus N1-Zellen oder EL4-Zellen) und für das VSV-Peptid spezifischen CTL ( $5 \times 10^4$ ) in 96-Well-Platten mit U-Boden bei 37°C kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen, und das Produkt TNF-α wurde biologisch in einem Zytotoxizitätstest unter Verwendung von WEHI164-Zellen gemessen.

**[0120]** WEHI164-Zellen ( $2,5 \times 10^2$ /Well) wurden mit seriell verdünnten Überständen kokultiviert, die zuvor wie oben beschrieben erhalten wurden. α-TNF-α wurde mit WEHI164-Zellen in separaten Wells als Kontrolle kultiviert. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C wurden 50 µl 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma, St. Louis) (1 mg/ml) zugesetzt, und es wurde weitere 4 Stunden inkubiert. Es wurden 100 µl Propanol/0,05 M HCl zugesetzt, und es wurde sofort die Extinktion bei 590 nm gemessen. Die Probenkonzentrationen wurden über einen Vergleich mit Verdünnungspunkten berechnet, die zu einem Abtöten von 50% der WEHI164-Zellen führten.

### 6.2.1. Ergebnisse

**[0121]** Makrophagen, die mit gp96, das aus N1-Zellen isoliert worden war, sensibilisiert wurden, stimulierten die Freisetzung von TNF durch VSV-spezifische CTLs, während diejenigen, die mit gp96, das aus EL4-Zellen isoliert worden war, sensibilisiert wurden, dieses nicht taten (**Fig. 1A**).

## 6.3. Fähigkeit sensibilisierter Makrophagen, als Targets für CTLs zu dienen

**[0122]** Peritoneale Makrophagen ( $5 \times 10^6$ ) wurden mit gp96 (10 µg/ml) das von N1-Zellen oder EL4-Zellen stammte, mit dem Peptid des VSV-Nukleocapsid-K<sup>b</sup>-Epitops (10 µM) als Positivkontrolle oder mit Kulturmedium als Kontrolle 2 Stunden bei 37°C sensibilisiert, woran sich eine Markierung mit <sup>51</sup>Cr für 1,5 Stunden anschloss. Diese sensibilisierten Makrophagen wurden als Targets in einem 4-stündigen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay mit VSV-spezifischen CTLs eingesetzt.

**[0123]** Anti-CD4-mAb (CK1.5), anti-CD8-mAb (YTS169,4), anti-N-2K<sup>b</sup>-mAb (Y3), anti-N-2D<sup>b</sup>-mAb (B22.249) oder die RPMI-Kontrolle wurden dem CTL-Assay zur gleichen Zeit wie die Effektorzellen

und die mit gp96 aus N1-Zellen sensibilisierten <sup>51</sup>Cr-markierten Makrophagen zugegeben.

### 6.3.1. Ergebnisse

**[0124]** Makrophagen, die mit aus N1-Zellen isoliertem gp96 sensibilisiert worden waren, wurden durch die Anti-VSV-CTLs lysiert, während diejenigen, die mit gp96 aus EL4-Zellen sensibilisiert worden waren, es nicht wurden (**Fig. 1B**). Die Lyse wird durch Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper (Jb) und Anti-CD8-Antikörper blockiert, aber nicht durch Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper (D6) und Anti-CD4-Antikörper (**Fig. 1C**).

**[0125]** Somit chaperonieren die gp96-Moleküle, die aus den N1-Zellen isoliert worden waren, das Kb-Epitop des VSV, und dieses Epitop wird in den endogenen Präsentationsweg von Makrophagen eingeführt.

## 7. BEISPIELE: ADOPTIVER TRANSFER SENSIBILISIERTER MAKROPHAGEN

### 7.1. Materialien und Methoden

**[0126]** Peritoneale Makrophagen wurden drei Tage nach der Injektion von 0,2 ml Pristan (Sigma, St. Louis) in nominell gesunde BALB/cJ-Mäuse durch das Zentrifugieren des Peritonealexudats gewonnen.

