

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1996/2007**

(22) Anmeldetag: **10.12.2007**

(43) Veröffentlicht am: **15.05.2009**

(51) Int. Cl.⁸: **C12N 5/06** (2006.01),
C12N 5/08 (2006.01),
C12N 15/11 (2006.01),
A61K 48/00 (2006.01),
A61K 39/00 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT
INNSBRUCK
A-6020 INNSBRUCK (AT)

(72) Erfinder:

BAIER GOTTFRIED DR.
INNSBRUCK (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER IMMUNREAKTIVITÄT**

(57) Die Erfindung betrifft ein in vitro oder ex vivo Verfahren zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems, welche mit einem Antigen kontaktiert wurden, umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der Cb1-b Funktion dieser Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen erhöht wird.

AT 506 041 A1 2009-05-15

013945

- 19 -

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein in vitro oder ex vivo Verfahren zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems, welche mit einem Antigen kontaktiert wurden, umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der Cbl-b Funktion dieser Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen erhöht wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Immunantwort von Zellen.

Aktive Immunisierung ermöglichte erst die flächendeckende Bekämpfung bedrohlichster Infektionskrankheiten und erreichte sogar in einigen Fällen deren weltweite Ausrottung unter Verwendung eines kostengünstigen und hoch effizienten körpereigenen Abwehrmechanismus. Es wurden und werden daher Anstrengungen unternommen um gegen diverse Indikationen prophylaktische und therapeutische Vakzinierungsansätze zu entwickeln. Allerdings bedingt eine effiziente Impfung die Induktion einer Immunantwort, welche zu einer schützenden Immunität führt. Mangelnde Immunogenität des Immunisierungsantigens führt jedoch zum Ausbleiben des gewünschten Effektes. Hochinteressante und spezifische Antigenformulierungen wurden bereits zur Prophylaxe sowie zur Behandlung von Malaria, HIV, Influenza oder Tumorerkrankungen, um nur einige prominente Beispiele anzuführen, entwickelt. Allerdings blieb der Erfolg dieser Therapien, beispielsweise bedingt durch mangelnde Immunogenität des Immunisierungsantigens aus. Ferner stehen selbst breit angewendete Impfstoffe vor Problemen mangelnder Immunogenität, wie zum Beispiel die Hepatitis B Vakzine, die nur für etwa 80 % der Behandelten auch tatsächlich schützende Immunantwortstiter aufbauen. Der wesentliche Grund für das Ausbleiben der Reaktivität des Immunsystems ist, dass diese Antigene nicht als „fremd“ erkannt werden. Im Säugtier sind es vor allem T Zellen welche entscheiden, ob eine durch Antigen präsentierende Zellen (APCs) dargebotene Struktur als körpereigen oder als fremd erkannt wird. Um eine Immunantwort zu induzieren, sind im Wesentlichen zwei getrennte und voneinander unabhängige Signale nötig. Dieser Mechanismus soll ein Überschießen des Immunsystems verhindern. Erste Voraussetzung ist, dass der T-Zell-Rezeptor das durch die APC dargebotene Antigen auch erkennt. Ist dies nicht der Fall, findet keine weitere Reaktion statt. Ferner ist zur Induktion einer Immunantwort die Interaktion des CD28 Rezeptors auf der T-Zelloberfläche mit B7, welches auf der APC nur dann exprimiert wird, wenn diese die antigene Struktur als gefährlich einstuft, zwingend erforderlich. Im Falle einer Vakzinierung mit einem nur marginal immunogenen Impfantigen kann die Kostimulation über die Interaktion zwischen B7 und CD28 ausbleiben, was in weiterer Folge zu keiner Immunantwort, sondern vielmehr zum Auftreten von Toleranz auf T-Zel-

lebene führt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Notwendigkeit der Kostimulation durch Abschalten eines Enzyms, der E3-Ubiquitinligase Cbl-b umgangen werden kann. Dieses Enzym stellt einen entscheidenden Weichenstellpunkt in der Steuerung der Immunreaktivität dar (Chiang et al., J Clin Invest (2007) doi:10.1172/JCI29472). In Abwesenheit von Cbl-b können verabreichte aber kaum immunogene Substanzen zur Induktion einer starken Immunantwort führen. Ferner sind Cbl-b defiziente Mäuse (homozygotischer Gen knock-out) lebensfähig und deren Immunsystem ist in der Lage effizient autolog-induzierte Tumore zu erkennen und dagegen eine vor allem auf CD8+ T Zellen-beruhende lytische Immunantwort aufzubauen (Loeser et al., JEM (2007) doi: 10.1084/jem.20061699). Allerdings führte die beschriebene, gänzliche Abschaltung des Enzyms ebenfalls zu einer erhöhten Autoimmunität, nach Immunisierung mit Superantigenen. Loeser et al. somit konnten aufzeigen, dass Cbl-b als negativer Regulator maßgeblich für die „Immunreaktivität“ von T-Zellen verantwortlich ist.

siRNA Technologie zur Attenuierung der spezifischen Gen-Expression ist auch für Cbl-b mit geringerer Effizienz bereits beschrieben. Die US 2007/0087988 betrifft ein Verfahren zur Regulierung der HPK1, dessen Expression durch die Erhöhung der Cbl-b Expression erhöht werden kann und vice versa (z.B. durch Cbl-b siRNA Inhibition).

Die US 2007/0054355 beschreibt Cbl-b Peptide und Cbl-b assoziierte Proteine, insbesondere POSH, und deren Verwendung zur Behandlung von Cbl-b assoziierten Krankheiten.

Es wurde allerdings noch keine für klinische Anwendungen geeignete Anwendung von Cbl-b Mediatoren beschrieben. Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung ein praxistaugliches Verfahren zur Modulierung der Immunreaktivität zur Verfügung zu stellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein in vitro oder ex vivo Verfahren zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems, welche mit einem Antigen kontaktiert wurden, umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der Cbl-b Funktion dieser Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen erhöht wird.

Das Cbl-b Gen sowie dessen Genprodukte sind im Stand der Technik ausführlich beschrieben (UniGene Id. Hs.3144 und Hs.

381921). Cbl-b Sequenzen sind z.B. in der GenBank Datenbank unter den Acc. Nr. NM_008279 und NP_009112 veröffentlicht. Anti-Cbl-b Antikörper, siRNAs und Antisense-Inhibitoren sind kommerziell erhältlich. Bestimmte siRNAs geeignet zur Reduzierung oder Inhibierung der Cbl-b Expression und damit auch der Cbl-b Funktion sind beispielsweise in der US 2007/0054355 mit gemischten RNA/DNA Nukleotiden und einer Länge von ca. 20 Basen offenbart.

