



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 30 634 T2** 2008.07.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 263 928 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 30 634.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/04678**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 910 649.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/059073**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.02.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/00** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

181822 P	11.02.2000	US
184687 P	24.02.2000	US

(73) Patentinhaber:

**Dana-Farber Cancer Institute, Inc., Boston, Mass.,
US**

(74) Vertreter:

Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GONG, Jianlin, Wayland, MA 01778, US; KUFÉ,
Donald W., Boston, MA 02115, US**

(54) Bezeichnung: **IDENTIFIZIERUNG VON ANTIGENEN PEPTIDEN DURCH ZYTOTOXISCHE T-LYMPHOZYTEN AK-
TIVIERT VON DENDRITISCHEN ZELLHYBRIDEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die in dieser Anmeldung beschriebene Forschung wurde teilweise vom National Cancer Institute des National Institutes of Health durch Grant Nr. CA38493 unterstützt. Die Regierung kann bestimmte Rechte an dieser Erfindung besitzen.

Erfindungsgebiet

[0002] Die Erfindung betrifft die zelluläre Immunologie.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Dendritische Zellen („DC“) sind potente Antigene präsentierende Zellen („APC“) im Immunsystem. Es ist gezeigt worden, dass DC alle Signale bereitstellen, die zur T-Zell-Aktivierung und -Proliferation erforderlich sind. Diese Signale können in zwei Typen kategorisiert werden. Der erste Typ, der der Immunantwort Spezifität verleiht, wird über die Wechselwirkung zwischen dem T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex („TCR/CD3“-Komplex) und einem antigenen Peptid vermittelt, das durch ein Haupthistokompatibilitätskomplex („MHC“) Klasse I oder II Protein auf der Oberfläche von APC präsentiert wird. Diese Wechselwirkung ist notwendig, aber nicht hinreichend, damit die T-Zell-Aktivierung stattfindet. Tatsächlich kann der erste Signaltyp ohne den zweiten Signaltyp zu T-Zell-Anergie führen. Der zweite Signaltyp, kostimulierende Signale genannt, ist weder antigenspezifisch noch MHC-beschränkt und kann in der Gegenwart des ersten Signaltyps zu einer vollständigen Proliferationsreaktion der T-Zellen und Induzierung von T-Zell-Effektorfunktionen führen.

[0004] Kostimulierende Signale werden durch Wechselwirkung zwischen Rezeptor-Liganden-Paaren erzeugt, die auf der Oberfläche von APC und T-Zellen exprimiert werden. Ein exemplarisches Rezeptor-Liganden-Paar ist eines der kostimulierenden B7-Moleküle auf der Oberfläche von DC und sein Gegenrezeptor CD28 oder CTLA-4 auf T-Zellen (Freeman et al., Science 262: 909–911, 1993; Young et al., J. Clin. Invest. 90: 229, 1992; Nabavi et al., Nature 360: 266, 1992).

[0005] DC sind Nebenbestandteile verschiedener Immunorgane, wie etwa Milz, Thymus, Lymphknoten, Epidermis und peripheres Blut. Beispielsweise repräsentieren DC lediglich etwa 1% unbehandelter Milz (Steinman et al., J. Exp. Med. 149: 1, 1979) oder epidermaler Zellsuspensionen (Schuler et al., J. Exp. Med. 161: 526, 1985 und Romani et al., J. Invest. Dermatol. 93: 600, 1989) und 0,1 bis 1% monoklonaler Zellen in peripherem Blut (Freudenthal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7698, 1990). Verfahren zum Erzeugen dendritischer Zellen aus Progenitoren aus peripherem Blut oder Knochenmark sind beschrie-

ben worden (Inaba et al., J. Exp. Med. 175: 1157, 1992; Inaba et al., J. Exp. Med. 176: 1693–1702, 1992; Romani et al., J. Exp. Med. 180: 83–93, 1994 und Sallusto et al., J. Exp. Med. 179: 1109–1118, 1994).

Kurzfassung der Erfindung

[0006] Die Erfindung zeichnet sich durch Verfahren zur Identifizierung von Peptiden aus, die durch CTL und HTL erkannt werden. Die Charakterisierung dieser Peptide wird die Identifizierung von Antigenen (beispielsweise tumorassoziierter Antigene) ermöglichen, die das Ziel der Immunantwort sind. Bei Verfahren zum Erzeugen von Effektor-T-Lymphozyten (beispielsweise zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) oder Helfer-T-Lymphozyten (HTL)) werden T-Lymphozyten durch fusionierte Zellen (auch als „Fusionszellen“ bezeichnet) aktiviert, die wie im Folgenden beschrieben durch Fusion zwischen dendritischen und nicht-dendritischen Säugetierzellen (beispielsweise menschlichen) hergestellt werden. Die T-Lymphozyten können beispielsweise aus einem Säugetier (beispielsweise einem Menschen) mit Krebs (beispielsweise Brustkrebs) oder mit einer Infektionskrankheit (beispielsweise einer Viruserkrankung, wie etwa AIDS) stammen. Die fusionierten Zellen weisen die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften auf. Die durch dieses Verfahren erzeugten CTL lysieren Zielzellen (beispielsweise autologe Tumorzellen, pathogene infizierte Zellen) durch einen MHC-beschränkten Mechanismus. Sie sezernieren Helferzytokine, die dazu dienen, die CTL- und B-Lymphozytenreaktionen nach Aktivierung durch an MHC-Moleküle gebundene antigene Peptide zu steigern.

[0007] Fusionierte Zellen werden durch Fusion zwischen wenigstens einer dendritischen Säugetierzelle (beispielsweise eine aus einer Knochenmarkkultur oder einer Kultur peripherer Blutzellen stammende DC) und wenigstens einer nicht-dendritischen Säugetierzelle (beispielsweise eine Krebszelle oder eine transfizierte Zelle), die ein Zelloberflächenantigen (beispielsweise ein Krebsantigen) exprimiert, erzeugt. Wenigstens 5% einer Vielzahl von Zellen können fusionierte Zellen sein. Mit „Krebsantigen“ ist ein antigenes Molekül gemeint, das im Gegensatz zu normalen Zellen primär oder vollständig von Krebszellen in einem an dem Krebs leidenden Individuum exprimiert wird. Die fusionierten Zellen in den Zusammensetzungen exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle, B7 und das Zelloberflächen-Antigen in einer Menge, die wirksam ist, um ein Immunsystem zu stimulieren (beispielsweise T-Zellen zu aktivieren). Mit „B7“ ist irgendein Element (Beispielsweise B7-1 oder B7-2) aus der B7-Familie kostimulierender Moleküle gemeint.

[0008] Die Parentalzellen, die verwendet werden, um die fusionierten Zellen zu erzeugen, können aus

einem einzelnen Individuum (beispielsweise einem Menschen, einer Maus oder einer Ratte) erhalten werden. Sie können auch aus unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies (beispielsweise Homo sapiens) mit übereinstimmenden oder nicht übereinstimmenden MHC-Molekülen erhalten werden. Beispielsweise sind die dendritischen Zellen autolog oder allog.

[0009] Dendritische Säugetierzellen werden mit nicht-dendritischen Säugetierzellen, die ein Zelloberflächenantigen exprimieren, in der Gegenwart eines Fusionsmittels (beispielsweise Elektrizität, Polyethylenglykol oder Sendai-Virus) fusioniert. Nach wahlweise eine Zeitdauer langem Kultivieren der Postfusionszellmischung in einem Medium (das wahlweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält), werden die kultivierten fusionierten Zellen von den nicht fusionierten parental nicht-dendritischen Zellen auf der Grundlage der unterschiedlichen Haftungseigenschaften der zwei Zellgruppen abgetrennt. Die nicht fusionierten parental dendritischen Zellen proliferieren nicht und so sterben sie ab. Auch wenn sie in der therapeutischen Zusammensetzung vorhanden bleiben, werden sie die Wirkungen der fusionierten Zellen nicht beeinträchtigen. Die isolierten fusionierten Zellen, die typischerweise (a) MHC-Klasse-II-Protein, (b) B7 und (c) das Zelloberflächenantigen auf den nicht-dendritischen Parentalzellen exprimieren, sind zum Stimulieren eines Immunsystems verwendbar. Die Zellen sind direkt nach der Fusion oder nach einem In-vitro-Kulturschritt bei Screeningverfahren oder bei therapeutischen Verfahren verwendbar.

[0010] Der DC-Phänotyp einer fusionierten Zelle kann durch deren Refusionieren mit wenigstens einer zusätzlichen dendritischen Säugetierzelle aufrechterhalten werden. Die refusionierten Zellen exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle, B7 und das Zelloberflächenantigen der dendritischen Parentalzellen und sind zum Stimulieren eines Immunsystems verwendbar.

[0011] Ein Verfahren zur Herstellung einer Population von Zellen, die CTL oder HTL enthält, beinhaltet die folgenden Schritte: (a) Bereitstellen einer Vielzahl von Zellen, die fusionierte Zellen enthält, wobei jede der fusionierten Zellen durch Fusion zwischen wenigstens einer dendritischen Säugetierzelle und wenigstens einer nicht-dendritischen Säugetierzelle (beispielsweise eine Krebszelle, wie etwa eine menschliche Brustkrebszelle), die ein Zelloberflächenantigen exprimiert, erzeugt wird, wobei wenigstens 5% der fusionierten Zellen (i) ein MHC-Klasse-II-Molekül, (ii) B7 und (iii) das Zelloberflächenantigen in einer Menge exprimieren, die wirksam ist, ein Immunsystem zu stimulieren, und (b) in Kontakt bringen einer Population von T-Lymphozyten mit der Vielzahl von Zellen, wobei das Kontaktieren das Aus-

differenzieren entweder (i) von CTL-Vorläuferzellen in der Population von T-Lymphozyten zu CTL oder (ii) von HTL-Vorläuferzellen in der Population von T-Lymphozyten zu HTL verursacht. In der bereitgestellten Vielzahl von Zellen sind wenigstens 5% der Zellen fusionierte Zellen.

[0012] Die Erfindung umfasst zudem ein Verfahren zum Testen eines Peptids auf Antigenaktivität, das die folgenden Schritte beinhaltet: (a) Bereitstellen der obigen Population von Zellen, die CTL enthält, und (b) in Kontakt bringen einer Vielzahl von Zielzellen mit der Population von Zellen in der Gegenwart des Peptids. Die Lyse der Vielzahl von Zielzellen oder eines Teils der Vielzahl von Zielzellen identifiziert das Peptid als ein antigenes Peptid, das von CTL innerhalb der Population von Zellen erkannt wird. Alternativ kann das Verfahren die folgenden Schritte enthalten: (a) Bereitstellen der obigen Population von Zellen, die HTL enthält, und (b) in Kontakt bringen einer Vielzahl von Antigen präsentierenden Zellen mit der Population von Zellen in der Gegenwart des Peptids. Eine Reaktion (beispielsweise eine Proliferationsreaktion oder eine Zytokin erzeugende Reaktion) der HTL identifiziert das Peptid als ein antigenes Peptid, das von HTL innerhalb der Population von Zellen erkannt wird. Die zum Herstellen der fusionierten Zellen verwendeten nicht-dendritischen Säugetierzellen können Krebszellen sein (beispielsweise menschliche Brustkrebszellen). Bei Verfahren zum Induzieren von Immunantworten in Subjekten (beispielsweise Patienten, wie etwa menschliche Brustkrebspatienten) können dem Patienten durch dieses Verfahren identifizierte Peptide oder Polypeptide, von denen die Peptide Fragmente sind, verabreicht werden.

[0013] Ein Verfahren zur Herstellung einer antigenspezifischen Immun-Effektorzelle wird durch in Kontakt bringen einer T-Zelle mit der oben beschriebenen Hybridzelle ausgeführt. Die T-Zelle stammt aus einer Vielzahl von Quellen, wie etwa peripherem Blut, oder aus einer Tumorstelle. Der Kontaktierungsschritt findet in vivo oder ex vivo statt. Beispielsweise wird ein Verfahren zur Herstellung einer gereinigten Population von aktivierten Immun-Effektorzellen, die für ein Zielantigen spezifisch sind, durch in Kontakt bringen einer T-Zelle mit einer Hybridzelle eine Zeitdauer lang, die ausreicht, die T-Zelle zu aktivieren, und Entfernen der Hybridzelle von der T-Zelle ausgeführt, so dass eine Population von antigenspezifischen Immun-Effektorzellen erhalten wird.

[0014] Soweit es nicht anders definiert wird, weisen die hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke die gleiche Bedeutung auf, wie sie üblicherweise von einem Fachmann auf dem Fachgebiet verstanden wird, dem diese Erfindung angehört. Im Folgenden werden exemplarische Verfahren und Materialien beschrieben, obwohl in der Praxis oder beim Testen der vorliegenden Erfindung

Verfahren und Materialien verwendet werden können, die jenen hierin beschriebenen ähnlich oder äquivalent sind. Alle hierin erwähnten Veröffentlichungen und anderen Referenzen werden in ihrer Gesamtheit durch Inbezugnahme übernommen. Im Fall eines Konflikts wird die vorliegende Beschreibung einschließlich der Definitionen gelten. Die Materialien, Methoden und Beispiele sind lediglich illustrativ und nicht dazu gedacht, einzuschränken.

[0015] Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus den folgenden Zeichnungen, der detaillierten Beschreibung und aus den Ansprüchen ersichtlich werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0016] [Fig. 1A](#) ist ein Graph, der die Ergebnisse einer Durchflusszytometrieanalyse der angegebenen Antigene auf der Oberfläche von DC (DC), MC38-Zellen (MC38/MUC1) und von durch Fusion zwischen DC und MC38/MUC1-Zellen (FC/MUC1) erzeugten fusionierten Zellen zeigt.

[0017] [Fig. 1B](#) ist ein Graph, der die Tumorzinzidenz bei weiblichen C57BL/6-Mäusen (10 pro Gruppe) zeigt, denen subkutan 2×10^5 MC38/MUC1-Zellen (offene Dreiecke), 2×10^6 DC gemischt mit 2×10^5 MC38/MUC1-Zellen (offene Kreise), 2×10^5 FC/MUC1-Zellen (schattierte Kreise) oder 5×10^5 FC/MUC1-Zellen (schattierte Kästchen) injiziert wurden. Die Tumorzinzidenz (> 3 mm Durchmesser) wurde an den angegebenen Tagen nach Injektion erfasst. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0018] [Fig. 1C](#) ist ein Graph, der den [3 H]-Thymidin-Einbau bei gemischten Leukozytenreaktionen zeigt. DC (offene Kreise), MC38/MUC1-Zellen (schattierte Kreise) und FC/MUC1-Zellen (offene Dreiecke) wurden bestrahlt (30 Gy) und mit den angegebenen Verhältnissen zu 1×10^5 allogeenen Balb/c T-Zellen hinzugefügt. die [3 H]-Thymidin-Aufnahme bei 6 h langes Inkubieren wird als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler von drei Bestimmungen ausgedrückt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0019] [Fig. 2A](#) ist ein Graph, der die Induktion von Antitumoraktivität durch FC/MUC1 in der Form von Prozent Tumorzinzidenz zeigt. Gruppen von 10 Mäusen wurden subkutan zweimal in 14-tägigen Intervallen 3×10^5 DC (offene Kreise), 3×10^5 FC/MUC1 (schattierte Kreise) oder PBS (offene Kästchen) injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit $2,5 \times 10^5$ MC38/MUC1-Zellen provoziert. Tumoren > 3 mm Durchmesser wurden als positiv gezählt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0020] [Fig. 2B](#) ist ein Graph, der die Induktion von Antitumoraktivität durch FC/MUC1 in der Form von Zytotoxizität zeigt. Mäuse, denen zweimal DC (offene Kreise), FC/MUC1 (schattierte Kreise) oder PBS (offene Kästchen) injiziert wurde, wurden mit $2,5 \times 10^5$ MC38/MUC1-Tumorzellen provoziert. Splenozyten wurden 20 Tage nach Provokation isoliert und mit den angegebenen Effektor:Ziel-Verhältnissen mit MC38/MUC1-Zielzellen inkubiert. Die Aktivität (arithmetisches Mittel \pm Standardfehler) von zytotoxischen T-Lymphozyten („CTL“) wurde durch den 4-h-LDH-Freisetzungstest bestimmt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0021] [Fig. 2C](#) ist ein Graph, der die Induktion von Antitumoraktivität durch FC/MUC1 in der Form von Prozent Tumorzinzidenz zeigt. Mäusen (8 pro Gruppe) wurde jeden Tag intravenös und intraperitoneal mAbs gegen CD4 $^+$ (offene Kästchen) und CD8 $^+$ (schattierte Kreise) injiziert, beginnend 4 Tage vor der ersten von zwei Immunisierungen mit FC/MUC1 und fortfahrend bis 4 Tage vor der Provokation mit 5×10^5 MC38/MUC1-Zellen. Ratten-IgG (offene Kreise) wurde als Kontrolle injiziert. Tumoren > 3 mm Durchmesser wurden als positiv gezählt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0022] [Fig. 2D](#) ist ein Liniengraph, der die Induktion von Antitumoraktivität durch FC/MUC1 in der Form von Zytotoxizität zeigt. Mäuse wurden wie oben mit mAbs gegen CD4 $^+$ (offene Kästchen) und CD8 $^+$ (schattierte Kreise) oder Ratten-IgG (offene Kreise) behandelt, mit FC/MUC1 immunisiert und dann mit MC38/MUC1-Zellen provoziert. Splenozyten wurden 20 Tage nach Tumorzinzidenz geerntet und mit MC38/MUC1-Zellen inkubiert. Die CTL-Aktivität (arithmetisches Mittel \pm Standardfehler) wurde durch den 4-h-LDH-Freisetzungstest bestimmt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei separaten Experimenten erhalten.

[0023] [Fig. 3A](#) ist ein Graph, der die Verhinderung von MC38/MUC1 pulmonalen Metastasen nach Immunisierung mit FC/MUC1 zeigt. Gruppen von 10 Mäusen wurde zweimal FC/MUC1-Zellen oder PBS injiziert und wurden nach 14 Tagen mit intravenöser Verabreichung von 1×10^6 MC38/MUC1-Zellen provoziert. Die Mäuse wurden 28 Tage nach Provokation getötet. Pulmonale Metastasen wurden nach Anfärben der Lungen mit Tusche (Wexler, J. Natl. Cancer Inst. 36: 641–643, 1966) gezählt.

[0024] [Fig. 3B](#) ist ein Graph, der die Behandlung von MC38/MUC1 pulmonalen Metastasen nach Immunisierung mit FC/MUC1 zeigt. Gruppen von 10 Mäusen wurden 1×10^6 MC38/MUC1-Zellen oder MC38-Zellen injiziert. Die Mäuse wurden 4 und 18 Tage nach Tumorzinzidenz mit 1×10^6 FC/MUC1

oder FC/MC38 provoziert und dann nach weiteren 10 Tagen getötet. Für jede Maus wurden pulmonale Metastasen gezählt. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei separaten Experimenten (10/10 mit FC/MUC1 behandelte Mäuse hatten beim zweiten Experiment keine pulmonalen Metastasen) erhalten.