**[0127]** Zellen des Peritonealexudats (PEC) oder Makrophagen ( $4 \times 10^7$ ) wurden bei 37°C 3 Stunden in 1 ml RPMI inkubiert, das 50 µg gp96-Peptid-Komplexe enthielt, die von Methylcholanthren-induzierten Tumoren oder aus der Leber stammten. Die Makrophagen wurden dann dreimal gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml in RPMI-Medium resuspendiert. 200 µl dieser Suspension wurden für die intraperitoneale Injektion in Mäuse eingesetzt, wie es in der Versuchsdurchführung unten beschrieben wird.

### 7.2. Modell des durch Methylcholanthren (Meth A) induzierten Sarkoms

**[0128]** Fünf Gruppen von Mäusen wurden folgendermaßen behandelt: a) subkutane Injektion von Pufferlösung, b) subkutane Injektion von 9 µg gp96-Peptid-Komplexen aus Lebergewebe, c) intraperitoneale Injektion von  $5 \times 10^6$  PEC oder Makrophagen, die mit gp96-Peptid-Komplexen aus normaler Leber sensibilisiert worden waren, d) subkutane Injektion von 9 µg gp96-Peptid-Komplexen aus Meth-A-Tumorzellen und e) intraperitoneale Injektion von  $5 \times 10^6$  PEC oder Makrophagen, die mit gp96-Peptid-Komplexen aus Meth-A-Tumorzellen sensibilisiert worden waren.

**[0129]** Die obigen Behandlungen wurden zweimal im Abstand von einer Woche durchgeführt, ehe 1 Woche nach der zweiten Injektion  $1 \times 10^5$  Meth-A-Tu-

morzellen intradermal injiziert wurden. Das Tumorgewachstum wurde über die Messung des durchschnittlichen Tumordurchmessers verfolgt.

### 7.3. Ergebnisse

**[0130]** Das Tumorgewachstum war in den Gruppen A, B und C, d. h. den Mäusen, die die Kontrollpufferlösung oder das gp96 aus Lebergewebe erhalten hatten, vergleichbar. Bei den Mäusen, die direkt mit gp96-Peptid-Komplexen (D) oder mit den mit dem gp96-Peptid-Komplex sensibilisierten Makrophagen (E) behandelt worden waren, war das Tumorgewachstum im Vergleich zu den Mäusen, die die Pufferkontrolle oder das gp96 aus der Leber erhalten hatten, deutlich gehemmt (**Fig. 2**). Somit stellt die direkte Verabreichung von gp96-Peptid-Komplexen oder die adoptive Therapie mit Makrophagen und/oder anderen APC, die mit gp96-Peptid-Komplexen sensibilisiert wurden, wie es hier beschrieben wurde, einen Ansatz zur Behandlung von Krebs mit einer potentiellen Anwendbarkeit auf einen weiten Bereich von Krebstypen, Infektionskrankheiten oder immunologischen Erkrankungen dar.

**[0131]** Die vorliegende Erfindung soll in ihrem Umfang nicht durch die hier beschriebenen spezifischen Ausführungsformen eingeschränkt werden. Tatsächlich werden für einen Fachmann auf diesem Gebiet verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu denjenigen, die hier beschrieben wurden, auf der Basis der vorangegangenen Beschreibung und der begleitenden Figuren offensichtlich sein. Diese Modifikationen sollen im Bereich der beigefügten Ansprüche enthalten sein.

### Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, die sensibilisierte antigenpräsentierende Zellen in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfaßt, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die antigenpräsentierenden Zellen menschliche Zellen sind.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen, der mit der Zusammensetzung zu behandeln ist, autolog sind.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen, der mit der Zusammensetzung zu behandeln ist, allogen sind.

5. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das Stressprotein aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus hsp70, hsp90, gp96 und Kombinationen aus zwei oder mehr davon.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein hsp70 ist.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein hsp90 ist.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei das Stressprotein gp96 ist.

9. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Komplex aus einem Tumor isoliert ist, der im Hinblick auf den Menschen, der mit der Zusammensetzung zu behandeln ist, autolog ist.

10. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Komplex aus einem Tumor isoliert ist, der im Hinblick auf den Menschen, der mit der Zusammensetzung zu behandeln ist, allogen ist.

11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Komplex aus einer Zelle isoliert ist, die mit einem infektiösen Mittel infiziert ist, das eine Infektionserkrankung auslöst.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die Zelle im Hinblick auf den Menschen autolog ist.

13. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das antigene Molekül ein exogenes antigenes Molekül ist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei das exogene antigenen Molekül ein Tumorantigen ist.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei das exogene antigenen Molekül ein Antigen eines infektiösen Mittels ist, das eine Infektionserkrankung auslöst.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei die Infektionserkrankung durch ein Virus, ein Bakterium, einen Pilz, einen Parasiten oder eine Protozoe ausgelöst wird.

17. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 16, das außerdem einen Modifikator für die biologische Reaktion umfaßt, der ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor.

18. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 17, die sensibilisierte antigenprä-

sentierende Zellen in einer Menge im Bereich von  $10^6$  bis  $10^{12}$  Zellen enthält.

19. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18, in einer Form, die für eine intravenöse Verabreichung geeignet ist.

20. Kit, der in einem Behälter einen Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, umfaßt, wobei das antigenes Molekül ein exogenes Antigen oder ein antigenes oder immunogenes Fragment oder Derivat davon ist.

21. Kit nach Anspruch 20, der außerdem in einem zweiten Behälter humane antigenpräsentierende Zellen umfassen.

22. Sensibilisierte antigenpräsentierende Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Verwendung als ein Arzneimittel.

23. Sensibilisierte antigenpräsentierende Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das Krebs hat.

24. Zellen nach Anspruch 23, wobei das Individuum menschlich ist.

25. Zellen nach Anspruch 24, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen autolog sind.

26. Zellen nach Anspruch 24, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen allogen sind.

27. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 26, wobei der Krebs ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Fibrosarkom, Myxosarkom, Liposarkom, Chondrosarkom, osteogenem Sarkom, Chordom, Angiosarkom, Endothelsarkom, Lymphangiosarkom, Lymphangioendothelsarkom, Synoviom, Mesotheliom, Ewing's Tumor, Leiomyosarkom, Rhabdomyosarkom, Dickdarmkarzinom, Pankreaskrebs, Brustkrebs, Ovarialkrebs, Prostatakrebs, Plattenepithelkarzinom, Basalzellenkarzinom, Adenokarzinom, Schweißdrüsenerkarzinom, Talgdrüsenerkarzinom, Zottenerkarzinom, Zottadenokarzinom, Cystadenokarzinom, medullärem Karzinom, bronchogenem Karzinom, Nierenzellkarzinom, Hepatom, Gallenwegskarzinom, Chorionkarzinom, Seminom, Embryonalkarzinom, Wilm's Tumor, Zervixkrebs, Testikelkarzinom, Lungenkarzinom, kleinzelligem Lungenkarzi-

nom, Blasenkarzinom, Epithelkarzinom, Gliom, Astrocytom, Medulloblastom, Craniopharyngiom, Ependymom, Pinealom, Hämangioblastom, akustischem Neurom, Oligodendrogiom, Meningiom, Melanom, Neuroblastom, Retinoblastom, Leukämie, Lymphom, multiplem Myelom, Waldenström's Makroglobulinämie und Hy<sup>-2</sup> Kettenkrankheit.

28. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Stressprotein aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus hsp70, hsp90, gp96 und Kombinationen von zwei oder mehr davon.