Um der Gefahr einer Überreaktion des Immunsystems, welche zur Induktion von z.B. Autoimmunreaktivität führen kann, zu begegnen, darf die Hemmung/Abschaltung von Cbl-b Funktionen in T Zellen nur in einem zeitlich streng definierten Zeitraum erfolgen. Es ist daher für einen therapeutisch adjuvanten Vakzinierungsansatz essentiell, Cbl-b nur für einen begrenzten Zeitraum kontrolliert zu attenuieren, um den Aufbau einer Immunisierungsantigen spezifischen Immunantwort zu unterstützen jedoch durch rechtzeitige Wiederherstellung des immunologischen „Normalzustandes“ einer Autoimmunerkrankung vorzubeugen. Daher wird erfindungsgemäß nur eine bestimmte Auswahl von isolierten Zellen des Immunsystems in vitro oder ex vivo behandelt und in einen Patienten wieder zurückgeführt. Ein Ansatz zur effizienten in vitro oder ex-vivo Cbl-b Attenuierung ist daher die Voraussetzung für die Steigerung der Immunreaktivität.

Vorzugsweise wird die Cbl-b Funktion durch Reduzierung oder Inhibierung der Expression von Cbl-b reduziert oder inhibiert. Die Begriffe Reduzierung oder Inhibierung betreffen die Absenkung der Funktion (bzw. der Expression) von Cbl-b im Vergleich zur unveränderten, natürlicher Funktion bis zur kompletten Inhibierung der Funktion. Vorzugsweise wird die Funktion (bzw. Expression) um mindestens 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 95% reduziert.

Die Reduzierung oder Inhibierung der Funktion von Cbl-b erfolgt in vorzugsweisen Ausführungsformen transient. D.h. die Funktion wird nur vorläufig w.o. angegeben reduziert und kann sich in Folge dessen wieder erholen, z.B. durch Verbrauch oder Abbau von Inhibitoren, wie z.B. Cbl-b siRNA, oder durch Neubildung oder nicht Cbl-b beeinträchtigter Zellen (in vivo).

Vorzugsweise wird die Expression von Cbl-b durch Verwendung von Cbl-b antisense RNA oder siRNA reduziert oder inhibiert. Hierzu werden kurze DNA und/oder RNA Sequenzen komplementär zu einem der Teil der Ziel (Cbl-b) mRNA Sequenz eingesetzt, so dass

diese damit hybridisieren und inaktivieren. Die Länge dieser Sequenzen ist vorzugsweise mindestens 15, 18, 20, 22, 25, 28, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 oder 200 Basen bis zur kompletten Ziel Sequenz, vorzugsweise bis zu 2502, 2000, 1500, 1000, 500 oder 300 Basen. Vorzugsweise werden die Sequenzen der SEQ ID Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und/oder 8 verwendet.

Ebenfalls kann die Funktion von Cbl-b durch eine Vielzahl weiterer bekannter Komponenten reduziert oder inhibiert werden, wie beispielsweise durch Verwendung von Cbl-b Antagonisten, Inhibitoren, Aptameren oder Intrameren.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Reduzierung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der c-Cbl Funktion der Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen reduziert wird, vorzugsweise durch transiente Reduzierung oder Inhibierung, insbesondere durch Verwendung von c-Cbl antisense RNA oder siRNA. Zur Steigerung der Immunreaktivität ist es nicht zwingend nötig, c-Cbl gemeinsam mit Cbl-b zu attenuieren. Wie in den Beispielen gezeigt erbringt die Attenuierung von c-Cbl vielmehr eine Umkehr der durch Cbl-b Inhibierung herbeigeführten Effekte. Cbl-b und c-Cbl haben daher antagonistische Funktionen. C-Cbl erfüllte ferner eine bisher noch unbekannte Funktion in der Feinregulierung der T-Zell Reaktivität, indem dessen Attenuierung zu einer erhöhten Immuntoleranz führt. Daher eignet sich die Reduzierung oder Inhibierung der c-Cbl Funktion zur Immunsuppression und ermöglicht daher dessen Anwendung bei z.B. Inflammation oder Allergien. Da das Ausmaß und die Richtung der Attenuierung von der Dosis der Reduzierung oder Inhibition von Cbl-b bzw. c-Cbl (analog uzu Cbl-b wie hierin beschrieben) abhängt, können beide Faktoren in ihrer Funktion in Kombination reduziert werden. Zur Erhöhung der Immunreaktivität überwiegt die Reduktion von Cbl-b über der Reduktion von c-Cbl und umgekehrt zur Erniedrigung. C-Cbl antisense oder siRNA können die gleichen Sequenzlinien wie oben für Cbl-b beschrieben aufweisen. Vorzugsweise werden die Sequenzen der SEQ ID Nr. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 und/oder 16 verwendet.

In bevorzugten Ausführungsformen sind die erfindungsgemäß einzusetzenden Zellen antigenpräsentierende Zellen, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), T-Lymphozyten, B-Lymphozyten,

Monozyten, Makrophagen und/oder dendritische Zellen, insbesondere T-Lymphozyten, wie Th1, Th2, Th17, Tregs (regulatory T cells) oder CTL (cytotoxische T-Zellen). Vorzugsweise wurde das Antigen durch die Zellen aufgenommen und diese präsentieren vorzugsweise ein Antigenfragment. Insbesondere bevorzugt werden dabei PBMCs und T-Zellen in Kombination zum Behandeln, um eine besonders starke Antigen-spezifische Reaktion hervorzurufen. In anderen Ausführungsformen, insbesondere zur allgemeinen Erhöhung der Immunreaktivität (z.B. zur Behandlung einer Immuninsuffizienz) reichen diverse T-Zellen alleine aus, um eine breite Wirkung zu erzielen.

Zusätzlich können die Zellen noch mit einem immunstimulierenden Cytokin, vorzugsweise CD3 und/oder CD28, stimuliert werden um eine Immunreaktion durch die Zellen einzuleiten.

In einem besonderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Cbl-b Inhibitoren oder Antagonisten zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Erhöhung der Immunreaktivität gegen ein Antigen in einem Patienten bzw. die Erhöhung der Immunreaktivität an sich, umfassend die Isolierung von Zellen des Immunsystems eines Patienten, in vitro oder ex vivo Erhöhung der Immunreaktivität der Zellen durch Verwendung der Cbl-b Inhibitoren oder Antagonisten und Reimplantation der Zellen in den Patienten, wobei durch eine Reduktion oder die Inhibition der Cbl-b Funktion der Zellen die Immunreaktivität erhöht wird.