[0025] [Fig. 4A](#) ist eine Serie von zweidimensionalen Durchflusszytometrie-Histogrammen, die die Expression von MUC1 oder MHC Klasse II auf MCF-7-Brustkrebszellen, humanen dendritischen Zellen und fusionierten DC/MCF-7-Zellen zeigen.

[0026] [Fig. 4B](#) ist eine Serie von Photomikrographien, die die Expression von MUC1 (oben links) und Zytokeratin (CT) (unten links) in primären humanen Brustkrebszellen und von MUC1 und MHC Klasse II (oben rechts) und Zytokeratin und MHC Klasse II (unten rechts) in humanen DC/primären Brustkrebs fusionierten Zellen zeigen.

[0027] [Fig. 4C](#) ist eine Serie von zweidimensionalen Durchflusszytometrie-Histogrammen, die die Expression von MHC Klasse II und MUC1 auf primären humanen Brustkrebszellen (BT), autologen humanen dendritischen Zellen (DC) und BT/DC fusionierten Zellen zeigen.

[0028] [Fig. 5A](#) ist ein Photomikrographienpaar, das das Clustering von autologen T-Zellen um BT/DC fusionierten Zellen (rechts), aber nicht BT-Zellen zeigt.

[0029] [Fig. 5B](#) ist ein Liniengraph, der die Proliferation von T-Zellen in Reaktion auf die Stimulation mit DC (offene Kreise), autologen BT-Zellen (offene Kästchen), autologen BT-Zellen gemischt mit autologen DC (schattierte Kästchen) oder autologen BT/DC-Fusionszellen in den angegebenen Verhältnissen von T-Zellen zu Stimulatorzellen (S) zeigt.

[0030] [Fig. 5C](#) ist ein Liniengraph, der die Proliferation von T-Zellen in Reaktion auf die Stimulation durch PEG-behandelte autologe DC (offene Dreiecke), autologe DC fusioniert an Monozyten (schattierte Dreiecke) oder autologe BT/DC fusionierte Zellen (offene Kreise) zeigt.

[0031] [Fig. 6A](#) ist ein Balkengraph, der die Zytolyse von autologen BT-Zielzellen durch T-Zellen zeigt, die in der Gegenwart von Human-IL-2 mit autologen DC, autologen BT-Zellen, autologen DC gemischt mit autologen BT-Zellen (DC + BT) oder autologen DC/BT fusionierten Zellen stimuliert wurden.

[0032] [Fig. 6B](#) ist ein Satz von drei Liniengraphen, die Daten zeigen, die mit Zellen aus drei verschiedenen Brustkrebspatienten erhalten wurden. Die Graphen zeigen die Zytolyse von autologen BT-Zielzellen durch T-Zellen, die entweder mit autologen BT-Zellen (offene Kreise) oder DCBT-Fusionszellen

(schattierte Kreise) stimuliert wurden.

[0033] [Fig. 7A](#) ist ein Balkengraphenpaar, das Daten zeigt, die mit Zellen aus zwei verschiedenen Brustkrebspatienten erhalten wurden. Die Graphen zeigen die Zytolyse von autologen BT-Zielzellen oder autologen Monozyten (MC) durch T-Zellen, die mit autologen DC/BT fusionierten Zellen stimuliert wurden.

[0034] [Fig. 7B](#) ist ein Balkengraph, der die Zytolyse von autologen BT-Zellen, autologen MC, MCF-7-Brustkrebszellen, Eierstockkrebszellen (OVCA) und K562-Zellen in Abwesenheit (durchgezogene Balken) und Anwesenheit (schraffierte Balken) von Antikörpern, die für humane MHC-Klasse-II-Moleküle spezifisch sind, durch T-Zellen zeigt, die mit autologen DC/BT fusionierten Zellen stimuliert wurden.

[0035] [Fig. 8A](#) ist eine Serie von Durchflusszytometrie-Histogrammen, die die Expression einer Vielfalt von Zelloberflächenmolekülen auf humanen DC, Ovarialkarzinomzellen (OVCA-Zellen) und OVCA/DC fusionierten Zellen (OVCA/FC) zeigen.

[0036] [Fig. 8B](#) ist eine Serie von Photomikrographien, die die Expression von HLA-DR (MHC Klasse II) in DC, OVCA und OVCA/DC fusionierten Zellen (OVCA/FC) zeigen.

[0037] [Fig. 9](#) ist eine Serie von zweidimensionalen Durchflusszytometrie-Histogrammen, die die Expression von CA-125 (OC-125), MHC Klasse II (MHC II), B7-2 und CD38 auf DC, OVCA-Zellen, autologen OVCA/DC fusionierten Zellen (autologe OVCA/FC) und allogenen OVCA/DC-Fusionszellen (allogene OVCA/FC) zeigen.

[0038] [Fig. 10A](#) ist ein Photomikrographienpaar, das das Clustering von autologen T-Zellen um OVCA/DC fusionierten Zellen (OVCA/FC) (rechts), aber nicht OVCA-Zellen (links) zeigt.

[0039] [Fig. 10B](#) ist ein Satz von drei Liniengraphen, die Daten zeigen, die mit Zellen aus drei verschiedenen Ovarialkarzinompatienten erhalten wurden. Die Graphen zeigen die Zytolyse von autologen OVCA-Zielzellen durch T-Zellen, die entweder mit autologen DC (offene Kreise), autologen OVCA-Zellen (offene Kästchen), autologen OVCA-Zellen gemischt mit DC (offene Dreiecke) oder OVCA/DC fusionierten Zellen (schattierte Kreise) stimuliert wurden.

[0040] [Fig. 10C](#) ist ein Balkengraph, der die Zytolyse von autologen OVCA-Zielzellen durch T-Zellen zeigt, die entweder mit autologen DC, autologen OVCA-Zellen, autologen OVCA/DC fusionierten Zellen (OVCA/DC) oder autologen OVCA-Zellen fusioniert an autologe Monozyten (OVCA/MC) stimuliert wurden.

den.

[0041] [Fig. 11A](#) ist ein Balkengraphenpaar, das Daten zeigt, die mit Zellen aus zwei verschiedenen Brustkrebspatienten erhalten wurden. Die Graphen zeigen die proliferativen Reaktionen der T-Zellen, die mit autologen oder allogenen DC (ausgezogener Balken) oder OVCA/DC fusionierten Zellen (schraffierter Balken), hergestellt durch Fusion von autologen OVCA-Zellen mit den autologen oder allogenen DC, stimuliert wurden.

[0042] [Fig. 11B](#) ist ein Balkengraphenpaar, das Daten zeigt, die mit Zellen aus zwei verschiedenen Brustkrebspatienten erhalten wurden. Die Graphen zeigen die Zytolyse von autologen OVCA-Zellen durch T-Zellen, die mit autologen oder allogenen DC (ausgezogener Balken), OVCA/DC fusionierten Zellen (schraffierter Balken), hergestellt durch Fusion von autologen OVCA-Zellen mit den autologen oder allogenen DC, oder autologen OVCA-Zellen stimuliert wurden.

[0043] [Fig. 12A](#) ist ein Balkengraph, der die Zytolyse von autologen OVCA-Zellen, autologen Monozyten (MC), MCF-7-Brustkrebszellen, allogenen Eierstockkrebszellen (Allo-OVCA) und K562-Zellen durch mit autologen OVCA/DC fusionierten Zellen stimulierte T-Zellen in Abwesenheit (durchgezogener Balken) und Anwesenheit (schraffierter Balken) von Antikörpern, der für humane MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch ist.

[0044] [Fig. 12B](#) ist ein Balkengraph, der die Zytolyse von autologen OVCA-Zellen, autologen Monozyten (MC), MCF-7-Brustkrebszellen, allogenen Eierstockkrebszellen (Allo-OVCA) und K562-Zellen durch mit allogenen OVCA/DC fusionierten Zellen stimulierte T-Zellen in Abwesenheit (durchgezogener Balken) und Anwesenheit (schraffierter Balken) von Antikörpern, der für humane MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch ist.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0045] Die Erfindung zeichnet sich durch Verfahren zum Identifizieren von antigenen Peptiden aus, die von CTL und/oder HTL erkannt werden.

[0046] DC können unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Protokollen aus Knochenmarkkulturen, peripherem Blut, Milz oder aus einem anderem geeigneten Gewebe eines Säugetiers erhalten werden. Knochenmark enthält DC-Progenitoren, die bei Behandlung mit Zytokinen, wie etwa Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor („GC-CSF“) und Interleukin 4 („IL-4“), proliferieren und in DC differenzieren. Tumornekrosefaktor (TNF) kann auch verwendet werden, um die Reifung von DC zu fördern. Die derart erhaltenen DC sind relativ

unreif (beispielsweise im Vergleich zu Milz-DC). GM-CSF/IL-4-stimulierte DC exprimieren MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle, B7-1, B7-2, ICAM, CD40 und unterschiedliche Pegel an CD83. Wie von den Anmeldern entdeckt wurde, sind diese unreifen DC eher einer Fusion zugänglich als die reiferen Zellen, die in der Milz gefunden werden. Peripheres Blut enthält ebenfalls relativ unreife DC oder DC-Progenitoren, die sich in der Gegenwart von geeigneten Zytokinen, wie etwa GM-CSF, vermehren und differenzieren können und die auch in Fusion verwendet werden können.

[0047] Die bei der Erfindung verwendeten nicht-dendritischen Zellen können durch wohlbekannte Verfahren aus irgendeinem Gewebe oder Krebsgeschwür (beispielsweise Brustkrebs, Lungenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs, neurologische Karzinome, urogenitale Karzinome, Hämatologische Karzinome, Melanome und andere Hautkrebse und gastrointestinale Karzinome) erhalten werden und können immortalisiert werden. Nicht-dendritische Zelle, die ein Zelloberflächenantigen von Interesse exprimieren, können durch Transfizieren der nicht-dendritischen Zellen eines gewünschten Typs mit einem Nukleinsäuremolekül erzeugt werden, das ein Polypeptid kodiert, das das Antigen umfasst. Exemplarische Zelloberflächenantigene sind MUC1, α -Fötoprotein, γ -Fötoprotein, karzinoembryonisches Antigen, fötales Sulfoglycoprotein, plazentare alkalische Phosphatase und leukämie-assoziiertes Antigen. Verfahren zur Transfizierung und Identifizierung von Antigenen sind im Fachgebiet wohlbekannt.

[0048] Die Fusion zwischen den DC und den nicht-dendritischen Zellen kann mit wohlbekannten Verfahren ausgeführt werden, wie etwa jene unter Verwendung von Polyethylenglykol („PEG“) Sendai-Virus oder Elektrofusion. Das Verhältnis von DC zu nicht-dendritischen Zellen bei Fusion kann von 1:100 zu 1000:1 variieren, wobei ein Verhältnis größer als 1:1 bevorzugt wird, wenn die nicht-dendritischen Zellen in Kultur stark proliferieren. Nach der Fusion sterben unfusionierte DC üblicherweise innerhalb weniger Tag in Kultur ab und die fusionierten Zellen können von den unfusionierten parentalen nicht-dendritischen Zellen durch die folgenden zwei Verfahren abgetrennt werden, die beide fusionierte Zellen mit einer Reinheit von ungefähr 50% oder höher ergeben, d. h. die fusionierten Zellpräparate enthalten weniger als 50% und häufig weniger als 30% unfusionierte Zellen.

[0049] Wenn die nicht-dendritischen Zellen in der Gegenwart eines gegebenen Reagens sterben oder wenigstens nicht proliferieren und diese Sensitivität durch die Fusion mit DC überwunden werden kann, können die Postfusionszellmischungen, die sowohl die fusionierten als auch die parentalen Zellen enthal-

ten, eine Zeitdauer lang, die ausreicht, die meisten unfusionierten Zellen zu eliminieren, in einem Medium inkubiert werden, das dieses Reagens enthält. Beispielsweise sind zahlreiche Tumorzelllinien infolge eines Mangels an funktioneller Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase („HGPRT“) sensitiv für HAT. Fusionierte Zellen, die aus DC und diesen Tumorzelllinien gebildet werden, werden resistent gegen HAT, sobald die DC funktionelle HGPRT beisteuern. Somit kann nach der Fusion eine HAT-Selektion ausgeführt werden, um unfusionierte parentale Zellen zu eliminieren. Im Gegensatz zu Standard-HAT-Selektionstechniken sollte die HAT-Selektion nicht länger dauern als 12 Tage, da die Anmelder festgestellt haben, dass übermäßig langes Kultivieren zu einer Verminderung an MHC-Klasse-II-Protein und/oder B7 kostimmulierenden Molekülen bei den fusionierten Zellen führt.

[0050] Das zweite Verfahren zur Separation unfusionierter Zellen basiert auf den unterschiedlichen Haft Eigenschaften zwischen den fusionierten Zellen und den nicht-dendritischen parentalen Zellen. Es wurde festgestellt, dass fusionierte Zellen im Allgemeinen leicht an Gewebekulturbedältern anhaften. Somit können die Postfusionszellmischungen, wenn die nicht-dendritischen parentalen Zellen wesentlich stärker haften, beispielsweise im Fall von Karzinomzellen, in einem geeigneten Medium kultiviert werden (HAT wird nicht benötigt, kann aber zugegeben werden, wenn es das Wachstum der nicht fusionierten Zellen abschwächt. Anschließend können die fusionierten Zellen behutsam entfernt und abgesaugt werden, während die unfusionierten Zellen fest an den Gewebekulturbedältern haftend wachsen. Wenn die nicht-dendritischen Zellen in Suspension wachsen, können sie im Gegensatz dazu nach der Kulturperiode behutsam abgesaugt werden, während die fusionierten Zellen lose an den Behältern haftend verbleiben. Durch die oben beschriebenen Verfahren erhaltene fusionierte Zellen bewahren typischerweise die phänotypischen Eigenschaften von DC. Beispielsweise exprimieren diese fusionierten Zellen T-Zellen stimulierende Moleküle, wie etwa MHC-Klasse-II-Protein, B7-1, B7-2, und für APC charakteristische Adhäsionsmoleküle, wie etwa ICAM-1. Die fusionierten Zellen exprimieren auch weiterhin Zelloberflächenantigene der parentalen nicht-dendritischen Zellen und sind deshalb zum Induzieren von Immunität gegen die Zelloberflächenantigene verwendbar. Insbesondere wenn der nicht-dendritische Fusionspartner eine Tumorzelle ist, wird oft festgestellt, dass die Tumorigenität der fusionierten Zellen im Vergleich zu der parentalen Tumorzelle abgeschwächt wird.

[0051] In dem Fall, dass die fusionierten Zellen bestimmte DC-Eigenschaften verlieren, wie etwa die Expression der APC-spezifischen T-Zellen stimulierenden Moleküle, können sie (d. h. die primär fusio-

nierten Zellen) mit dendritischen Zellen refusioniert werden, um den DC-Phänotyp wiederherzustellen. Die refusionierten Zellen (d. h. die sekundär fusionierten Zellen) erweisen sich als hochpotente APC und weisen in einigen Fällen sogar eine geringere Tumorigenität auf als primär fusionierte Zellen. Die fusionierten Zellen können mit dendritischen Zellen oder nicht-dendritischen parentalen Zellen so oft wie gewünscht refusioniert werden.

[0052] Fusionierte Zellen, die MHC-Klasse-II-Protein, B7 oder andere gewünschte T-Zellen stimulierende Moleküle exprimieren, können auch durch Panning oder fluoreszenzaktivierte Zellsortierung mit Antikörpern gegen diese Moleküle selektiert werden.

[0053] Die fusionierten Zellen der Erfindung können verwendet werden, um das Immunsystem eines Säugtiers zur Behandlung oder Prophylaxe einer Krankheit zu stimulieren. Um beispielsweise einen Tumor (primär oder metastatisch) in einem Menschen zu behandeln, kann ihm eine Zusammensetzung, die fusionierte Zellen enthält, die von seinen eigenen DC und Tumorzellen gebildet werden, verabreicht werden, beispielsweise an einer Stelle nahe dem Lymphgewebe. Die Zusammensetzung kann mehrmals (beispielsweise drei- bis fünfmal) in einem geeigneten Intervall (beispielsweise alle zwei bis drei Wochen) und in geeigneter Dosierung (beispielsweise ungefähr 10^5 bis 10^8 , z. B. etwa $0,5 \times 10^6$ fusionierte Zellen pro Verabreichung) gegeben werden. Zur Prophylaxe (d. h. Impfung) gegen Krebs können nicht-syngene fusionierte Zellen, wie etwa jene, die aus syngen DC und allogenen oder xenogenen Krebszellen oder aus allogenen DC und Krebszellen gebildet werden, verabreicht werden. Um die Wirkung der Impfung zu überwachen, können zytotoxische T-Lymphozyten, die aus dem behandelten Individuum erhalten werden, in Zytotoxizitätstests auf ihre Potenz gegen Krebszellen getestet werden. Es können mehrere Steigerungen nötig sein, um die Potenz der zytotoxischen T-Lymphozyten zu erhöhen. Beispiel I unten demonstriert, dass Fusionszellen, die aus Tumorzellen und syngen DC gebildet werden, Tumoren in Tiermodellen vorbeugen und behandeln können. Beispiel III demonstriert darüber hinaus, dass solche Fusionszellen sogar anergisierte T-Zellen aktivieren können, die spezifisch für Tumorantigene sind.

[0054] Zellen, die mit einem intrazellulären Pathogen infiziert sind, können auch als nichtdendritische Fusionspartner zur Behandlung der durch das Pathogen verursachten Krankheit verwendet werden. Beispiele von Pathogenen schließen Viren (beispielsweise Humanes Immundefizienzvirus, Hepatitisvirus A, B oder C, Papillomavirus, Herpesvirus oder Marnervirus), Bakterien (beispielsweise Corynebacterium diphtheria, Bordetella pertussis) und intrazelluläre eukaryotische Parasiten (beispielsweise Plasmodi-

um spp., Schistosoma spp., Leishmania spp., Trypanosoma spp. oder Mycobacterium leprae) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Bei einer Therapie, die als durch einen Fachmann geeignet bestimmt wird, werden einem Individuum (beispielsweise einem Menschen) Zusammensetzungen, die die geeigneten fusionierten Zellen enthalten, verabreicht. Beispielsweise kann die Zusammensetzung mehrmals (beispielsweise drei- bis fünfmal) in einem geeigneten Intervall (beispielsweise alle zwei bis drei Wochen) und in geeigneter Dosierung (beispielsweise ungefähr 10^5 bis 10^8 und vorzugsweise etwa 10^7 fusionierte Zellen pro Verabreichung) gegeben werden.

[0055] Alternativ können nicht-dendritische Zellen, die mit einer oder mehreren Nukleinsäurekonstrukten transfiziert sind, die jeweils eines oder mehrere Krebsantigene oder Antigene aus einem Pathogen kodiert, als die nicht-dendritischen Partner bei der Fusion verwendet werden. Diese Antigene müssen nicht auf der Oberfläche der Krebszellen oder Pathogene exprimiert werden, solange die Antigene durch ein MHC-Klasse-I- oder -II-Molekül auf der fusionierten Zelle präsentiert wird. Von DC erzeugten fusionierte Zellen und diese transfizierten Zellen können sowohl zur Behandlung als auch zur Prophylaxe von Krebs oder einer durch das Pathogen verursachten Krankheit verwendet werden. Beispielsweise können Fusionszellen, die MUC1 exprimieren, verwendet werden, um Brustkrebs, Eierstockkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs und Myelom zu behandeln oder vorzubeugen, können Fusionszellen, die Fötoprotein exprimieren, verwendet werden, um Hepatom oder chronische Hepatitis zu behandeln oder vorzubeugen, wobei Fötoprotein häufig auf höheren Niveaus exprimiert wird, und können Fusionszellen, die prostataspezifisches Antigen exprimieren, verwendet werden, um Prostatakrebs zu behandeln.

