

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
4. August 2016 (04.08.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/120331 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 39/095 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/104 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/051708

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Januar 2016 (27.01.2016)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2015 201 479.7
28. Januar 2015 (28.01.2015) DE

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder : LANG, Karl Sebastian [DE/DE];
Dürerstrasse 11, 45147 Essen (DE).

(72) Erfinder: DUHAN, Vikas; Hufelandstraße 23, 45147
Essen (DE). KHAIRNAR, Vishal; Hohlweg 26, App. 11,
45147 Essen (DE). SINGER, Bernhard;
Sommerburgstraße 94, 45149 Essen (DE).

(74) Anwalt: PATENTANWÄLTE RUFF, WILHELM,
BEIER, DAUSTER & PARTNER MBB; 10 40 36,
70035 Stuttgart (DE).

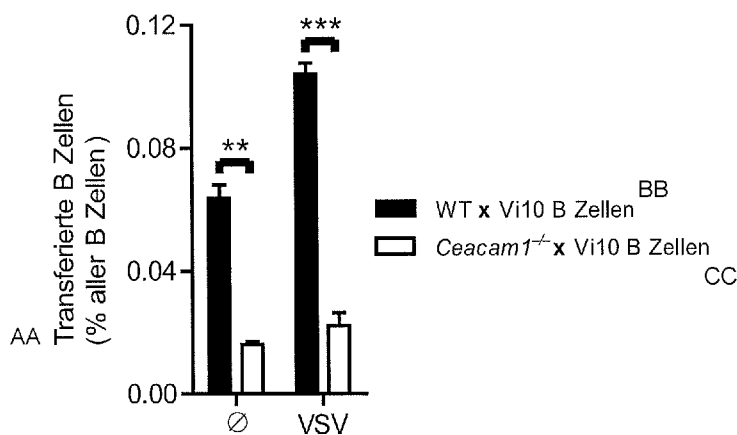
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: AGONISTIC ANTI-CD66CD66 ANTIBODY FOR ANTIVIRAL THERAPY

(54) Bezeichnung : AGONISTISCHE ANTI-CD66CD66 ANTIKÖRPER FÜR DIE ANTIVIRALEN THERAPIE



Figur 5 A

AA... Transferred B-cells
(% of all B-cells)
BB... B-cells
CC... B-cells

(57) Abstract: The invention relates to a substance for use in the therapy of viral infections and/or viral infectious diseases, the substance activating the expression and/or function of CEACAM1. The invention also relates to a substance for use in the therapy of B-cell-dependent diseases, said substance inhibiting the expression and/or function of CEACAM1. The invention further relates to a substance for use in the diagnosis of viral infections, viral infectious diseases and/or B-cell-dependent diseases, the substance being used to detect the expression and/or function of CEACAM1. In addition, the invention relates to an antibody, a therapeutic antibody, a variable heavy-chain (V_H) antibody domain, a variable light-chain (V_L) antibody domain, an isolated nucleic acid coding for a variable heavy-chain (V_H) antibody domain, an isolated nucleic acid coding for a variable light-chain (V_L) antibody domain, a hybridoma cell, and to a method for producing an antibody.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Substanz zur Anwendung bei der Therapie von viralen Infektionen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

und/oder viralen Infektionskrankheiten, wobei die Substanz die Expression und/oder Funktion von CEACAM1 aktiviert. Weiterhin betrifft die Erfindung eine Substanz zur Anwendung bei der Therapie von B-Zell-abhängigen Krankheiten, wobei die Substanz die Expression und/oder Funktion von CEACAM inhibiert. Des Weiteren betrifft die Erfindung eine Substanz zur Anwendung bei der Diagnose von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, wobei die Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von CEACAM1 verwendet wird. Die Erfindung betrifft ferner einen Antikörper, einen therapeutischen Antikörper, eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, eine isolierte Nukleinsäure codierend für eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, eine isolierte Nukleinsäure codierend für eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, eine Hybridomzelle sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers.

AGONISTISCHE ANTI-CD66CD66 ANTIKÖRPER FÜR DIE ANTIVIRALEN THERAPIE

- 5 Die Erfindung betrifft Substanzen zur Anwendung bei der Therapie oder Diagnose von viralen Infektionen, Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, Arznei- und Diagnosemittel, Antikörper, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domänen, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domänen, isolierte Nukleinsäuren, B-Zelllinien und ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern.
- 10 CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) ist ein humanes Glykoprotein, welches ebenfalls unter der Bezeichnung CD66a (Cluster of Differentiation 66a) bekannt ist. Es gehört zur der „carcinoembryonic antigen“ Gen-Familie. Dieser Familie gehören zwei Untergruppen an, nämlich die Untergruppe der Zelladhäsionsmoleküle, zu welchen das CEACAM1 zählt, sowie die Untergruppe der schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine.
- 15 Es ist bekannt, dass es sich bei CEACAM1 um ein spezielles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül handelt, welches auf Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen vorhanden ist. Zellen, die CEACAM1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, geben dieses aber auch in die Blutbahn ab. Das Glykoprotein vermittelt die Zelladhäsion mittels homophiler oder heterophiler Bindung zu anderen Proteinen der Zelladhäsionsmolekül-Untergruppe.
- 20 Es ist weiterhin bekannt, dass diverse Zellaktivitäten, wie beispielsweise die Differenzierung und Anordnung von dreidimensionalen Gewebestrukturen, die Angiogenese, die Apoptose, die Tumorsuppression und die Metastase, durch CEACAM1 beeinflusst werden kann.

Die Publikation von Singer et al. („Adhesion Molecule 1 Expression and Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Signaling in Human, Mouse, and Rat Leukocytes: Evidence for Replacement of the Short Cytoplasmic Domain Isoform by Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins in Human Leukocytes“, Bernhard B. Singer, Inka Scheffrahn, Robert Heymann, Kristmundur Sigmundsson, Robert Kammerer und Björn Öbrink, The Journal of Immunology (2002), Vol. 168, 5139-5146) beschäftigt sich mit Expressionsuntersuchungen von CEACAM1 auf Leukozyten von Menschen, Mäusen sowie Ratten.

Die Publikation von Greicius et al. („CEACAM1 is a Potent Regulator of B Cell Receptor Complex-induced Activation“, Gediminas Greicius, Eva Severinson, Nicole Beauchemin, Björn Öbrink und Bernhard B. Singer, Journal of Leukocyte Biology (2003), Vol. 74, 126-134) erwähnt, dass CEACAM1 das Tumorstadium von epithelialen Zellen, die Angiogenese, die NK-Zellzytotoxizität sowie die T-Zellzytotoxizität reguliert.

Die Publikation von Chen et al. („Editorial: CEACAM1: fine-tuned for fine-tuning“, Zhangguo Chen, Lanfen Chen und Richard S. Blumberg, Journal of Leukocyte Biology (2009), Vol. 86, 195-197) unterstreicht die Bedeutung von CEACAM1 in Bezug auf Tumorentstehung, Angiogenese und Metabolismus.

10 Die Publikation von Lobo et al. („Pivotal Advance: CEACAM1 is a Negative Coreceptor for the B Cell Receptor and Promotes CD19-mediated Adhesion of B Cells in a PI3K-dependent Manner“, Elizabeth O. Lobo, Zhifang Zhang und John E. Shively, Journal of Leukocyte Biology (2009), Vol. 86, 205-218) offenbart, dass CEACAM1 ein negativer Rezeptor für den sogenannten B-Zellen-Rezeptor (BCR) darstellt.

15 Die Publikation von Blau et al. („Targeted Disruption of the Ceacam1 (MHVR) Gene Leads to Reduced Susceptibility of Mice to Mouse Hepatitis Virus Infection“, Dianna M. Blau, Claire Turbide, Michel Tremblay, Melanie Olson, Stéphanie Létourneau, Eva Michaliszyn, Serge Jothy, Kathryn V. Holmes und Nicole Beauchemin, Journal of Virology (2001), Vol. 75, 8173-8186) offenbart, dass CEACAM1-Knockout-Mäuse weniger anfällig für eine Hepatitisinfektion sind.

20 WO 2005/058358 A2 offenbart von CEACAM1 abgeleitete Fusionsproteine im Zusammenhang von entzündlichen Erkrankungen.

Die US 8,598,322 B2 sowie die WO 2013/054331 A1 offenbaren jeweils Anti-CEACAM1-Antikörper sowie deren Verwendung zur Behandlung von Krebs.

25 Die WO 2013/082366 A1 offenbart CEACAM1-Antikörper für die Tumorentstehung, insbesondere Krebsbehandlung.

Die WO 2013/054331 A1 thematisiert CEACAM1-Antikörper im Kontext der Behandlung von viralen Infektionen und Krebserkrankungen.

In der WO 2014/022332 A1 wird eine Zusammensetzung beschrieben, welche die Interaktion zwischen TIM3 und CEACAM1 moduliert.

Der potentielle Nutzen von CEACAM1 als sogenanntes therapeutisches Target (therapeutische Zielsubstanz) ist somit zwar grundsätzlich erkannt worden. Gleichwohl sind bislang viele Fragen bezüglich einer therapeutischen Verwendbarkeit von CEACAM1 als Target noch nicht geklärt. Insbesondere gibt es bislang widersprüchliche Daten, ob CEACAM1 auf B-Zellen exprimiert wird und inwieweit CEACAM1-bindende Substanzen, insbesondere Antikörper, in der Lage sind, B-Zellen in vitro zu beeinflussen.

Es besteht daher weiterhin ein großer Bedarf an der Entwicklung von therapeutisch wirksamen Substanzen, deren therapeutisches Target CEACAM1 darstellt. Ein entsprechender Bedarf besteht dabei insbesondere für die Indikationsgebiete virale Infektionen, virale Infektionskrankheiten sowie B-Zell-abhängige Krankheiten.

Entsprechend lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, therapeutische Substanzen bereitzustellen, welche sich insbesondere für die Therapie von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten sowie B-Zell-abhängigen Krankheiten eignen. Weiterhin lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Substanzen zur Anwendung bei der Diagnose von insbesondere viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten sowie B-Zell-abhängigen Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch eine Substanz gemäß unabhängigem Anspruch 1, ein Arzneimittel gemäß Anspruch 11, einen Antikörper gemäß unabhängigem Anspruch 12, einen therapeutischen Antikörper gemäß unabhängigem Anspruch 13, eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß unabhängigem Anspruch 14, eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß unabhängigem Anspruch 15, isolierte Nukleinsäuren gemäß den unabhängigen Ansprüchen 16 und 17, eine B-Zelllinie gemäß Anspruch 18 sowie ein Verfahren gemäß Anspruch 19. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 9 definiert. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch ausdrückliche Bezugnahme zum Inhalt der vorliegenden Beschreibung gemacht.

Weiterhin werden die der Erfindung zugrundeliegenden Aufgaben durch die in der Beschreibung offenbarten Erfindungsgegenstände gelöst.

Die Erfindung beruht auf den folgenden überraschenden Befunden:

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass eine Aktivierung von CEACAM1 in Mäusen eine Aktivierung und insbesondere Differenzierung von B-Zellen bewirkt und weiterhin insbesondere eine positive Beeinflussung des Verlaufs von viralen Infektionen sowie Infektions-

krankheiten ermöglicht. Als Virusmodelle werden das lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) und das vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) verwendet. Das LCMV ist in der Maus nicht zytopathisch. Somit wird der Schaden, der bei einer Infektion entsteht, in erster Linie durch die Immunantwort gegen das Virus verursacht. Damit verhält sich dieses Virus ähnlich wie die
5 schwach zytopathischen Viren Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) und Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) im Menschen. Das vesikuläre Stomatitis Virus ist in der Maus zytopathisch. Es verhält sich daher ähnlich dem Ebola-Virus, Poliovirus, Rabiesvirus, Ebstein-Barr-Virus (EBV), Influenza-Virus, Herpes-Simplex-Virus sowie Cytomegalievirus (CMV).

Weiterhin konnte im Rahmen von Mäuseversuchen überraschenderweise nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung von CEACAM1 in vivo die Aktivierung und Differenzierung bzw.
10 Entwicklung von B-Zellen stark inhibiert und insbesondere den Ausbruch einer B-Zell-abhängigen Autoimmunität verhindert. Hierzu wurde bei Mäusen eine B-Zell-abhängige Autoimmunität mittels Pristan induziert. Dabei stellte sich heraus, dass eine Inhibierung von CEACAM1 eine Erkrankung der Mäuse verhinderte. Des Weiteren konnte der Erfinder nach-
15 weisen, dass eine Inhibierung von CEACAM1 zu reduzierten Serum-IgE-Konzentrationen führte.

Der Ausdruck „Expression“ umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung alle Prozesse, welche für eine vollständige, d. h. funktionsfähige, Ausprägung des Proteins CEACAM1 erforderlich sind. So umfasst der Ausdruck „Expression“ im Sinne der vorliegenden Erfindung insbesondere
20 die Transkription, die nachfolgende RNA-Prozessierung, die Translation sowie die Proteinreifung, wie beispielsweise Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen, von CEACAM1.

Der Ausdruck „Funktion von CEACAM1“ definiert im Sinne der vorliegenden Erfindung die physiologische Funktion bzw. die physiologischen Funktionen von CEACAM1, insbesondere dessen Befähigung, die Aktivität und insbesondere Differenzierung von B-Zellen zu beeinflussen.

25 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Antikörper besitzen jeweils eine für Antikörper charakteristische Struktur: Sie weisen jeweils zwei identische schwere Polypeptidketten und zwei identische leichte Polypeptidketten auf, welche durch kovalente Disulfidbindungen zu einer Y-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen Domäne, nachfolgend als variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne be-
30 zeichnet, und einer konstanten Domäne, nachfolgend als konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne bezeichnet. Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable Domäne, nachfolgend als variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne bezeichnet, und drei konstante Domänen, nachfolgend als konstante Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domänen bezeichnet.

Wenn daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung von einer variablen Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne des Antikörpers oder einer variablen Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne des Antikörpers die Rede ist, so bedeutet dies, dass der Antikörper insgesamt zwei variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domänen, nämlich eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne pro schwere Kette, bzw. zwei variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domänen, nämlich eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne pro leichte Kette, mit den im Folgenden offenbarten Merkmalen aufweist. Entsprechendes gilt sinngemäß, wenn im Folgenden von einer konstanten Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne des Antikörpers die Rede ist. Wenn im Folgenden von konstanten Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domänen des Antikörpers die Rede ist, so sind damit die konstanten Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domänen von beiden schweren Ketten des Antikörpers gemeint.

Gemäß einem ersten Aspekt schlägt die Erfindung eine Substanz zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen und/oder viralen Infektionskrankheiten, vorzugsweise beim Menschen oder nichthumanen Tier, vor. Die Substanz kann insbesondere zur Anwendung bei der Impfung gegen virale Infektionskrankheiten vorgesehen sein bzw. zur Impfung gegen virale Infektionskrankheiten verwendet werden.

Die Substanz zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie CEACAM1, bevorzugt die Expression und/oder Funktion von CEACAM1, aktiviert.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem CEACAM1 um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 1.

In einer alternativen Ausführungsform handelt es sich bei dem CEACAM1 um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 2. Das CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 2 besitzt im Unterschied zu dem CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr.1 eine sogenannte Interleukin-2 sekretorische Sequenz (IL-2 secretory sequence). Diese Sequenz führt dazu, dass das Protein den sekretorischen Weg einschlägt und somit von Zellen sezerniert wird. Ohne diese Modifikation würde das Protein nicht sezerniert werden.

Eine Aktivierung der Expression und/oder Funktion von CEACAM1 durch die erfindungsgemäß vorgesehene Substanz kann in unterschiedlicher Weise erfolgen.

Erfindungsgemäß kann es beispielsweise vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 auf Nukleinsäureebene aktiviert.

Weiterhin kann es vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 durch Aktivierung eines endogenen CEACAM1-Promotors aktiviert.

Des Weiteren kann es vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 auf mRNA-Ebene aktiviert.

- 5 Ferner kann es erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass die Substanz eine Aktivierung von CEACAM1 auf Proteinebene bewirkt.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um ein Polynukleotid, welches ein Polypeptid bzw. Protein codiert, wobei das Polypeptid bzw. Protein die Expression und/oder Funktion von CEACAM1 aktiviert.

- 10 Die erfindungsgemäß vorgesehene Substanz bindet bevorzugt, insbesondere unter Ausbildung einer Kreuzvernetzung, an CEACAM1. Die Kreuzvernetzung führt dazu, dass sich CEACAM1-Moleküle in der Membran zusammenlagern und durch Interaktion mit sich selbst oder anderen Signalproteinen ihre Wirkung in der Zelle entfalten.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um eine gegen CEACAM1 gerichtete Substanz.

Die Substanz kann weiterhin insbesondere gegen Inhibitoren, biologische Vorläufer und/oder Varianten, insbesondere Isoformen, von CEACAM1 gerichtet sein.

- 20 Grundsätzlich kann die Substanz ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Antisense-RNA, Aptamere, Spiegel-Aptamere, Antikörper, lösliche Bindungspartner, insbesondere lösliche Liganden, von CEACAM1, löslichen Rezeptoren, siRNA (small interfering RNA), shRNA (small hairpin RNA), siRNA-haltige Partikel (wie siRNA-haltige Calciumphosphat-Partikel), shRNA-haltige Partikel (wie shRNA-haltige Calciumphosphat-Partikel), siRNA-haltige Vesikel (wie siRNA-haltige Liposomen), shRNA-haltige Vesikel (wie siRNA-haltige Liposomen) und Ribozyme. Bevorzugt liegen die siRNA und shRNA in den siRNA-haltigen Partikel und shRNA-haltigen
25 Partikel verpackt vor.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um einen gegen CEACAM1 gerichteten Antikörper (aktivierender Antikörper).

Bei dem Antikörper handelt es sich in einer weiteren Ausführungsform um einen murinen Antikörper oder leporinen Antikörper. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß bevorzugt sein, wenn es sich bei dem Antikörper um einen Kaninchen-Antikörper, Maus-Antikörper oder Ratten-Antikörper handelt, d. h. um einen Antikörper, welcher von einem Kaninchen, einer Maus oder einer Ratte hergestellt worden ist.