Eine Realisierung der angepeilten, vorzugsweise zeitlich limitierten Steigerung der Immunreaktivität begleitend zu einer Vakzinierung, der Verabreichung des Antigens, kann durch eine Herabsetzung der Cbl-b Expression in einem geringen Anteil der zirkulierenden T-Zellen herbeigeführt werden. Hierfür können PBMCs (periphere mononukleare Blutzellen) aus Vollblut des Patienten, welcher im Idealfall einige Tage zuvor, z.B. 5 Tage immunisiert wurde, gewonnen und in vitro oder ex vivo mit einem Cbl-b spezifischen siRNA Attenuierungsansatz behandelt werden. Dieses Verfahren erfolgt sehr schnell. Im Idealfall könnte diese Zellpräparation nur wenige Minuten nach deren Entnahme dem Patienten wieder verabreicht werden. Optional können die Zellen durch für die jeweiligen Zellen geeignete ex vivo-Stimulations-Protokolle vermehrt oder expandiert werden, bevor die Zellen reimplantiert werden. Die in vitro aktivierten T-Zellen, welche

nur wenige Prozent der T-Zellpopulation des Patienten darstellen, treffen bei deren Zirkulation im Empfängerorganismus in Lymphknoten auf Antigen präsentierende Zellen, welche bedingt durch die bereits erfolgte Immunisierung Antigene aufgenommen haben und dorthin migriert sind. Nachdem die in vitro behandelten T-Zellen kein Ko-Stimulationssignal benötigen, werden diese sofort nach Erkennung des Immunisierungsantigens proliferieren und Zytokine ausschütten, welche systemisch zur Induktion einer Immunantwort sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene beitragen. Mit diesem Ansatz werden selbst schwach immunogene Antigene zur Etablierung eines lang anhaltenden Impfschutzes führen. Ebenso kann somit die Abstoßung autologer Tumoren in Krebspatienten eingeleitet werden. Ein Cbl-b-Antagonist steigert hierbei die Immunreaktivität, wobei diesen entweder bei einer alleinigen, bzw. bei einer begleitenden Chemo/Radiotherapie Behandlung von onkologischen Erkrankungen, oder in Kombination mit Passiv-Immunisierungen, wie tumorantigenspezifischen Antikörpern zur Anwendung kommt.

Dieses Verfahren ist daher zur Anwendung bei der Behandlung einer angeborenen oder erworbenen Immuninsuffizienz, insbesondere AIDS, multiples Myelom, chronische lymphatische Leukämie, medikamentenbedingte Immunsuppression oder einer Krebserkrankung, gegebenenfalls unter Auswahl von Krankheits-spezifischen Antigenen, geeignet. Insbesondere bevorzugt ist dabei die Behandlung einer Krebserkrankung, die feste Tumore bildet.

Zur Erhöhung der Erfolgchancen einer Therapie erfolgt die Behandlung einer Krebserkrankung vorzugsweise in Kombination mit einer weiteren Anti-Tumor-Therapie, insbesondere einer Chemotherapie, Radiotherapie oder Verabreichung eines therapeutischen Biologics.

Die in vitro oder ex vivo Erhöhung der Immunreaktivität kann im therapeutischen Verfahren wie oben beschrieben vorgenommen werden, wobei die Exposition der Zellen gegenüber einem Antigen bereits vor Entnahme der Zellen erfolgen kann oder nachher.

Die zeitliche Abfolge der Darbietung des Immunisierungsantigene, deren Aufnahme durch Antigen präsentierende Zellen und ferner der Migration dieser Zellen zu lokalen Lymphknoten, wo die aufgenommenen Substanzen reaktiv gemachten T-Zellen präsentiert werden, ist bei der therapeutischen Umsetzung zusätzlich bedeutend. Daher wird vorzugsweise der Patient mit dem Antigen

beimpft, vorzugsweise noch vor der Isolierung der Zellen, insbesondere bevorzugt vor mindestens 1, 2, 3, 4 oder 5 Tagen und/oder höchstens 20, 16, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 oder 1 Woche(n) vor Isolierung der Zellen. Alternativ ist auch eine nachträgliche Vakzinierung oder eine Behandlung der Zellen in vitro oder ex vivo mit einem Antigen möglich.

Vorzugsweise sind die Zellen spezifisch für ein bestimmtes Antigen oder es werden Zellen umfassend ein bestimmtes Antigen auf die Spezifität oder Anwesenheit des Antigens selektioniert, wobei die Immunreaktivität der selektionierten Zellen erhöht wird. Durch die Auswahl eines bestimmten Antigens kann gezielt eine Immunreaktion gegen ein bestimmtes Ziel im Patienten gerichtet werden. Ein solches Ziel ist insbesondere ein Tumor (durch die Auswahl zumindest eines oder mehrerer Tumor-Antigene) oder ein Pathogen.

Es ist vorstellbar, dass parallel zur Abtrennung der Zellen im selben, sterilen Einwegröhrchen bereits die dementsprechende siRNA im Transfektionsansatz vorgelegt wird. Daher betrifft die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt einen vorzugsweise sterilen Behälter, wie ein Einwegröhrchen, umfassend einen Cbl-b Inhibitor, insbesondere zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems gegen ein Antigen.

Ebenso sieht die vorliegende Erfindung einen Kit vor, der einen Behälter, insbesondere ein Einwegröhrchen zum Aufnehmen der Zellen des Immunsystems, sowie einen Cbl-b-Inhibitor, wie siRNA, umfasst, insbesondere zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems gegen ein Antigen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Der Behälter bzw. der Kit kann auch zusätzlich ein immunstimulierendes Cytokin, vorzugsweise CD3 und/oder CD28, umfassen, um die Stimulierung noch zusätzlich zu verstärken. Ebenso können der Kit oder der Behälter nach Stabilisierungskomponenten, -medien oder -puffer (zur Stabilisierung der Zellen), Transfektions- oder -Nukleofektions-Lösungen, vorzugsweise Zellmedien, wie RPMI, umfassen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele illustriert ohne darauf beschränkt zu sein.

In den Figuren zeigen:

Fig. 1 eine schematische, vereinfachte Darstellung der T-Zellaktivierung durch Ko-Stimulation (a), oder im Falle der At-

tenuierung der Cbl-b-Expression durch alleinige Stimulation des T-Zell-Rezeptors (c), die üblicherweise nicht zur Aktivierung führt (b);

Fig. 2 eine Western-Blot-Analytik der Cbl-b-Expression. CD8⁺-Zellen wurden aus humanen PBMC isoliert, mit Cbl-b-siRNA transfiziert, in Kultur gehalten und mit einer Kontrollgruppe ohne, nach anti-CD3 oder nach anti-CD3 und anti-CD28-Stimulation verglichen. Als Ladekontrolle wurde Fyn verwendet;

Fig. 3 die IFN-gamma Sekretion humaner CD8⁺ Zellen 2 Tage nach siRNA Behandlung. Gemessen wurde die IFN-gamma-Konzentration in Überständen von CD8⁺-T-Zellen ohne Stimulation (Medium) (links) und nach CD3-spezifischer (Mitte) oder nach CD3- und CD28-spezifischer Ko-Stimulation (rechts). Es wurden jeweils 2 Tage alte Zellpopulationen verglichen, die mittels unspezifischer (1. Balken), Cbl-b spezifischer (2. Balken), c-Cbl-spezifischer (3. Balken) und Cbl-b- und c-Cbl-spezifischer siRNA (4. Balken) transfiziert wurden;

Fig. 4 die IL2 Sekretion humaner CD8⁺ Zellen 20 Tage nach siRNA Behandlung. Gemessen wurde die IL2-Konzentration in Überständen von CD8⁺-T-Zellen ohne Stimulation (Medium) (links) und nach CD3-spezifischer (Mitte) oder nach CD3- und CD28-spezifischer Ko-Stimulation (rechts). Es wurden jeweils 2 Tage alte Zellpopulationen verglichen, die mittels unspezifischer (1. Balken), Cbl-b spezifischer (2. Balken), c-Cbl-spezifischer (3. Balken) und Cbl-b- und c-Cbl-spezifischer siRNA (4. Balken) transfiziert wurden; und

Fig. 5 die zeitliche Abfolge des in vitro Cbl-b-Attenuierungsansatzes zur Steigerung der Immunreaktivität.