[0056] Verfahren zum Transfizieren und Identifizieren von Antigenen sind im Fachgebiet wohlbekannt.

Verfahren zur Erzeugung von Effektorzellen CTL und HTL

[0057] Die Effektorzellen (CTL und HTL) der Erfindung können auf vielerlei Wegen erzeugt werden. Im Grunde werden Lymphozyten (die CTL- und HTL-Vorläuferzellen enthalten), beispielsweise in peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC), Milzzellen oder Lymphknotenzellen, mit einer Zusammensetzung in Kontakt gebracht, die irgendeine der beschriebenen Zellen der Erfindung enthält. Die Kontaktierung kann in vivo (beispielsweise durch Injektion der fusionierten Zellen in den Patienten), in vitro (beispielsweise durch Kultivieren der Zellen, die Lymphozyten enthalten, mit den fusionierten Zellen) oder durch eine Kombination aus von In-vivo- und In-vitro-Methodik (beispielsweise durch In-vitro-Aktivie-

rung von Zellen aus einem Patienten, dem fusionierte Zellen injiziert wurden). Die durch die fusionierten Zellen zu aktivierenden Lymphozyten können „native“ T-Zellen sein (d. h. T-Zellen, die nicht, bevor sie mit den fusionierten Zellen in Kontakt gebracht werden, aktivierenden Antigenen ausgesetzt worden sind, die von den fusionierten Zellen exprimiert werden) oder können zuvor derart ausgesetzt worden sein. Beispielsweise werden die Lymphozyten, wenn die Lymphozyten in einem Patienten mit einem Tumor oder einer Infektionskrankheit vorhanden sind oder daraus stammen, vor der Exposition durch die fusionierten Zellen Antigenen ausgesetzt worden sein, die durch die Tumorzellen oder die infizierten Zellen im Patienten exprimiert werden.

[0058] Das Kontaktieren mit den fusionierten Zellen kann einmalig oder mehrmalig erfolgen, d. h. eine einzelne In-vitro-Exposition oder mehrere In-vitro-Expositionen, wahlweise nach einer oder mehreren In-vivo-Expositionen. Die fusionierten Zellen, die zum Erzeugen von Effektorzellen verwendet werden, können unbehandelt verwendet werden oder sie können mit einem Wirkstoff (beispielsweise ionisierende Strahlung oder ein Arzneimittel, wie etwa Mitomycin-C) vorbehandelt werden, der ihre Proliferationsfähigkeit außer Kraft setzt. Im Allgemeinen werden zur In-vitro-Aktivierung verwendete fusionierte Zellen mit solch einem Wirkstoff vorbehandelt worden sein. Das Kontaktieren kann mit oder ohne Zugabe einer exogenen Quelle irgendeines im Folgenden erläuterten Zytokins ausgeführt werden. Das Kontaktieren der Vorläuferzellen kann zur Aktivierung von CTL und/oder HTL führen. Das Testen der aktivierten Zellen auf CTL- und HTL-Aktivität kann unter Verwendung irgendeines im Folgenden beschriebenen Verfahrens ausgeführt werden.

[0059] Die meisten CTL sind durch MHC-Klasse-I-Moleküle beschränkte CD8⁺ T-Zellen und die Mehrzahl der HTL sind durch MHC-Klasse-II-Moleküle beschränkte CD4⁺ T-Zellen. Allerdings sind ebenso durch MHC-Klasse-II-Moleküle beschränkte CD4⁺ CTL und durch MHC-Klasse-I-Moleküle beschränkte CD8⁺ HTL beschrieben worden. Außerdem hat es auch Berichte über durch MHC-Klasse-II-Moleküle beschränkte CD4⁺ CTL und durch MHC-Klasse-I-Moleküle beschränkte CD4⁺ CTL gegeben. CD8⁺ CTL produzieren ebenfalls, obgleich auf niedrigerem Niveau als CD4⁺ Helfer-T-Zellen, eine breite Auswahl an Zytokinen. All diese Effektorzellpopulationen werden durch die Erfindung umfasst, vorausgesetzt, sie werden durch Kontaktieren der T-Lymphozyten mit den fusionierten Zellen der Erfindung erzeugt. Die CTL und die HTL der Erfindung können polyklonal oder monoklonal sein. Verfahren zum Klonieren von CTL und HTL sind im Fachgebiet bekannt.

Verfahren zum Screening von Peptidkandidaten auf Antigenaktivität

[0060] Die oben beschriebenen CTL und HTL („Effektorzellen“) können verwendet werden, um durch zahlreiche im Fachgebiet verwendete Verfahren Antigene zu identifizieren, die von nicht-dendritischen Zellpartnern der fusionierten Zellen exprimiert werden, die verwendet werden, um die Effektorzellen der Erfindung zu erzeugen. Kurz, die Effektorzellen enthaltende Zellpopulation wird zusammen mit einem Peptid- oder Polypeptidkandidaten und entweder einer geeigneten Zielzelle (wobei die Zytotoxizität getestet wird) oder einer Antigene präsentierenden Zelle (APC) (wobei die Zellproliferation oder Zytokinproduktion getestet wird) kultiviert und es wird die relevante Aktivität bestimmt. Ein Peptid, das Effektoraktivität induziert, wird ein antigenes Peptid sein, das von den Effektorzellen erkannt wird. Ein Polypeptid, das Effektoraktivität induziert, wird ein antigenes Polypeptid sein, von dem ein Peptidfragment von den Effektorzellen erkannt wird.

[0061] Die zytotoxische Aktivität kann durch eine Vielfalt von im Fachgebiet bekannten Verfahren getestet werden (beispielsweise der in den Beispielen I und III bis V beschriebene ^{51}Cr - oder Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzungstest. Die Zielzellen können irgendwelche einer Vielfalt von Zelltypen sein, beispielsweise Fibroblasten, Lymphozyten, durch Lektine (beispielsweise Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA) oder Lipopolysaccharid (LPS)) aktivierte Lymphozytenblasten, Makrophagen, Monozyten oder Tumorzelllinien. Die Zielzellen sollten nicht die auf Antigenaktivität zu testenden Antigenkandidaten exprimieren, obgleich sie sie rekombinant exprimieren könnten. Die Zielzellen sollten jedoch gemeinsam mit der CTL (in Abhängigkeit von der Restriktion des relevanten CU) wenigstens einen Typ von MHC-Klasse-I-Molekülen oder MHC-Klasse-II-Molekülen exprimieren. Die Zielzellen können endogen ein geeignetes MHC-Molekül exprimieren oder sie können transfizierte Polynukleotide exprimieren, die solche Moleküle kodieren. Die gewählte Zielzellpopulation kann vor dem Test mit dem Peptid- oder Polypeptidkandidaten gepulst werden oder der Peptid- oder Polypeptidkandidat kann zum Testgefäß, beispielsweise ein Mikrotiterplattenwell oder ein Kulturröhrchen, zusammen mit der CTL und den Zielzellen zugegeben werden. Alternativ können Zielzellen verwendet werden, die mit einem Expressionsvektor transfiziert oder transformiert sind, der eine Sequenz enthält, die den Peptid- oder Polypeptidkandidaten kodiert. Die CTL enthaltende Zellpopulation, die Zielzellen und der Peptid- oder Polypeptidkandidat werden zusammen etwa 4 bis etwa 24 Stunden lang kultiviert. Die Lyse der Zielzellen wird beispielsweise durch Freisetzung von ^{51}Cr oder von LDH aus den Zielzellen gemessen. Ein Peptid, das die Lyse der Zielzellen durch die CTL auslöst, ist ein an-

tigenes Peptid, das durch die CTL erkannt wird. Ein Polypeptid, das die Lyse der Zielzellen durch die CTL auslöst, ist ein antigenes Polypeptid, von dem ein Peptidfragment von der CTL erkannt wird.

[0062] Die Peptid- oder Polypeptidkandidaten können auf ihre Fähigkeit getestet werden, sowohl in CU als auch in HTL proliferative Reaktionen zu induzieren. Die Effektorzellen werden zusammen mit einem Peptid- oder Polypeptidkandidaten in der Gegenwart von APC kultiviert, die ein geeignetes MHC-Klasse-I- oder -Klasse-II-Molekül exprimieren. Solche APC können B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen oder insgesamt PBMC sein. APC können auch immortalisierte Zelllinien sein, die von B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen abstammen. Die APC können endogen ein geeignetes MEC-Molekül exprimieren oder sie können einen transfizierten Expressionsvektor exprimieren, der solch ein Molekül kodiert. In allen Fällen können die APC vor dem Test beispielsweise durch Behandlung mit ionisierender Strahlung oder mit Mitomycin-C nicht-proliferativ gemacht werden. Die Effektorzellen enthaltende Population wird mit und ohne Peptid- oder Polypeptidkandidaten kultiviert und die Proliferationsreaktionen der Zellen werden beispielsweise durch Einbau von $[^3\text{H}]$ -Thymidin in ihre DNA gemessen.

[0063] Als eine Alternative zum Messen der Proliferation kann die Zytokinproduktion durch die Effektorzellen mit dem Fachmann bekannten Verfahren gemessen werden. Die Zytokine schließen ohne Beschränkung Interleukin-2 (IL-2), IFN, IL-4, IL-5, TNF, Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-15 (IL-15) und transformierender Wachstumsfaktor (TGF) ein und die Tests zu deren Messung schließen ohne Beschränkung ELISA und Bioassays ein, bei denen auf die relevanten Zytokine ansprechende Zellen auf Ansprechverhalten (beispielsweise Proliferation) in der Gegenwart einer Testprobe. Alternativ kann die Zytokinproduktion durch die Effektorzellen direkt durch intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie visualisiert werden.

[0064] Die Wahl von auf Antigenität zu testenden Peptid- und Polypeptidkandidaten wird von den nicht-dendritischen Zellen abhängen, die verwendet wurden, um die fusionierten Zellen herzustellen. Wenn die nicht-dendritischen Zellen Tumorzellen sind, werden die Polypeptidkandidaten jene sein, die von den relevanten Tumorzellen exprimiert werden. Sie werden vorzugsweise jene sein, die mit signifikant höherem Pegel in den Tumorzellen als im normalen Zelläquivalent der Tumorzellen exprimiert werden. Peptidkandidaten werden Fragmente solcher Polypeptide sein. Somit könnten beispielsweise die Polypeptidkandidaten für Melanomzellen Tyrosinase oder ein Element der MART-Molekülfamilie, für Dick-

darmkrebs karzinoembryonisches Antigen, für Prostatakrebs prostataspezifisches Antigen, für Brust- oder Eierstockkrebs HER2/neu, für Eierstockkrebs CA-125 oder für die meisten Karzinome Mucin-1 (MUC-1) sein.

[0065] Wenn demgegenüber die nicht-dendritischen Zellen, die verwendet werden, um die fusionierten Zellen zu erzeugen, infizierte Zellen oder Zellen sind, die genetisch verändert sind, so dass sie ein von einem Pathogen abgeleitetes Polypeptid exprimieren, wird der Polypeptidkandidat ein solcher sein, der von den geeigneten infektiösen Mikroorganismen exprimiert wird bzw. der von den transfizierten Zellen exprimiert wird. Beispiele solcher Polypeptide schließen retrovirale (beispielsweise HIV oder HTLV) Membranglykoproteine (beispielsweise gp160) oder Gag-Proteine, Influenzavirusneuraminidase oder Hemagglutinin, Proteine von *Mycobacterium tuberculosis* oder *leprae* oder Proteine von Protozoen (beispielsweise *Plasmodium* oder *Trypanosoma*). Die Polypeptide können auch aus anderen hierin aufgelisteten Mikroorganismen stammen. Die zu testenden Peptide können beispielsweise eine Reihe von Peptiden sein, die verschiedene Segmente eines Polypeptids von Interesse mit voller Länge sind, beispielsweise Peptide mit überlappenden Sequenzen, die aneinandergereiht die gesamte Sequenz abdecken. Die zu testenden Peptide können jede Länge aufweisen. Beim Testen von durch MHC Klasse I beschränkten Reaktionen von Effektorzellen werden sie vorzugsweise eine Länge von 7 bis 20 (beispielsweise 8 bis 12) Aminosäuren aufweisen. Demgegenüber werde die Peptide bei durch MHC Klasse II beschränkte Antworten vorzugsweise 10 bis 30 (beispielsweise 12 bis 25) Aminosäuren lang sein.

[0066] Alternativ kann eine zufällige Bibliothek von Peptiden getestet werden. Durch Vergleichen der Sequenzen jener auslösenden positiven Reaktionen in den geeigneten Effektorzellen mit einer Proteinsequenzdatenbank können Polypeptide identifiziert werden, die die Peptidsequenz umfassen. Relevante Polypeptide oder die identifizierten Peptide selbst würden Therapeutika- oder Impfstoffkandidaten für entsprechende Krankheiten sein (siehe unten).

[0067] Die Polypeptide und Peptide können durch eine Vielfalt von im Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden. Kleinere Peptide (kleiner als 50 Aminosäuren lang) können in geeigneter Weise durch chemische Standardverfahren synthetisiert werden. Zudem können sowohl Polypeptide als auch Peptide durch In-vitro-Standardtechniken mit rekombinanter DNA und genetische In-vivo-Rekombination (beispielsweise Transgenese) unter Verwendung von Nukleotidsequenzen hergestellt werden, die die entsprechenden Polypeptide oder Peptide kodieren. Dem Fachmann wohlbekannte Verfahren können verwendet werden, um Expressionsvektoren zu kon-

struieren, die relevante kodierende Sequenzen und geeignete Transkriptions-/Translationssteuersignale enthalten. Siehe beispielsweise die bei Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989) und Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates und Wiley Interscience, N. Y., 1989) beschriebenen Techniken.

[0068] Um die Peptide und Polypeptide zu exprimieren, kann eine Vielfalt von Wirt-Expressionsvektor-Systemen verwendet werden. Solche Wirt-Expressionsvektor-Systeme repräsentieren Vehikel, durch welche die Polypeptide von Interesse produziert und anschließend gereinigt werden können, aber repräsentieren auch Zellen, die das relevante Peptid oder Polypeptid in situ produzieren, wenn sie mit den entsprechenden kodierenden Nukleotidsequenzen transformiert oder transfiziert sind. Diese umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Mikroorganismen wie etwa Bakterien, beispielsweise *E. coli* oder *B. subtilis*, transformiert mit rekombinanter Bakteriophagen-DNA, Plasmid- oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren, die Peptide oder Polypeptide kodierende Sequenzen enthalten, Hefe, beispielsweise *Saccharomyces* oder *Pichia*, transformiert mit rekombinanten Hefe-Expressionsvektoren, die die entsprechenden kodierenden Sequenzen enthalten, Inselzellsysteme, die mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren infiziert sind, beispielsweise Baculovirus, Pflanzenzellsysteme, die mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren infiziert sind, beispielsweise Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV) oder Tabak-Mosaikvirus (TMV), oder mit rekombinanten Plasmid-Expressionsvektoren transformiert sind, beispielsweise Ti-Plasmide, die die entsprechenden kodierenden Sequenzen enthalten, oder Säugetierzellsysteme, beispielsweise COS, CHO, BHK, 293 oder 3T3, die rekombinante Expressionskonstrukte beherbergen, die Promotoren enthalten, die vom Genom von Säugetierzellen, beispielsweise der Metallothioneinpromotor, oder von Säugetierviren abgeleitet sind, beispielsweise der späte Adenoviruspromotor oder der Vacciniavirus-7.5K-Promotor.

[0069] Peptide der Erfindung schließen jene oben beschriebenen ein, die aber zur In-vivo-Verwendung durch die Anfügung eines Blockierungsmittels an einem oder an beiden der amino- und carboxylterminalen Enden modifiziert sind, um das Überleben des relevanten Peptids in vivo zu fördern. Dies kann für jene Situationen sinnvoll sein, bei denen die Peptidtermini dazu neigen, vor der zellularen oder mitochondrialen Aufnahme durch Proteasen abgebaut zu werden. Solche Blockierungsmittel können ohne Beschränkung zusätzliche verwandte oder nicht verwandte Peptidsequenzen einschließen, die an den amino- und/oder carboxylterminalen Resten des zu verabreichenden Peptids angefügt werden können. Dies kann entweder chemisch während der Synthese

des Peptids oder durch rekombinante DNA-Technologie durch dem Durchschnittsfachmann vertraute Verfahren vorgenommen werden. Alternativ können im Fachgebiet bekannte Blockierungsmittel, wie etwa Pyroglutaminsäure oder andere Moleküle, an den amino- und/oder carboxylterminalen Resten angefügt werden oder die Aminogruppe am Aminotermminus oder die Carboxylgruppe am Carboxylterminus können durch einen anderen Rest ersetzt werden. Gleicherweise können die Peptide vor der Verabreichung kovalent oder nicht-kovalent an pharmazeutisch verträgliche „Träger“-Proteine gebunden werden.

[0070] Ebenso sind peptidmimetische Verbindungen von Interesse, die auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen der Peptide oder Polypeptide entworfen werden. Peptidmimetische Verbindungen sind synthetische Verbindungen, die eine dreidimensionale Konformation (d. h. ein „Peptidmotiv“) aufweisen, die im Wesentlichen gleich der dreidimensionalen Konformation eines ausgewählten Peptids ist. Das Peptidmotiv versieht die peptidmimetische Verbindung mit der Fähigkeit, T-Zellen auf eine Art und Weise zu aktivieren, die qualitativ identisch zu der des Peptids oder Polypeptids ist, von dem das Peptidmimetikum abgeleitet wurde. Peptidmimetische Verbindungen können zusätzliche Eigenschaften aufweisen, die ihre therapeutische Brauchbarkeit erhöhen, wie etwa gesteigerte Zellpermeabilität und längere biologische Halbwertszeit.

[0071] Die Peptidmimetika besitzen typischerweise ein Rückgrat, das teilweise oder vollständig nicht-peptidisch ist, aber mit Seitengruppen, die identisch zu den Seitengruppen der Aminosäurereste sind, die in dem Peptid auftreten, auf dem das Peptidmimetikum beruht. Im Fachgebiet sind mehrere chemische Bindungen bekannt, beispielsweise Ester-, Thioester-, Thioamid-, reduzierte Carbonyl-, Dimethylen- und Ketomethylenbindungen, die im Allgemeinen sinnvolle Substituenten bei der Konstruktion von proteaseresistenten Peptidmimetika sind.