Der Antikörper kann insbesondere eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne aufweisen, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne murinen Ursprungs und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne aufweist, welche von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Weiterhin kann der Antikörper insbesondere eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne aufweisen, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtkette-(V_L)-Domäne murinen Ursprungs und variable Antikörper-Leichtkette-(V_L)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass der Antikörper eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne aufweist, welche von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Zur Verbesserung der Verträglichkeit des Antikörpers kann es in einer weiteren Ausführungsform vorgesehen sein, dass der Antikörper konstante Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domänen humanen Ursprungs und/oder eine konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne humanen Ursprungs aufweist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Antikörper um einen humanisierten Antikörper. Bei dieser Ausführungsform sind die konstanten Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domäne sowie die konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne des Antikörpers jeweils humanen Ursprungs, wohingegen die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne des Antikörpers jeweils xenogenen, insbesondere murinen oder leporinen, Ursprungs sind.

Der Antikörper weist vorzugsweise eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne auf, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne auf, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß
5 SEQ ID Nr. 13.

Besonders bevorzugt weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5 auf.

In einer alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 auf.
10

Gemäß einer weiteren alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13 auf.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne auf, welche durch eine Nukleotidsequenz codiert ist, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 8 und SEQ ID Nr. 12.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Leichtketten (V_L)-Domäne auf, welche durch eine Nukleotidsequenz codiert ist, welche
20 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 14.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 4 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 6 codiert ist, auf.

25 Gemäß einer alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 8 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 10 codiert ist, auf.

Gemäß einer weiteren alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 12 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 14 codiert ist, auf.

- 5 Weiterhin handelt es sich bei dem Antikörper vorzugsweise um einen monoklonalen Antikörper.

Bei dem Antikörper kann es sich in einer weiteren Ausführungsform um einen Antikörper handeln, welcher von einer B-Zell-Hybridomlinie (B-Zellklon) produziert wird, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 6G5J, B3-17 und 18-20.

- 10 Gemäß weiteren Ausführungsformen kann es sich bei der erfindungsgemäß vorgesehenen Substanz um einen natürlichen Bindungspartner von CEACAM1 oder um eine modifizierte Form eines solchen Bindungspartners handeln. Beispielsweise kann die Substanz ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus lösliches UspA1 Protein von *Moraxella catarrhalis*, modifiziertes UspA1 Protein von *Moraxella catarrhalis*, lösliches Opa Protein von *Neisseria gonorrhoeae*, modifiziertes Opa Protein von *Neisseria gonorrhoeae*, lösliches variables P5 Protein von *Haemophilus influenzae*, modifiziertes variables P5 Protein von *Haemophilus influenzae*, modifiziertes Tim3, modifiziertes Glykoprotein des Hepatitisvirus, modifiziertes Salmonella-Oberflächenprotein und modifiziertes *Escherichia coli*-Oberflächenprotein.
- 15

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche Protein UspA1 von *Moraxella catarrhalis* gemäß SEQ ID Nr. 15.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche Protein UspA1 von *Moraxella catarrhalis*, welches durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 16 codiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche Protein Opa von *Neisseria gonorrhoeae* gemäß SEQ ID Nr. 17.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche variable Protein P5 von *Haemophilus influenzae* gemäß SEQ ID Nr. 18.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche, humane, rekombinante CEACAM1-Fusionsprotein gemäß SEQ ID Nr. 19.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um das lösliche, humane, rekombinante CEACAM1-Fusionsprotein, welches durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 20 codiert wird.

5 Die viralen Infektionen bzw. Infektionskrankheiten sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus virale Hepatitis, Hepatitis B, Hepatitis C, HIV-Infektion, Aids, Influenza, Poliomyelitis, virusinduzierte Myokarditis, Epstein-Barr-Virus-Infektionen bzw. -Infektionskrankheiten wie Pfeiffer-Drüsenfieber, Herpes simplex, Zytomegalie, Tollwut und Ebola.

10 Gemäß einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung eine Substanz zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von B-Zell-abhängigen Krankheiten, vorzugsweise beim Menschen oder nichthumanen Tier.

Die Substanz zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie CEACAM1, bevorzugt die Expression und/oder Funktion von CEACAM1, inhibiert.

15 Eine Inhibierung der Expression und/oder Funktion von CEACAM1 durch die erfindungsgemäß vorgesehene Substanz kann in unterschiedlicher Weise erfolgen.

Erfindungsgemäß kann es beispielsweise vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 auf Nukleinsäureebene inhibiert.

Weiterhin kann es vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 durch Aktivierung eines endogenen CEACAM1-Promotors inhibiert.

20 Des Weiteren kann es vorgesehen sein, dass die Substanz die Expression von CEACAM1 auf mRNA-Ebene inhibiert.

Ferner kann es erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass die Substanz eine Inhibierung von CEACAM1 auf Proteinebene bewirkt.

25 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um ein Polynukleotid, welches ein Polypeptid bzw. Protein codiert, wobei das Polypeptid bzw. Protein die Expression und/oder Funktion von CEACAM1 inhibiert.

Bei den B-Zell-abhängigen Krankheiten handelt es sich vorzugsweise um Autoimmunkrankheiten und/oder entzündliche Krankheiten.

Bevorzugt sind die Autoimmunkrankheiten bzw. entzündlichen Krankheiten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Myasthenia gravis, systemischer Lupus erythematodes, Autoimmunthyreoiditis, Dermatitis wie atopische Dermatitis und/oder Ekzem, Psoriasis, Sjögren Syndrom, Morbus Crohn, Konjunktivitis, Cholangitis ulcerosa, Asthma bronchiale, allergisches Asthma, Lupus erythematodes wie kutaner Lupus erythematodes, Allergien, Morbus Wegener (granulomatöse Polyangiitis), Stevens-Johnson-Syndrom, Sprue, Morbus Basedow, Sarkoidose, primär biliäre Zirrhose, Autoimmunhepatitis, Diabetes mellitus wie Diabetes mellitus Typ 1 und/oder Diabetes mellitus Typ 2, Arthritis wie rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis und/oder Psoriasisarthritis, Multiple Sklerose und B-Zell-Lymphom.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der Substanz wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen vollständig auf die im Rahmen des ersten Erfindungsaspekts gemachten Ausführungen Bezug genommen. Die dort beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile gelten sinngemäß auch für die Substanz gemäß zweitem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem dritten Aspekt betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, vorzugsweise zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, insbesondere beim Menschen oder nichthumanen Tier.

Das Arzneimittel zeichnet sich besonders dadurch aus, dass es wenigstens eine Substanz gemäß erstem und/oder zweitem Erfindungsaspekt enthält.

Bevorzugt enthält das Arzneimittel zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff. Als geeignete Trägerstoffe kommen grundsätzlich anorganische und/oder organische Trägerstoffe in Frage. Beispielsweise kann der Trägerstoff ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Wasser, pflanzliche Öle, Fettverbindungen, Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlenhydrate wie Laktose und/oder Stärke, Magnesiumstearat, Talg, Vaseline und Mischungen davon. Bezüglich geeigneter Trägerstoffe sei beispielhaft auf das Lehrbuch von Bauer et al. (Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, 6. Auflage, 1999, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart) sowie auf das Lehrbuch von Rowe et al. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5. Auflage, 2006, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association) verwiesen, deren Offenbarungsgehalt in Bezug auf die dort

beschriebenen Trägerstoffe durch ausdrückliche Bezugnahme zum Inhalt der vorliegenden Beschreibung gemacht wird.

Erfindungsgemäß kann es weiterhin vorgesehen sein, dass das Arzneimittel ferner wenigstens einen Hilfsstoff enthält, welcher beispielsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

5 Gleitstoffe, Konservierungsstoffe, Stabilisierungsstoffe, Resorptionsbeschleuniger, Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farbstoffe, Geschmackstoffe, Duftstoffe, weitere Wirkstoffe und Mischungen davon.

Bei dem Arzneimittel kann es sich insbesondere um ein Impfmittel gegen virale Infektionskrankheiten handeln.

- 10 Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Arzneimittels, insbesondere der wenigstens einen Substanz, der viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort in Bezug auf die Substanz beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile sowie die dort erwähnten viralen Infektionen, viralen Infektionskrank-
- 15 heiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten gelten sinngemäß auch für das Arzneimittel gemäß drittem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem vierten Aspekt betrifft die Erfindung eine Substanz zur Anwendung bei der Diagnose von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, vorzugsweise beim Menschen oder nichthumanen Tier

- 20 Die Substanz zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie zum Nachweis von CEACAM1, bevorzugt zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von CEACAM1, vorgesehen ist bzw. verwendet wird.

Ein Nachweis der Expression und/oder Funktion von CEACAM1 durch die erfindungsgemäß vorgesehene Substanz kann in unterschiedlicher Weise erfolgen.

- 25 Erfindungsgemäß kann es beispielsweise vorgesehen sein, dass die Substanz zum Nachweis der Expression von CEACAM1 auf Nukleinsäureebene verwendet wird.

Weiterhin kann es vorgesehen sein, dass die Substanz zum Nachweis der Expression von CEACAM1 auf mRNA-Ebene verwendet wird.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um ein Polynukleotid, welches ein Polypeptid bzw. Protein codiert, wobei das Polypeptid bzw. Protein die Expression und/oder Funktion von CEACAM1 inhibiert.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Substanz um eine gegen CEACAM1 gerichtete Substanz.

Besonders bevorzugt ist die gegen CEACAM1 gerichtete Substanz ein Antikörper. Ein derartiger Antikörper kann im Rahmen von dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren, beispielsweise ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), eingesetzt werden. Im Falle des ELISA wird ein gegen das zu bestimmende Antigen (CEACAM1) gerichteter spezifischer Antikörper an
10 ein Trägermaterial, beispielsweise Cellulose oder Polystyrol, gebunden. Auf dem Trägermaterial bilden sich nach einer Inkubation mit einer Probe, welche CEACAM1 als Antigen enthält, Immunkomplexe. In einem nachfolgenden Schritt wird diesen Immunkomplexen ein markierter Antikörper, welcher ebenfalls gegen das Antigen CEACAM1 gerichtet ist, aber zweckmäßigerweise an einer anderen Stelle bindet als der auf dem Trägermaterial gebundene Antikörper,
15 hinzugegeben. Bei diesem markierten Antikörper handelt es sich gewöhnlich um ein Antikörper-Enzym-Konjugat, wobei es sich bei dem Enzym in der Regel um alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase handelt. Durch die Zugabe des markierten Antikörpers entstehen letztendlich ternäre Komplexe aus dem Antigen (CEACAM1) und den beiden jeweils gegen das Antigen (CEACAM1) gerichteten Antikörpern. Diese ternären Komplexe lassen sich durch Zugabe
20 von chromogenen Substraten, wie beispielsweise para-Nitrophenol, sichtbar machen. Hieraus kann die Konzentration von CEACAM1 in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Antigenkonzentration ermittelt werden. Ebenso ist es möglich, gegen CEACAM1 gerichtete Antikörper im Rahmen von ELISPOT-Verfahren einzusetzen. Die in diesem Absatz erwähnten Verfahren
25 sind dem Fachmann hinreichend vertraut, so dass auf weitergehende Ausführungen verzichtet wird.

In einer weiteren Ausführungsform kann es sich bei der Substanz um ein Oligonukleotid handeln, welches beispielsweise mittels der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dazu
geeignet ist, selektiv bestimmte DNA-Abschnitte von CEACAM1 zu amplifizieren und auf diese
30 Weise einen vorzugsweise quantitativen Nachweis von CEACAM1 zu erbringen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann es sich bei der Substanz um ein Oligo- oder Polynukleotid handeln, welches mit CEACAM1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Mit Hilfe von derartigen Oligo- bzw. Polynukleotiden können beispielsweise Southern Blots oder

Northern Blots durchgeführt werden, um auf diese Weise den DNA- oder RNA-Gehalt an CEACAM1 nachzuweisen. Auf diese Weise lässt sich beispielsweise auch die Transkriptionsrate von CEACAM1 untersuchen. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann ebenfalls hinreichend geläufig, so dass auf weiterführende Ausführungen an dieser Stelle ebenfalls verzichtet werden soll.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der Substanz sowie bezüglich möglicher viraler Infektionen, viraler Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort in Bezug auf die Substanz beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile sowie die dort genannten viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten gelten sinngemäß auch für die Substanz gemäß viertem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem fünften Aspekt betrifft die Erfindung ein Diagnosemittel, vorzugsweise zur Anwendung bei der Diagnose von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, insbesondere beim Menschen oder nichthumanen Tier.

Das Diagnosemittel zeichnet sich besonders dadurch aus, dass es wenigstens eine Substanz gemäß erstem und/oder zweitem Erfindungsaspekt enthält.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Diagnosemittels, insbesondere der wenigstens einen Substanz, der viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, wird ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort in Bezug auf die Substanz beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile sowie die dort genannten viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten gelten sinngemäß auch für das Diagnosemittel gemäß fünftem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem sechsten Aspekt betrifft die Erfindung einen gegen CEACAM1 gerichteten Antikörper.

Der Antikörper zeichnet sich besonders dadurch aus, dass er eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11, und/oder eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, ausgewählt aus der

Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13, aufweist.

Der Antikörper weist in einer bevorzugten Ausführungsform eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5 auf.

In einer alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 auf.

10 In einer weiteren alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11 und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13 auf.

Bei dem Antikörper handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform um einen murinen Antikörper oder leporinen Antikörper. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß bevorzugt, 15 wenn es sich bei dem Antikörper um einen Maus-Antikörper, Ratten-Antikörper oder Kaninchen-Antikörper handelt, d. h. um einen Antikörper, welcher von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Insbesondere kann die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne murinen Ursprungs und 20 variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Weiterhin kann insbesondere die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne ausgewählt sein 25 aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne murinen Ursprungs und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Zur Verbesserung der Verträglichkeit des Antikörpers kann es in einer weiteren Ausführungsform vorgesehen sein, dass der Antikörper eine konstante Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domäne humanen Ursprungs und/oder eine konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne humanen Ursprungs aufweist.

- 5 Gemäß einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Antikörper um einen humanisierten Antikörper. Bei dieser Ausführungsform sind die konstante Antikörper-Schwerketten-(C_H)-Domäne sowie die konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne des Antikörpers jeweils humanen Ursprungs, wohingegen die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne des Antikörpers jeweils xenogenen, insbesondere
10 murinen oder leporinen, Ursprungs sind.

Weiterhin handelt es sich bei dem Antikörper vorzugsweise um einen monoklonalen Antikörper.

Bei dem Antikörper kann es sich insbesondere um einen Antikörper handeln, welcher von einer B-Zell-Hybridomlinie (B-Zellklon) produziert wird, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 6G5J, B3-17 und 18-20.

- 15 Bei dem Antikörper handelt es sich weiterhin vorzugsweise um einen Antikörper zur Anwendung in der Medizin.

Grundsätzlich kann es sich bei dem Antikörper um einen diagnostischen und/oder therapeutischen Antikörper handeln. Entsprechend kann der Antikörper zur Anwendung bei der Diagnose und/oder Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von Krankheiten vorgesehen sein.

- 20 Grundsätzlich kann es sich bei dem Antikörper um einen Antikörper zur Anwendung bei der Diagnose von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten und/oder Tumoren handeln.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Antikörper um einen Antikörper zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von Krankheiten.

- 25 Besonders bevorzugt ist der Antikörper zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten und/oder Tumoren vorgesehen. Mit anderen Worten handelt es sich bei dem Antikörper gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform um einen Antikörper zur Anwen-

derung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten und/oder Tumoren.

Bei den Tumoren kann es sich grundsätzlich um benigne Tumore oder maligne Tumore handeln.

- 5 Vorzugsweise handelt es sich bei den Tumoren um maligne Tumore. Die maligne Tumore können dabei insbesondere ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Karzinome, Melanome, Plastome, Lymphome und Sarkome.

Die Karzinome können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Analkarzinom, Bronchialkarzinom, Lungenkarzinom, Endometriumkarzinom, Gallenblasenkarzinom, hepatozelluläres
10 Karzinom, Hodenkarzinom, kolorektales Karzinom, Larynxkarzinom, Speiseröhrenkrebs, Magenkarzinom, Mammakarzinom, Nierenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreastumor, Pharynxkarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom und Cervixkarzinom.

Die Sarkome können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Angiosarkom, Chondrosarkom, Ewing-Sarkom, Fibrosarkom, Karposi-Sarkom, Lipo-Sarkom, Leiomyosarkom, malignes fibröses Histiozytom, neurogenes Sarkom, Osteosarkom und Rhabdomyosarkom.
15

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Antikörpers, insbesondere möglicher viraler Infektionen, viraler Infektionskrankheiten und/oder B-Zell-abhängigen Krankheiten, zu deren Diagnose und/oder Therapie der Antikörper verwendet bzw. eingesetzt werden kann, wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.
20

Gemäß einem siebten Aspekt betrifft die Erfindung einen weiteren, gegen CEACAM1 gerichteten Antikörper.

Der Antikörper zeichnet sich besonders dadurch aus, dass er eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz codiert ist, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 8 und SEQ ID Nr. 12,
25 und/oder eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz codiert ist, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 14, aufweist.

Besonders bevorzugt weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 4 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 6 codiert ist, auf.

- 5 In einer alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 8 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 10 codiert ist, auf.

- 10 In einer weiteren alternativen Ausführungsform weist der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 12 codiert ist, und eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 14 codiert ist, auf.

- 15 Bei dem Antikörper handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform um einen murinen Antikörper oder leporinen Antikörper. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn es sich bei dem Antikörper um einen Maus-Antikörper, Ratten-Antikörper oder Kaninchen-Antikörper handelt, d. h. um einen Antikörper, welcher von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

- 20 Insbesondere kann die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne murinen Ursprungs und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

- 25 Weiterhin kann insbesondere die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne murinen Ursprungs und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten kann es erfindungsgemäß insbesondere vorgesehen sein, dass die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

- 30 Zur Verbesserung der Verträglichkeit des Antikörpers kann es in einer weiteren Ausführungsform vorgesehen sein, dass der Antikörper eine konstante Antikörper-Schwerketten-(C_H)-

Domäne humanen Ursprungs und/oder eine konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne humanen Ursprungs aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Antikörper um einen humanisierten Antikörper. Bei dieser Ausführungsform sind die konstante Antikörper-Schwerketten-
5 (C_H)-Domäne sowie die konstante Antikörper-Leichtketten-(C_L)-Domäne des Antikörpers jeweils humanen Ursprungs, wohingegen die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne des Antikörpers jeweils xenogenen, insbesondere murinen oder leporinen, Ursprungs sind.