B e i s p i e l e :

Beispiel 1: Sequenzen

Die folgenden siRNA-Sequenzen wurden zur Inhibierung von Cbl-b verwendet, alleine oder in Kombination:

1. Sense Sequenz:

G.A.A.C.A.U.C.A.C.A.G.G.A.C.U.A.U.G.A.U.U (SEQ ID Nr. 1)

Antisense Sequenz:

5'-P.U.C.A.U.A.G.U.C.C.U.G.U.G.A.U.G.U.U.C.U.U (SEQ ID Nr.2)

2. Sense Sequenz:

G.U.A.C.U.G.G.U.C.C.G.U.U.A.G.C.A.A.A.U.U (SEQ ID Nr. 3)

Antisense Sequenz:

5'-P.U.U.U.G.C.U.A.A.C.G.G.A.C.C.A.G.U.A.C.U.U (SEQ ID Nr. 4)

3. Sense Sequenz:

G.G.U.C.G.A.A.U.U.U.U.G.G.G.U.A.U.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 5)

Antisense Sequenz:

5'-P.U.A.A.U.A.C.C.C.A.A.A.A.U.U.C.G.A.C.C.U.U (SEQ ID Nr. 6)

4. Sense Sequenz

U.A.U.C.A.G.C.A.U.U.U.A.C.G.A.C.U.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 7)

Antisense Sequenz

5'-P.U.A.A.G.U.C.G.U.A.A.A.U.G.C.U.G.A.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 8)

Die folgenden siRNA-Sequenzen wurden zur Inhibierung von C-Cbl verwendet, alleine oder in Kombination:

1. Sense Sequenz

A.A.U.C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.C.G.G.A.A.A.U.U (SEQ ID Nr. 9)

Antisense Sequenz

5'-P.U.U.U.C.C.G.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G.A.U.U.U.U (SEQ ID Nr. 10)

2. Sense Sequenz

G.A.C.A.A.U.C.C.C.U.C.A.C.A.A.U.A.A.A.U.U (SEQ ID Nr. 11)

Antisense Sequenz

5'-P.U.U.U.A.U.U.G.U.G.A.G.G.G.A.U.U.G.U.C.U.U (SEQ ID Nr. 12)

3. Sense Sequenz

U.A.G.C.C.C.A.C.C.U.U.A.U.A.U.C.U.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 13)

Antisense Sequenz

5'-P.U.A.A.G.A.U.A.U.A.A.G.G.U.G.G.G.C.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 14)

4. Sense Sequenz

G.G.A.G.A.C.A.C.A.U.U.U.C.G.G.A.U.U.A.U.U (SEQ ID Nr. 15)

Antisense Sequenz

5'-P.U.A.A.U.C.C.G.A.A.A.U.G.U.G.U.C.U.C.C.U.U (SEQ ID Nr. 16)

Beispiel 2: Transiente Reduktion der Cbl-b Expression

In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die Immunreaktivität von T-Zellen ex vivo beeinflusst werden konnte.

Mittels CPT Röhrchen (Vacutainer) wurde einem Spender Vollblut abgenommen und daraus PBMCs durch Zentrifugation abgetrennt. Aus dieser Präparation wurden in einem weiteren Schritt CD8+ Zellen angereichert. Diese wurden mittels einer Cbl-b spezifischen siRNA unter Verwendung eines Amaxa Transfektionsgerätes transfiziert (Detailprotokoll Beispiel 2) und weiter kultiviert. Als Kontrolle wurde der identische Ansatz mit einer unspezifischen siRNA unter Verwendung des identischen Protokolls transfiziert. Nachdem eine potentielle Überschneidung der Funktion von Cbl-b und c-Cbl vermutet wird, wurden zwei weitere Ansätze mittels c-Cbl spezifischer siRNA sowie einer Kombination aus c-Cbl und Cbl-b spezifischer siRNA behandelt. Alle Ansätze wurden für 2 Tage in Kultur genommen. Dass die Transfektion zur gewünschten Attenuierung der Cbl-b Expression geführt hat, wurde durch anschließende Western-Blot Analyse aufgezeigt. Um die Cbl-b Expression zu induzieren, wurden die Kulturen mit CD3 und in einem weiteren Ansatz mit CD3 und CD28 spezifischen Antikörpern stimuliert. Die Cbl-b Expression in der transfizierten Präparation wurde in allen Versuchen auf unter 5 % der Intensität einer Kontrolltransfektion gedrückt, wie in Fig. 2 ersichtlich ist. Nachdem die Stabilität der siRNA und demzufolge eine effiziente Expressionsunterdrückung von begrenzter Dauer ist und nicht an weitere Zellen weitergegeben wird, handelt es sich bei dem gewählten Ansatz um eine transiente Attenuierung der Cbl-b Expression, die strikt an die Anwesenheit der Cbl-b siRNA gebunden ist.

Beispiel 3: Transfektionsprotokoll

Nukleofektion mit siRNAs in humane T-Zellen

Nukleofektion wird zusammen mit einem anderen Labor-Angestellten durchgeführt. Eine Person übernimmt die Pipettierung der siRNA Oligos und ein anderer Angestellter transferiert die Proben in ein Nährmedium. Dies beschleunigt das Protokoll signifikant.