Verfahren zur Verwendung der Effektorzellen, Polypeptide und Peptide der Erfindung

[0072] Die Effektorzellen (CTL und HTL), Polypeptide und Peptide der Erfindung können bei Grundlagenforschungsstudien der Tumor- und Infektionsimmunologie verwendet werden. Sie können beispielsweise bei Studien verwendet werden, um die Mechanismen der Antigenverarbeitung, Antigenpräsentation, Antigenerkennung, Signaltransduktion in CTL und HTL und HTL-CTL-Interaktionen weiter aufzuklären. Zusätzlich zu anderen Verwendungen können sie als positive oder negative Kontrollen in entsprechenden Tests verwendet werden. Sie könnten auch zur Diagnose verwendet werden. Beispielsweise wäre die Fähigkeit von T-Zellen aus einem Testsub-

jekt, auf ein Polypeptid oder Peptid der Erfindung zu reagieren, ein Anzeichen, dass das Testsubjekt eine Krankheit hat, die mit der Expression des relevanten Peptids oder Polypeptids verbunden ist, oder dafür anfällig ist. Die CTL und HTL der Erfindung wären nützliche „positive Kontrollen“ für einen entsprechenden diagnostischen Test. Darüber hinaus können die Effektorzellen, die Polypeptide und die Peptide bei Therapie- und Impfverfahren verwendet werden. Diese Verfahren der Erfindung fallen in 2 grundlegende Klassen, d. h. jene, die In-vivo-Ansätze verwenden, und jene, die Ex-vivo-Ansätze verwenden.

In-vivo-Ansätze

[0073] Bei einem In-vivo-Ansatz kann einem Patienten durch irgendeinen der oben aufgelisteten Wege ein Polypeptid, ein Peptid oder ein Peptidmimetikum verabreicht werden. Es wird bevorzugt direkt einem geeigneten Lymphgewebe (beispielsweise Milz, Lymphknoten oder schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe (MALT)) zugeführt. Der Patient kann irgendeine der hierin offenbarten Krankheiten haben oder dafür anfällig sein, diese zu haben. Die im Patienten durch Verabreichen des Polypeptids, des Peptids oder des Peptidmimetikums erzeugte Immunantwort kann die Symptome der Krankheit entweder vollständig aufheben oder mindern. Alternativ kann das Polypeptid, das Peptid oder das Peptidmimetikum dem Patienten als eine Impfung verabreicht werden, d. h. mit dem Ziel, eine relevante Krankheit zu verhindern oder deren Beginn hinauszuzögern.

[0074] Die erforderliche Dosierung hängt von der Wahl des Polypeptids, Peptids oder Peptidmimetikums, dem Weg der Verabreichung, der Natur der Formulierung, der Natur der Krankheit des Patienten und der Beurteilung des behandelnden Arztes ab. Geeignete Dosierungen liegen im Bereich von 0,1 bis 100,0 g/kg. Hinsichtlich der Variation der erhältlichen Polypeptide, Peptide oder Peptidmimetika der Erfindung und der sich unterscheidenden Wirkungen der verschiedenen Wege der Verabreichung werden breite Variationen der benötigten Dosierung zu erwarten sein. Beispielsweise würde erwartet werden, dass bei oraler Verabreichung höhere Dosierungen erforderlich sind als bei intravenöser Injektion. Unter Verwendung von empirischen Standardprozeduren zur Optimierung, wie sie im Fachgebiet wohlverstanden sind, können diese Dosierungspegel eingestellt werden.

Ex-vivo-Ansätze

[0075] Bei einem Ex-vivo-Ansatz können einem Patienten, der irgendeine der hierin beschriebenen Krankheiten hat oder dafür anfällig ist, Populationen von Zellen verabreicht werden, die Effektorzellen (CTL und/oder HTL), die wie oben beschrieben unter Verwendung der fusionierten Zellen der Erfindung er-

zeugt wurden) enthalten. Die Lymphzellen, die verwendet werden, um die Effektorzellen zu erzeugen, können aus dem Patienten oder einem zweiten Patienten, vorzugsweise der gleichen Art, noch besser mit keiner oder einer einzigen MHC-Lokus-Inkompatibilität (Klasse I oder Klasse II) mit dem ersten Patienten, erhalten worden sein. Beispielsweise hat sich bei Donorlymphozyteninfusion (DLI), bei der allogene Zellen (beispielsweise PBMC), die T-Lymphozyten enthalten, in einen Patienten infundiert werden, gezeigt, dass sie bei einer Vielfalt von Karzinomen die Tumorbelastrung vermindert oder sogar zu einer vollständigen Remission führt. Die therapeutische Aktivität wird der Graft-versus-Tumor-Aktivität von durch MHC- und/oder Nicht-MHC-Alloantigene des Empfängers aktivierten Donor-T-Zellen zugeschrieben. Die Effektorfunktion der für DLI verwendeten Zellen kann dadurch erhöht werden, dass sie vor der Infusion in den Empfänger (einfach oder mehrfach) (beispielsweise in vitro) geeigneten fusionierten Zellen der Erfindung ausgesetzt werden. Vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise, werden die fusionierten Zellen aus den dendritischen Zellen und nicht-dendritischen Zellen aus dem Empfänger erzeugt worden sein. Die DLI wird üblicherweise, aber nicht notwendigerweise, nach einer nicht-myeloablativen Knochenmarktransplantation durchgeführt. Die Technologie der DLI und der nicht-myeloablativen Knochenmarktransplantation sind im Fachgebiet bekannt.

[0076] Bei einem zweiten Ex-vivo-Ansatz werden aus dem Patienten und einem anderen Patienten Lymphzellen isoliert und (beispielsweise in vitro) einem Polypeptid oder Peptid ausgesetzt, das durch das Verfahren der Erfindung in der Gegenwart geeigneter APC identifiziert wurde. Die Lymphzellen können einmal oder mehrmals (beispielsweise 2-, 3-, 4-, 6-, 8- oder 10-mal) exponiert werden. Die Fähigkeit der stimulierten Lymphzellen zur Zytolyse, zur Proliferation oder zur Produktion von Zytokinen kann nach einer oder mehreren Expositionen überwacht werden. Wenn einmal der gewünschte Pegel an Effektoraktivität erreicht worden ist, können die Zellen dem Patienten über irgendeines der hierin aufgelisteten Wege zugeführt werden. Natürlich könnten die für die DLI (siehe oben) verwendeten Zellen, anstelle durch die fusionierten Zellen der Erfindung aktiviert zu werden, durch die Peptide oder Polypeptide wie oben beschrieben aktiviert werden.

[0077] Die Verfahren, um zu testen, ob ein Peptid oder Polypeptid therapeutisch für eine bestimmte Krankheit ist oder dagegen prophylaktisch ist, sind im Fachgebiet bekannt. Wenn ein therapeutischer Effekt getestet wird, wird eine Testpopulation, die die Symptome der Krankheit zeigen (beispielsweise Krebspatienten oder Versuchstiere mit Krebs), unter Verwendung irgendeiner der oben beschriebenen Strategien mit einer Test-Effektorzellen enthaltenden Zellpopulation, einem Peptid oder Polypeptid behandelt.

Eine Kontrollpopulation, die ebenfalls Symptome dieser Krankheit zeigt, wird unter Verwendung der gleichen Methodologie mit einem Placebo behandelt.

[0078] Das Verschwinden oder eine Abnahme der Krankheitssymptome bei den Testsubjekten würde anzeigen, dass das Polypeptid oder Peptid ein effektiver therapeutischer Wirkstoff wäre.

[0079] Durch Anwenden der gleichen Strategien auf Patienten vor dem Ausbruch der Krankheitssymptome (beispielsweise menschliche oder experimentelle Subjekte mit einer genetischen Prädisposition für die Krankheit) können Effektorzellen enthaltende Zellpopulationen, Polypeptide oder Peptide der Erfindung auf Wirksamkeit beim Induzieren von Immunantworten oder als prophylaktische Wirkstoffe, d. h. Impfstoffe, getestet werden. In diesem Fall wird die Verhinderung oder Verzögerung des Ausbruchs der Krankheitssymptome getestet. Alternativ können die Pegel der in den experimentellen Trockenkontrollgruppen induzierten Immunantworten verglichen werden.

[0080] Die folgenden Beispiele sind zur Veranschaulichung gedacht, aber nicht dazu, die Erfindung einzuschränken.

Beispiel I: Fusion von dendritischen und nicht-dendritischen Mauszellen

Materialien und Methoden:

Zellkultur und Fusion

[0081] Murine (C57BL/6) MC38-Adenokarzinomzellen wurden stabil mit der DF3/MUC1-cDNA transfiziert, um die MC38/MUC1-Zelllinie zu erzeugen (Siddiqui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2320–2323, 1988; Akagi et al., J. Immunother. 20: 38–47, 1997). MC3S, MC38/MUC1 und syngene MB49-Blasenkrebszellen wurden in mit 10% hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum („FCS“), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin ergänztem DMEM gehalten.

[0082] Unter Verwendung eines bei Inaba et al. (J. Exp. Med. 176: 1693–1702, 1992) beschriebenen Verfahrens mit Modifikationen wurden aus Knochenmarkkultur DC erhalten. Kurz, Knochenmark wurde aus langen Knochen gespült und rote Zellen wurden mit Ammoniumchlorid lysiert. Lymphozyten, Granulozyten und Ia⁺-Zellen wurden aus den Knochenmarkzellen durch Inkubieren mit den folgenden monoklonalen Antikörpern („mAb“) abgereichert und dann komplementiert:

- (1) 2.43, Anti-CD8 [TIB 210; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD];
- (2) GK1.5, Anti-CD4 (TIB 207, ATCC);
- (3) RA3-3A1/6.1, Anti-B229/CD45R (TIB 146,

ATCC);

(4) B21-2, Anti-1a (TIB 229, ATCC); und

(5) RB6-8C5, Anti-Gr-1 (Pharmingen, San Diego, CA);

[0083] Die unlysierten Zellen wurden in 6-Well-Kulturplatten in RPMI-1640-Medium ausplattiert, das mit 5% hitze-inaktiviertem FCS, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 1 mM HEPES (pH 7,4) 2 mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 500 U/ml rekombinantem murinem GM-CSF (Boehringer Mannheim, Indiana) ergänzt war. Am Tag 7 der Kultur wurden nicht haftende und lose haftende Zellen gesammelt und in 100 mm Petrischalen (10^6 Zellen/ml; 8 ml/Schale) replattiert. Die nicht haftenden Zellen wurden nach 30 min Inkubation gewaschen und zu den haftenden Zellen wurde GM-CSF enthaltendes RPMI-Medium gegeben. Nach 18 Stunden in Kultur wurden die nicht haftende Zellpopulation zur Fusion mit MC38IMTJCI-Zellen oder MC38 entfernt.

[0084] Die Fusion wurde durch Inkubieren der Zellen mit 50% PEG in Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung („PBS“) ohne Ca^{2+} oder Mg^{2+} bei pH 7,4 ausgeführt. Das Verhältnis von DC zu Tumorzellen bei der Fusion betrug 15:1 bis 20:1. Nach der Fusion wurden die Zellen 10 bis 14 Tage lang in 24-Well-Kulturplatten in einem HAT (Sigma) enthaltendem Medium ausplattiert. Weil die MC38-Zellen nicht sehr sensitiv auf HAT sind, wurde HAT eher verwendet, um die Proliferation von MC38/MUC1- und MC38-Zellen zu verlangsamen, als sie zu töten. Die MC38/MUC1- und MC38-Zellen wachsen fest am Gewebekulturkolben haftend, während die fusionierten Zellen durch behutsames Pipettieren entfernt wurden.

Durchflusszytometrie

[0085] Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 30 min lang auf Eis mit mAb DF3 (Anti-MUC1), mAb Mi/42/3.9.8 (Anti-MHC Klasse I), mAb M5/114 (Anti-MHC Klasse II), mAb 16-10A1 (Anti-B7-1), mAb GL1 (Anti-B7-2) und mAb 3E² (anti-ICAM-1) inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde weitere 30 Minuten mit Fluoresceinisothiocyanat („FITC“) konjugiertes Anti-Hamster-, -Ratten- und -Maus-IgG auf Eis zugegeben. Die Proben wurden dann gewaschen, fixiert und durch FACSCAN (Becton Dickinson, Mount View, CA) analysiert.

Zytotoxische T-Zell-Aktivität

[0086] Die zytotoxische T-Zell-Aktivität („CTL“-Aktivität) wurde durch die Freisetzung von Lactatdehydrogenase („LDH“) bestimmt (CytoTox, Promega, Madison, WI).

Gemischte Leukozytenreaktionen

[0087] Die DC-, MC38/MUC1- und FC/MUC1-Zellen wurden ionisierender Strahlung (30 Gy) ausgesetzt und 5 Tage lang in flachbodigen 96-Well-Kulturplatten zu 1×10^5 syngen oder allogenen T-Zellen gegeben. Die T-Zellen wurden durch Passieren von Milzsuspensionen durch Nylonwolle, um restliche APC zu entfernen, hergestellt und 90 min lang in 100 mm Gewebekulturschalen ausplattiert. Die [³H]-Thymidinaufnahme in nicht haftenden Zellen wurde 6 Stunden nach einem Impuls von 1 µCi/Well (GBq/mmol; Du Pont-New England Nuclear, Wilmington, DE) gemessen. Jede Reaktion wurde dreifach ausgeführt.

In-vivo-Abreicherung von Immunzellmengen

[0088] Mäusen wurde 4 Tage vor der ersten von zwei Immunisierungen mit FC/MUC1 über 4 Tage vor Provokation mit MC38/MUC1-Zellen jeden Tag sowohl intravenös als auch intraperitoneal mAb GK1.5 (Anti-CD4), mAb 2.43 (Anti-CD8) oder Ratten-IgG 4 injiziert. Die Splenozyten wurden zur Durchflusszytometrie und Analyse der CTL-Aktivität geerntet.

Ergebnisse:

[0089] Murine MC38-Adenokarzinomzellen wurden an aus Knochenmark stammende DC fusioniert. Um erfolgreiche Fusionen zu demonstrieren, wurden zuerst MC38-Zellen verwendet, die satbil die das DF3/MUC1 tumorassoziierte Antigen exprimieren (Siddiqui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5132–5136, 1978). Die Fusionszellen (FC/MUC1) exprimierten DF3/MUC1 sowie MHC Klasse I und II, B7-1, B7-2 und ICAM-1.

[0090] Darüber hinaus zeigten die meisten der Fusionszellen eine DC-Morphologie mit verdeckten Prozessen und Dendriten. Die Fusionen von MC38-Zellen mit den DC (FC/MC38) führten zu ähnlichen Mustern der Zelloberflächenantigen-Expression mit Ausnahme von nicht feststellbarem DF3/MUC1-Antigen. Die Injektion von MC38/MUC1-Zellen in Mäuse führte zur Bildung von subkutanen Tumoren. Ähnliche Befunde wurden mit MC38/MUC1-Zellen erhalten, die mit DC gemischt waren, oder nach Mischung von MC38 mit DC.

[0091] Allerdings zeigte der Befund, dass sich in Mäusen, denen FC/MUC1 injiziert wurde, keine Tumoren bildeten, dass die Fusionszellen nicht krebserregend sind.

[0092] Die dendritischen Zellen sind potente Stimulatoren für primäre MLR (Steinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5132–5136, 1978; van Voorhis et al., J. Exp. Med. 158: 174–191, 1983) und induzieren in vitro die Proliferation von allogenen

CD8⁺-T-Zellen (Inaba et al., J. Exp. Med. 166: 182–194, 1987; Young et al., J. Exp. Med. 171: 1315–1332, 1990). Um die Funktion von FC/MUC1-Zellen teilweise zu charakterisieren, wurde ihre Wirkung in allogenen MLR mit der Wirkung von CD und MC38/MUC1-Zellen verglichen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass FC/MUC1-Zellen, wie DC, eine stimulierende Funktion in allogenen MLR zeigen. Im Gegensatz dazu hatten MC38/MUC1-Zellen geringe Wirkung auf die T-Zell-Proliferation.

[0093] Um die In-vivo-Funktion zu beurteilen, wurden Mäuse zweimal mit FC/MUC1-Zellen immunisiert. Tumoren entwickelten sich in Mäusen, die zweimal mit 10^6 bestrahlten MC38/MUC1-Zellen immunisiert und anschließend mit MC38/MUC1-Zellen provoziert wurden (Tab. 1). Im Gegensatz dazu blieben nach Immunisierung mit $2,5 \times 10^5$ FC/MUC1-Zellen alle Tiere nach Provokation mit MC38/MUC1-Zellen tumorfrei (Tab. 1). Mit DC alleine oder mit PBS immunisierte und dann subkutan mit $2,5 \times 10^5$ MC38- oder MC38/MUC1-Zellen provozierte Tiere zeigten innerhalb von 10 bis 20 Tagen Tumorstadium.

[0094] Darüber hinaus hatte die Immunisierung mit FC/MUC1 oder FC/MC3S keine feststellbare Wirkung auf das Wachstum von verschiedenen syngenen MB49-Blasenkarzinomen (Tab. 1). CTL von mit FC/MUC1-Zellen immunisierten Mäusen induzierten die Lyse von MC38/MUC1-, aber nicht von MB49-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten CTL von mit DC oder PBS immunisierten Mäusen keine feststellbare Lyse der MC38/MUC1-Ziele.

[0095] Um die für Antitumoraktivität verantwortlichen Effektorzellen weiter zu definieren, wurden Mäusen vor und nach Immunisierung mit FC/MUC1 intraperitoneal Antikörper gegen CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen injiziert. Die Abreicherung der entsprechenden Population um 80 bis 90% wurde durch Durchflusszytometrieanalyse von Splenozyten bestätigt. Der Befund, dass die Injektion von Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörpern die Tumorzinsidenz erhöhte, zeigt an, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen zur Antitumoraktivität beitragen ([Fig. 2C](#)).

[0096] Darüber hinaus war die Abreicherung von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen mit verminderter Lyse von MC38/MUC1-Zellen in vitro verbunden ([Fig. 2D](#)).

[0097] Um zu bestimmen, ob die Immunisierung mit FC/MUC1-Zellen zur Verhinderung von Dissemination wirksam ist, wurde ein Modell von MC38/MUC1 pulmonalen Metastasen verwendet. Die intravenöse oder subkutane Immunisierung mit FC/MUC1 schützte vollständig gegen intravenöse Provokation mit MC38/MUC1-Zellen. Im Gegensatz dazu entwickelten alle nicht immunisierten Mäuse, die gleichermaßen mit MC38/MUC1-Zellen provoziert wurden, über 250 pulmonale Metastasen.

[0098] Bei einem Behandlungsmodell wurden MC38/MUC1 pulmonale Metastasen 4 Tage vor der Immunisierung mit FC/MUC1 gebildet. Während mit Vehikeln behandelte Kontrollmäuse über 250 Metastasen bildeten, hatten 9 von 10 mit FC/MUC1 behandelte Mäuse keine feststellbaren Metastasen und eine Maus hatte weniger als 10 Knoten. Mit FC/MC3S-Zellen behandelte Mäuse hatten keine feststellbaren MC38 pulmonalen Metastasen. Diese Befunde zeigen an, dass die FC/MUC1-Immunisierung sowohl für Verhinderung als auch die Behandlung von Metastasierung verwendet werden kann.