Weiterhin handelt es sich bei dem Antikörper vorzugsweise um einen monoklonalen Antikörper.

10 Bei dem Antikörper kann es sich insbesondere um einen Antikörper handeln, welcher von einer B-Zell-Hybridomlinie (B-Zellklon) produziert wird, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 6G5J, B3-17 und 18-20.

Bei dem Antikörper handelt es sich weiterhin vorzugsweise um einen Antikörper zur Anwendung in der Medizin.

15 Grundsätzlich kann es sich bei dem Antikörper um einen diagnostischen und/oder therapeutischen Antikörper handeln. Entsprechend kann der Antikörper zur Anwendung bei der Diagnose und/oder Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von Krankheiten vorgesehen sein.

Grundsätzlich kann es sich bei dem Antikörper um einen Antikörper zur Anwendung bei der Diagnose von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten
20 und/oder Tumoren handeln.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Antikörper um einen Antikörper zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von Krankheiten.

Besonders bevorzugt ist der Antikörper zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen
25 Krankheiten und/oder Tumoren vorgesehen. Mit anderen Worten handelt es sich bei dem Antikörper gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform um einen Antikörper zur Anwendung bei der Therapie, d.h. Behandlung und/oder Vorbeugung, von viralen Infektionen, viralen Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten und/oder Tumoren.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Antikörpers, insbesondere möglicher viraler Infektionen, viraler Infektionskrankheiten, B-Zell-abhängigen Krankheiten und/oder Tumoren, zu deren Diagnose und/oder Therapie der Antikörper eingesetzt bzw. verwendet werden kann, wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.

Gemäß einem achten Aspekt betrifft die Erfindung eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne eines gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpers.

Die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne ist ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11.

Die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne ist in einer bevorzugten Ausführungsform murinen oder leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

Der Antikörper ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der variablen Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne sowie des Antikörpers wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenso vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort in Bezug auf die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne sowie den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen sowie Vorteile gelten sinngemäß auch für die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß achtem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem neunten Aspekt betrifft die Erfindung eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne eines gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpers.

Die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne ist ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13.

Die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne ist in einer bevorzugten Ausführungsform murinen oder leporinen Ursprungs. Mit anderen Worten ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne von einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen hergestellt worden ist.

- 5 Der Antikörper ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der variablen Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne sowie des Antikörpers wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenso vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort in Bezug auf die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne sowie den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen und
10 Vorteile gelten sinngemäß auch für die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß neuem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem zehnten Aspekt betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure, welche für eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne eines gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpers codiert.

- 15 Bei der Nukleinsäure sowie dem Antikörper handelt es sich vorzugsweise um eine humane Nukleinsäure bzw. humanen Antikörper. Der Antikörper ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper.

Die Nukleinsäure weist eine Nukleotidsequenz auf oder besteht aus einer Nukleotidsequenz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 4 und SEQ ID Nr. 8 und SEQ
20 ID Nr. 12.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der Nukleinsäure wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort insbesondere in Bezug auf die variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne sowie den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile gelten sinngemäß auch für die Nukleinsäure gemäß zehntem Erfindungsaspekt.
25

Gemäß einem elften Aspekt betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure, welche für eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne eines gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpers codiert.

Bei der Nukleinsäure sowie dem Antikörper handelt es sich vorzugsweise um eine humane Nukleinsäure bzw. humanen Antikörper. Der Antikörper ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper.

Die Nukleinsäure weist eine Nukleotidsequenz auf oder besteht aus einer Nukleotidsequenz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 14.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der Nukleinsäure wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort insbesondere in Bezug auf die variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne sowie den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile gelten sinngemäß auch für die Nukleinsäure gemäß elftem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem zwölften Aspekt betrifft die Erfindung eine Hybridomzelle, welche einen Antikörper gemäß sechstem oder siebtem Erfindungsaspekt produziert.

Die Hybridomzelle ist vorzugsweise durch Fusion von B-Lymphozyten, welche aus einem gegen CEACAM1 immunisierten Versuchstier stammen und gegen CEACAM1 gerichtete Antikörper produzieren, und Myelomzellen gebildet. Das Versuchstier kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Maus, Ratte, Kaninchen und Ziege. Unter Myelomzellen werden allgemein Zellen (Plasmazellen) einer aus einem Myelom (Plasmazytom) eines Tieres gewonnenen Zelllinie verstanden. Die Myelomzellen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung aus dem Myelom einer Maus, einer Ratte, eines Kaninchens oder einer Ziege gewonnen sein.

Bevorzugt handelt es sich bei den Myelomzellen um Zellen der Maus-Myelom-Zelllinie NS1/0.

Die Hybridomzelle gehört vorzugsweise zu einer B-Zell-Hybridomlinie (B-Zellklon), welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 6G5J, B3-17 und 18-20.

Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile der Hybridomzelle wird zur Vermeidung von unnötigen Wiederholungen ebenfalls vollständig auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen. Die dort insbesondere in Bezug auf den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile geltend sinngemäß auch für die Hybridomzelle gemäß zwölftem Erfindungsaspekt.

Gemäß einem dreizehnten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpers, insbesondere eines Antikörpers gemäß sechstem oder siebtem Erfindungsaspekt.

Das Verfahren weist die folgenden Schritte auf:

- 5 a) Fusionieren von B-Zellen, welche aus einem gegen ein Antigen immunisierten Versuchstier stammen, und Myelomzellen unter Ausbildung von Hybridomzellen,
- b) Selektieren der Hybridomzellen,
- c) Isolieren von Hybridomzellen, welche gegen das Antigen gerichtete Antikörper produzieren.

- 10 Gegenüber gattungsgemäßen Verfahren zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren besonders dadurch aus, dass das Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 1, CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 2, ein Fragment, insbesondere Epitop, der SEQ ID Nr. 1 und ein Fragment, insbesondere Epitop, der SEQ ID Nr. 2.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Antigen um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein Fragment, insbesondere Epitop, davon.

In einer alternativen Ausführungsform handelt es sich bei dem Antigen um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 2 oder ein Fragment, insbesondere Epitop, davon.

- 20 Bei dem Versuchstier handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform um eine Maus, eine Ratte, ein Kaninchen oder eine Ziege. Die Verwendung einer Maus als Versuchstier ist erfindungsgemäß jedoch besonders bevorzugt.

Die B-Zellen können mit Zellen einer aus einem Myelom einer Maus, einer Ratte, eines Kaninchens oder einer Ziege gewonnenen Zelllinie fusioniert werden.

Vorzugsweise werden die B-Zellen mit Zellen der Maus-Myelom-Zelllinie NS1/0 fusioniert.

- 25 Der Schritt a), d. h. die Zellfusion, kann mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt werden. Hierzu werden die B-Zellen und Myelom-Zellen zusammen in eine wässrige, polyethylenglykolhaltige Fusionslösung gegeben und zentrifugiert. Da das Wasser weitgehend durch

PEG gebunden wird, werden die Zellmembranen in engen Kontakt zueinander gebracht, wodurch eine spontane Fusion der Zellmembranen erreicht wird.

Alternativ kann der Schritt a) unter Einwirkung von elektrischer Spannung, d. h. als sogenannte Elektrofusion, vorgenommen werden. Bei der Elektrofusion werden mittels elektrischer Pulse
5 die Zellmembranen lokal „aufgeschmolzen“, wodurch eine Verschmelzung der Zellmembranen erreicht wird. Um die Fusion zu unterstützen, kann die Zugabe von geringen Mengen an PEG vorgesehen sein.

Die B-Zellen und die Myelom-Zellen werden in einer weiteren Ausführungsform in einem Verhältnis von 5:1 fusioniert (B-Zellen zu Myelom-Zellen).

10 Der Schritt b) wird in einer bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung eines selektiven Mediums, in welchem nur Hybridomzellen überlebensfähig sind, durchgeführt. Als selektives Medium wird vorzugsweise das sogenannte HAT-Medium verwendet. Das HAT-Medium enthält die chemischen Substanzen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Hypoxanthin stellt eine Vorstufe für essentielle Moleküle (Purine) dar, die für den Aufbau der Desoxyribonukleinsäure
15 (DNA) benötigt werden. Zu dessen Umwandlung ist allerdings das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) notwendig. Da bei der Fusion eine Myelom-Zelllinie verwendet wird, der eben dieses Enzym fehlt oder bei der es in inaktiver Form vorliegt, sind einzelne Myelom-Zellen in diesem Medium somit nicht überlebensfähig. Milzzellen besitzen hingegen HGPRT, sind für sich aber nicht überlebensfähig und sterben im Kulturmedium rasch
20 ab. Einzig Hybridomzellen können kultiviert werden, da sie die Immortalität der Myelom-Zellen sowie die HGPRT-Gene der Milzzellen besitzen. Aminopterin dient allein der Blockierung anderer Purin-Synthesewege. Da dadurch auch das essentielle Thymidin nicht mehr de novo hergestellt werden kann, muss es dem Medium beigegeben werden.

Der Schritt c) wird vorzugsweise mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)-Test
25 oder Durchflusszytometrie durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform werden die isolierten Hybridomzellen expandiert. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass eine ausreichend große Anzahl an Hybridomzellen zur Verfügung steht, welche den gegen CEACAM1 gerichteten Antikörper produzieren.

30 Bezüglich weiterer Merkmale und Vorteile des Verfahrens, insbesondere der Hybridomzellen, des Antigens sowie des Antikörpers, wird vollständig auf die bisherige sowie auf die im Beispielteil gemachten Ausführungen Bezug genommen. Die dort insbesondere in Bezug auf die Hyb-

ridomzelle, das Antigen sowie den Antikörper beschriebenen Ausführungsformen und Vorteile gelten sinngemäß auch für das Verfahren gemäß dreizehntem Erfindungsaspekt.

Die in der allgemeinen Beschreibung sowie in den Patentansprüchen genannten Sequenzen (Aminosäuresequenzen und Nukleotidsequenzen) entsprechen den im beigefügten Sequenzprotokoll offenbarten Sequenzen.

Beispielteil

1.1 Figurenbeschreibungen

Die Figuren zeigen schematisch:

- 10 Fig. 1A: repräsentative Durchflusszytometrie Histogramme von wuchernden B-Zellen aus Wildtyp-(WT) oder CEACAM1^{-/-} Mäusen (CEACAM1-Knockout-Mäusen), die unbehandelt (graue Fläche), mit anti-CEACAM1 Antikörper, LPS oder mit rekombinantem Maus-CD40-Ligand in Kombination mit Maus-IL-4 (schwarze Linie) für 48 Stunden behandelt wurden. DAPI-Zellen sind gezeigt (n = 6).
- 15 Fig. 1B: Absolute Anzahl lebender Zellen B (DAPI-) zu angegebenen Zeitpunkten (n = 3); aus der Milz sortiert, nach der Behandlung mit oder ohne rekombinantem Maus-CD40-Ligand in Kombination mit Maus IL-4 (n = 3).
- Fig. 1C: Repräsentative Histogramme und statistische Analyse der Annexin-V⁺ B-Zellen, die mit rekombinantem Maus-CD40-Ligand in Kombination mit Maus IL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen wurden, nach 48 Stunden (DAPI- B Zellen sind gezeigt, n = 6).
- 20 Fig. 1D: Prozentsatz der DAPI⁺ B-Zellen aus der Milz von WT und CEACAM1^{-/-} Mäusen nach der Aktivierung mit rekombinantem Maus-CD40-Ligand in Kombination mit Maus-IL-4 in Anwesenheit oder Abwesenheit von Btk Inhibitor Ibrutinib kultiviert für 48 Stunden durch FACS-Analyse bestimmt (n = 6). * P <0,05; ** P <0,01; und *** P <0,001 (Student-t-Test).
- 25 Die in den Figuren 1A bis 1D grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CEACAM1 das Überleben von B-Zellen in vitro fördert.
- Fig. 2A: Schema der Entwicklung, Reifung und Migration von B-Zellen in Knochenmark, Blut, Lymphknoten und Milz. Die durchgezogenen Pfeile zeigen den wahrscheinlichen

Entwicklungsweg. Die gestrichelten Pfeile zeigen einen noch in der Diskussion befindlichen Entwicklungsweg. Die punktierten Pfeile zeigen die Differenzierung nach der Antigen-Stimulation. Der „Strich-Punkt Pfeil“ zeigt angenommene Entwicklungswege.

- 5 Fig. 2B-E: Gesamtzahl der B-Zell-Subpopulationen von Wildtyp (WT) und CEACAM1-/- Mäusen, gemessen mittels Durchflusszytometrie im Knochenmark (b, n = 6), im Blut (c, n = 4), Lymphknoten (d, n = 4) und in der Milz (e, n = 10). Marker siehe Methoden.

10 Die in den Figuren 2A bis 2D grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CEACAM1 die B-Zell-Differenzierung und das Überleben der B-Zellen in vivo fördert.

- Fig. 3: Gesamtzahl der B1a und B2 B-Zell-Subpopulationen (B1a, CD19^{low}CD5^{int}; B2, CD19^{high}CD5^{neg}) und T-Zellen aus Wildtyp-(WT) und CEACAM1-/- Mäuse, gemessen mittels Durchflusszytometrie in der Bauchhöhle (n = 6). * P < 0,05 (Student-t-Test); ns = nicht signifikant.

15 Die in Figur 3 grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CEACAM1 die B1 B-Zellen verändert.

- Fig. 4: Menge der Serum Immunglobuline in naiv-Wildtyp (WT) und CEACAM1-/- Mäusen (n = 8 pro Genotyp). ** P < 0,01; und *** P < 0,001 (Student-t-Test).

20 Die in Figur 4 grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen eine vorteilhafte Beeinflussung der Serum-Immunglobuline durch CEACAM1.

- Fig. 5A: Prozent von WT x Vi10 B-Zellen und CEACAM1-/- x Vi10 B-Zellen, die adoptiv in WT-Mäusen (1×10^7 pro Maus) am Tag -1 übertragen wurden und die mit 2×10^6 PFU VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus) am Tag 0 infiziert wurden. Analyse Tag 3 nach Infektion (n = 3).

- 25 Fig. 5B,C: Gesamt VSV neutralisierende Antikörper und neutralisierende IgG-Antikörper in WT und CEACAM1-/- Mäusen nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU VSV (B, n = 6-9 pro Gruppe) und / oder nach der intravenösen Infektion mit 2×10^8 PFU von UV-inaktivierten VSV (C, n = 8-9 pro Gruppe).

Fig. 5D: VSV neutralisierende Antikörperantwort und neutralisierende IgG-Antikörper in Seren von WT und CEACAM1-/- Mäusen, die 1×10^7 VSV-spezifische B-Zellen (Vi10) am Tag -1 erhalten hatten und dann mit 2×10^6 PFU VSV am Tag 0 infiziert wurden (n = 7-9 pro Gruppe).

5 Fig. 5E: VSV-Titer in verschiedenen Organen von WT und CEACAM1-/- Mäuse nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU VSV analysiert 8 Tage nach Infektion (n = 6 pro Gruppe).

Fig. 5F: Überleben von WT und CEACAM1-/- Mäusen nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU VSV (n = 9-12 pro Gruppe).

10 Fig. 5G: Überleben von WT und CEACAM1-/- Mäusen, die unbehandelt waren oder adoptiv mit 1×10^7 VSV-spezifischen B-Zellen (Vi10) am Tag -1 behandelt wurden und am Tag 0 mit 2×10^6 PFU VSV infiziert wurden (n = 4-9). * P < 0,05; ** P < 0,01; und *** P < 0,001 (Student-t-Test).

15 Die in den Figuren 5A bis 5G grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von CEACAM1 für eine Infektion mit VSV essentiell ist.

Fig. 6: Anti-VSV-spezifische IgM- und IgG-Antikörper in Wildtyp (WT) und CEACAM1-/- Mäusen nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU von VSV (n = 4-7 pro Gruppe). * P < 0,05; ** P < 0,01; und *** P < 0,001 (Student-t-Test). Daten, die für zwei Experimente sind (Mittelwert $\pm$ SEM).

20 Die in Figur 6 grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CEACAM1 für eine Anti-VSV spezifische Ig-Produktion essentiell ist.

Fig. 7A: LCMV (lymphozytäres Choriomeningitis Virus) Glykoprotein-spezifische IgG-Antikörper im Serum von Wildtyp (WT) und CEACAM1-/- Mäusen nach intravenöser Infektion mit 200 PFU LCMV-WE (n = 3-6 pro Gruppe).

25 Fig. 7B: Leber Virustiter von WT und CEACAM1-/- Mäusen 10 Tage nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV-WE (n = 3 pro Gruppe). *** P < 0,001 (Student-t-Test).

Die in Figur 7A und 7B grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von CEACAM1 die LCMV-abhängige B-Zell-Aktivierung erhöht.