1. Stelle das Medium für die Zell-RPMI (+pen/strep., +L-glut,

- +10% FCS) her.
2. Pipettiere das Nährmedium zumindest in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen/Konstrukt (eines zum Sammeln der Nukleofekt-Zellen und eines für das Küvetten-Waschmedium), 1 ml/l Nukleofektions-Probe in jedes Röhrchen. Bringe die Röhrchen auf 37°C.
 3. Markiere die Eppendorf-Röhrchen für jede Nukleofektions-Probe.
 4. Zentrifugiere die Nukleofekt-Zellen (410 g) für 7 min und entferne den Überstand. Füge Optimem (Gibco, #31985-047) hinzu,
 5. so dass die Zelldichte $40 \times 10^6/\text{ml}$ beträgt. Pipettiere 100 μl ($= 4 \times 10^6$ Zellen) in jedes Eppendorf-Röhrchen.
 6. Füge 1,5 - 2,5 μM siRNA-Oligo in die Eppendorf-Röhrchen hinzu, die die Zellen gerade vor der Nukleofektion enthalten. Mixen durch Pipettieren und übertrage die Lösung in die Küvette (vermeide Luftblasen). Klopfe die Küvette gegen den Tisch, um die Blasen zu entfernen.
 7. Schließe den Deckel und stelle die Küvette in die Vorrichtung. (Programmiere U-14 und nicht V-24 als beste Option mit der Nukleofektor-Lösung). Drücke den x-Knopf und entferne die Küvette nach dem OK-Signal. (Drücke den x-Knopf vor der nächsten Elektroporation nochmals.)
 8. Füge unverzüglich 500 μl RPMI (37°C) in die Nukleofektions-Küvette und mische behutsam durch Pipettieren mit der Pasteur-Pipette. Übertrage die Zellen in das Sammel-Falcon-Röhrchen. Wasche die Küvette einmal mit 500 μl vorerwärmter RPMI und Übertragen den Rest der Zellen in das Sammel-Falcon-Röhrchen.
 9. Wiederhole die Schritte 5-7 mit jeder Probe.
 10. Stelle die Falcons in den Inkubator, bis alle Proben nukleofektiert sind.
 11. Pipettiere 4 ml der Zellsuspension in 6-Well-Platten-Well ($= 2$ Proben) und gib die Platten in den Inkubator.
 12. Sammle am nächsten Tag die Zellen, zähle sie und starte die Kultur 24 Stunden nach der wie oben beschrieben durchgeführten Nukleofektion. Nimm ein Aliquot der Zellen zur RNA-Isolierung, um zu überprüfen, dass das Target-Gen zum Zeitpunkt der Aktivierung herunterreguliert ist. Die Proteinproben werden auf Grundlage der Protein-Expressions-Kinetik

genommen.

Beispiel 4: Nucleofektionseffizienz

CD8+ wurde w.o. beschrieben aus humanem peripherem Blut isoliert. Die neg. Selektion erfolgt über Beads.

Resultat (Vergleich Amaxa):

Reinheit der Population: 97% CD8+ (FACS)

Gerät	Viability nach 3,5h trypanblau negative [%]	Viability nach 24h trypanblau negative [%]	Effizienz siGlo pos im FACS [%]
Amaxa V-24	94	93	96
unbehandelt	100	99	0

Versuch mit Optimem:

Nucleofec- tion in	Pro- gramm	Zellen danach in	Viability nach 3,5h trypanblau negative [%]	Viability nach 24h trypanblau negative [%]	Effizienz siGlo pos im FACS [%]
Nucleofec- tor Solu- tion	V-24	hTC	99	92	96
Optimem	V-24	RPMI	92	67	96
Optimem	U-14	RPMI	95	92	96

Proteinchemisch wurde somit eine deutlich herabgesetzte Expression von Cbl-b nachgewiesen.

Beispiel 5: Transiente Steigerung der T-Zell Reaktivität - Messung von IFN-gamma

Es wurde somit gezeigt, dass die Cbl-b Expression in humanen CD8+ Zellen mit mindestens 95 % Effizienz unterdrückt werden konnte. Als weitere Konsequenz wird nun gezeigt, dass die Reaktivität der T-Zellpopulation gleichermaßen gesteigert werden kann. Um sicherzustellen, dass der gewünschte Effekt exklusiv Cbl-b spezifisch ist und nicht im Falle der Attenuierung der

Cbl-b Expression durch c-Cbl umgangen werden kann, wurde in einem weiteren Ansatz ebenfalls c-Cbl und in einem dritten c-Cbl und Cbl-b attenuiert. All diese CD8+ Zellkulturen wurden für zwei Tage in Kultur gehalten und einerseits mittels CD3 und ferner mittels CD3 und CD28 stimuliert und mit einer nicht stimulierten Gruppe verglichen. Normalerweise benötigen T-Zellen diese Kostimulation von CD3 und CD28, um zu proliferieren, was durch eine Ausschüttung inflammatorischer Zytokine in den Überständen der Kulturen leicht nachgewiesen werden kann. Um diese T-Zellaktivierung zu erfassen wurden IFN-gamma Titer in den Überständen gemessen. Eine graphische Darstellung des Einflusses der Expressionsattenuierung durch siRNA Behandlung auf die T-Zellreaktivität ist in Fig. 3 wiedergegeben. 2 Tage nach der Transfektion wurden sämtliche CD8+ Zellkulturen, die mit Cbl-b und/oder c-Cbl spezifischer siRNA transfiziert wurden, wie beschrieben stimuliert und mit einer Kontrollgruppe, die mit einer nicht spezifischen siRNA transfiziert wurde, verglichen. Unstimulierte Zellen zeigten grundsätzlich keine IFN-gamma Expression auf. Nach exklusiver CD3 Stimulation zeigten alle Kulturen eine erhöhte Reaktivität, so dass mindestens 500 pg/ml IFN-gamma in den Überständen nachgewiesen werden konnte. Hierbei waren die Signale für c-Cbl spezifische siRNA und unspezifisch transfizierte Zellen sehr ähnlich (niedrig). Lediglich mit Cbl-b spezifischer siRNA transfizierte Zellen zeigten eine deutlich höhere Reaktivität, welche mit einem IFN-gamma Titer von ca. 3 ng/ml einherging. Die Reaktivität der mittels c-Cbl und Cbl-b spezifischer siRNA ko-transfizierten Zellpräparation war jedoch geringer als nach Cbl-b spezifischer siRNA Behandlung und erreichte nur 1,2 ng/ml. Eine CD3 und CD28 spezifische Kostimulation erbrachte, wie erwartet, in allen Fällen deutlich höhere Signale als die nur CD3 spezifische Stimulation. Die Kontrollpräparation, die mit unspezifischer siRNA behandelt wurde, erbrachte IFN-gamma Titer in einer Höhe von 1,2 ng/ml während die mittels Cbl-b spezifischer siRNA behandelte Kultur eine IFN-gamma Konzentration um 3,8 ng/ml aufwies. Bemerkenswert war, dass die Cbl-b und c-Cbl spezifisch koattenuierte Kultur Titer in der Höhe von 1.7 ng/ml aufzeigte, die demnach deutlich geringer waren als die in der Cbl-b attenuierten Gruppe. Unerwartet war auch, dass die Zellpopulation, die mit c-Cbl spezifischer siRNA behandelt wurde, eine markant geringere Reaktivität aufwies und nur 500 pg/ml

IFN-gamma im Überstand gemessen wurden. Diese Konzentration ist deutlich geringer als die der unspezifisch behandelten ko-stimulierten Kontrollgruppe und vergleichbar mit Werten der nur mit anti-CD3 stimulierten Kontrollgruppe. Damit ist im Gegensatz zum murinen System eine Redundanz von Cbl-b und c-Cbl in humanen CD8+ T-Zellen experimentell ausgeschlossen und ein therapeutischer Ansatz nur über Cbl-b (und dessen Upstream-regulators) aber nicht via Cbl-b/c-Cbl Kombinationen zur Erhöhung der Immunreaktivität sinnvoll. Die Inhibition von c-Cbl ermöglicht allerdings eine Immunsuppression für andere Anwendungen, wie z.B. die Behandlung von Inflammation oder Allergien.