Beispiel II: Fusion von menschlichen DC und Myelomzellen

Materialien und Methoden:

[0099] Durch Leukophorese erhaltene Leukozyten in Buffy Coats (oder Leukopacks) wurden durch Zentrifugieren in Ficoll fraktioniert. Die mononukleare (periphere Blut-) Zellen enthaltende Fraktion wurde 30 min lang bei 37°C in einem Kolben, der mit 10% fötalem Kälberserum („FCS“) ergänztes RPMI 1640 enthielt, inkubiert. Nicht haftende Zellen, von denen einige dendritische Zellen waren, wurden behutsam von den haftenden Zellen abgetrennt, die behalten wurden. Um die DC in der nicht haftenden Population zu sammeln, wurden die nicht haftenden Zellen 30 min bis 1 h lang in mit 20% FCS ergänztem RPMI 1640 inkubiert, wonach schwimmende Zellen entfernt und verworfen wurden. Beide Proben der haftenden Zellen wurden dann 2 bis 3 Tage lang in mit 20% FCS ergänztem RPMI 1640 inkubiert, so dass die Ablösung der lose haftenden Zellen (DC) ermöglicht wird. Diese lose haftenden Zellen wurden entfernt und behalten. Die verbleibenden haftenden Zellen, die immer noch einen relativ geringen Anteil von lose haftenden DC enthielten, wurden über Nacht in mit 10% fötalem Kälberserum ergänztem RPMI 1640 inkubiert, um die Ablösung der lose haftenden Zellen zu ermöglichen. Diese wurden von den verbleibenden haftenden Zellen abgetrennt. Die zwei Proben der lose haftenden DC wurden dann vereinigt und 5 bis 6 Tage lang in GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (100 U/ml) enthaltendem Medium bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ml kultiviert. Die aus diesen Kulturen geborgenen Zellen waren die bei den Fusionsexperimenten verwendeten DC.

[0100] Auch aus Knochenmark-Stammzellkulturen wurden DC erhalten. Kurz, Stammzellen wurden in einen Kolben gegeben, der mit 10% FCS ergänztes RPMI 1640 enthielt. Nach 30 min langer Inkubation bei 37°C wurden nicht haftende Zellen weggewaschen. Zu den verbleibenden haftenden Zellen wurde frisches RPMI 1640 gegeben, das mit 10% FCS ergänzt war. Nach Inkubieren über Nacht wurden lose haftende Zellen gesammelt und 5 bis 6 Tage in RPMI 1640/10% FCS Medium, enthaltend GM-CSF (1000

U/ml) und IL-4 (100 U/ml), inkubiert. Die sich ergebenden Zellen waren DC, die zur Verwendung bei der Fusion bereit waren.

[0101] Die Zellfusion wurde zwischen DC und humanen Myelomzellen MY5 ausgeführt, so dass fusionierte Zellen DC/MY5 hergestellt wurden. Nach der Fusion wurden die Zellen 10 bis 14 Tage lang in HAT-Selektionsmedium gegeben. Zur Kultur wurde IL-6 mit 20 bis 50 ng/ml zugegeben, um das Überleben der DC/MY5-Zellen zu fördern. Die Prozeduren zur Fusion waren im Wesentlichen die gleichen wie die beim obigen Beispiel I beschriebenen, mit der Ausnahme, dass die fusionierten Zellen von den unfusionierten Zellen auf der Grundlage des von den fusionierten Zellen gezeigten höheren Grads an Oberflächenhaftung abgetrennt werden.

Ergebnisse:

[0102] Wie durch Durchflusszytometrie gezeigt wurde, behielten die DC/MY5-Zellen die phänotypischen Eigenschaften der Parentalzellen: DC/MY5 wurden durch mAb positiv auf HLA-DR, CD38 (ein Myelomzellenoberflächenmarker), DF3 (ein Tumorzellenoberflächenmarker), CD38 (ein DC-Zelloberflächenmarker), B7-1 und B7-2 angefärbt. Gemischte Tests für die Lymphozytenreaktion (MLR) demonstrierten, dass diese fusionierten Zellen auch potente Stimulatoren für T-Zellen waren.

Beispiel III: Umkehrung der Toleranz für humanes MUC1-Antigen in mit fusionierten Zellen immunisierten MUC1 transgenen Mäusen

Materialien und Methoden:

MUC1 transgene Mäuse

[0103] Ein für humanes MUC1 transgener C57B1/6-Mausstamm wurde wie von Rowse et al. (Cancer Res. 58: 315–321, 1998) beschrieben gebildet. Um die Gegenwart der MUC1-Sequenzen zu bestätigen, wurden 500 ng an Schweif-DNA durch PCR unter Verwendung von MUC1-Primern entsprechend den Nukleotiden 745 bis 765 bzw. den Nukleotiden 1086 bis 1065 amplifiziert.

Zellkultur und Fusion

[0104] Murine (C57B1/6) MC38- und MB49-Karzinomzellen wurden stabil mit einer MUC1-cDNA transfiziert (Siddiqui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2320–2323, 1988; Akagi et al., J. Immunotherapy 20: 38–47, 1997; Chen et al., J. Immunol. 159: 351–359, 1997). Die Zellen wurden in mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin ergänztem DMEM gehalten. DC wurden aus Knochenmarkkultur erhalten und wie oben bei Beispiel I beschrieben mit den

Karzinomzellen fusioniert.

In-vitro-T-Zell-Proliferation

[0105] Einzelne Zellpräparate von Milz und Lymphknoten wurden in RPMI-Medium suspendiert, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 50 M 2-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin ergänzt war. Die Zellen wurden mit 5 U/ml gereinigtem MUC1-Antigen stimuliert (Sekine et al., J. Immunol. 135: 3610–3616, 1985). Nach 1, 3 und 5 Tagen der Kultur wurden die Zellen 12 Stunden lang mit 1 µCi [³H]-Thymidin pro Well gepulst und mit einem halbautomatischen Zellerntegerät auf Filtern gesammelt. Die Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillation quantifiziert.

Erzeugung von CD8⁺-T-Zelllinien

[0106] Lymphknotenzellen („LNC“) wurden in komplettem RPMI-Medium suspendiert, das 5 U/ml MUC1-Antigen enthielt. Nach 5 Tagen der Kultur wurden 10 U/ml IL-2 hinzugefügt. An den Tagen 10 und 15 wurden die Zellen erneut mit 5 U/ml MUC1-Antigen und mit 1:5 bestrahlten (30 Gy) Milzzellen als APC stimuliert. Nach Entfernen der toten Zellen durch Ficoll-Zentrifugieren und Abreichern der restlichen APC durch Passieren durch Nylonwolle wurden die T-Zellkulturen analysiert. Die T-Zellen wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD3e (145-2C11), CD4 (H129,19), CD8 (53-6.7), αβTcR (H57-597) and γδTcR (UC7-13D5) (PharMingen) angefärbt. Nach 1 h langer Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen, fixiert und durch FACSCAN (Becton-Dickinson) analysiert.

Zytotoxizitätstests

[0107] Die In-vitro-Zytotoxizität wurde in einem ⁵¹Cr-Freisetzungsstandardtest gemessen. Kurz, die Zellen wurden 60 min lang bei 37°C mit ⁵¹Cr markiert und dann gewaschen, um nicht inkorporiertes Isotop zu entfernen. Die Zielzellen (1 × 10⁴) wurden in Wells von 96-Well-V-Bottom-Platten gegeben und 5 h lang bei 37°C mit Effektorzellen inkubiert. Die Überstände wurden in einem Gammazähler auf ⁵¹Cr getestet. Die spontane Freisetzung von ⁵¹Cr wurde durch Inkubieren von Zielzellen in Abwesenheit von Effektoren beurteilt, während die maximale oder Gesamtfreisetzung von ⁵¹Cr durch Inkubieren von Zielzellen in 0,1% Triton-X-100 bestimmt wurde. Der Prozentanteil der spezifischen ⁵¹Cr-Freisetzung wurde die folgende Gleichung bestimmt: Prozentanteil spezifische Freisetzung = [(experimentell – spontan)/(maximal – spontan)] × 100.

Humorale Immunantworten

[0108] Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 5 U/Well gereinigtem MUC1-Antigen beschichtet.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, das 5% Pferdeserumalbumin enthielt, und dann 1 h lang mit vierfacher Verdünnung an Mäuseserum inkubiert. Nach Waschen und Inkubieren mit Ziegen-Anti-Maus-IgG, konjugiert an Meerrettichperoxidase (Amersham Life Sciences), wurden durch die Entwicklung mit o-Phenylendiamin (Sigma) Antikörperkomplexe erfasst und in einem ELISA-Mikroplatten-Autoreader EL310 bei einer OD von 490 nm gemessen.

Immunhistologie

[0109] Frisch entferntes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren. In einem Kryostat wurden Gewebeschnitte von 5 µm Breite hergestellt und 10 min lang in Aceton fixiert. Die Schnitte wurden dann 30 min lang bei Raumtemperatur mit monoklonalem Antikörper DF3 (Anti-MDC1), Anti-CD4 (H129,19) oder Anti-CD8 (53-6.7) inkubiert und dann indirekter Immunperoxidasefärbung unter Verwendung des VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories) unterworfen.

Ergebnisse:

[0110] Wie es in Beispiel I gezeigt wird, induzieren aus der Fusion von DC und MC38/MUC1-Karzinomzellen (FC/MUC1) stammende Impfstoffe potente Antitumorimmunität. Um die Wirkungen der Impfung MUC1-transgener Mäuse mit FC/MUC1 zu beurteilen, wurden die Mäuse zweimal mit 5×10^5 FC/MUC1 und als Kontrollen mit 10^6 bestrahlten MC38/MUC1-Zellen oder PBS immunisiert. Nach Provokation mit 10^6 MC38- oder MC38/MUC1-Zellen entwickelten alle mit MC38/MUC1-Zellen oder PBS immunisierten Mäuse Tumoren. Im Gegensatz dazu wurde bei mit FC/MUC1 immunisierten Mäusen kein Tumorwachstum beobachtet. Die Immunisierung von MUC1 transgenen Mäusen mit FC/MUC1 hatte keine Wirkung auf das Wachstum der verschiedenen MB49-Blasenkarzinome (Chen et al., J. Immunol. 159: 351–359, 1997). Allerdings konnten MB49-Zellen, die MUC1 exprimierten (MB49/MCU1) nicht in den mit FC/MUC1 immunisierten Mäusen wachsen.

[0111] Um diese Ergebnisse zu erweitern, wurden CTL aus den mit FC/MUC1 immunisierten Mäusen auf die Lyse von Zielzellen getestet. CTL aus MUC1 transgenen Mäusen, die mit bestrahlten MC38/MUC1-Zellen oder PBS immunisiert wurden, zeigten, wenn überhaupt, geringe Aktivität gegen MC38/MUC1-Zellen. Im Gegensatz dazu induzierten CTL aus mit FC/MUC1 immunisierten Mäusen die Lyse von MC38-, MC38/MUC1- und MB49/MUC1-, aber nicht von MB49-Zellen. Wie es bei Wildtypmäusen gezeigt wurde (obiges Beispiel I), induziert die Immunisierung mit FC/MUC1 eine Immunität gegen MUC1 und andere unbekannte Antigene auf MC38-Zellen. Somit bestätigt die Demonstration, dass MB49/MUC1- und nicht MB49-Zellen von CTL

lysiert werden, dass FC/MUC1 eine MUC1-spezifische Reaktion induziert. Darüber hinaus induzierte die Immunisierung der MUC1 transgenen Mäusen mit FC/MUC1 aber nicht mit bestrahlten MC38/MUC1 oder PBS eine spezifische Antikörperreaktion gegen MUC1.

[0112] Um zu bestimmen, ob T-Zellen aus den MUC1 transgenen Mäusen geprimed werden können, um eine Anti-MUC1-Reaktion zu induzieren, wurden aus mit bestrahlten MC38/MUC1-Zellen oder FC/MUC1 immunisierten Mäusen drainierende LNC isoliert. Die LNC wurden in vitro mit MUC1-Antigen stimuliert. Die Ergebnisse demonstrieren, dass LNC aus mit PBS oder bestrahlten MC38/MUC1-Zellen in der Gegenwart von MUC1-Antigen nicht proliferieren. Um die Induktion von CTL gegen MUC1 zu bestimmen, wurden aus mit FC/MUC1 immunisierten MUC1 transgenen Mäusen drainierende LNC isoliert und in der Gegenwart von MUC1-Antigen und bestrahlten Splenozyten kultiviert. Die Zellen wurden am Beginn und an 10 bis 15 Tagen der Kultur durch FACSCAN analysiert. Die Ergebnisse demonstrieren die Selektion einer vorherrschenden CD8⁺-T-Zell-Population nach Inkubation mit MUC1-Antigen. Anders als bei naiven T-Zellen aus nicht immunisierten MUC1 transgenen Mäusen, zeigten diese CD8⁺-T-Zellen spezifische CTL-Aktivität gegen MC38/MUC1- und MB49/MUC1-Ziele. Zusammengefasst, die Ergebnisse legen nahe, dass die Immunisierung mit FC/MUC1 die Unempfindlichkeit auf MUC1 in den MUC1 transgenen Mäusen umkehrt.

[0113] Der Befund, dass die Unempfindlichkeit auf MUC1 durch Immunisierung mit FC/MUC1 umgekehrt werden kann, legt nahe, dass dieser Impfstoff verwendet werden könnte, um Dissemination bei einem MUC1-Expressionshintergrund durch normales Epithel zu behandeln. Bei einem Behandlungsmodell wurden durch Schwanzveneninjektion von MC38/MUC1-Zellen in die MUC1 transgenen Mäuse MC38/MUC1 pulmonale Metastasen gebildet. Wohingegen mit Vehikel behandelte Kontrollmäuse pulmonale Metastasen bildeten, hatten mit FC/MUC1 an Tag 2 oder 4 immunisierte Mäuse keine feststellbaren Metastasen. Diese Befunde zeigen an, dass FC/MUC1-Immunisierungen verwendet werden können, um Metastatisierung in den MUC1 transgenen Mäusen zu behandeln. Wichtig, gegen MC38/MUC1-Tumor geschützte Mäuse zeigten beständige Expression von MUC1-Antigen in normalem Bronchialepithel und anderen Geweben, die das Transgen exprimieren (Rowse et al., Cancer Res. 58: 315–321, 1998). Zudem zeigte Anfärben von MUC1-positiven Geweben mit Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörpern keine T-Zell-Infiltration.

[0114] Die Umkehrung der Unempfindlichkeit gegen ein Eigenantigen in adulten Mäusen besitzt potentielle Wichtigkeit auf dem Gebiet der Antitumorimmun-

therapie. Das vorliegende Beispiel demonstriert, dass die Immunisierung mit den DC-Tumorfusionszellen eine Immunantwort induziert, die ausreicht, eine Unterdrückung der gebildeten Metastasen zu erreichen. Insbesondere die Induktion einer Anti-MUC1-Reaktion, die Antitumoraktivität verleiht, hat, wenn überhaupt, geringe Auswirkung auf normales sezernierendes Epithel, das MUC1 an apikalen Rändern entlang Gängen exprimiert. Diese Befunde demonstrieren, dass die Induktion von Anti-MUC1-Immunität eine effektive Strategie zur Behandlung von MUC1-positiven humanen Tumoren darstellt.

Beispiel IV: Aktivierung von tumorspezifischen CTL durch Fusion von humanen dendritischen Zellen und Brustkarzinomzellen

Materialien und Methoden:

Brustkarzinomzellkultur

[0115] Humane MCF-7-Brustkarzinomzellen (ATCC, Rockville, MD) wurden in DMEM-Kulturmedium gezüchtet, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt war. Humane Brustkarzinomzellen wurden unter Bewilligung des Institutional Review Board aus Biopsien von primären Tumoren und metastatischen Läsionen von Haut, Lungen und Knochenmark erhalten. Die Zellen wurden durch Inkubieren in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier Hanks ausgeglichener Kochsalzlösung getrennt, die 1 mg/ml Collagenase, 0,1 mg/ml Hyaluronidase und 1 mg/ml DNase enthielt. Brusttumorzellen wurden zudem aus malignen Pleuraergüssen durch Zentrifugieren und Lyse von kontaminierenden roten Blutzellen isoliert. Die Brusttumorzellen wurden in RPMI-1640-Medium gehalten, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und µg/ml Insulin (Sigma) ergänzt war.

Herstellung von DC, Monozyten und T-Zellen

[0116] Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugieren aus Patienten mit metastatischem Brustkrebs isoliert. Die PBMC wurden 1 h lang in RPMI-1640-Kulturmedium suspendiert, das mit 10% Humanserum (Sigma) ergänzt war. Die nicht haftenden Zellen wurden entfernt und T-Zellen wurden durch Nylonwolleseparation isoliert. Die haftenden Zellen wurden 1 Woche lang in RPMI-1640-Medium/10 Humanserum kultiviert, das 1000 U/ml GM-CSF (Genzyme) und 500 U/ml IL-4 enthielt. Die mit GM-CSF/IL-4 stimulierten DC exprimierten MHC Klasse I und II, B7-1, B7-2, ICAM, CD40 und verschiedene Mengen an CD83, aber kein CD14, CD19, Zytokeratin oder MUC1. Nicht haftende und lose haftende Zellen wurden durch wiederholte Waschungen geerntet, um die DC-Population zu erzeugen. Fest haftende Monozy-

ten wurden mit Trypsin von den Platten abgelöst.

Zellfusion

[0117] Die DC wurden in einem Verhältnis von 10:1 mit MC7- oder primären Brustkrebszellen gemischt und 5 min lang in serumfreiem RPMI-1640-Medium inkubiert, das 50% Polyethylenglykol (PEG) enthielt. Nach langsamem Verdünnen mit serumfreiem RPMI-1640-Medium wurden die Zellen gewaschen, in RPMI-1640-Medium resuspendiert, das mit 10% autologem Humanserum und 500 U/ml GM-CSF ergänzt war, und 7 bis 14 Tage lang bei 37°C inkubiert.

Durchflusszytometrie

[0118] Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1 h lang auf Eis mit murinen Antikörpern inkubiert, die gegen MUC1 (DF3) (Kufe et al., Hybridoma 3: 223–232, 1984), MHC Klasse I (W6/32), MHC Klasse II (HLA-DR), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) oder ICAM (CD54) (Pharmingen) gerichtet war. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min lang auf Eis mit fluorescein-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG inkubiert. Die Zellen wurden abermals gewaschen und dann 1 h lang bei 4°C mit PE-konjugiertem Anti-MHC Klasse II oder Anti-B7.1 inkubiert. Die Proben wurden dann gewaschen, mit 2% Paraformaldehyd fixiert und durch FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) einer zweidimensionalen Analyse unterzogen.

Immunhistochemie

[0119] Cytospinpräparate der Zellpopulationen wurden 10 min lang in Aceton fixiert. Die Objektträger wurden 30 min lang bei Raumtemperatur mit Mab DF3 (Anti-MUC1) oder Anti-Zytokeratin-Antikörper (AE1/AE3), Boehringer Mannheim, IN) und dann weitere 30 min lang mit biotinyliertem Pferde-Anti-Maus-Ig inkubiert. Die Reaktivität wurde mit ABC-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, CA) festgestellt. Die Zellen wurden dann 30 min lang mit murinem Anti-MHC-Klasse-II und weitere 30 min lang mit alkalischem phosphatasemarkiertem Anti-Maus-Ig inkubiert. Um eine blaue Gegenfärbung zu erzeugen, wurde AP-ABC-Lösung (Vector) verwendet.