- Fig. 8A: Milz VSV-Titer von WT oder CEACAM1-/- Mäuse 7 h nach intravenöser Infektion mit 2×10^6 PFU von VSV (n = 6 pro Genotyp). ** P < 0,01 (Student-t-Test).
- Fig. 8B: Interferon-alpha levels im Serum von WT oder CEACAM1-/- Mäusen 2 und 4 Stunden nach intravenöser Infektion mit 2×10^8 PFU von VSV.
- 5 Die in den Figuren 8A und 8B grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen mangelhafte Randzonen, Replikation und Interferon-Induktion in CEACAM1-/- Mäusen.
- Fig. 9: Anzahl Autoantikörper-bindender Zellen auf Lebergewebsschnitten, die mit Serum von WT und CEACAM1-/- Mäusen 100 Tage nach intraperitonealer Injektion mit 500 µL Pristan, und fluoreszierendem anti-mouse IgG behandelt wurden (n = 3-5).
- 10 Fig. 10: Menge von Virus in unterschiedlichen Organen von Wildtyp-(WT) oder CEACAM1-/- Mäusen nach Infektion mit 200 PFU des chronischen lymphozytären Choriomeningitis Virusstammes (LCMV-Docile), gemessen 10 Tage nach Infektion (n = 3).
- Fig. 11A: Menge von Virus in Blut von Wildtyp-(WT) oder CEACAM1-/- Mäusen, die mit Kontrollantikörper oder anti-CEACAM1 Antikörper (200µg Tag -1) behandelt wurden und zusätzlich am Tag 0 mit 2×10^4 PFU des chronischen lymphozytären Choriomeningitis Virusstammes (LCMV-Docile) infiziert wurden (n = 6).
- 15 Fig. 11B: Alanin-Aminotransferase (Biomarker für Leberschaden) im Serum von Wildtyp-(WT) oder CEACAM1-/- Mäusen, die mit Kontrollantikörper oder anti-CEACAM1 Antikörper (200µg Tag -1) behandelt wurden und zusätzlich am Tag 0 mit 2×10^4 PFU des chronischen lymphozytären Choriomeningitis Virusstammes (LCMV-Docile) infiziert wurden (n = 6).
- 20 Fig. 12: Menge von Virus in unterschiedlichen Organen von Wildtyp-(WT) Mäusen (gemessen Tag 60), die am Tag 0 mit 2×10^6 PFU des chronischen lymphozytären Choriomeningitis Virusstammes (LCMV-Docile) infiziert wurden und zusätzlich am Tag 16 unbehandelt blieben oder mit anti-CEACAM1 Antikörper (200µg) behandelt wurden (n = 3-4).
- 25

1.2 Methoden und Materialien:

1.2.1 Mäuse:

Ceacam1^{-/-}-Mäuse wurden auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 gehalten (mindestens 8-mal und bis zu 16-mal rückgekreuzt) und wurden homozygot gezüchtet. Vi10/CD45.1-Mäuse, die einen VSV-spezifischen B-Zellenrezeptor als Transgen exprimieren, wurden für Zelltransferuntersuchungen verwendet, und Mäuse, die das CD45.1-Transgen exprimieren, wurden zur Rekonstitution von Knochenmark verwendet. In allen Untersuchungen wurden sechs bis acht Wochen alte und gleichgeschlechtliche Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden in belüfteten Einzelkäfigen gehalten. Bei den Überlebensexperimenten wurde der Gesundheitszustand der Mäuse zweimal täglich überprüft. Die Tierversuche wurden mit Genehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Recklinghausen, Deutschland) und gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz oder gemäß den Institutsrichtlinien des Ontario Cancer Institute of the University Health Network und der McGill University, USA durchgeführt. Tiere, die schwere Krankheitssymptome oder Paralyse zeigten oder während einer VSV-Infektion beträchtlichen Gewichtsverlust erlitten, wurden aus dem Experiment genommen und für die statistische Analyse als Todesfälle gezählt.

1.2.2 Virus-Assays und Plaque-Assays:

Vesikuläre Stomatitis virus (VSV), Stamm Indiana (VSV-IND, Mudd-Summers-Isolat) wurde ursprünglich von Prof. D. Kolakofsky (Universität Genf, Schweiz) erhalten. Das Virus wurde auf BHK-21-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 0,01 vermehrt. Die VSV-Konzentration wurde wie beschrieben bestimmt, und wurde dann in der Plaquetechnik auf Vero-Zellen ausplattiert (Fink, K. et al. „Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses.” *European journal of immunology* (2006), 36, 2094-2105.). Mäuse wurden intravenös mit VSV in den angegebenen Dosen infiziert. Virustiter wurden mit einem Plaque-Assay gemessen. Für dieses Assay wurden Organe in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das 2 % fötales Kälberserum (FKS) enthält, zerkleinert, 1:3 über 12 Stufen eingestellt und auf Vero-Zellen ausplattiert. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde ein Überschichtungsmedium (Overlay) zugegeben und das Virus-Präparat nochmals bei 37 °C inkubiert. Die Plaques wurden 24 h später mittels Anfärbung mit Kristallviolett ausgezählt.

Der Stamm des lymphozytären Choriomeningitis Virus LCMV-WE wurde ursprünglich von F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institut, Hamburg, Deutschland) erhalten und in L929-Zellen, MC57-Zellen oder beiden vermehrt. Mäuse wurden intravenös in der angegebenen Dosis infiziert. LCMV-Virustiter wurden durch ein Plaque-Assay auf MC57-Fibroblasten wie zuvor beschrieben nachgewiesen (Battegay, M. et al. „Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates.” *J Virol Methods* (1991), 33, 191-198.). Kurz gesagt, zerkleinerte Organe wurden mit MC57-Zellen wie oben beschrieben ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

Der Stamm des lymphozytären Choriomeningitis Virus LCMV-Docile wurde ursprünglich von F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institut, Hamburg, Deutschland) erhalten und in L929-Zellen, MC57-Zellen oder beiden vermehrt.

Das Influenza A Virus wurde von der Arbeitsgruppe Westendorf, Universität Duisburg-Essen
5 erhalten.

Nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C wurde ein Überschichtungsmedium zugegeben und das Virus-Präparat nochmals bei 37 °C inkubiert. Die Plaques wurden 72 h später mittels Anfärbung mit LCMV-NP (Nukleoprotein des LCMV) ausgezählt. Die Zellen wurden fixiert (mit 4 % Formaldehydlösung), permeabilisiert (mit 1 % Triton-X-Lösung), blockiert (mit 10 %
10 FKS in phosphatgepufferter Salzlösung PBS) und mit anti-LCMV-NP-Antikörper (hausintern hergestellt) angefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit ECL (Enhanced Chemoluminescence) konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (anti-rabbit-IgG antibody) verwendet. Plaques wurden durch eine Farbreaktion nachgewiesen (0,2 M Na₂HPO₄ + 0,1 M Citronensäure + 30 % H₂O₂ + o-Phenylendiamindihydrochlorid), wobei alle Chemikalien von Sigma-Aldrich
15 bezogen wurden.

1.2.3 Test auf neutralisierende Antikörper:

Serum wurde vorverdünnt (1:40). Das Komplementsystem wurde bei 56°C 30 min lang inaktiviert. Um eine IgG-Kinetik aufzunehmen, wurden verdünnte Proben mit 2-Mercaptoethanol (0,1 M) behandelt, um IgM zu entfernen. Serum wurde 1:2 über 12
20 Stufen eingestellt und wurde mit 1 x 10³ Plaque bildenden Einheiten (PFU, Plaque Forming Units) des VSV inkubiert. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde das Virus-Serum-Gemisch auf Vero-Zellen ausplattiert. Nach einer Stunde wurde ein Überschichtungsmedium zugegeben und die Mischung wurde nochmals 24 h lang bei 37 °C inkubiert. Die Plaques wurden durch Anfärbung mit Kristallviolett ausgezählt. Antikörpertiter sind als 2- oder 3-fache Verdünnungsstufen (-log₂ und -log₃)-fache Vorverdün-
25 nung (d.h. x40) dargestellt.

1.2.4 Kultur von B-Zellen:

Milzpräparate von Mäusen des Wildtyps (WT) und *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen wurden in MACS-Puffer (1 % FKS und 0,8 % 0,5 M EDTA) zur magnetaktivierten Zellsortierung homogenisiert.
30 B220⁺-B-Zellen wurden durch positive Selektion mit CD45R-konjugierten Magnetpartikeln (MACS Miltenyi Biotech) isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde bestätigt, dass die Reinheit der B220⁺-Zellen über 95 % betrug. Für Proliferationsversuche wurden die Zellen mit 5 µM Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) markiert, und es wurden 2 x 10⁵ Zellen pro

Vertiefung in 96-Lochplatten in Zellkulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % LPS-freiem FKS (ohne Lipopolysaccharid), 1 % Antibiotika und 0,1 % 50 mM 2-Mercaptoethanol kultiviert. Danach wurden sie mit anti-CEACAM1-Antikörper (20 µg/ml, Klon CC1; überlassen von Dr. Kathryn V. Holmes, University of Colorado, Denver, USA) oder rekombinantem Maus-CD40-Liganden (1 µg/ml) in Kombination mit Maus-IL4 (10 ng/ml; R&D Systems) oder LPS (10 ng/ml; Sigma Aldrich) 48 h lang behandelt. Ebenso wurden für Inhibitionsexperimente gereinigte B-Zellen (wie oben beschrieben) in dem oben beschriebenen Medium mit rekombinantem Maus-CD40-Liganden (1 µg/ml) in Kombination mit Maus-IL4 (10 ng/ml; R&D Systems) kultiviert und mit 10 µM Ibrutinib (Selleck) behandelt. Als Kontrolle wurden gleiche Mengen an DMSO (Dimethylsulfoxid), das zum Lösen von Ibrutinib verwendet wird, in Vertiefungen gegeben. Der Zelltod wurde durch Anfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Life Technologies) gemessen. Für Überlebensexperimente wurden B-Zellen wie zuvor angegeben kultiviert und die Zellen wurden mit Annexin-V (BD Biosciences) danach mit DAPI angefärbt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Proliferation und das Überleben durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) bestimmt. Für Zellsignalexperimente wurden Splenozyten in VLE-DMEM (Very Low Endotoxin-DMEM) unter Zusatz von 10 % LPS-freiem FKS und 1 % Antibiotika dissoziiert und mit anti-CEACAM1-Antikörper (Klon CC1, 20 µg/ml; K. Holmes) und anti-IgM-Antikörper (10 µg/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) über unterschiedliche Zeitdauern bei 37 °C behandelt.

1.2.5 Durchflusszytometrie:

Periphere Blutzellen wurden angefärbt mit Antikörpern anti-Ly6G (RB6-8C5), anti-CD115 (AFS98), anti-CD45R (B220; RA3-6B2), anti-CD90.2 (30-H12), anti-CEACAM1 (CC1; mit korrespondierender Isotyp-Kontrolle anti-IgG1 [M1-14D12]), anti-IgD (11-26c), anti-CD93 (AA4.1), anti-CD19 (1D3) (alle von eBioscience) und anti-IgM (II/41; BD Biosciences). Isolierte Knochenmarkzellen wurden in FACS-Puffer (0,5 M EDTA, 0,1 % Natriumazid, 1 % FKS in PBS) suspendiert und inkubiert mit Antikörpern anti-CD45R (B220; RA3-6B2), anti-IgD (11-26c), anti-IgM (II-41), anti-CEACAM1 (CC1), anti-CD24 (M1/69) (alle von eBioscience), anti-CD43 (1B-11) und anti-BP1 (6C3) (von BioLegend). Leistenlymphknoten wurden in FACS-Puffer disaggregiert und die Zellen wurden angefärbt auf Antikörper anti-CD45R (B220; RA3-6B2), anti-CD19 (1D3), anti-IgD (11-26c) (alle von eBioscience) und anti-IgM (II/41) (BD Biosciences). Milzen wurden in FACS-Puffer dissoziiert und Splenozyten wurden inkubiert mit Antikörpern anti-CD45R (B220; RA3-6B2), anti-CD19 (1D3), anti-CD93 (AA4.1), anti-CD21/35 (8D9), anti-CD23 (B3B4), anti-IgD (11-26c), anti-CEACAM1 (CC1), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104) (alle von eBioscience) und anti-IgM (II/41) (BD). Humane periphere Blut-

proben wurden angefärbt mit Antikörpern anti-IgD (IA6-2) und anti-CD27 (M-T271) (beide von BD Biosciences) und Antikörper anti-CEACAM1 (mAB, B3-17) (von Dr. Singer, Essen). Peritoneale B-Zellen wurden angefärbt auf Antikörper anti-CD19 (1D3), anti-CD45R (B220; RA3-6B2), anti-IgM (II/41) (alle von eBioscience) und anti-CD5 (53-7.3) (BD Biosciences) und anti-CD43 (1B-11) (von BioLegend). Tote Zellen wurden durch Anfärben mit Propidiumiodid (PI, eBioscience) und/oder DAPI diskriminiert und wurden von allen Analysen außer Blutanalysen ausgeschlossen. Für Zellsignalexperimente wurden Zellen gemäß der Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert (BD Phosflow, BD Biosciences). Die Zellen wurden mit Antikörper anti-Btk (pY223)/Itk (pY180) (BD Phosflow) angefärbt. Alle Antikörper wurden 1:100 zu ihrer Ausgangskonzentration in FACS-Puffer verdünnt. Zur quantitativen Bestimmung der Gesamtzellzahlen wurden FACS-Partikel verwendet (BD Biosciences). Alle angefärbten Zellen wurden auf einem Durchflusszytometer vom Typ LSRII oder FACSFortessa (BD Biosciences) analysiert, und die Daten wurden mit Flowjo-Software analysiert.

1.2.6 Gatingstrategie zum Identifizieren von Untergruppen von B-Zellen

Herkunft	B-Zelluntergruppe	Marker
Knochenmark	unreif, neugebildet	B220 ⁺ CD43 ⁻ IgD ^{-/low} IgM ⁺
	reif rezirkulierend, follikulär (FO)	B220 ⁺ CD43 ⁻ IgD ^{high} IgM ⁻
Blut	unreif, neugebildet	B220 ⁺ IgD ^{-/low} IgM ⁺
	reif rezirkulierend, follikulär (FO)	B220 ⁺ IgD ^{high} IgM ⁻
	nativ-ähnlich	B220 ⁺ CD93 ^{high} IgD ⁻ IgM ⁻
Lymphknoten	unreif, neugebildet	B220 ⁺ CD19 ⁺ IgD ^{-/low} IgM ⁺
	reif rezirkulierend, follikulär (FO)	B220 ⁺ CD19 ⁺ IgD ^{high} IgM ⁻
Milz	Marginalzone (MZ)	B220 ⁺ CD19 ⁺ CD93 ^{-/low} CD21/35 ^{high} CD23 ⁻
	follikulär (FO)	B220 ⁺ CD19 ⁺ CD93 ^{-/low} CD21/35 ^{int} CD23 ⁺
	transitional T1	B220 ⁻ CD19 ⁻ CD93 ⁺ CD23 ⁻ IgM ^{high}
	transitional T2	B220 ⁻ CD19 ⁻ CD93 ⁺ CD23 ⁺ IgM ^{high}
	transitional T3	B220 ⁻ CD19 ⁻ CD93 ⁺ CD23 ⁺ IgM ^{low}

Tabelle 1: Gatingstrategie zum Identifizieren von Untergruppen von B-Zellen

1.2.7 LCMV-Glykoprotein GP1-spezifische IgG-Messungen:

Der Nachweis des LCMV-Glykoprotein GP1-spezifischen IgG durch ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurde schon beschrieben (Recher, M. et al. „Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production.” Nature immunology (2004), 5, 934-942.). Kurz gesagt, flachbödige 96-Lochplatten Nunc Immuno Plates (Thermo Scientific) wurden mit anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) ENREF 60 in Beschichtungspuffer (0,1 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃; pH 9,6) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit einem Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween20) gewaschen und 2 Stunden lang eine Blockierung unspezifischer Bindung mit 2 % FKS in PBS vorgenommen. Die Platten wurden mit LCMV Gp-Fc Überstand (hausintern hergestellt) 3 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und mit vorverdünntem (1:20) Serum über 12 Vertiefungen mit Verdünnungen von 1:3 in aufeinanderfolgenden Vertiefungen eingestellt. Nach einer Inkubation von 90 Minuten wurden die Platten mit HRP-konjugiertem (Horseradish Peroxidase) anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma) inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Platten wie nachfolgend beschrieben entwickelt.

1.2.8 ELISA-Messungen:

Zum Nachweis von VSV-spezifischen anti-IgG- und anti-IgM-Antikörpern wurden flachbödige 96-Lochplatten Nunc Immuno Plates (Thermo Scientific) mit Baculovirus VSV-GP (Lang, K.S. et al. „MyD88 protects from lethal encephalitis during infection with vesicular stomatitis virus.” European journal of immunology (2007), 37, 2434-2440.) in Beschichtungspuffer 0,1 M NaCO₃ (0,1 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃; pH 9,6) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit einem Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween20) gewaschen und 1 bis 2 Stunden lang eine Blockierung unspezifischer Bindung mit 2 % FKS in PBS vorgenommen. Die Platten wurden einmal gewaschen und mit vorverdünntem (1:15) Serum über 12 Vertiefungen mit Verdünnungen von 1:3 in aufeinanderfolgenden Vertiefungen eingestellt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur 2 h lang inkubiert. Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und mit HRP-konjugiertem anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma) oder anti-Maus-IgM-Antikörper (Sigma) 30 bis 60 min lang inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und mit 1X TMB Substratlösung (eBioscience) im Dunkeln inkubiert, wonach 10 % H₂SO₄-Lösung zugegeben wurde, um die Farbreaktion zu unterbrechen. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gemessen (FLUOstar Omega, BMG LABTECH). Es wurden verschiedene Immunglobulin-Isotypen und -Untertypen in naivem Serum von WT-Mäusen und *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen gemessen, wie es beschrieben wurde (Recher, M. et al. „B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome

protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice.” Blood (2012), 119, 2819-2828.).

1.2.9 Bildung von Maus-anti-Human-CEACAM1-Antikörper:

Weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 10 Wochen wurden in drei Stufen mit humanem CEACAM1-Fc (50 µg / 90 µl in PBS) gemischt mit Gerbu Adjuvans MM (60 µl) immunisiert (idealerweise an Tag 0, Tag 14 und Tag 21; intraperitoneal (i.p.) die erste, subkutan (s.c.) die zweite und dritte Immunisierung). Die Menge der ersten Immunisierung war die doppelte Menge aller nachfolgenden Immunisierungen. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurde den Mäusen zur Serumgewinnung Blut entnommen. Um zu testen, ob der Titer ausreichend war, wurde ein ELISA oder eine Durchflusszytometrieanalyse durchgeführt. Der Titer von Tag 0 bis Tag 21 war in der Regel 100 bis 1000-fach erhöht. Mäuse mit ausreichendem Titer wurden geboostet mit 25 µg humanem CEACAM1-Fc, gelöst in sterilem PBS ohne Adjuvans i.v. und i.p., vier Tage bevor die Mäuse getötet wurden und die Splenozyten (Milzzellen) gewonnen wurden.

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die Milz wurde unter aseptischen Bedingungen entfernt. Die Milz wurde durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb gequetscht. Splenozyten wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dreimal mit DMEM-Medium, das keine Additive (z.B. FKS) enthält, gewaschen. Parallel wurde die Fusionspartner-Zelllinie (die Maus-Myelom-Zelllinie NS1/0) ebenfalls in DMEM gewaschen. Danach wurden Splenozyten und Myelomzellen in einem Verhältnis von 5:1 gemischt und bei 2000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde zur Fusion verwendet. Dazu wurde 1 ml PEG langsam zu dem Zellpellet zugegeben und vorsichtig innerhalb von 1 min vermischt. Danach wurde PEG sehr langsam mit warmen DMEM, nach dem folgenden Protokoll, verdünnt: 1 min = 1 ml, 1 min = 1 ml, 1 min = 1 ml, 1 min = 1,5 ml, 1 min = 1,5 ml, 1 min = 2,5 ml, 1 min = 2,5 ml, 1 min = 5 ml, 1 min = 5 ml, 1 min = 5 ml, 1 min = 5 ml, 1 min = 5 ml, 1 min = 5 ml.