Dieser entweder als Solotherapie konzipierte oder mit einer Vakzinierung einhergehende, begleitende therapeutische Ansatz ist ferner in der Lage, disseminierte Tumorzellen auch in der Peripherie zu erkennen und durch den Aufbau einer Immunantwort nachhaltig zu bekämpfen. Sofort nach Diagnose einer Krebserkrankung eingesetzt wird hiermit ebenfalls eine Disseminierung eines Primärtumors verhindert.

Beispiel 6: Transiente Steigerung der T-Zell Reaktivität - Messung von IL2

Ein sehr ähnliches Bild ergab sich durch Messung der IL2 Konzentrationen in denselben Überständen, wie aus Fig. 4 entnommen werden kann: Ohne Stimulation gab es keine messbare Antwort, während eine anti-CD3 spezifische Behandlung zu einem deutlichen messbaren Signal in allen Gruppen führte. Somit wurden >200 pg/ml in der Cbl-b attenuierten Gruppe gemessen. Die IL2 Konzentration in der Cbl-b und c-Cbl koattenuierten Population war wiederum deutlich niedriger und betrug <100 pg/ml. Die anti-CD3 und anti-CD28 spezifische Kostimulation ergab wiederum höhere Signale. Es wurden in allen Gruppen unabhängig von der siRNA Behandlung IL2 Konzentrationen von >800 pg/ml gemessen. Die Kontrollgruppe erbrachte sehr ähnliche Titer wie die Cbl-b attenuierte von 1,3 bzw. 1,4 ng/ml. Interessanterweise waren die IL2 Konzentrationen nach c-Cbl spezifischer Attenuierung deutlich geringer und betrugen nur 800 pg/ml unabhängig davon, ob nur c-Cbl exklusiv oder c-Cbl zusammen mit Cbl-b im Ansatz verwendet wurden.

Beispiel 7: Transiente Steigerung der Immunreaktivität

Durch die in vitro oder ex vivo Behandlung wird die T-Zell-reaktivität effizient gesteigert, so dass es durch alleinige Stimulation des T-Zellrezeptors möglich ist, die Proliferation der T-Zellen einzuleiten. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für den beschriebenen therapeutischen Ansatz. Aufgrund der Verwendung der RNAi Technologie ist diese Attenuierung transien-ter Natur.

Diese Anwendbarkeit dieser modifizierten Zellen dient der Steigerung der Immunogenität von Vakzinen sowie zur allgemeinen Erhöhung der Reaktivität des Immunsystems. Einem Patienten wird fünf Tage nach einer Grundimmunisierung Vollblut in CPT Röhrchen abgenommen. Nach ca. 20 Minuten werden daraus durch Zentrifuga-tion PBMCs isoliert. Die Zellpräparationen wird mit Cbl-b spezi-fischen siRNAs transfiziert und sofort danach dem Patienten wieder re-implantiert. Zum Tag 10 wird wieder Vollblut entnommen und daraus Serum gewonnen. In diesem werden pro-inflammatorische Zytokintiter gemessen und mit der Kontrollgruppe verglichen. Es wird ebenfalls die Natur der induzierten Immunantwort hinsicht-lich deren zellulärer Ausrichtung einer Th1 gesteuerten (gestei-gerte IFNgamma, IL2 und IL12 Titer) oder einer humoralen Tendenz einer Th2 gerichteten Immunantwort (gesteigerte IL4, IL5 und IL10 Titer) analysiert. Falls nötig werden weitere Boosterimmu-nisierungen im 14 Tagesintervall mit oder ohne PBMC Behandlung durchgeführt (Fig. 5).

Patentansprüche:

1. In vitro oder ex vivo Verfahren zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems, welche mit einem Antigen kontaktiert wurden, umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der Cbl-b Funktion dieser Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Cbl-b Funktion durch Reduzierung oder Inhibierung der Expression von Cbl-b reduziert oder inhibiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Reduzierung oder Inhibierung der Funktion von Cbl-b transient ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression von Cbl-b durch Verwendung von Cbl-b antisense RNA oder siRNA reduziert oder inhibiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Funktion von Cbl-b durch Verwendung von Cbl-b Antagonisten, Inhibitoren, Aptameren oder Intrameren reduziert oder inhibiert wird.
6. Verfahren zur Reduzierung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems umfassend die Reduzierung oder Inhibierung der c-Cbl Funktion der Zellen, wodurch die Immunreaktivität der Zellen gegen das Antigen reduziert wird, vorzugsweise durch transiente Reduzierung oder Inhibierung, insbesondere durch Verwendung von c-Cbl antisense RNA oder siRNA.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen das Antigen aufgenommen haben und vorzugsweise ein Antigenfragment präsentieren.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen antigenpräsentierende Zellen, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und/oder dendritische Zellen umfas-

sen, insbesondere T-Lymphozyten.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen mit einem immunstimulierenden Cytokin, vorzugsweise CD3 und/oder CD28, stimuliert werden.

10. Verwendung von Cbl-b Inhibitoren oder Antagonisten zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Erhöhung der Immunreaktivität gegen ein Antigen in einem Patienten durch Isolierung von Zellen des Immunsystems eines Patienten, in vitro oder ex vivo Erhöhung der Immunreaktivität der Zellen durch Verwendung der Cbl-b Inhibitoren oder Antagonisten und Reimplantation der Zellen in den Patienten, wobei durch eine Reduktion oder die Inhibition der Cbl-b Funktion der Zellen die Immunreaktivität erhöht wird.

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung einer angeborenen oder erworbenen Immuninsuffizienz, insbesondere AIDS, multiples Myelom, chronische lymphatische Leukämie, medikamentenbedingte Immunsuppression oder einer Krebserkrankung.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Krebserkrankung feste Tumore bildet.

13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12 zur Behandlung einer Krebserkrankung in Kombination mit einer weiteren Anti-Tumor Therapie, vorzugsweise Chemotherapie, Radiotherapie oder Verabreichung eines Biologics.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Patient mit dem Antigen beimpft wurde, vorzugsweise vor der Isolierung der Zellen, insbesondere bevorzugt vor mindestens 2 Tagen und/oder höchstens 8 Wochen vor Isolierung der Zellen.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in vitro oder ex vivo mit dem Antigen kontaktiert werden.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch ge-

kennzeichnet, dass die in vitro oder ex vivo Erhöhung der Immunreaktivität oder die Zellen wie in Ansprüchen 1 bis 5, 7 bis 9 definiert sind.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass Zellen spezifisch für ein bestimmtes Antigen oder Zellen umfassend ein bestimmtes Antigen auf die Spezifität oder Anwesenheit des Antigens selektioniert werden und die Immunreaktivität der selektionierten Zellen erhöht wird.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Tumor Antigen ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen vor der Reimplantation expandiert werden.