Autologe T-Zell-Stimulation

[0120] Die DC, Brustkrebszellen und Fusionszellen wurden 30 Gy ionisierender Strahlung ausgesetzt und 5 h lang in flachbodigen 96-Well-Kulturplatten zu autologen T-Zellen gegeben. Die Aufnahme von [^3H]-Thymidin durch T-Zellen wurden 12 h nach einem Impuls von 1 Ci/Well gemessen (New England Nuclear, Wilmington, DE)

CTL-Tests

[0121] PBMC wurden 10 d lang mit autologen Brusttumor- oder Fusionszellen in der Gegenwart von 20 U/ml humanem Interleukin-2 (HuIL-2). Die stimulierten T-Zellen wurden durch Nylonwollseparation geerntet und als Effektorzellen in CTL-Tests mit Zellzielen verwendet. Primäre Brusttumorzellen, Monozyten, MC-7-Zellen, primäre Eierstockkrebszellen (OVCA) und K562-Zellen wurden 60 min lang bei 37°C mit ^{51}Cr markiert. Nach Waschen, um nicht inkorporiertes Isotop zu entfernen, wurden die Ziele (2×10^3) 5 h bei 37°C mit Effektorzellen kokultiviert. Bei dem angegebenen Experiment wurden markierte Zielzellen vor der Zugabe der Effektorzellen 30 min lang bei 37°C mit MAb Wb/32 (Anti-MHC Klasse II) inkubiert. Die Überstände wurden in einem Gammazähler auf ^{51}Cr -Freisetzung untersucht. Die spontane Freisetzung von ^{51}Cr wurde durch Inkubieren der Ziele in der Abwesenheit von Effektoren getestet, während die maximale oder Gesamtfreisetzung von ^{51}Cr durch Inkubieren der Ziele in 0,1% Triton X-100 bestimmt. Der Prozentanteil der spezifischen ^{51}Cr -Freisetzung = $[(\text{experimentell} - \text{spontan}) / (\text{maximal} - \text{spontan})] \times 100$.

Ergebnisse:

Phänotyp der Human-Brusttumor/DC-Fusionen

[0122] Um zu bestimmen, ob Human-DC bei der Erzeugung von Heterokaryonen mit Tumorzellen verwendet werden können, wurden DC aus PBMC von Patienten mit metastatischem Brustkrebs präpariert. Die DC wurden anfänglich mit humanen MCF-7-Brustkarzinomzellen fusioniert. Zweidimensionale Durchflusszytometrie zeigte, dass MCF-7-Zellen das MUC1 karzinom-assoziierte Antigen und MHC Klasse I, aber nicht Klasse II, B7-1, B7-2 oder ICAM exprimieren. Im Gegensatz dazu exprimierten DC MHC Klasse I, Klasse II und kostimulierende Moleküle, aber nicht MUC1. Nach der Fusion von MCF-7-Zellen und DC koexprimierten die sich ergebenden Heterokaryonen MUC1 und MHC Klasse II. Ähnliche Koexpressionsmuster von MUC1 mit B7-1, B7-2 und ICAM wurden an den fusionierten Zellen beobachtet. Da diese Befunde darauf hinwiesen, dass es möglich war, Brustkrebszellen/DC-fusionierte Zellen zu erzeugen, wurden aus Patienten mit primären oder metastatischen Tumoren humane Brustkrebszellen zu dem Zweck isoliert, mit diesen DC-Fusionszellen herzustellen. Immunfärbung von Kurzzeitkulturen zeigte, dass die Brustkarzinomzellen MUC1 und Zytokeratin (CT) exprimierten. Die Brusttumorzellen wiesen keine feststellbare Expression von MHC Klasse II, kostimulierenden oder Adhäsionsmolekülen auf. Die Tumorzellen wurden mit autologen DC fusioniert und nach 7 Tage langem Kultivieren wurde die sich ergebende Population auf das Vorhandensein von Fusionszellen analysiert. Die Fu-

sion von Tumorzellen an autologe DC führte zur Erzeugung von Heterokaryonen, die sowohl MUC1 als auch MHC Klasse II oder Zytokeratin und MHC Klasse II exprimierten. Die Analyse durch zweidimensionale Durchflusszytometrie bestätigte, dass die Brusttumorzellen (BT) MUC1 und nicht MHC Klasse II exprimieren, während die autologen DC MHC Klasse II, aber nicht MUC1 exprimierten. Im Gegensatz dazu exprimierten über 40% der fusionierten Zellen (DC/BT) sowohl MUC1 als auch MHC Klasse II. Ähnliche Ergebnisse, die durch histochemisches Anfärben und zweidimensionale Durchflusszytometrie erhalten wurden, wiesen darüber hinaus auf das Vorhandensein von fusionierten Zellen und keine Aggregate hin. Wie durch beide Verfahren getestet, rangierte die Effizienz der autologen Fusionen von sechs einzelnen Brustkrebspatienten von 30 bis 50% der Tumorzellpopulation.

Fusion der Brusttumor/DC-Fusionen

[0123] Um zu bestimmen, ob die autologen Fusionszellen beim Stimulieren autologer T-Zellen wirksam sind, wurden sie Heterokaryonen mit T-Zellen kokultiviert, die aus nicht haftenden PBMC isoliert wurden. Als Kontrolle wurden die T-Zellen zudem mit autologen Tumorzellen kokultiviert. Während es keinen Hinweis auf eine T-Zell-Reaktion auf autologe Tumoren gab, stimulierten die Fusionszellen die T-Zell-Proliferation und die Bildung von T-Zellen/Fusionszellclustern. Um die Spezifität dieser Reaktion zu testen, wurden autologe T-Zellen mit DC, bestrahlten Brusttumorzellen, einer Mischung aus nicht fusionierten DC und Brusttumorzellen oder DC-Brusttumorfusionszellen inkubiert. Es gab, wenn überhaupt, nur eine geringe T-Zell-Stimulation durch autologe DC, Tumoren oder eine Mischung der beiden Zelltypen. Als zusätzliche Kontrollen zeigten autologe T-Zellen, wenn überhaupt, nur eine geringe Reaktion auf PEG-behandelte DC oder auf an Monozyten fusionierte DC im Vergleich zu der Reaktion, die mit DC/Tumor-Fusionszellen erhalten wurden.

[0124] Diese Befunde demonstrieren, dass die Fusion von Brusttumorzellen und DC zur Stimulation einer spezifischen T-Zell-Reaktion führt.

Erzeugung von CTL gegen humanen Brusttumor

[0125] Um die Induktion von tumorspezifischen CTL zu testen, wurden T-Zellen 10 Tage lang stimuliert und dann zum Testen der Lyse von autologen Tumorzellen getestet. T-Zellen, die mit autologen DC, bestrahlten Brusttumorzellen oder einer nicht fusionierten Mischung beider inkubiert wurden, zeigten einen geringen Grad an Lyse autologer Brusttumorzellen. Bezeichnenderweise waren mit den fusionierten T-Zellen stimulierte T-Zellen bei der Induktion von Zytotoxizität von autologen Tumoren wirksam. Ähnliche Ergebnisse wurden mit T-Zellen aus drei Brustkreb-

spatienten erhalten, die mit autologen DC/Brusttumorzell-Fusionen stimuliert wurden. Darüber hinaus konnten nicht stimulierte T-Zellen, die mit autologen Brusttumorzellen kokultiviert worden sind, nicht signifikant die Zerstörung von Tumorzellen vermitteln. Um die Spezifität der durch Inkubieren mit Fusionszellen erzeugten CTL zu definieren, wurde ihre Fähigkeit zur Lyse autologer Tumoren und anderer Zelltypen verglichen. Die zwei Graphen in [Fig. 7A](#) zeigen Daten, die mit Zellen aus zwei einzelnen Patienten erhalten wurden. Die Inkubation von fusionsstimulierten T-Zellen mit autologen Brusttumoren oder Monozyten demonstrierte die Selektivität für die Lyse der Tumorzellen. Zudem zeigten T-Zellen, die mit autologen Fusionszellen stimuliert wurden, eine signifikante Lyse von autologen Brusttumorzellen, während die Lyse von MCF-7-Zellen, primären Eierstockkrebszellen und NK-sensitiven K562-Zellen ähnlich zu der war, die mit autologen Monozyten erhalten wurde. Der Befund, dass die Präinkubation der Ziele mit einem für MHC Klasse I spezifischen Antikörper zu einer Aufhebung der Lyse von autologen Brusttumorzellen führte, weist darauf hin, dass die Zerstörung durch MHC Klasse I beschränkt war. Im Gegensatz dazu hatte für MHC Klasse I spezifischer Antikörper, wenn überhaupt, nur geringe Wirkung auf die Lyse der anderen Zelltypen.

Beispiel V: Aktivierung von tumorspezifischen CTL durch Fusion von humanen dendritischen Zellen und Eierstockkrebszellen

Materialien und Methoden:

Isolierung von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC)

[0126] Durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation wurden mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Eierstockkrebs und normalen Donoren isoliert. Die PBMC wurden 1 h lang in RPMI 1640 Kulturmedium kultiviert, das 1% autologes Serum enthielt. Die nicht haftenden Zellen wurden entfernt und die T-Zellen durch Nylonwolleseparation gereinigt. Die haftenden Zellen wurden 1 Woche lang in RPMI 1640 Kulturmedium kultiviert, das 1% autologes Serum, 1000 U/ml GM-CSF (Genzyme) und 500 U/ml IL-4 (Genzyme) enthielt. Die DC wurden aus den nicht haftenden und lose haftenden Zellen geerntet. Die fest haftenden Monozyten wurden nach Behandlung mit Trypsin geerntet.

Herstellung und Fusion von Eierstockkrebszellen

[0127] Ovarialkarzinomzellen (OVCA-Zellen), die aus primären Tumoren und malignen Aszites erhalten wurden, wurden von anderen Zellen und nichtzellularen Komponenten in Hanks ausgeglichener Kochsalzlösung ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei) abgetrennt, die 1 mg/ml Collagenase, 0,1 mg/ml Hyaluronidase und 1

mg/ml DNase enthielt. Die Zellen wurden bis zur Fusion in RPMI 1640 Kulturmedium kultiviert, das mit 10% hitzeinaktiviertem autologem Humanserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin ergänzt war. Autologe oder allogene DC wurden 5 min lang mit den OVCA-Zellen bei einem Verhältnis von 10:1 in serumfreiem RPMI 1640 Medium inkubiert, das 50% Polyethylenglykol (PEG) enthielt. RPMI 1640 Kulturmedium wurde dann langsam zugefügt, um das PEG zu verdünnen. Nach Waschen wurden die Zellen 7 bis 14 Tage lang in RPMI 1640 Kulturmedium resuspendiert, das mit 10% autologem Serum und 500/ml GM-CSF ergänzt war.

Phänotypanalyse

[0128] Die Zellen wurden 1 h lang auf Eis mit monoklonalen Mausantikörpern (Mab) inkubiert, die gegen humanes DF3/MUC1 (Mab DF3) (Kufe et al., Hybridoma 3: 223–232, 1984) humanes CA-125 (Mab OC-125) (Bast et al., N Engl. J Med 309 (15): 883–887, 1983), humanes MHC Klasse I (W6/32), humanes MHC Klasse II (RLA-DR), humanes B7-1 (CD80), humanes B7-2 (CD86), humanes ICAM (CD54; Pharmingen) und humanes CD83 (Pharmingen) gerichtet war. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min lang mit fluorescein-konjugiertem Ziegenantikörper inkubiert, der für Maus-IgG spezifisch war. Zur dualen Expressionsanalyse wurden die Zellen mit Mab OC-125 inkubiert, gewaschen und dann 1 h lang bei 4°C mit phycoerythronkonjugiertem Antikörper inkubiert, der für MHC Klasse II, B7-2 oder CD38 spezifisch war. Die Proben wurden gewaschen, in 2% Paraformaldehyd fixiert und durch FACSscan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) analysiert.

Immunhistochemische Färbung

[0129] Zytospinpräparate wurden in Aceton fixiert und 30 min lang bei Raumtemperatur mit Mab OC-125 inkubiert. Die Objektträger wurden gewaschen und weitere 30 min lang mit biotinyliertem Pferdeantikörper inkubiert, der für Maus-IgG spezifisch war. Die Färbung (rote Farbe) wurde mit ABC-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, CA) erzielt. Die Objektträger wurden dann 30 min lang mit murinem Antikörper inkubiert, der für humanes MHC Klasse II spezifisch war, gefolgt von alkalischem, mit Phosphatase markiertem Anti-Maus-IgO. Um eine blaue Gegenfärbung zu erzeugen, wurde AP-ABC-Lösung (Vector Laboratories) verwendet.

T-Zell-Proliferationstests

[0130] Die Zellen wurden 30 Gy ionisierender Strahlung ausgesetzt und 5 Tage lang zu T-Zellen in flachbodigen 96-Well-Platten hinzugefügt. Der Einbau von [^3H]-Thymidin durch die T-Zellen wurde nach 12 h langem Inkubieren in der Gegenwart von 1 Ci/Well

gemessen.

Zytotoxizitätstests

[0131] Die T-Zellen wurden 1 Woche lang mit den angegebenen Zellpräparaten in der Gegenwart von 20 U/ml HuIL-2 stimuliert. Die T-Zellen wurden durch Nylonwollseparation geerntet und als Effektorzellen in CTL-Tests verwendet. Autologe OVCA-Zellen, allogene OVCA-Zellen, autologe Monozyten, MCF-7-Brustkarzinomzellen und K562-Zellen wurden 60 min lang bei 37°C mit ^{51}Cr markiert. Nach Waschen wurden Ziele (2×10^4) 5 h lang bei 37°C mit den T-Zellen kultiviert. Bei bestimmten Experimenten wurden die markierten Zielzellen vor der Zugabe der Effektorzellen 30 min lang bei 37°C mit MAb W6/32 (Anti-MHC-Klasse-I) inkubiert. Die Überstände wurden in einem Gammazähler auf ^{51}Cr -Freisetzung getestet. Die spontane Freisetzung von ^{51}Cr wurde durch Inkubieren der Ziele in der Abwesenheit von Effektoren getestet. Die maximale oder Gesamtfreisetzung von ^{51}Cr wurde durch Inkubieren der Ziele in 0,1% Triton X-100 bestimmt. Der Prozentanteil der spezifischen ^{51}Cr -Freisetzung = $[(\text{experimentell} - \text{spontan})/(\text{maximal} - \text{spontan})] \times 100$.

Ergebnisse:

Charakterisierung von mit autologen und allogenen DC fusionierten Ovarialkarzinomzellen (OVCA-Zellen)

[0132] Die DC wurden aus Patienten mit metastatischem Eierstockkrebs und aus normalen Freiwilligen gewonnen. Haftende Zellen wurden aus PBMC isoliert und eine Woche lang in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die sich ergebende Population wurde einer FACS-Analyse unterworfen. Die DC zeigten einen charakteristischen Phänotyp mit Expression von MHC Klasse I, Klasse II, kostimulierenden Molekülen, CD83 und ICAM, aber nicht der DF3/MUC1 oder CA-125 karzinomassoziierten Antigene. Im Gegensatz dazu exprimierten OVCA-5-Zellen, die aus einer Patientin mit metastatischem Eierstockkrebs isoliert wurden, MUC1, CA-125, MHC Klasse I und ICAM, aber nicht MHC Klasse II, B7-1, B7-2 oder CD83. Ähnliche Befunde wurden mit OVCA-Zellen erhalten, die aus primären Ovarialtumoren und aus malignem Aszites erhalten wurden. Die Fusion der OVCA-Zellen mit autologen DC (OVCA/FC) führte zur Erzeugung von Heterokaryonen (OVCA/FC), die die CA-125- und MUC1-Antigene, MHC Klasse II, B7-1, B7-2 und CD83 exprimieren.

[0133] Darüber hinaus war das Muster der Antigenexpression ähnlich, wenn die OVCA-Zellen mit allogenen DC fusioniert wurden. Immunfärbung bestätigte, dass die DC MHC Klasse II und nicht CA-125 exprimierten. Umgekehrt exprimierten die OVCA-Zellen CA-125 und nicht MHC Klasse II. Die Analyse der Fu-

sionszellen (OVCA/FC) demonstrierte die Expression beider Antigene.

[0134] Um die Effizienz der Fusionen zu bewerten, wurde zweidimensionale Durchflusszytometrie verwendet. Im Gegensatz zu DC exprimierten OVCA-Zellen CA-125, aber nicht MHC Klasse II, B7-2 oder CD83. Die Analyse von mit autologen DC fusionierten OVCA-Zellen zeigte, dass 32,6% der Population sowohl CA-125 als auch MHC Klasse II exprimierte. Die Bewertung der CA-125- und B7-2-Expression zeigte, dass 30% der autologen OVCA/FC beide Antigene exprimierte. Darüber hinaus exprimierte 10,8% der autologen OVCA/FC sowohl CA-125 als auch CD83. Die Fusion der OVCA-Zellen und allogenen DC führte zudem zu Zellen, die CA-125 und MHC Klasse II, B7-2 oder CD83 koexprimierten. Diese Befunde demonstrieren die Bildung von Heterokaryonen durch Fusionieren von OVCA-Zellen an autologe oder allogene DC.

Stimulation von Anti-Tumor-CTL durch autologe OVCA/FC

[0135] Um die Funktion von OVCA/FC zu beurteilen, wurden die Fusionszellen mit autologen PBMC kokultiviert. Das Experiment wurde mit Zellen aus drei einzelnen Patienten ausgeführt und jeder der drei Graphen in [Fig. 10B](#) zeigt Daten, die mit Zellen aus einem der Patienten erhalten wurden. Als Kontrolle wurden die PBMC zudem mit autologen OVCA-Zellen kultiviert. Die Fusionszellen, aber nicht die Tumorzellen, stimulierten die Bildung von T-Zellclustern. Nach 10 d Stimulation wurden die T-Zellen für die Beurteilung der Zytotoxizitätsaktivität isoliert. Unter Verwendung von autologen OVCA-Zellen als Ziele ergab sich beim Testen von T-Zellen, die mit autologen DC, autologem Tumor oder einer Mischung aus unfusionierten DC und Tumor inkubiert worden sind, ein niedriger Lysegrad. Im Gegensatz dazu waren mit OVCA/FC stimulierte T-Zellen wirksam beim Induzieren der Lyse von autologen Tumorzielen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit T-Zellen aus den drei Patienten mit Eierstockkrebs erhalten. Als Kontrolle wiesen T-Zellen, die mit an autologe Monozyten (OVCA/MC) fusionierten OVCA oder mit an Monozyten (DC/MC) fusionierten DC stimuliert wurden, einen geringen Effekt auf die Stimulation von Anti-Tumor-CTL-Aktivität auf.