Dann wurden die fusionierten Zellen zentrifugiert (10 min bei 800 U/min) und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Dann wurde das Zellpellet resuspendiert (8 ml HAT-Medium pro 10^7 NS/1/0-Zellen) und die Zellen wurden in flachbödigen 96-Loch-Zellkulturplatten zur HAT-Selektion ausplattiert. Das Medium wurde jeden dritten Tag entfernt. Nach 10 bis 14 Tagen, wenn Zellklone sichtbar waren und das Medium durch die pH-Verschiebung gelb wurde, wurden Überstände auf sekretierte anti-human-CEACAM1-Antikörper mittels Durchflusszytometrie und ELISA getestet. Positive Zellklone wurden subkloniert (= monoklonal), weiter getestet und für eine mAb-Produktion verwendet.

Anschließend wurden mAbs vom Zellkulturüberstand (beispielsweise 500 ml) über Protein G-Sepharose-Säulen (Säulenchromatographie) gereinigt, durch pH-Verschiebung unter Verwendung von 0,1 M Glycin-Puffer (pH 2,5) eluiert und gegen sterile PBS dialysiert. Steril-filtrierte mAb-Lösung wurde verwendet, um die Ig-Konzentration durch Messung der OD_{280nm} zu bestimmen und die Konzentration wurde unter Verwendung der Formel $OD_{280nm}/1,36 = x \text{ mg/ml}$ berechnet.

1.2.10 Statistische Analyse:

Daten wurden als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (Statistischer Standardfehler des Mittels) ausgedrückt. Der Student t-Test wurde eingesetzt, um statistisch signifikante Differenzen zwischen Gruppen zu erfassen. Signifikante Differenzen zwischen verschiedenen Gruppen wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA, Analysis of Variance) mit Post-Hoc-Tests nach Bonferroni oder Dunnett erfasst. Das Überleben wurde mit Log-Rank-Tests (Mantel-Cox-Tests) verglichen. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei $P < 0,05$ festgelegt.

Patentansprüche

1. Substanz zur Anwendung bei der Therapie von viralen Infektionen und/oder viralen Infektionskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz die Expression und/oder Funktion von CEACAM1 aktiviert.
2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei CEACAM1 um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 1 handelt.
3. Substanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um eine gegen CEACAM1 gerichtete Substanz handelt.
4. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um einen gegen CEACAM1 gerichteten Antikörper handelt.
5. Substanz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11, und/oder eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 und variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13, aufweist.
6. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um das lösliche Protein UspA1 von *Moraxella catarrhalis* gemäß SEQ ID Nr. 15 handelt.
7. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um das lösliche Protein Opa von *Neisseria gonorrhoeae* gemäß SEQ ID Nr. 17 handelt.
8. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um das lösliche variable Protein P5 von *Haemophilus influenzae* gemäß SEQ ID Nr. 18 handelt.

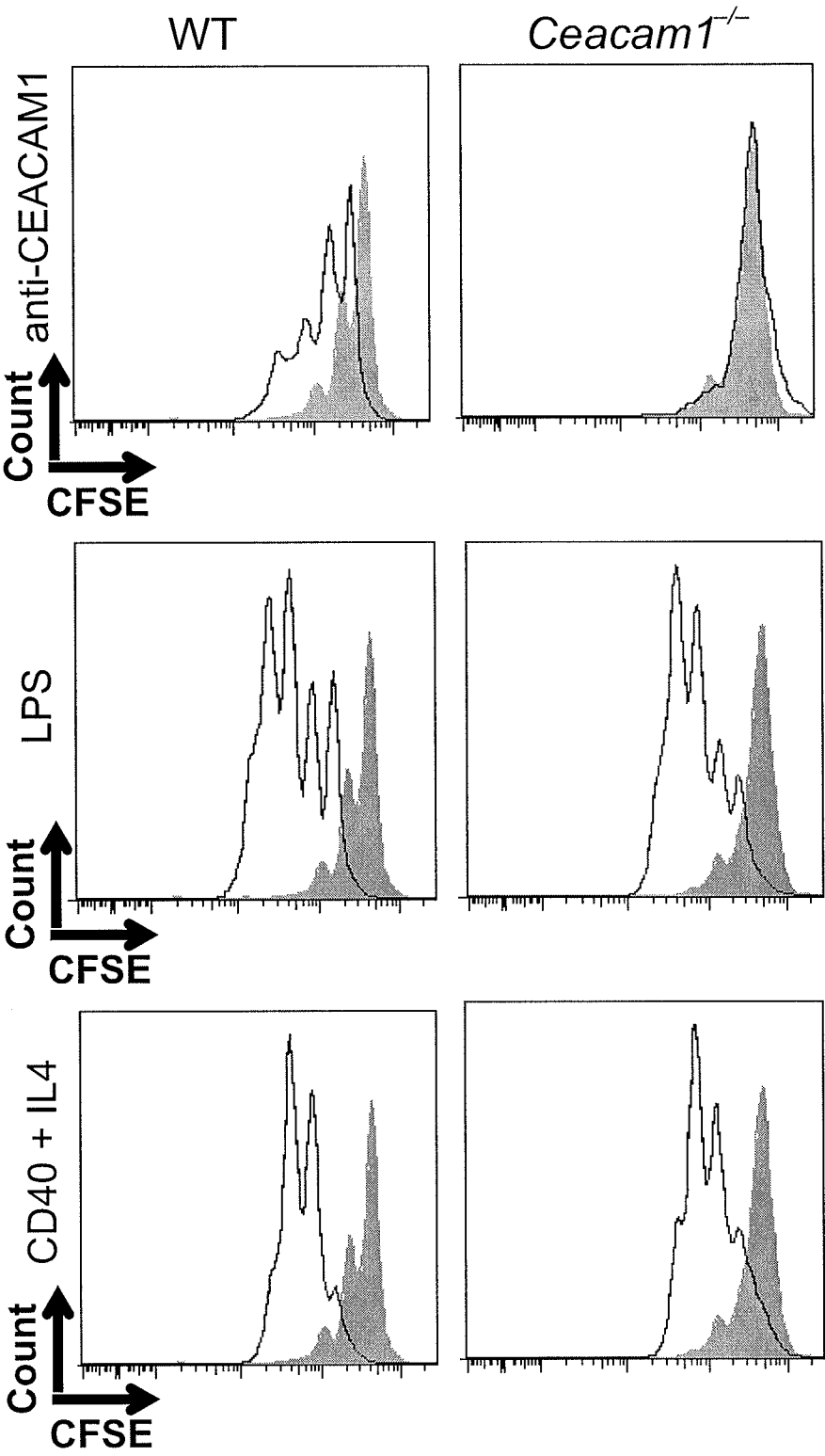
9. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Substanz um das lösliche humane rekombinante CEACAM1-Fusionsprotein gemäß SEQ ID Nr. 19 handelt.
10. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die viralen Infektionen bzw. Infektionskrankheiten ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus virale Hepatitis, Hepatitis B, Hepatitis C, HIV-Infektion, Aids, Influenza, Poliomyelitis, virusinduzierte Myokarditis, Pfeiffer-Drüsenfieber, Herpes simplex, Zytomegalie, Tollwut und Ebola.
11. Arzneimittel zur Anwendung bei der Therapie von viralen Infektionen und/oder viralen Infektionskrankheiten, enthaltend wenigstens eine Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
12. Antikörper, aufweisend eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr.3 und/oder eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr.5.
13. Therapeutischer Antikörper, aufweisend eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr.3, variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 7 und Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 11, und/oder eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr.5, variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 9 und Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 13.
14. Variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 7.
15. Variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne gemäß SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 9.
16. Isolierte Nukleinsäure codierend für eine variable Antikörper-Schwerketten-(V_H)-Domäne, wobei die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz aufweist oder aus einer Nukleotidsequenz besteht, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 4 und SEQ ID Nr. 8.
17. Isolierte Nukleinsäure codierend für eine variable Antikörper-Leichtketten-(V_L)-Domäne, wobei die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz aufweist oder aus einer Nukleotidsequenz

besteht, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 6 und SEQ ID Nr. 10.

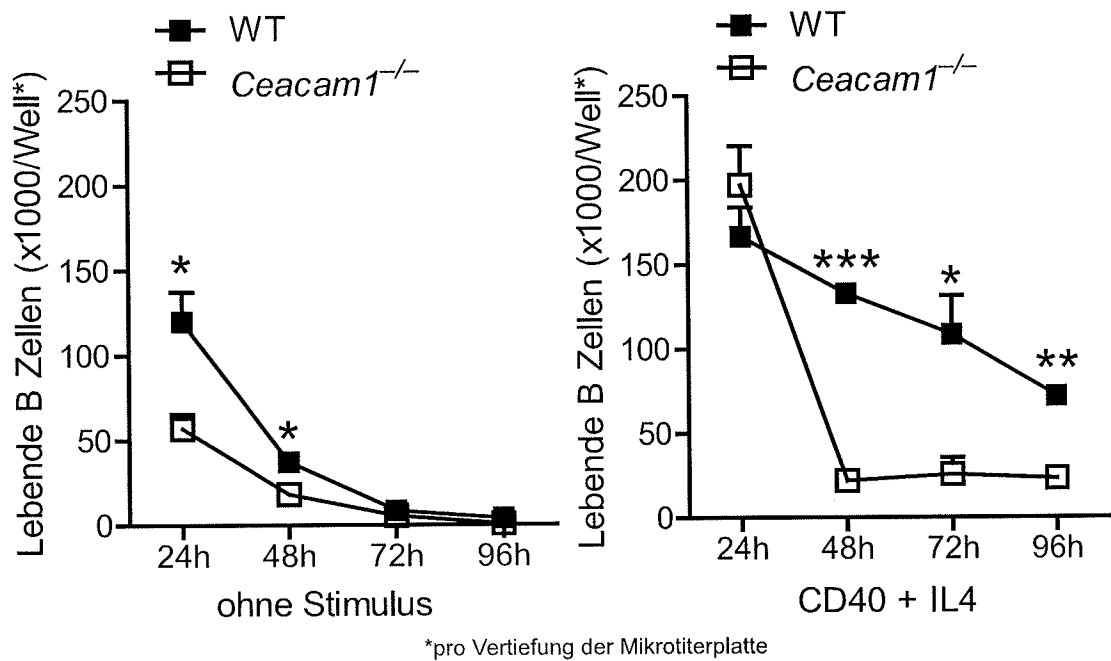
18. Hybridomzelle, welche einen Antikörper nach Anspruch 12 oder 13 produziert.
19. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, insbesondere eines Antikörpers nach Anspruch 12 oder 13, aufweisend die folgenden Schritte:
 - a) Fusionieren von B-Zellen, welche aus einem gegen ein Antigen immunisierten Versuchstier stammen, und Myelomzellen unter Ausbildung von Hybridomzellen,
 - b) Selektieren der Hybridomzellen,
 - c) Isolieren von Hybridomzellen, welche gegen das Antigen gerichtete Antikörper produzieren,

5

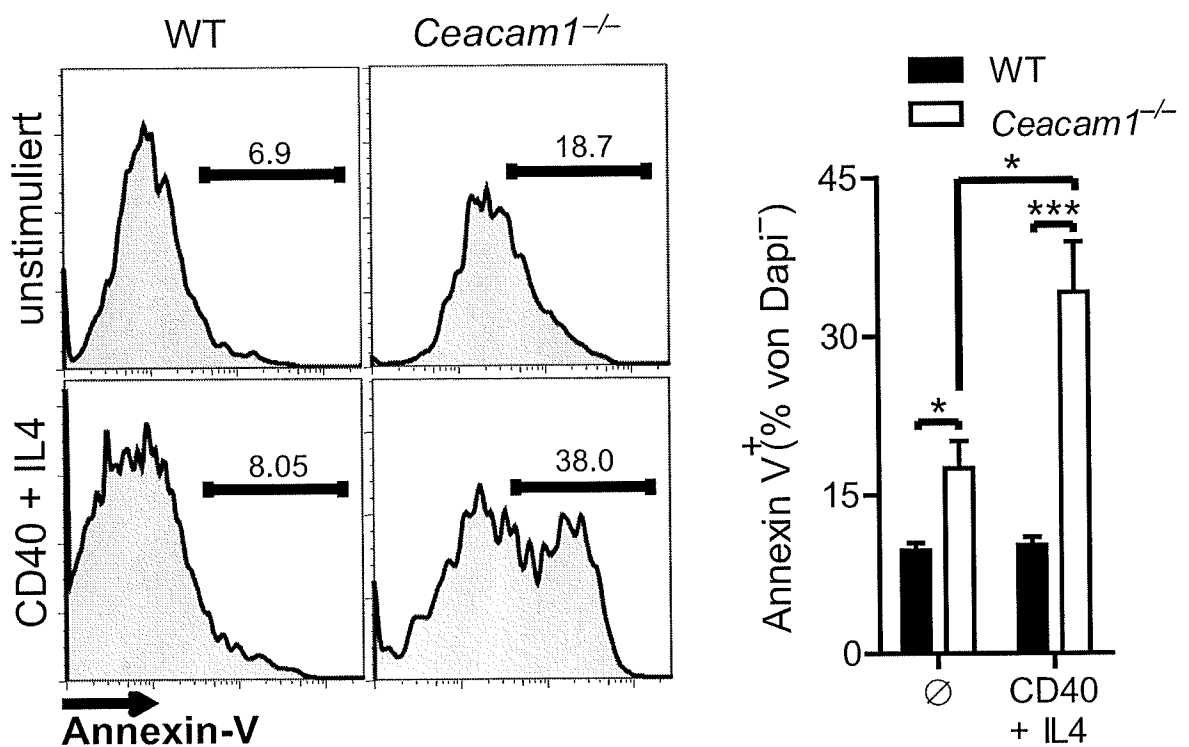
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Antigen um CEACAM1 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein Fragment, insbesondere Epitop, davon handelt.



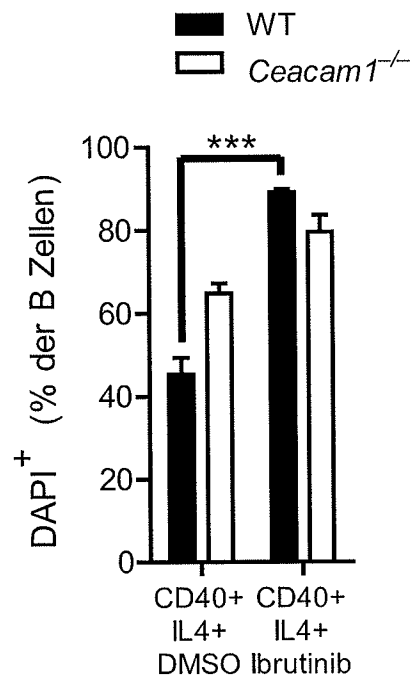
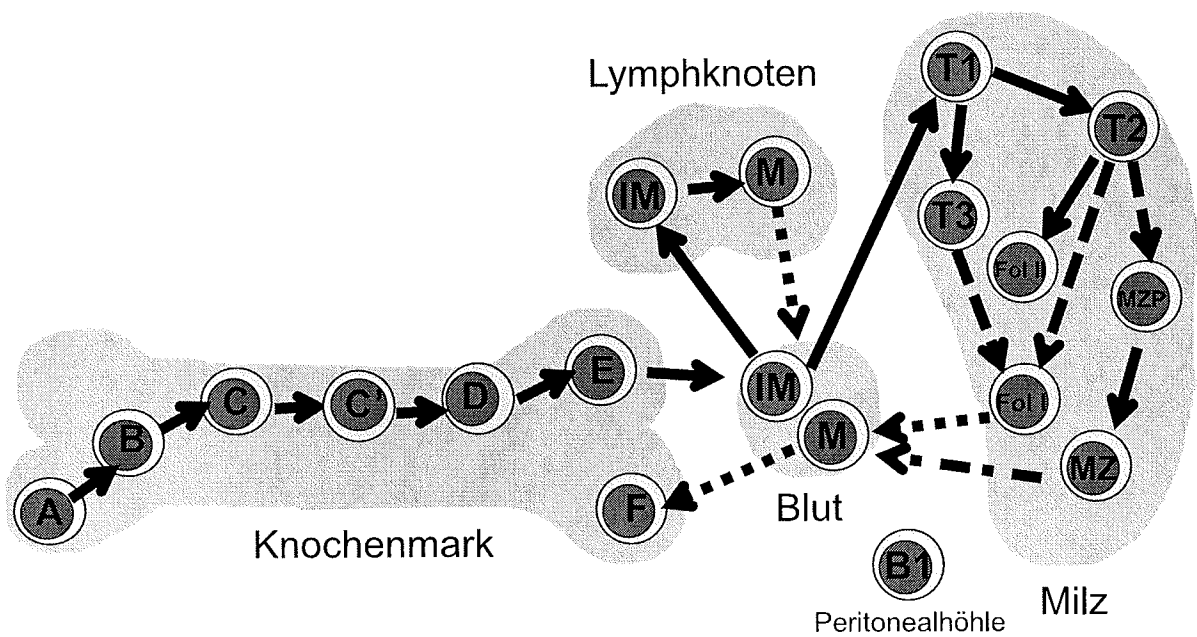
Figur 1 A