29. Zellen nach Anspruch 28, wobei das Stressprotein hsp70 ist.

30. Zellen nach Anspruch 28, wobei das Stressprotein hsp90 ist.

31. Zellen nach Anspruch 28, wobei das Stressprotein gp96 ist.

32. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 31, wobei der Komplex aus einem Tumor isoliert ist, der im Hinblick auf den Menschen autolog ist.

33. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 31, wobei der Komplex aus einem Tumor isoliert ist, der im Hinblick auf den Menschen allogen ist.

34. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 33 zur Verwendung in Assoziation mit einem Modifikator der biologischen Antwort, der ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor.

35. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 34 zur Verwendung in einer Menge im Bereich von  $10^6$  bis  $10^{12}$  Zellen.

36. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 35 in einer Form, die für eine intravenöse Verabreichung geeignet ist.

37. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 36, wobei der Komplex aus den Zellen des genannten Krebses des Individuums isoliert ist.

38. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 24 bis 37, wobei das antigenes Molekül ein exogenes antigenes Molekül ist.

39. Zellen nach Anspruch 38, wobei das exogene antigenes Molekül ein Tumorantigen ist.

40. Sensibilisierte antigenpräsentierende Zellen, wobei die antigen präsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden

ist, sensibilisiert wurden, zur Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung oder zur Prävention einer Infektionserkrankung bei einem Individuum, bei dem eine derartige Behandlung oder Prävention gewünscht wird.

41. Zellen nach Anspruch 40, wobei das Individuum ein Mensch ist.

42. Zellen nach Anspruch 41, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen autolog sind.

43. Zellen nach Anspruch 41, wobei die antigenpräsentierenden Zellen im Hinblick auf den Menschen allogen sind.

44. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 41 bis 43, wobei der Komplex aus einer Zelle isoliert ist, die mit einem infektiösen Mittel infiziert ist, das die Infektionserkrankung auslöst.

45. Zellen nach Anspruch 44, wobei die Zelle im Hinblick auf den Menschen autolog ist.

46. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 41 bis 45, wobei das antigene Molekül ein exogenes antigenes Molekül ist.

47. Zellen nach Anspruch 46, wobei das exogene antigene Molekül ein Antigen eines infektiösen Mittels ist, das die Infektionserkrankung auslöst.

48. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die Infektionserkrankung durch ein Virus, ein Bakterium, einen Pilz, einen Parasiten oder eine Protozoen ausgelöst wird.

49. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 41 bis 48, wobei das Stressprotein aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus hsp70, hsp90, gp96 und Kombinationen von zwei oder mehr davon.

50. Sensibilisierte antigenpräsentierende Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Verwendung in einem Verfahren zur Prävention von Krebs bei einem Individuum, bei dem eine derartige Prävention gewünscht wird.

51. Zellen nach irgendeinem der Ansprüche 22 bis 50, wobei die antigenpräsentierenden Zellen Makrophagen und/oder dendritische Zellen umfassen.

52. Verwendung von sensibilisierten antigenpräsentierenden Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stresshormon, das nicht-kovalent an ein antigenes

Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Individuums, das Krebs hat.

53. Verwendung von sensibilisierten antigenpräsentierenden Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder zur Prävention einer Infektionserkrankung in einem Individuum.

54. Verwendung von sensibilisierten antigenpräsentierenden Zellen, wobei die antigenpräsentierenden Zellen in vitro mit einem Komplex aus einem Stressprotein, das nicht-kovalent an ein antigenes Molekül gebunden ist, sensibilisiert wurden, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder zur Prävention von Krebs bei einem Individuum.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