Erzeugung von Anti-Tumor-CTL durch an allogene DC fusionierte OVCA-Zellen

[0136] Um die OVCA/FC-Funktion zu beurteilen, wenn die Fusion mit allogenen DC ausgeführt wird, wurden autologe PBMC mit an autologen oder allogenen DC fusionierten OVCA-Zellen stimuliert. Jeder der zwei Graphen in [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) zeigt Daten, die mit Zellen aus einem einzelnen Patienten erhalten wurden. Als Kontrollen wurden die autologen

PBMC zudem mit nicht fusionierten DC oder OVCA-Zellen stimuliert. Die Inkubation der T-Zellen mit allogenen DC war mit stärkerer Stimulation verbunden als die, die mit autologen DC erhalten wurde. Die Ergebnisse demonstrieren zudem, dass die T-Zell-Proliferation zu einem stärkeren Ausmaß durch OVCA fusioniert an allogene, im Vergleich zu autologen, DC stimuliert wird. Ähnliche Befunde wurden mit T-Zellen erhalten, die aus den zwei Patienten erhalten wurden. Nach 10 d langer Stimulation wurden die T-Zellen isoliert und auf Lyse von autologen Tumoren getestet. Die Stimulation mit nicht fusionierten allogenen oder autologen DC hatte, wenn überhaupt, nur geringe Wirkung auf die lytische Funktion im Vergleich zu der, die mit T-Zellen erhalten wurden, die in der Gegenwart von OVCA-Zellen stimuliert wurden. Im Gegensatz dazu induzierten T-Zellen, die mit an allogenen DC fusionierten OVCA-Zellen stimuliert wurden, Lyse von autologen Tumoren. Darüber hinaus zeigten für beide Patienten T-Zellen, die mit an autologen oder allogenen DC fusionierten OVCA-Zellen stimuliert wurden, Induktion von CTL-Aktivität. Diese Befunde zeigen, dass die Anti-Tumor-Aktivität von autologen CTL durch Fusionen von Tumorzellen an autologe oder allogene DC stimuliert wird.

Spezifität von OVCA/FC-stimulierten CTL

[0137] Um die Spezifität von durch Fusionszellen induzierte CTL zu beurteilen, wurden T-Zellen, die mit an autologen DC fusionierten OVCA-Zellen stimuliert wurden, mit autologen Tumoren, autologen Monozyten, MCF-7-Brustkarzinomzellen, allogenen OVCA-Zellen und NK-sensitiven K562-Zellen inkubiert. Die in [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) gezeigten Daten wurden aus CTL-Testkulturen erhalten, die in Abwesenheit (ausgezogene Balken) oder Anwesenheit (schraffierte Balken) von für humane MHC-Klasse-I-Moleküle spezifischen MAb ausgeführt wurden. Inkubieren der OVCA/FC-stimulierten T-Zellen mit autologen Tumoren oder Monozyten zeigte selektive Lyse des Tumors. Zusätzlich ergab sich keine signifikante Lyse der MCF-7-, allogenen OVCA- oder K562-Zellen durch diese CTL. Präinkubation der Ziele mit Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper blockierte die Lyse der autologen OVCA-Zellen und hatte geringe Wirkung auf die für andere Zelltypen in der Abwesenheit von Antikörper erhaltene. T-Zellen, die mit an allogenen DC fusionierten autologen OVCA-Zellen stimuliert wurden, zeigen zudem selektive Lyse des autologen Tumors. Darüber hinaus wurde die Lyse des autologen Tumors durch Präinkubation der Ziele mit Anti-MHC-Klasse-I aufgehoben, was deshalb darauf hinweist, dass die Erkennung des Tumors durch die CTL durch MHC-Klasse-I-Moleküle beschränkt war.

Andere Ausführungsbeispiele

[0138] Es versteht sich von selbst, dass, während die Erfindung in Zusammenhang mit deren detaillier-

ter Beschreibung beschrieben worden ist, die vorangehende Beschreibung dazu gedacht ist, den Umfang der Erfindung, der durch den Umfang der beigefügten Ansprüche definiert wird, zu illustrieren, und nicht ihn einzuschränken.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Testen eines Peptids auf antigenische Aktivität, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- a) Bereitstellen einer hybriden Zelle, die ein Fusionsprodukt einer menschlichen dendritischen Zelle und einer menschlichen Tumor- oder Krebszelle umfasst, wobei die Tumor- oder Krebszelle eine primäre oder metastatische Tumorzelle ist, wobei die hybride Zelle auf ihrer Oberfläche B7 exprimiert;
- b) In Kontakt bringen der hybriden Zelle mit einer menschlichen Immuneffektorzelle, wodurch eine menschliche geschulte Immuneffektorzelle erzeugt wird; und
- c) In Kontakt bringen einer Zielzelle mit der menschlichen geschulten Immuneffektorzelle in der Gegenwart des Peptids, wobei die Lyse der Zielzelle das Peptid als ein antigenisches Peptid identifiziert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend:

- a) Bereitstellen einer Vielzahl von Zellen, wobei wenigstens 5% der Zellen der Population fusionierte Zellen sind, die durch Fusion zwischen wenigstens einer menschlichen dendritischen Zelle und wenigstens einer menschlichen Tumor- oder Krebszelle erzeugt werden, die ein Zelloberflächen-Antigen exprimiert, wobei die Tumor- oder Krebszelle eine primäre oder metastatische Tumorzelle ist, wobei die fusionierten Zellen (i) ein MHC-Klasse-II-Molekül, (ii) B7 und (iii) das Zelloberflächen-Antigen in Mengen exprimieren, die wirksam sind, eine Immunantwort zu stimulieren;
- b) In Kontakt bringen einer Population von menschlichen T-Lymphozyten mit der Vielzahl von Zellen, wobei das Inkontaktbringen die Differenzierung von Effektorzell-Vorläuferzellen in der Population von T-Lymphozyten zu Effektorzellen verursacht, die zytotoxische T-Lymphozyten umfassen; und
- c) In Kontakt bringen von Zielzellen mit den Effektorzellen in der Gegenwart des Peptids; wobei die Lyse der Vielzahl von Zielzellen oder eines Teils davon das Peptid als ein antigenisches Peptid identifiziert, das durch die zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Peptid ein Fragment eines Proteins ist, das durch die Krebszelle exprimiert wird.

4. Verfahren, umfassend die Schritte des Testens eines oder mehrerer Peptide auf antigenische Aktivität nach Anspruch 1, Identifizieren wenigstens eines der Peptide als ein antigenisches Peptid und Verwen-

den des antigenischen Peptids oder eines Polypeptids, von dem das Peptid ein Fragment ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung beim Induzieren einer Immunantwort in einem Patienten.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Peptid aus einem Polypeptid abgeleitet ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus carcinoembryonalem Antigen, prostataspezifischem Antigen, HER2/neu, CA-125 und Mucin-1 (MUC1) besteht.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

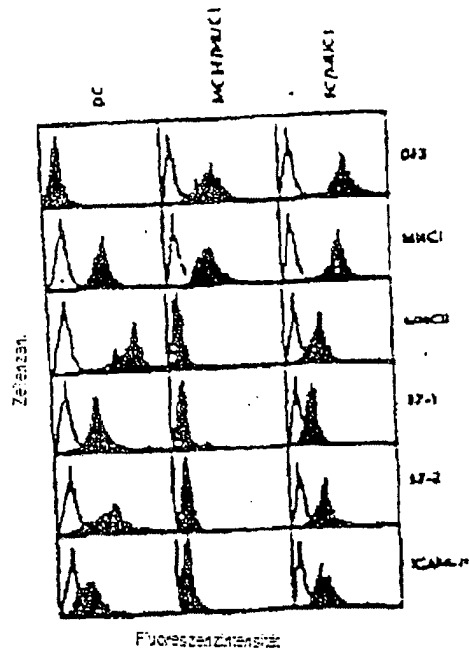


FIG. 1A

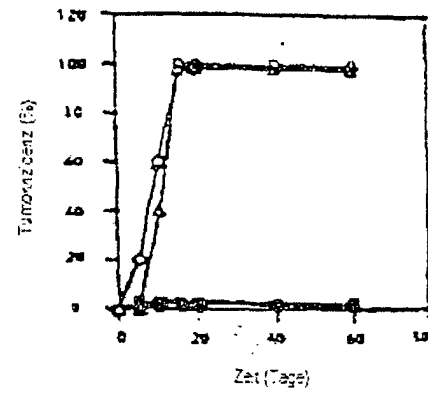


FIG. 1B

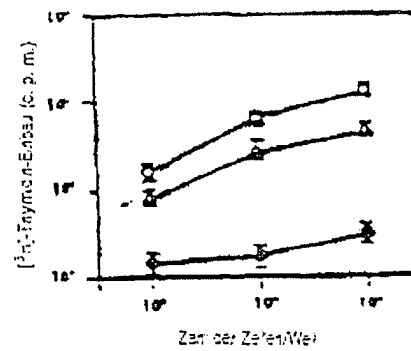


FIG. 1C

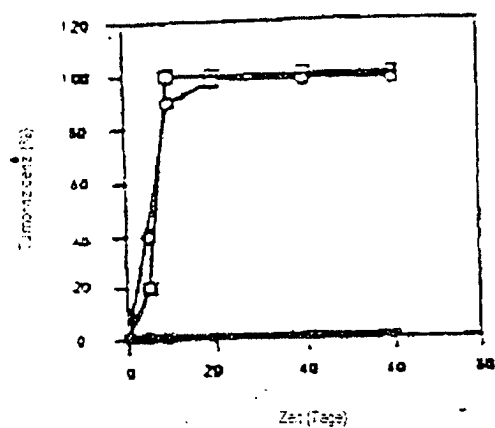


FIG. 2A

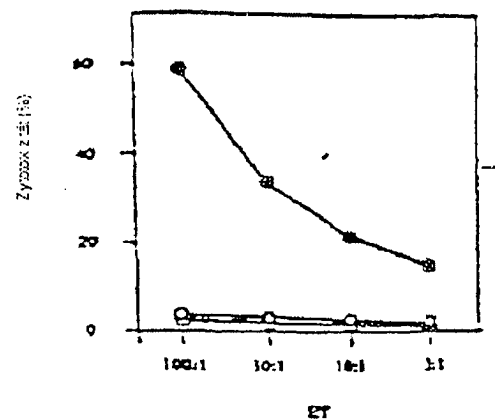


FIG. 2B

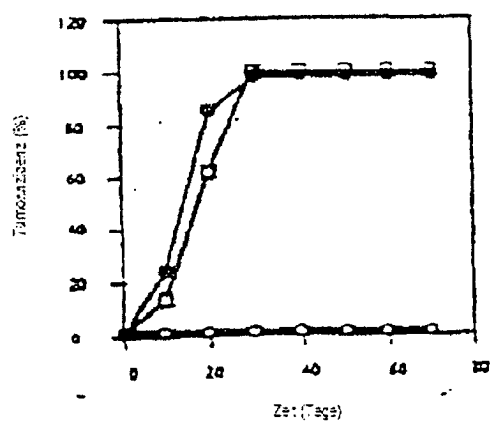


FIG. 2C

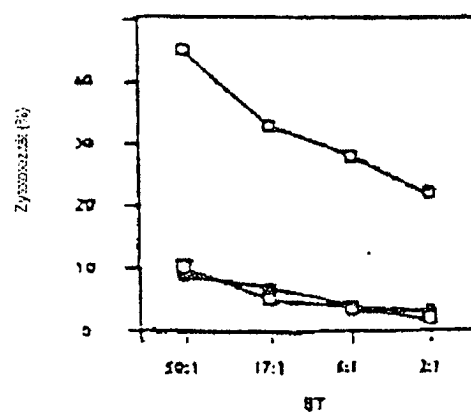


FIG. 2D

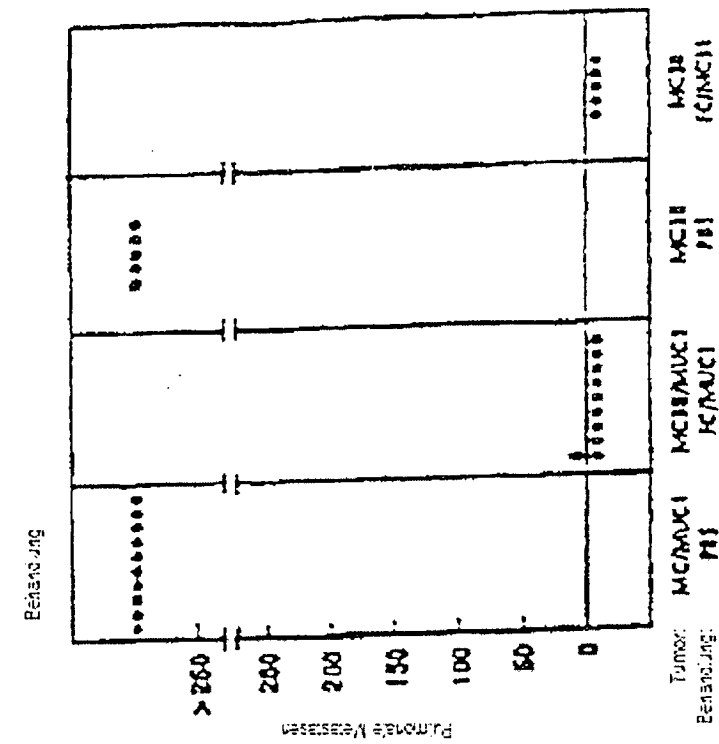


FIG. 3B

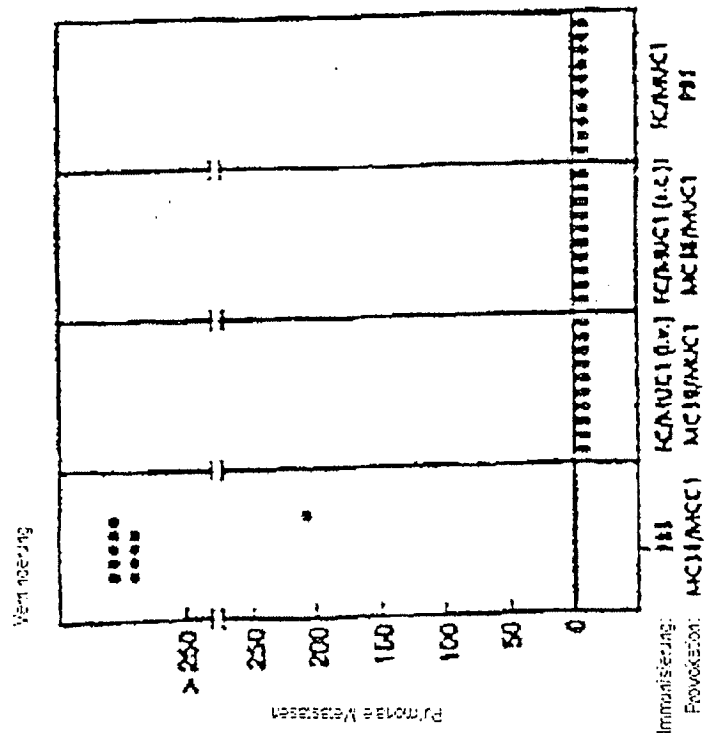


FIG. 3A

Fig. 4 A.

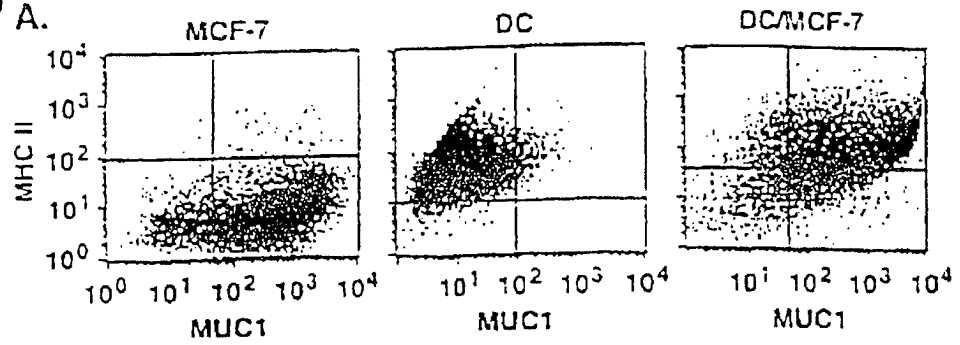


Fig. 4 B.

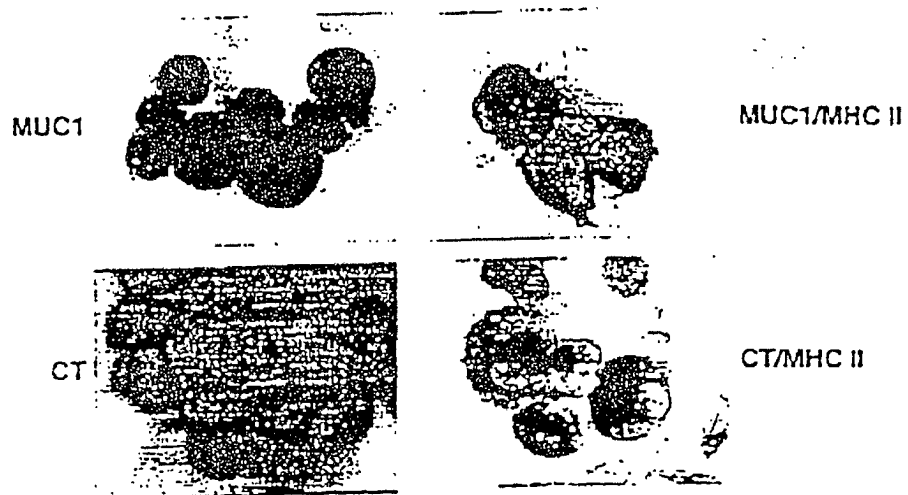


Fig. 4 C.

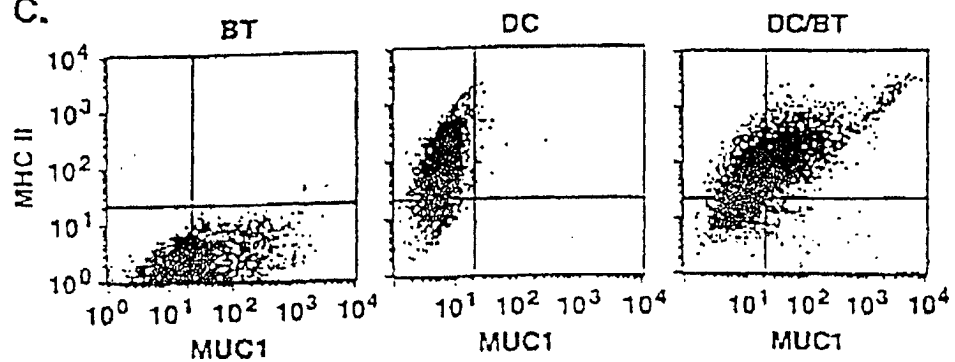


Fig. 5 A.

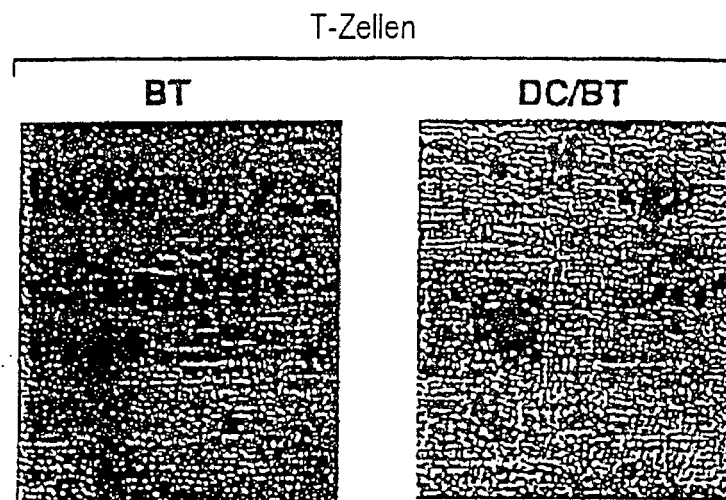


Fig. 5 B.