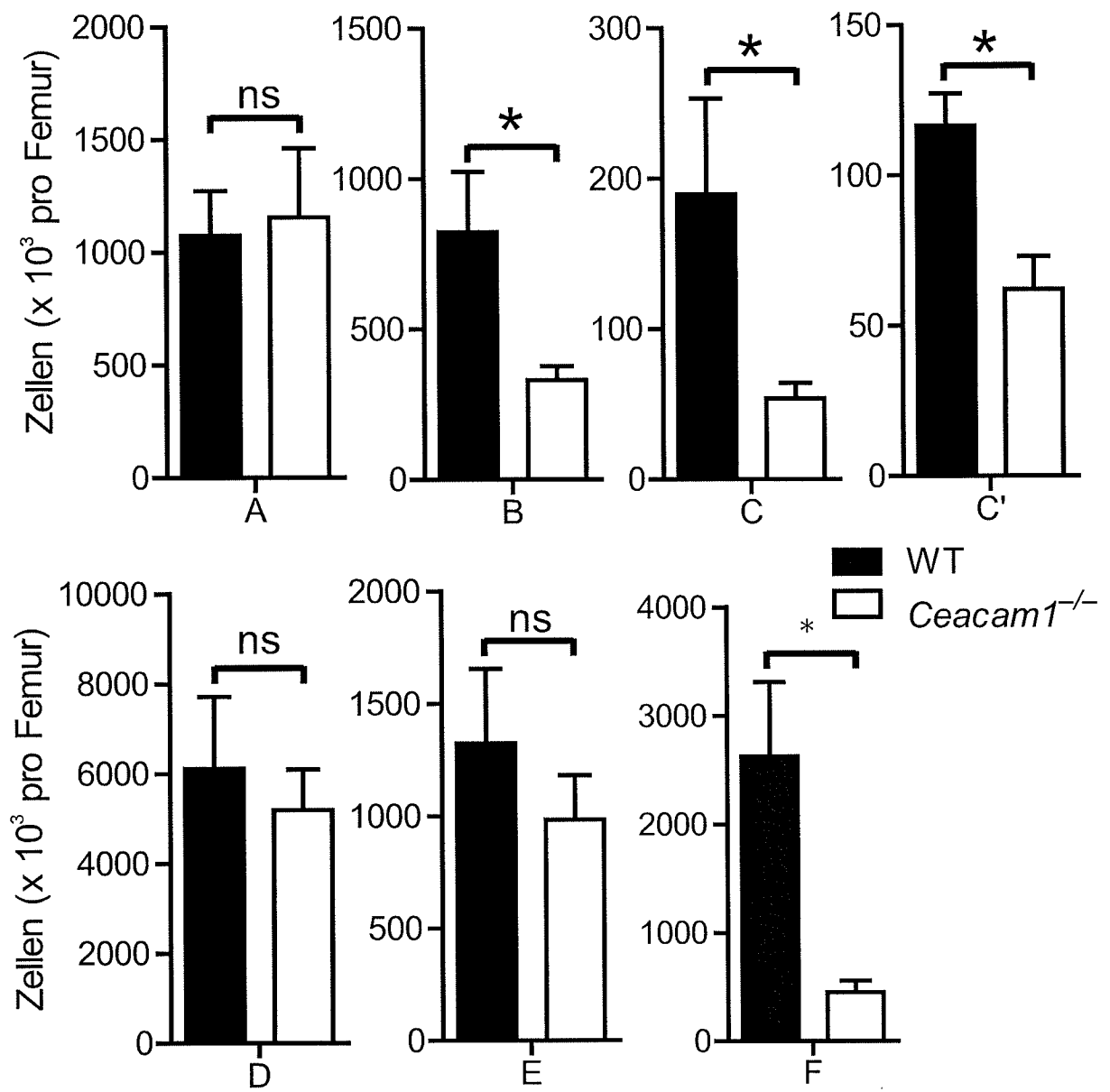
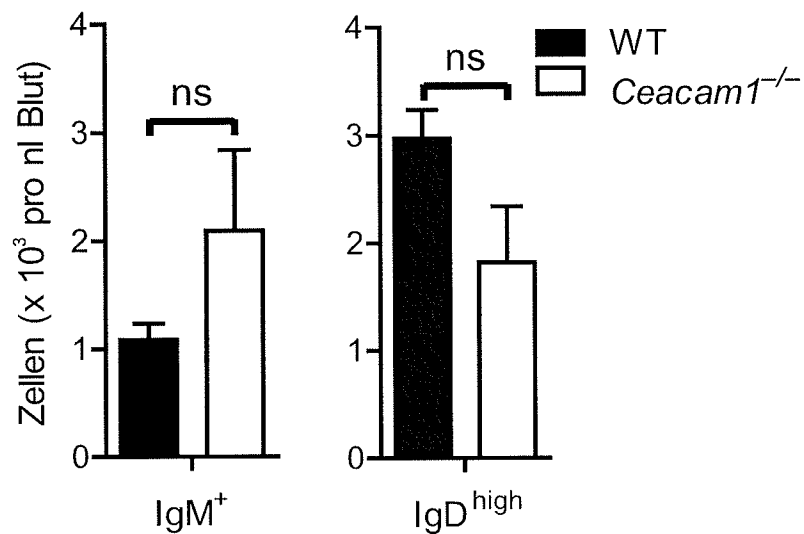


Figur 1 B



Figur 1 C

**Figur 1 D****Figur 2 A**

**Figure 2 B****Figure 2 C**

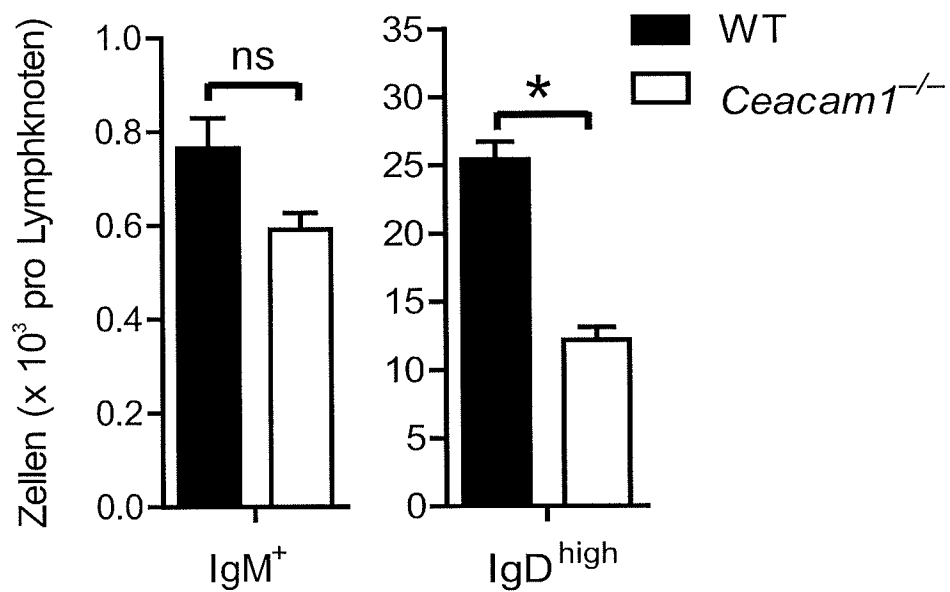


Figure 2 D

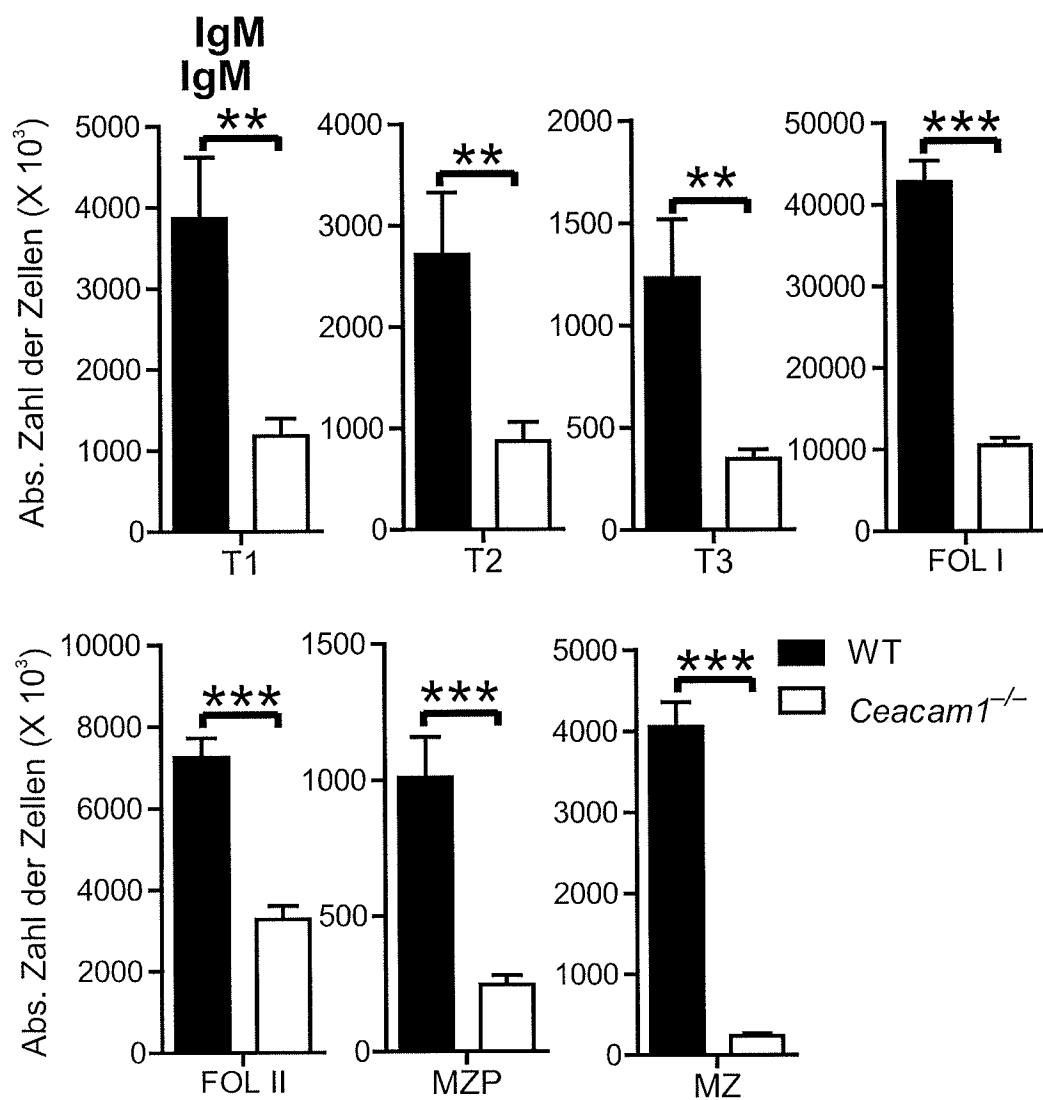
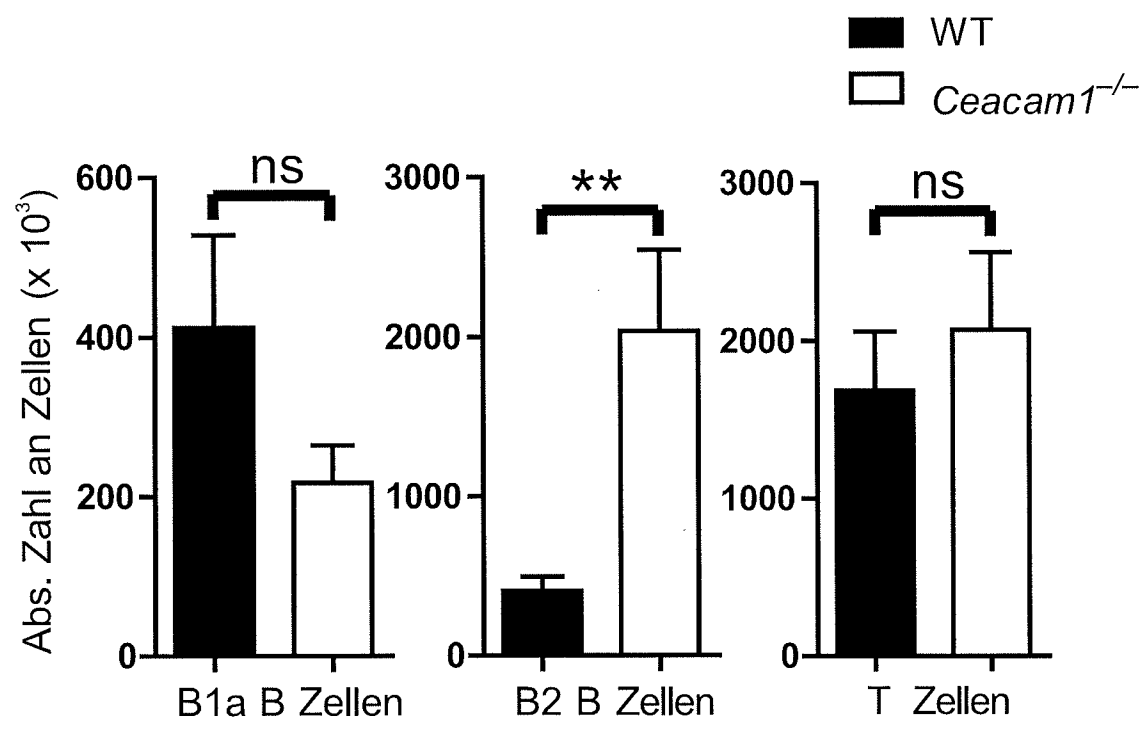
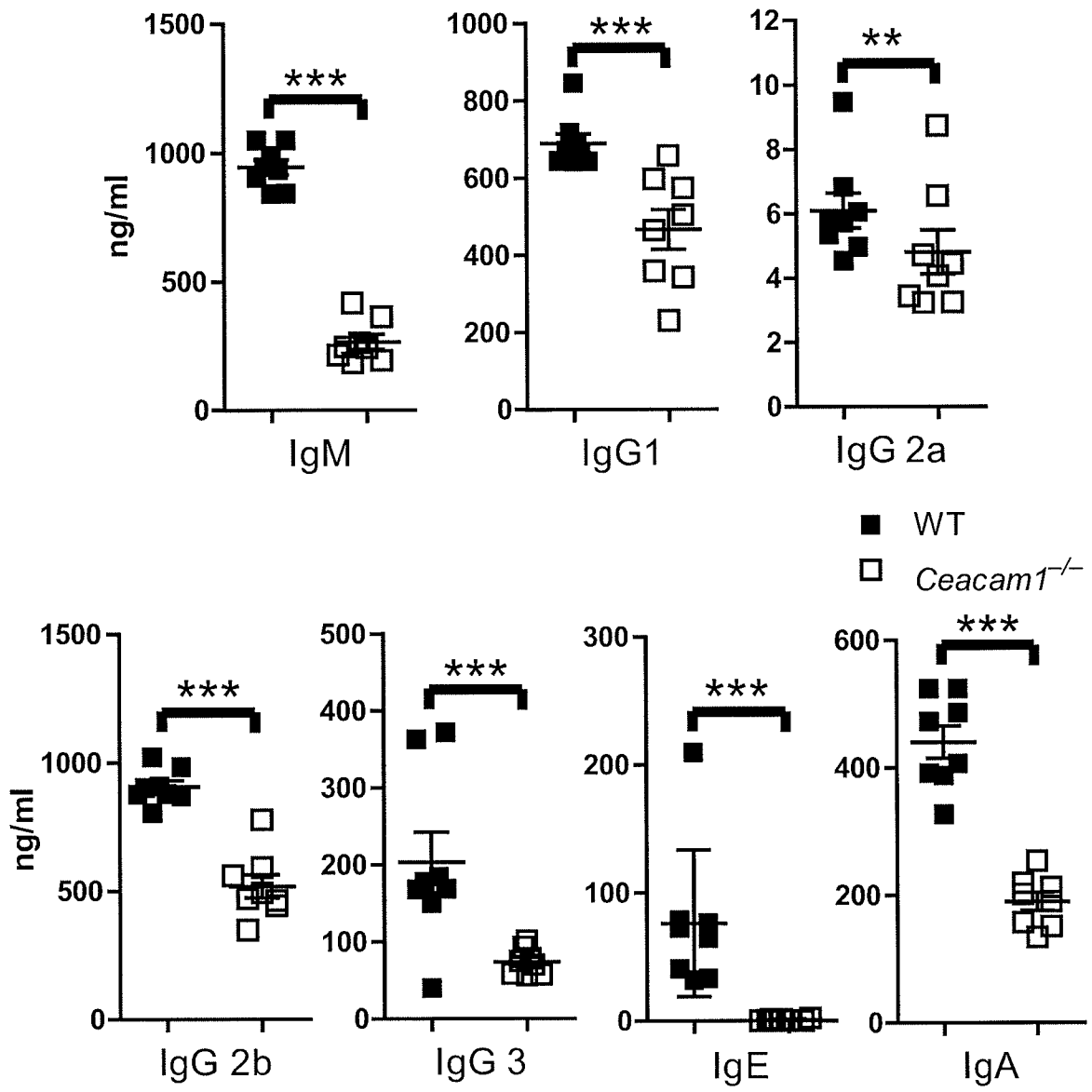