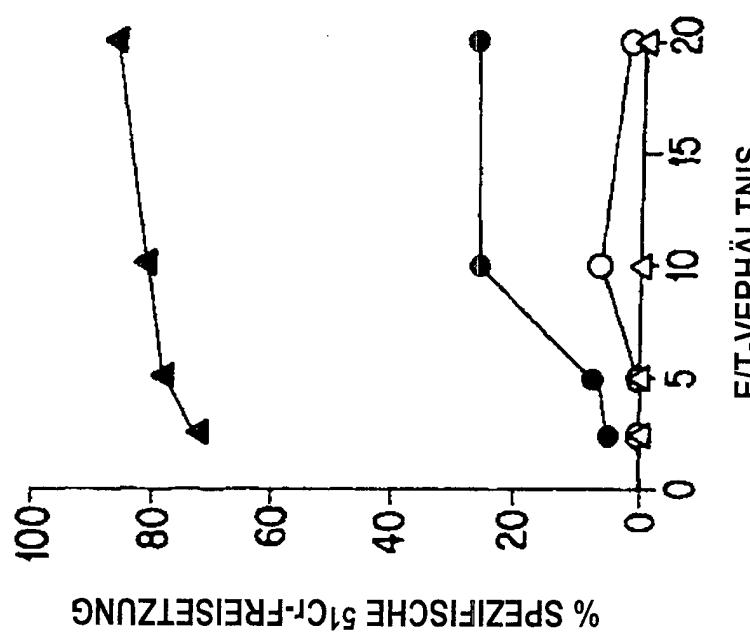


FIG. 1B

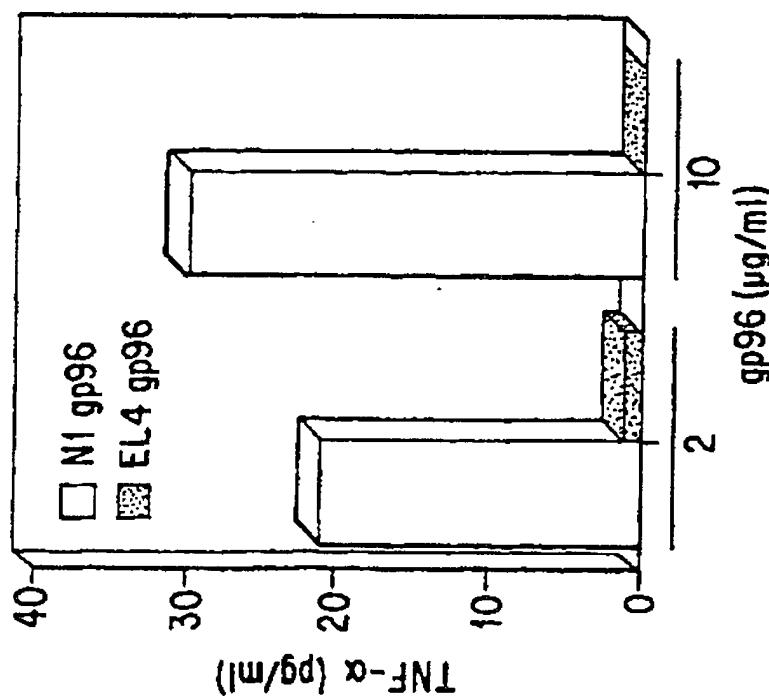


FIG. 1A

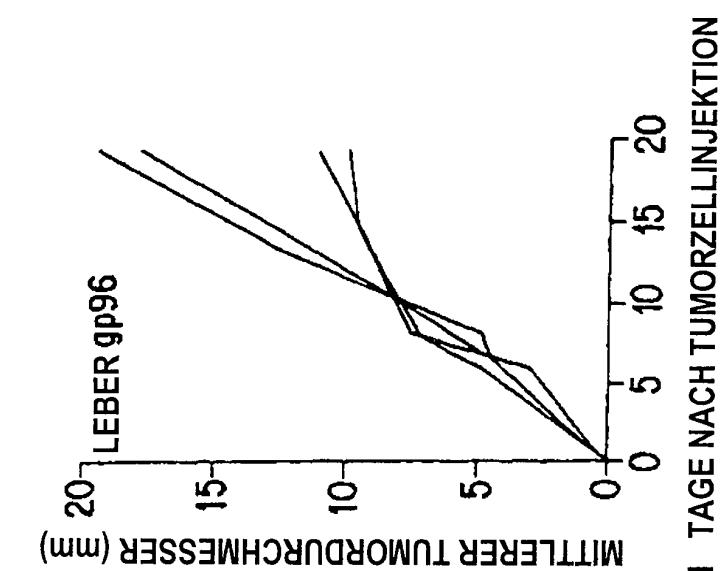