20. Behälter, vorzugsweise ein Einwegröhrchen, umfassend einen Cbl-b Inhibitor, insbesondere zur Erhöhung der Immunreaktivität von Zellen des Immunsystems gegen ein Antigen, vorzugsweise wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert oder für eine Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 19.

21. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 oder zur Verwendung der Ansprüche 10 bis 19, umfassend einen Behälter, vorzugsweise ein Einwegröhrchen, zur Aufnahme von Zellen, einem Cbl-b-Inhibitor und vorzugsweise ein Zellmedium und/oder einen Transfektionspuffer.

22. Behälter nach Anspruch 20 oder Kit nach Anspruch 21 umfassend ein immunstimulierendes Cytokin, vorzugsweise CD3 und/oder CD28.

013945

1/4

Fig. 1

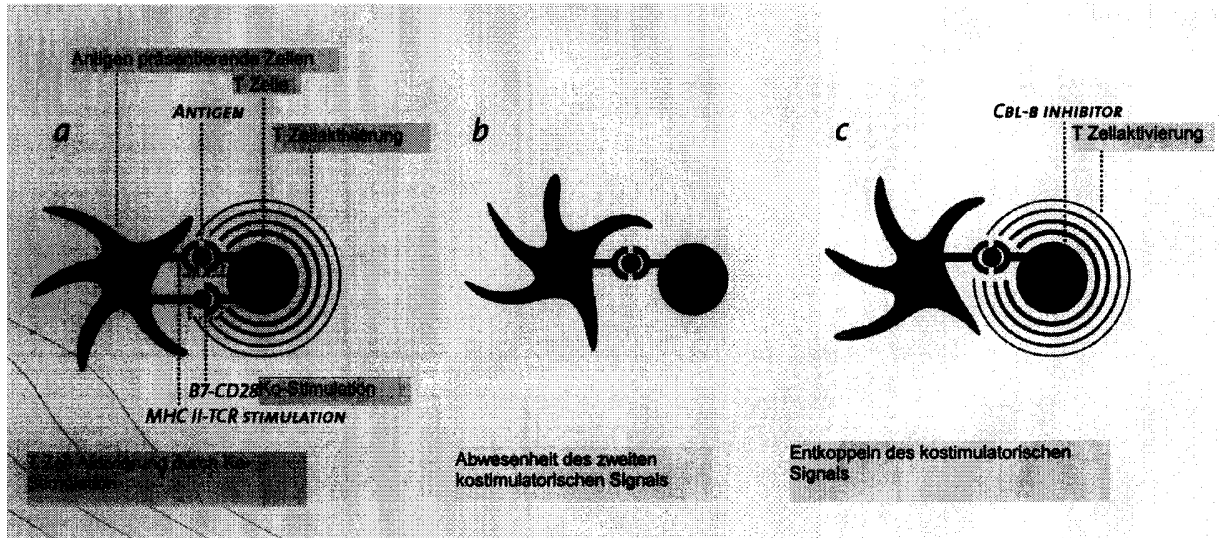
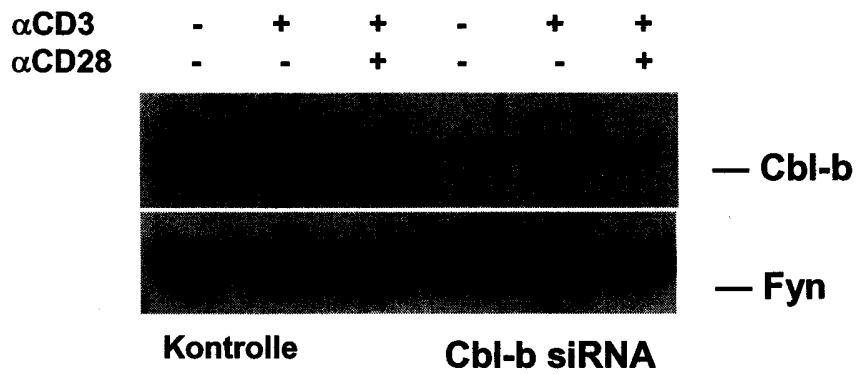