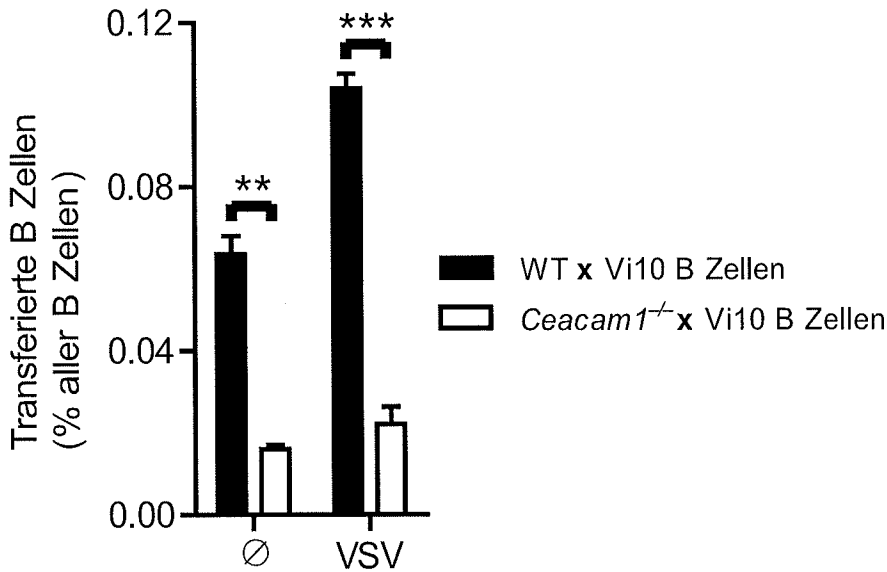
Figure 2 E



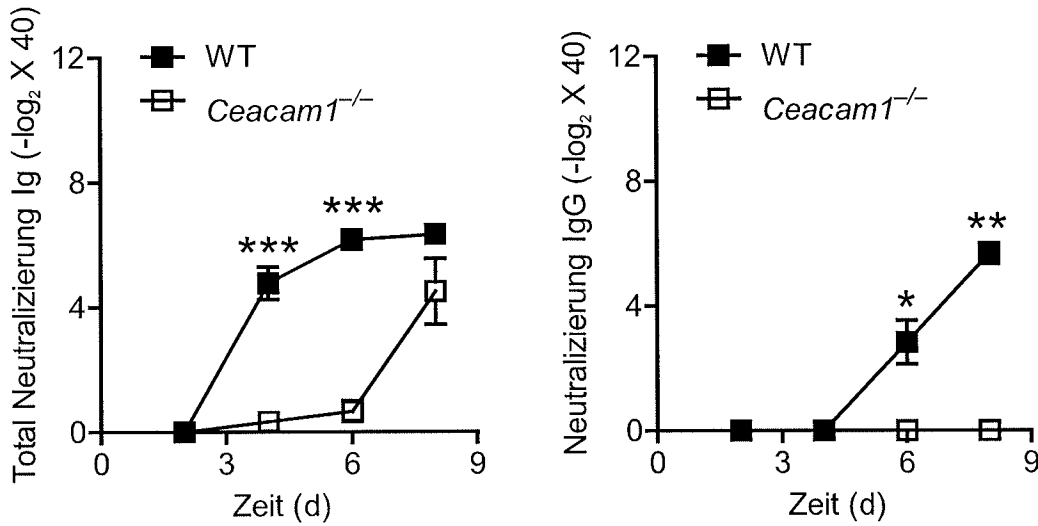
Figur 3



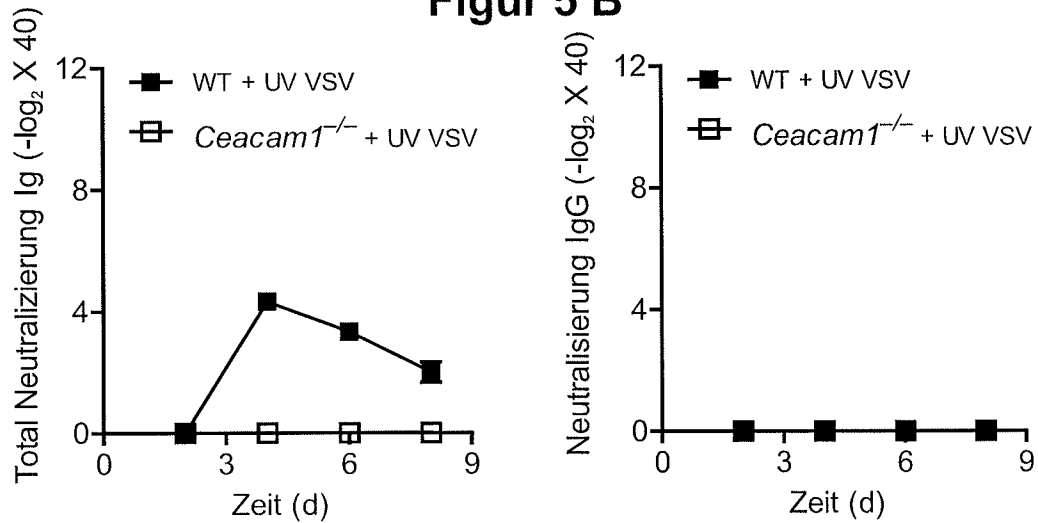
Figur 4



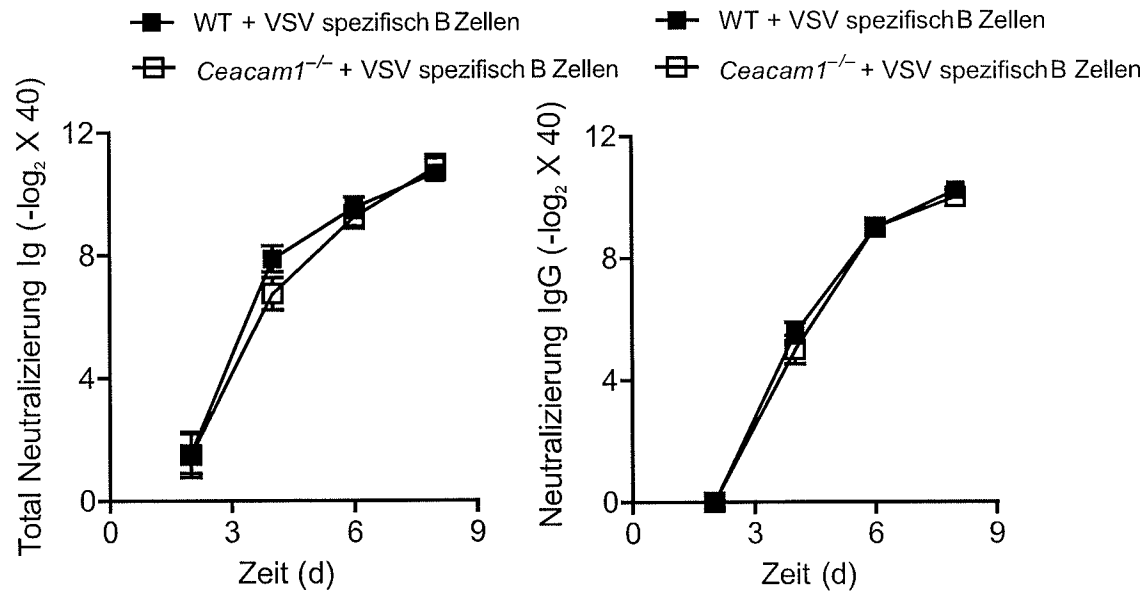
Figur 5 A



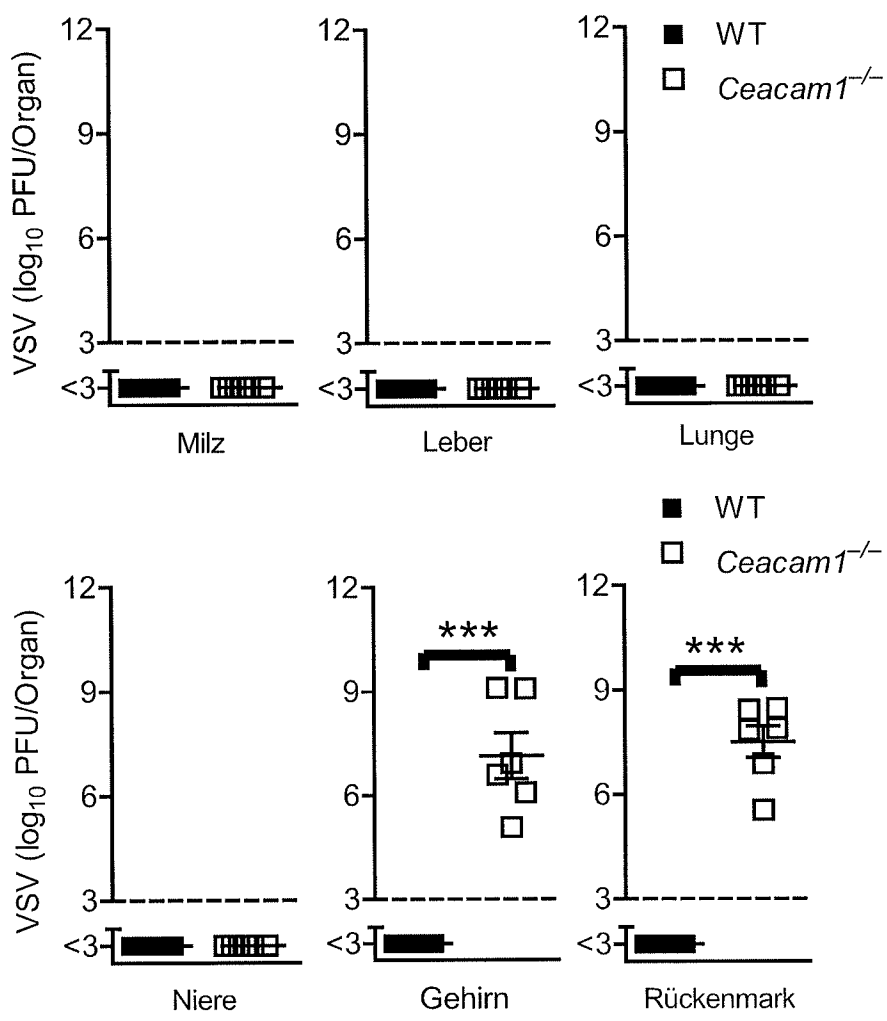
Figur 5 B



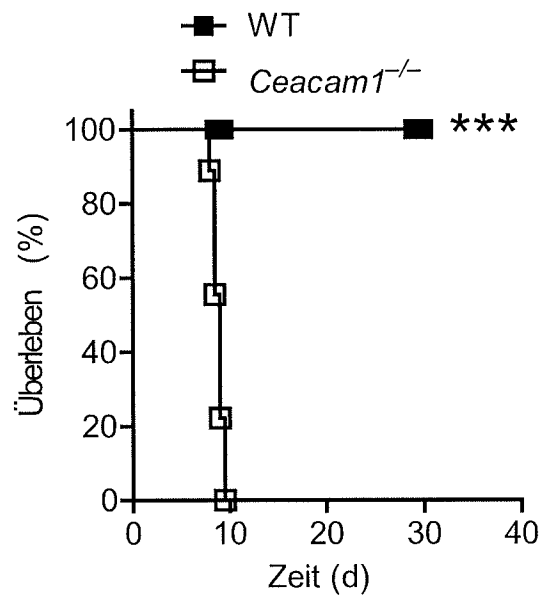
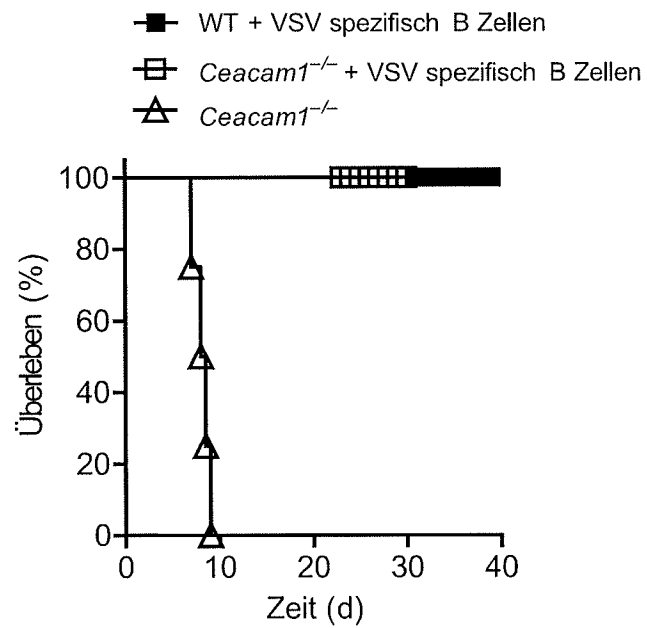
Figur 5 C

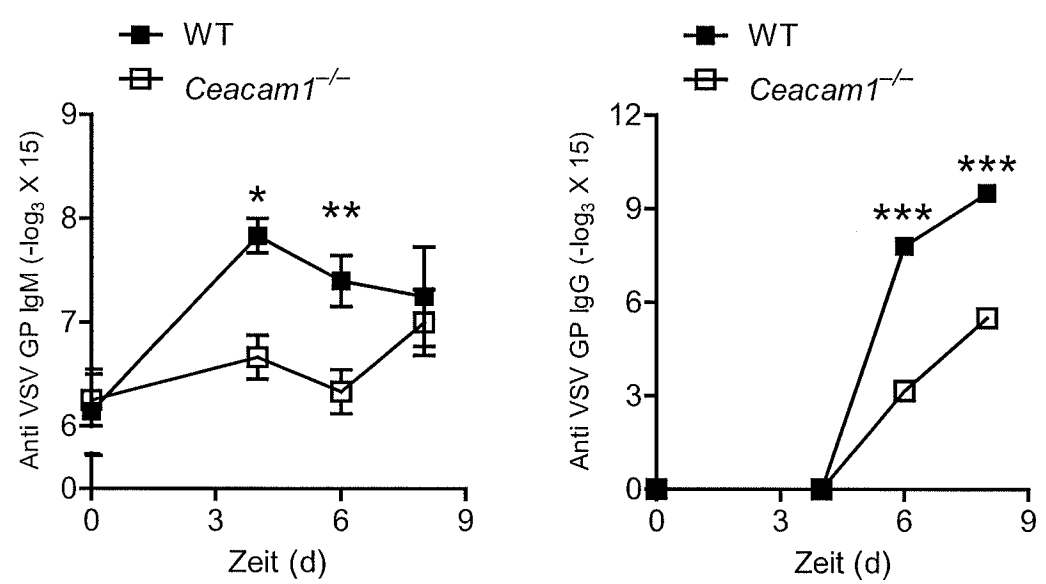


Figur 5 D

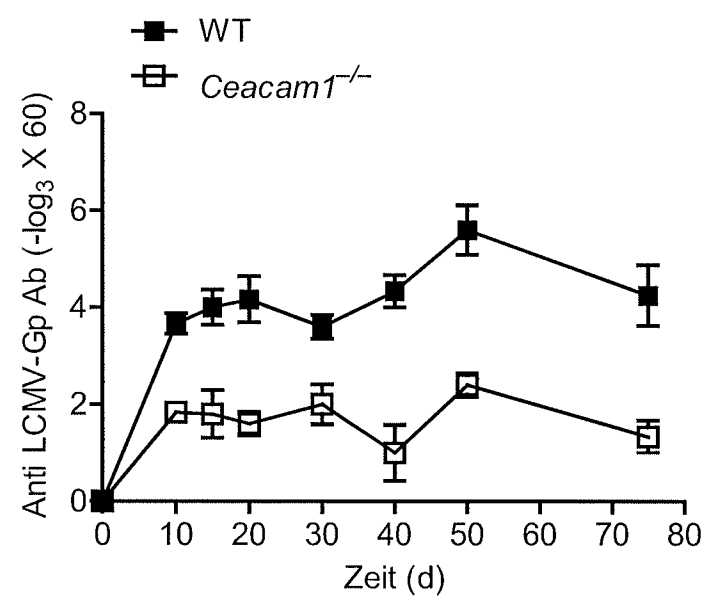


Figur 5 E

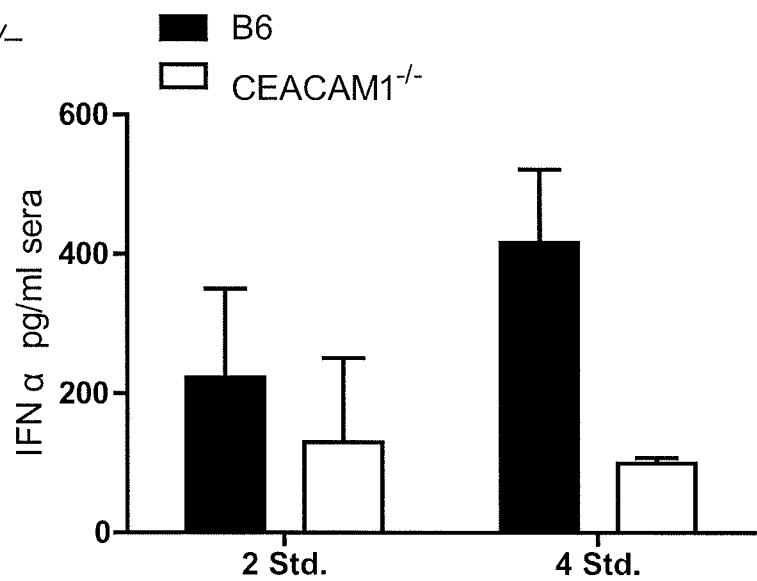
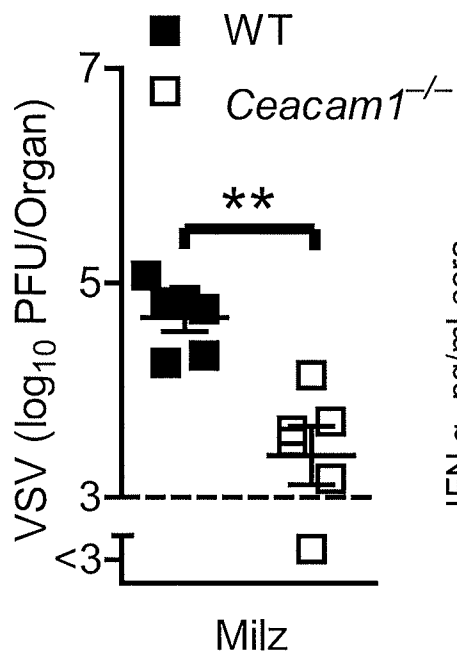
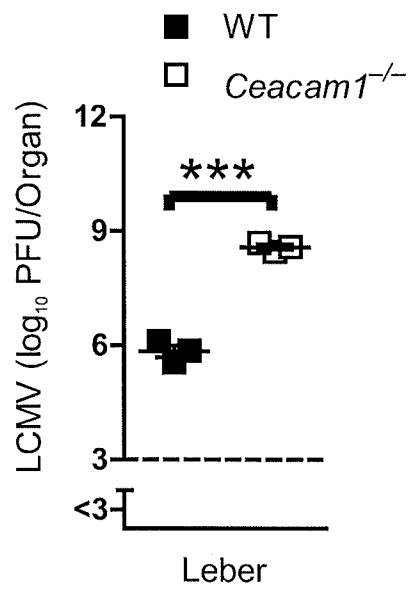
**Figur 5 F****Figur 5 G**