FIG. 2B

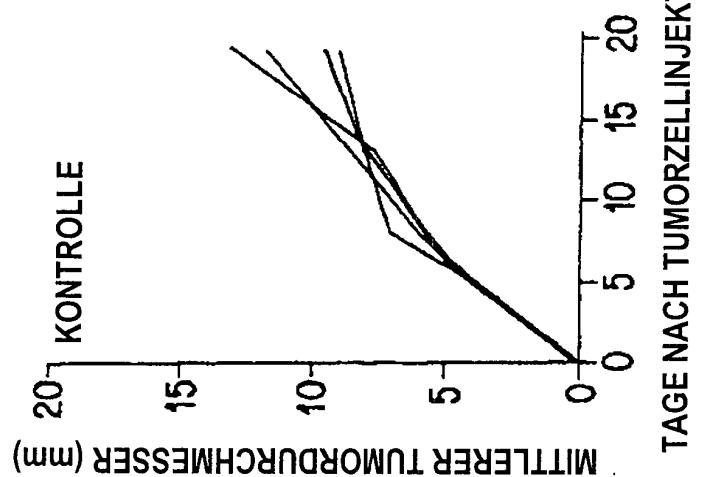


FIG. 2A

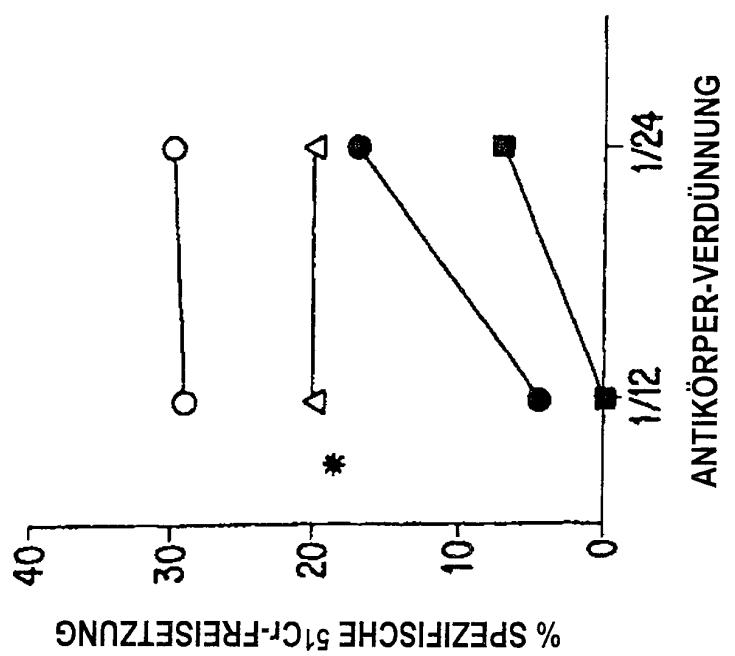


FIG. 1C