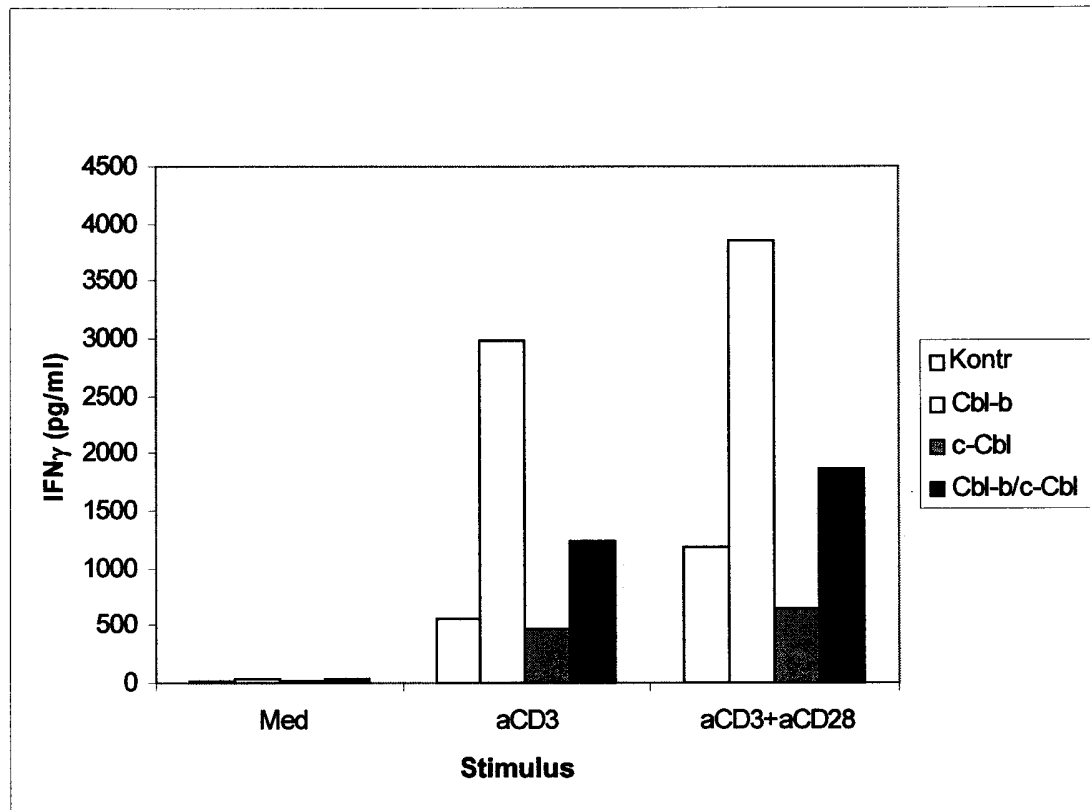
Fig. 2



013945

2/4

Fig. 3



013943

3/4

Fig. 4

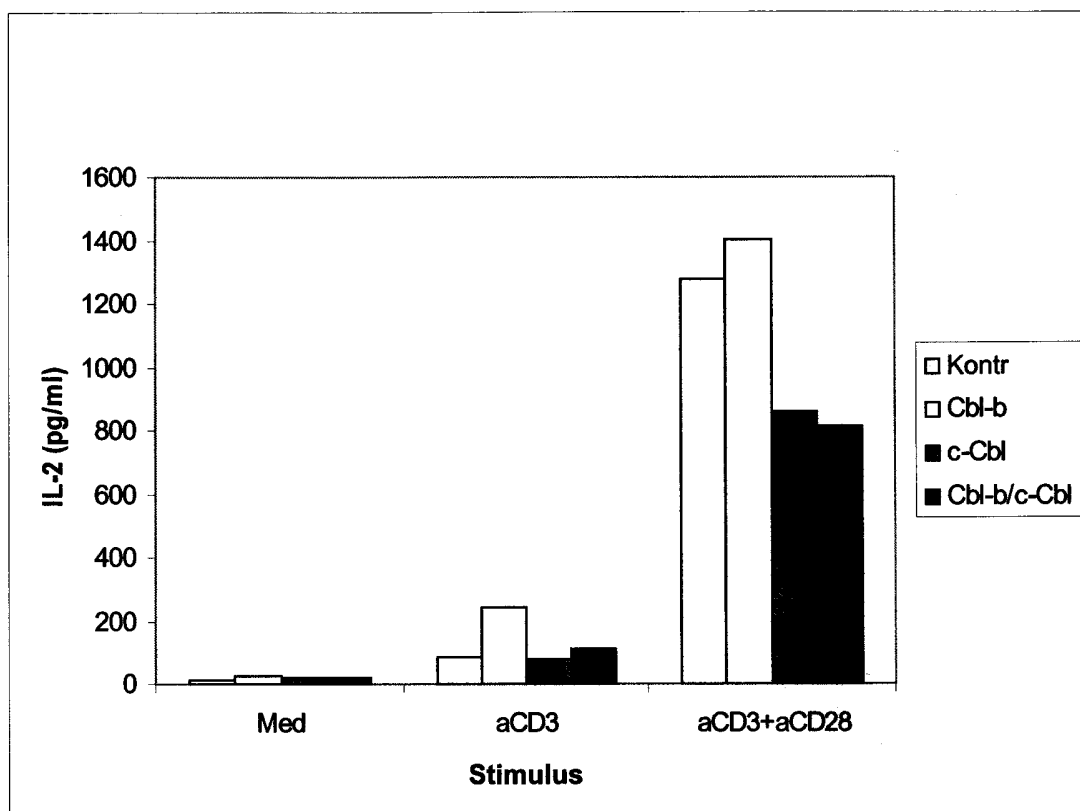
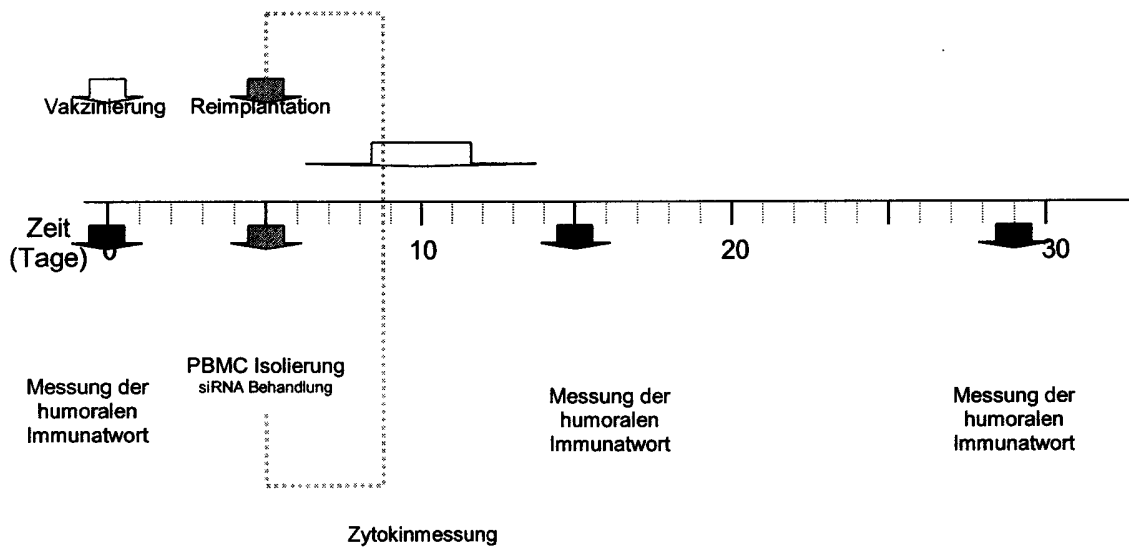
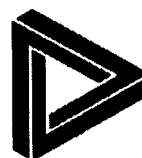


Fig. 5





Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC⁸:
C12N 5/06 (2006.01); **C12N 5/08** (2006.01); **C12N 15/11** (2006.01); **A61K 48/00** (2006.01);
A61K 39/00 (2006.01)

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA:
C12N5/06B11, C12N15/11B, A61K48/00, A61K39/00

Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):
C12N, A61K

Konsultierte Online-Datenbank:
WPI, EPODOC, FullText Engl.

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 10. Dezember 2007 eingereichten Ansprüchen 1-5, 7-9 erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend-Anspruch
X	US 2006292119 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 28. Dezember 2006 (28.12.2006) <i>gesamtes Dokument, bes. Ansprüche, Beschreibung Absatz [0555], [0321], [0324], [0332]</i> --	1-5, 7-9
X	WO 2004/078130 A2 (PROTEOLOGICS INC) 16. September 2004 (16.09.2004) <i>gesamtes Dokument, bes. Ansprüche 1, 2, 16, 17, 29-35, 52, 58, 61-67</i> --	1-4
A	WO 2004/055181 A1 (GARVAN INST MED RES) 1. Juli 2004 (01.07.2004) <i>gesamtes Dokument</i> ----	1-5, 7-9

Datum der Beendigung der Recherche:
18. September 2008

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
Dr. ETZ

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y** Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.

- A** Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P** Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E** Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- &** Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.