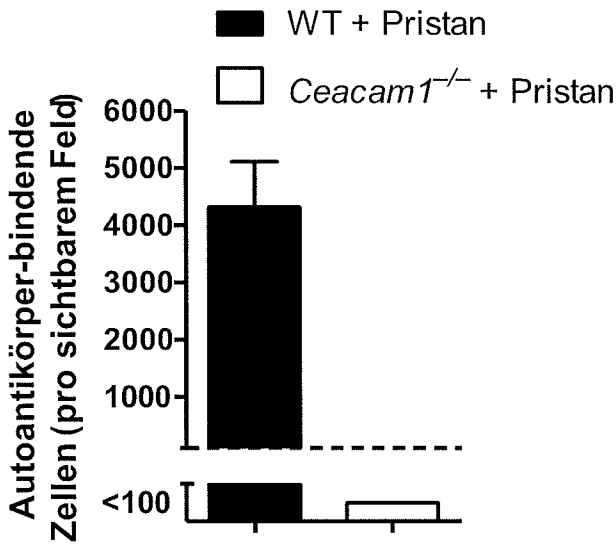


Figur 6



Figur 7 A





Figur 9

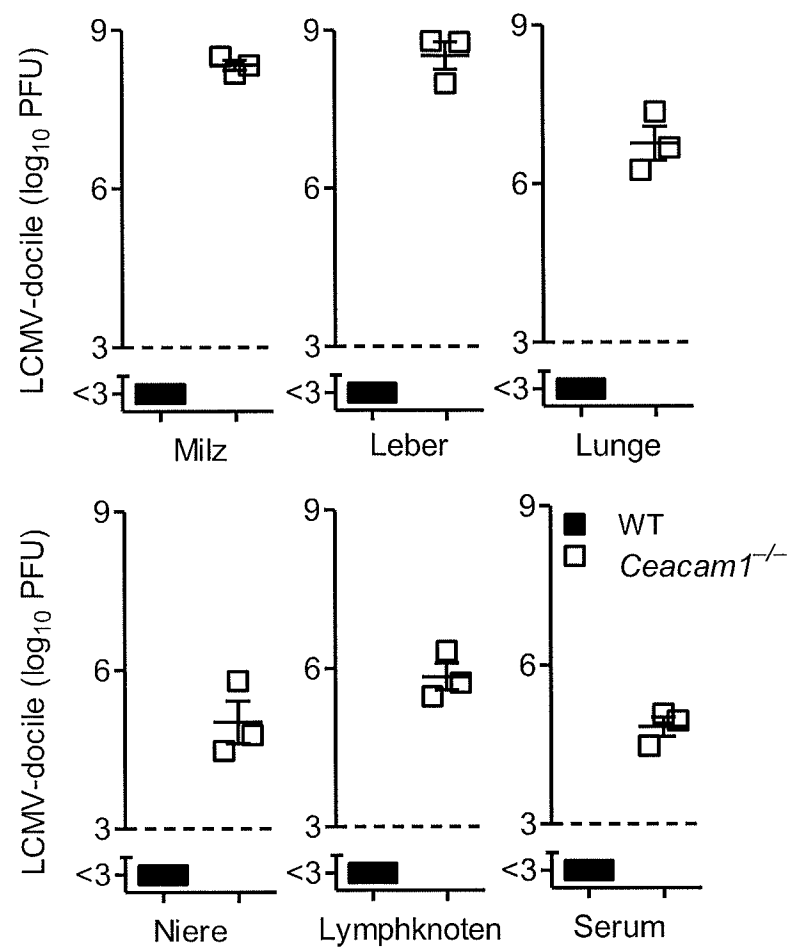


Figure 10

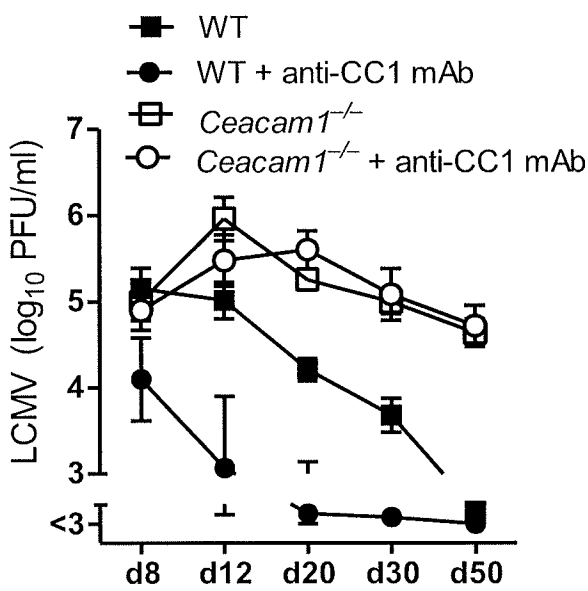


Figure 11 A

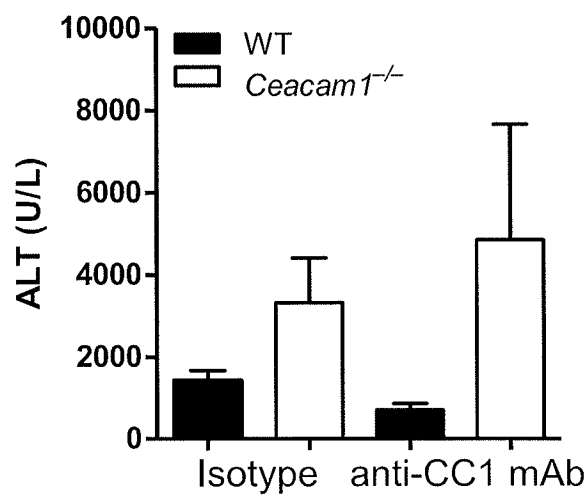
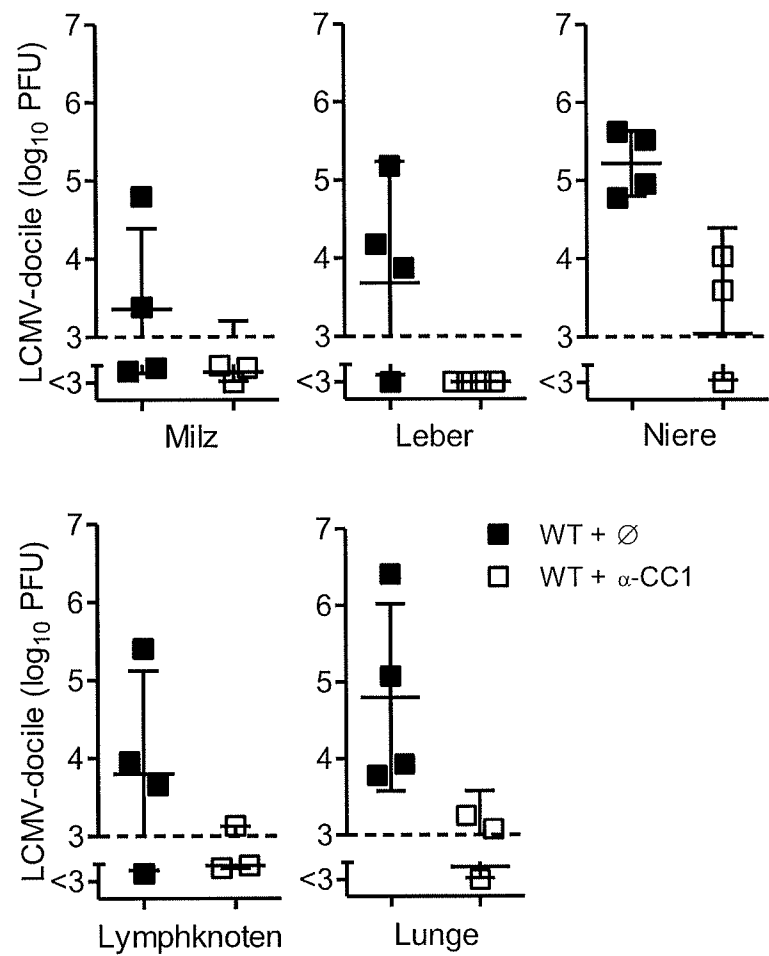


Figure 11 B



Figur 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/051708

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/104 C07K16/28 A61P37/06 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/16 A61P31/22 A61P31/20 A61P31/14 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Anti-Mouse CD66a (CEACAM1) PE" In: "affymetrix eBioscience CatNo: 12-0661", 1 January 2009 (2009-01-01), XP055259614, the whole document -----	1-19
X	B. C. TURNER ET AL: "Receptor-Dependent Coronavirus Infection of Dendritic Cells", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 78, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 5486-5490, XP055261618, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.10.5486-5490.2004 the whole document figure 3 ----- -/-	1-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
1 April 2016	20/06/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lechner, Oskar	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051708

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. NAKAGAKI ET AL: "Receptor-Independent Spread of a Highly Neurotropic Murine Coronavirus JHMV Strain from Initially Infected Microglial Cells in Mixed Neural Cultures", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 79, no. 10, 27 April 2005 (2005-04-27), pages 6102-6110, XP055261605, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.10.6102-6110.2005 abstract -----	1-19
X	Anna G Tietjens: "Initiale Schritte der Hepatitis C Virus Infektion: Evaluation mit verschiedenen Modellsystemen", 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1-155, XP055261810, Retrieved from the Internet: URL:http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-21057/Gesamte_Arbeit_final_Veroeffentlichung.pdf [retrieved on 2016-03-31] page 99 - page rd777777 -----	1-19
Y	Miriam Kellich: "Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von löslichem CEACAM8 und CEACAM1 auf naiven B-Zellen und aktivierten Lymphozyten", Dissertation, 13 February 2014 (2014-02-13), XP055261821, Retrieved from the Internet: URL:http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-35937/Diss_Kellich.pdf [retrieved on 2016-03-31] page 82 - page 88 -----	1-19
Y	G. GREICIUS: "CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 74, no. 1, 22 May 2003 (2003-05-22), pages 126-134, XP055257893, US ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1189/jlb.1202594 abstract ----- -/-	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051708

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLAU D M ET AL: "Targeted disruption of the Ceacam1 (MHVR) gene leads to reduced susceptibility of mice to mouse hepatitis virus infection", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 17, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 8173-8186, XP002203177, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.17.8173-8186.2001 abstract -----	1-19
A	QIGUI YU ET AL: "Association of Neisseria gonorrhoeae OpaCEA with Dendritic Cells Suppresses Their Ability to Elicit an HIV-1-Specific T Cell Memory Response", PLOS ONE, vol. 8, no. 2, 12 February 2013 (2013-02-12), page e56705, XP055257999, DOI: 10.1371/journal.pone.0056705 abstract -----	1-19
A	HEIKO ADLER ET AL: "Perturbation of Lytic and Latent Gammaherpesvirus Infection in the Absence of the Inhibitory Receptor CEACAM1", PLOS ONE, vol. 4, no. 7, 21 July 2009 (2009-07-21), page e6317, XP055258045, DOI: 10.1371/journal.pone.0006317 abstract -----	1-19
A	GRAY-OWEN SCOTT D ET AL: "CEACAM1: contact-dependent control of immunity", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, GB, vol. 6, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 433-446, XP002605706, ISSN: 1474-1733 abstract -----	1-19
A	IDO D. WEISS ET AL: "IFN-[gamma] Treatment at Early Stages of Influenza Virus Infection Protects Mice from Death in a NK Cell-Dependent Manner", JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH., vol. 30, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 439-449, XP055261509, US ISSN: 1079-9907, DOI: 10.1089/jir.2009.0084 abstract -----	1-3,10, 11
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051708

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENCHEVA MARIETA ET AL: "Regulation of CEACAM1 transcription in human breast epithelial cells", BMC MOLECULAR BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 11, no. 1, 4 November 2010 (2010-11-04), page 79, XP021073235, ISSN: 1471-2199, DOI: 10.1186/1471-2199-11-79 abstract -----	1-3,10, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/051708

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

4-9, 12-19 (completely); 1-3, 10, 11 (partly)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 4-9, 12-19 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Substances, which are specifically mentioned in the claims, which activate the expression and/or function of CEACAM1, and the production and therapeutic use thereof.

1.1. Claims 4, 5, 12-19 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Anti-CEACAM1 antibody (Ak), the production and therapeutic use thereof for treating viral infections and/or viral infectious diseases.

1.2. Claims 6 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Use of UspA1 of *Moraxella catarrhalis* (Seq 15) - “-.

1.3. Claims 7 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Use of Opa of *Neisseria gonorrhoeae* (Seq 17) - “-.

1.4. Claims 8 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Use of variable protein P5 of *Haemophilus influenzae* (Seq 18) - “-.

1.5. Claims 9 (in full); 1-3, 10, 11 (in part)

Use of soluble human recombinant CEACAM1 fusion protein according to Seq 19 - “-.

2. Claims 1-3, 10, 11 (all in part)

Substances which are not covered by subinventions 1.1.-1.5. and fall under the scope of protection as per claim 1, which activate the expression and/or function of CEACAM1, the production and therapeutic use thereof for treating viral infections and/or viral infectious diseases.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/051708

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/104 C07K16/28 A61P37/06
A61P31/12 A61P31/18 A61P31/16 A61P31/22 A61P31/20
A61P31/14 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A61K C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	"Anti-Mouse CD66a (CEACAM1) PE" In: "affymetrix eBioscience CatNo: 12-0661", 1. Januar 2009 (2009-01-01), XP055259614, das ganze Dokument -----	1-19
X	B. C. TURNER ET AL: "Receptor-Dependent Coronavirus Infection of Dendritic Cells", JOURNAL OF VIROLOGY., Bd. 78, Nr. 10, 15. Mai 2004 (2004-05-15), Seiten 5486-5490, XP055261618, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.10.5486-5490.2004 das ganze Dokument Abbildung 3 ----- -/-	1-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,
aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach
dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-
scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer
anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden
soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie
ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,
eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach
dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum
oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der
Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der
Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung
kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf
erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung
kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet
werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren
Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und
diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. April 2016

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/06/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lechner, Oskar

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	K. NAKAGAKI ET AL: "Receptor-Independent Spread of a Highly Neurotropic Murine Coronavirus JHMV Strain from Initially Infected Microglial Cells in Mixed Neural Cultures", JOURNAL OF VIROLOGY., Bd. 79, Nr. 10, 27. April 2005 (2005-04-27), Seiten 6102-6110, XP055261605, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.10.6102-6110.2005 Zusammenfassung -----	1-19
X	Anna G Tietjens: "Initiale Schritte der Hepatitis C Virus Infektion: Evaluation mit verschiedenen Modellsystemen", 1. April 2008 (2008-04-01), Seiten 1-155, XP055261810, Gefunden im Internet: URL:http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-21057/Gesamte_Arbeit_final_Veroeffentlichung.pdf [gefunden am 2016-03-31] Seite 99 - Seite rd777777 -----	1-19
Y	Miriam Kellich: "Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von löslichem CEACAM8 und CEACAM1 auf naiven B-Zellen und aktivierten Lymphozyten", Dissertation, 13. Februar 2014 (2014-02-13), XP055261821, Gefunden im Internet: URL:http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-35937/Diss_Kellich.pdf [gefunden am 2016-03-31] Seite 82 - Seite 88 -----	1-19
Y	G. GREICIUS: "CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, Bd. 74, Nr. 1, 22. Mai 2003 (2003-05-22), Seiten 126-134, XP055257893, US ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1189/jlbb.1202594 Zusammenfassung ----- -/--	1-19

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BLAU D M ET AL: "Targeted disruption of the Ceacam1 (MHVR) gene leads to reduced susceptibility of mice to mouse hepatitis virus infection", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 75, Nr. 17, 1. September 2001 (2001-09-01), Seiten 8173-8186, XP002203177, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.17.8173-8186.2001 Zusammenfassung -----	1-19
A	QIGUI YU ET AL: "Association of Neisseria gonorrhoeae OpaCEA with Dendritic Cells Suppresses Their Ability to Elicit an HIV-1-Specific T Cell Memory Response", PLOS ONE, Bd. 8, Nr. 2, 12. Februar 2013 (2013-02-12), Seite e56705, XP055257999, DOI: 10.1371/journal.pone.0056705 Zusammenfassung -----	1-19
A	HEIKO ADLER ET AL: "Perturbation of Lytic and Latent Gammaherpesvirus Infection in the Absence of the Inhibitory Receptor CEACAM1", PLOS ONE, Bd. 4, Nr. 7, 21. Juli 2009 (2009-07-21), Seite e6317, XP055258045, DOI: 10.1371/journal.pone.0006317 Zusammenfassung -----	1-19
A	GRAY-OWEN SCOTT D ET AL: "CEACAM1: contact-dependent control of immunity", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, GB, Bd. 6, Nr. 6, 1. Juni 2006 (2006-06-01), Seiten 433-446, XP002605706, ISSN: 1474-1733 Zusammenfassung -----	1-19
A	IDO D. WEISS ET AL: "IFN-[gamma] Treatment at Early Stages of Influenza Virus Infection Protects Mice from Death in a NK Cell-Dependent Manner", JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH., Bd. 30, Nr. 6, 1. Juni 2010 (2010-06-01), Seiten 439-449, XP055261509, US ISSN: 1079-9907, DOI: 10.1089/jir.2009.0084 Zusammenfassung -----	1-3,10, 11
	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GENCHEVA MARIETA ET AL: "Regulation of CEACAM1 transcription in human breast epithelial cells", BMC MOLECULAR BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, Bd. 11, Nr. 1, 4. November 2010 (2010-11-04), Seite 79, XP021073235, ISSN: 1471-2199, DOI: 10.1186/1471-2199-11-79 Zusammenfassung -----	1-3,10, 11

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
4-9, 12-19(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 4-9, 12-19(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Spezifisch in den Ansprüchen angeführte Substanzen welche die Expression und/oder Funktion von Ceacam1 aktivieren, deren Herstellung und therapeutische Verwendung.

1.1. Ansprüche: 4, 5, 12-19(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Anti-Ceacam1 Antikörper (Ak), deren Herstellung und therapeutische Verwendung zur Behandlung von viralen Infektionen und/oder viralen Infektionskrankheiten.

1.2. Ansprüche: 6(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Verwendung von UspA1 von *Moraxella catarrhalis* (Seq 15) -"-

1.3. Ansprüche: 7(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Verwendung von Opa von *Neisseria gonorrhoeae* (Seq 17) -"-

1.4. Ansprüche: 8(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Verwendung des variablen proteins P5 von *Haemophilus influenzae* (Seq 18) -"-

1.5. Ansprüche: 9(vollständig); 1-3, 10, 11(teilweise)

Verwendung von löslichem humanen rekombinanten CEACAM1-Fusionsprotein gem. Seq 19 -"-

2. Ansprüche: 1-3, 10, 11(alle teilweise)

Substanzen die nicht durch Untererfindungen 1.1 - 1.5 abgedeckt werden und in den Schutzanspruch gem. Anspruch 1 fallen, welche die Expression und/oder Funktion von Ceacam1 aktivieren, deren Herstellung und therapeutische Verwendung zur Behandlung von viralen Infektionen und/oder viralen Infektionskrankheiten.