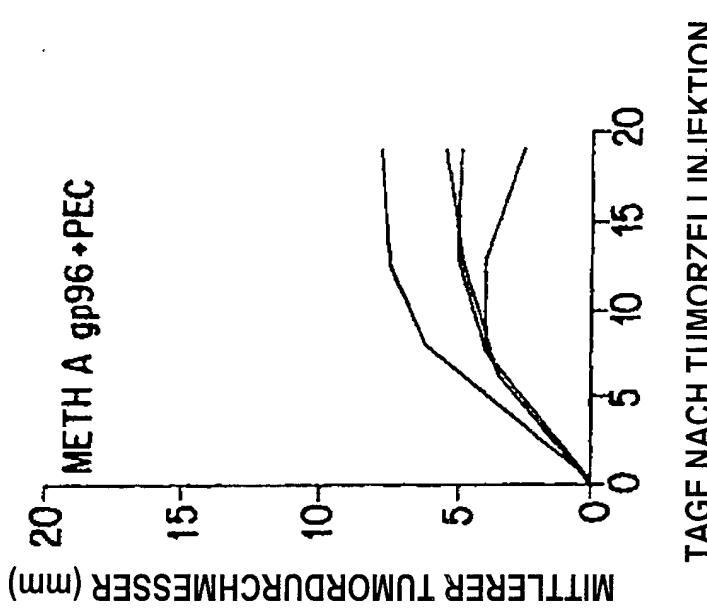


FIG. 2E

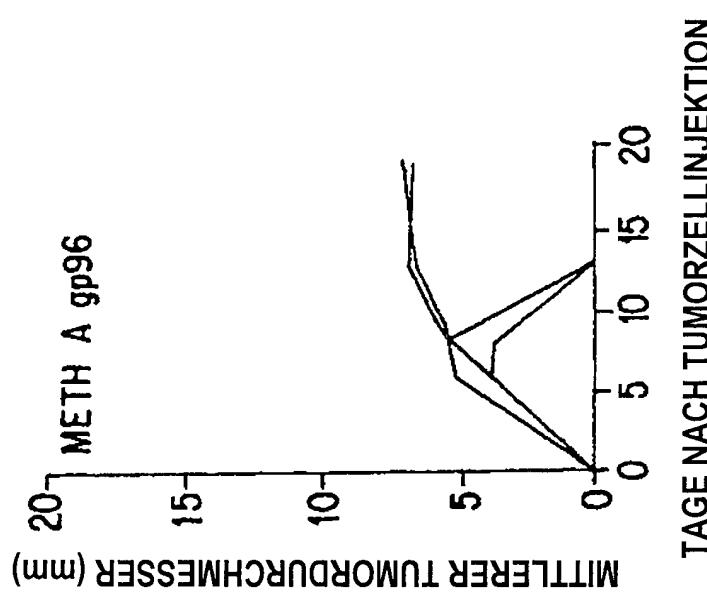


FIG. 2D

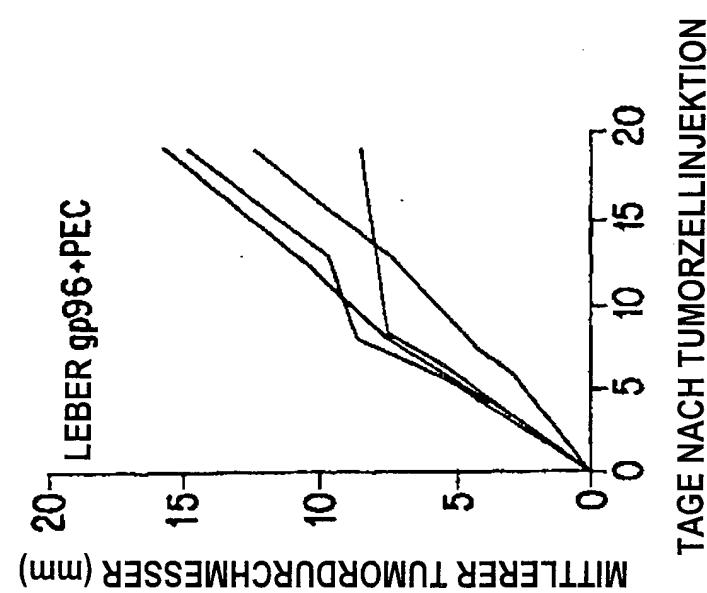


FIG. 2C