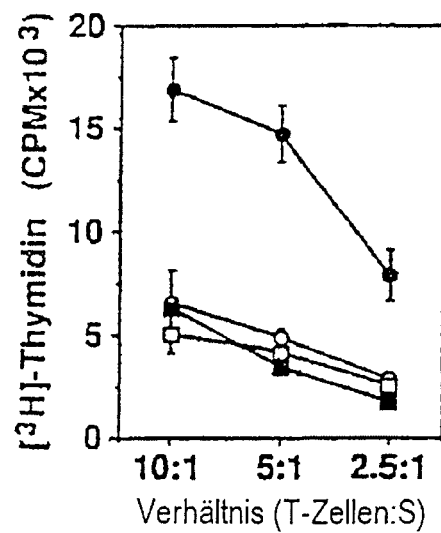
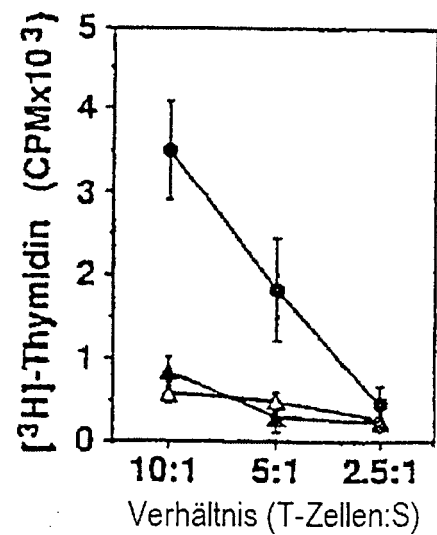


Fig. 5 C.



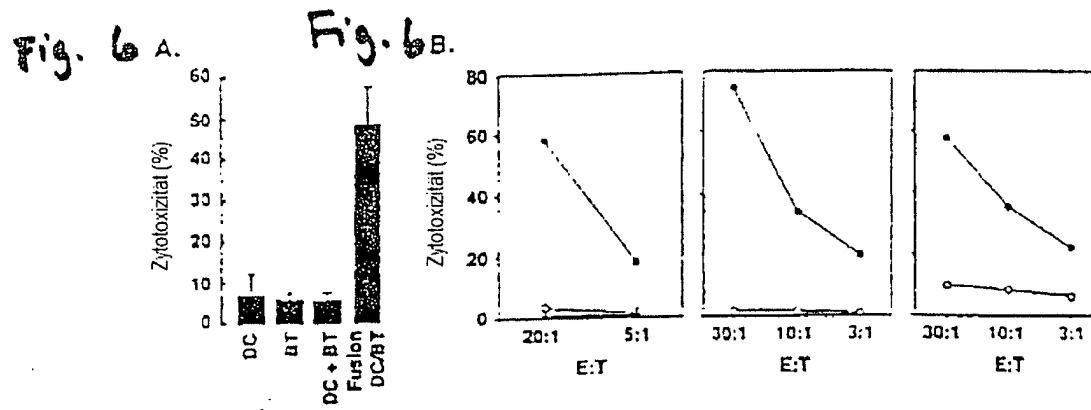


Fig. 7A.

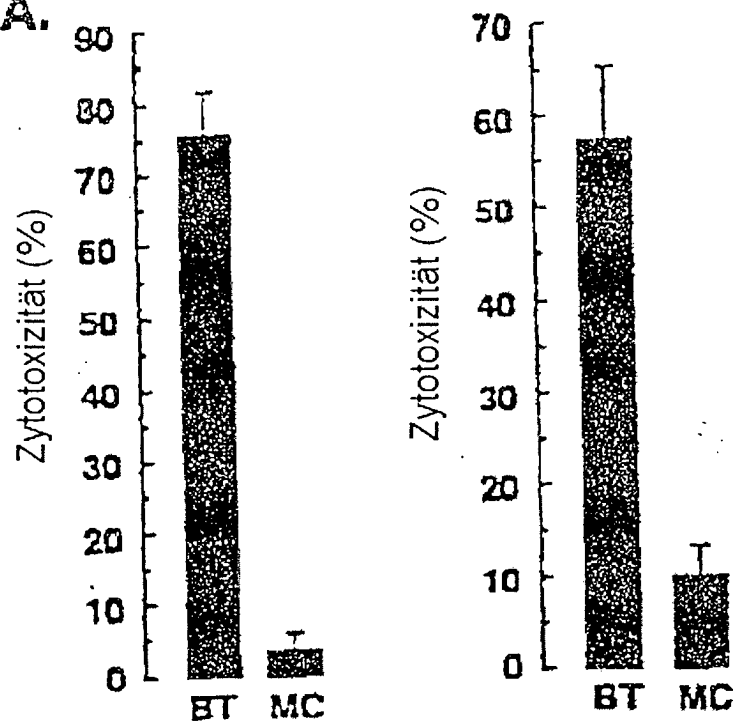


Fig. 7B.

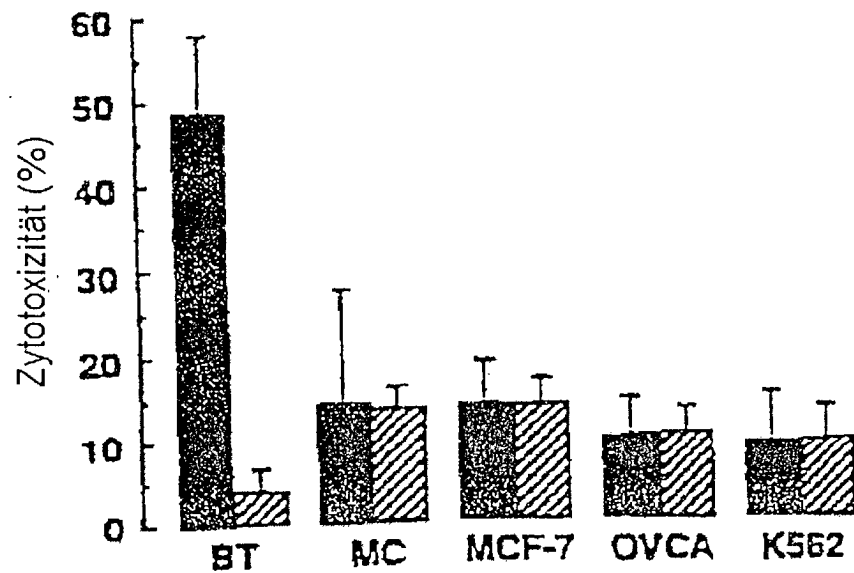


Fig. 8 A.

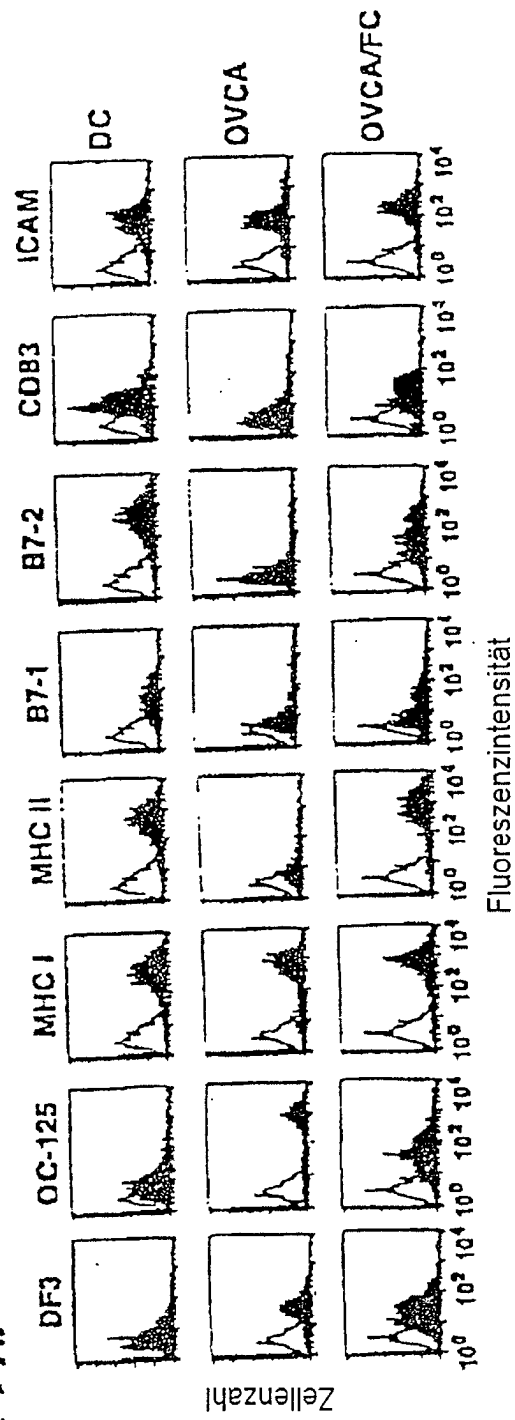


Fig. 8 B.

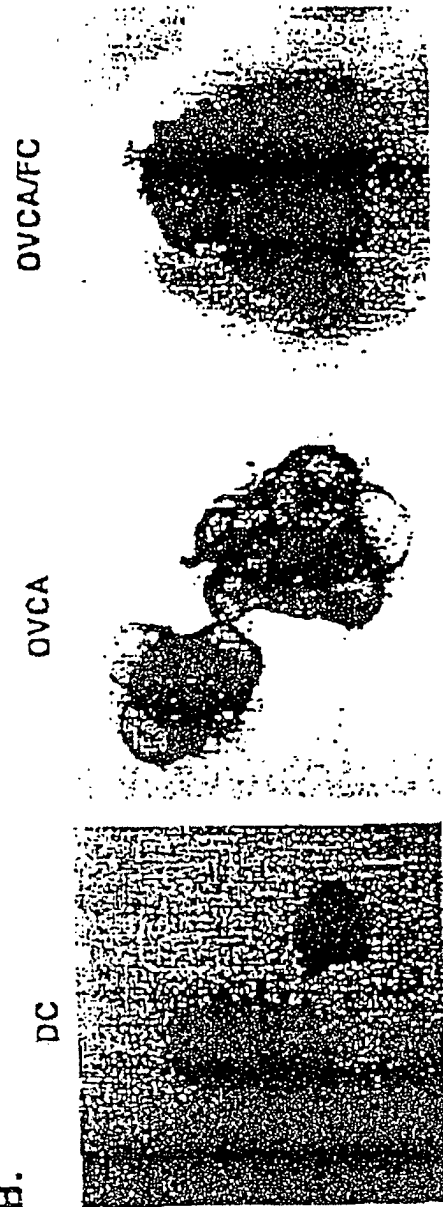


Fig. 9

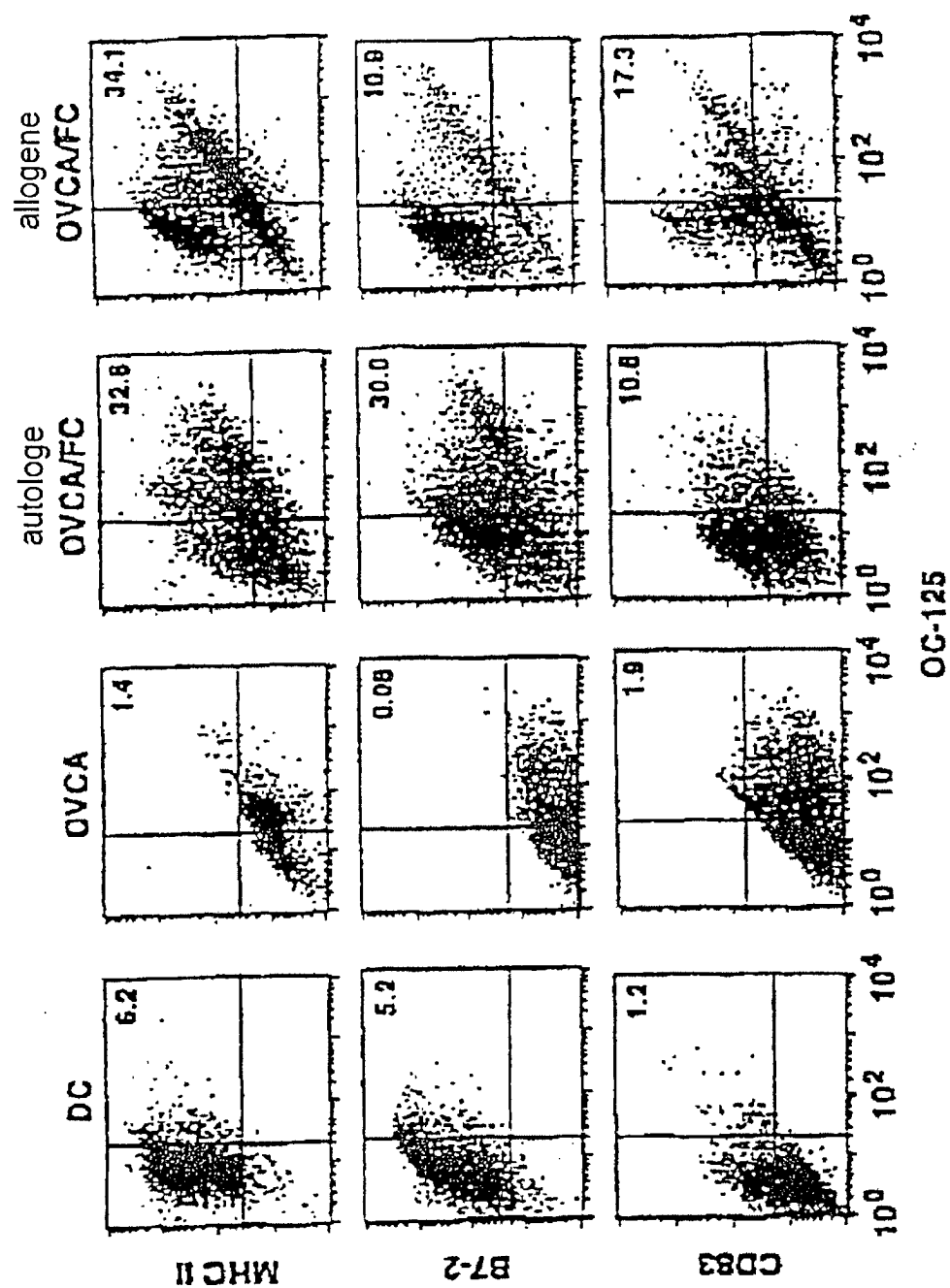


Fig. 10 A.

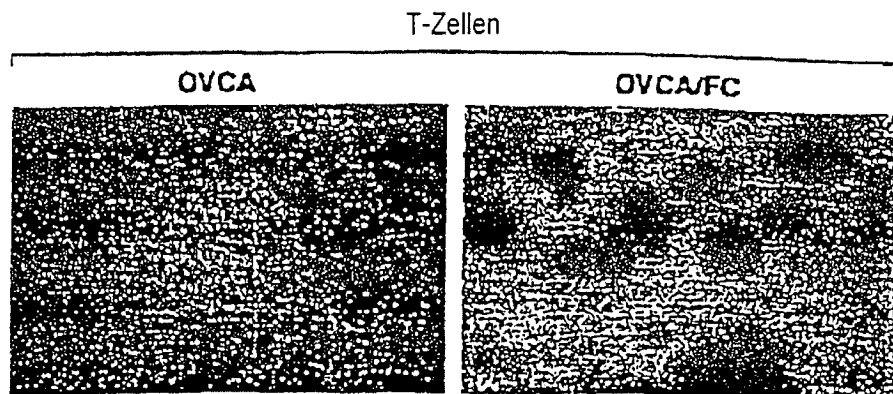


Fig. 10 B.

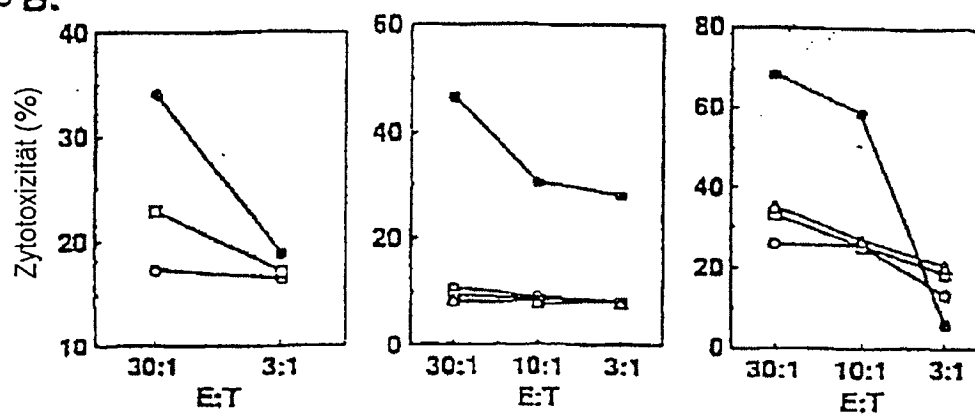


Fig. 10 C.

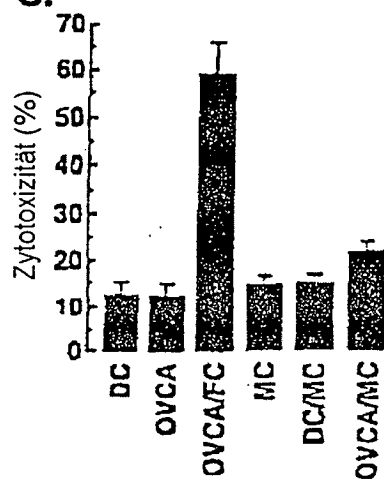


Fig. 11 A.

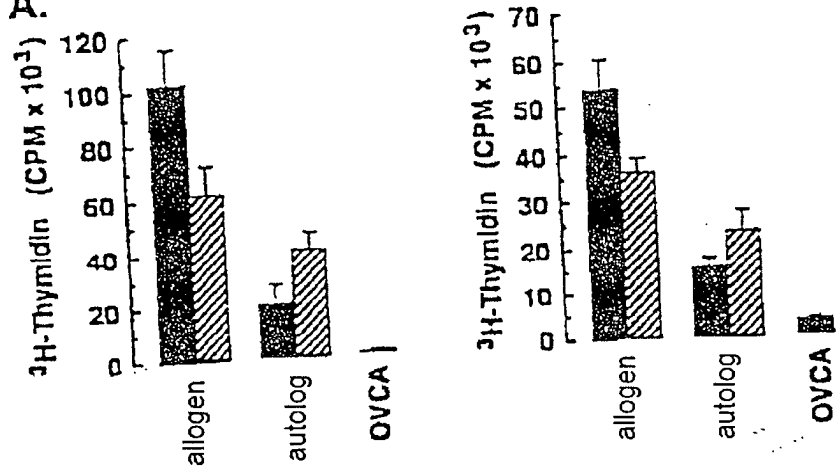


Fig. 11 B.

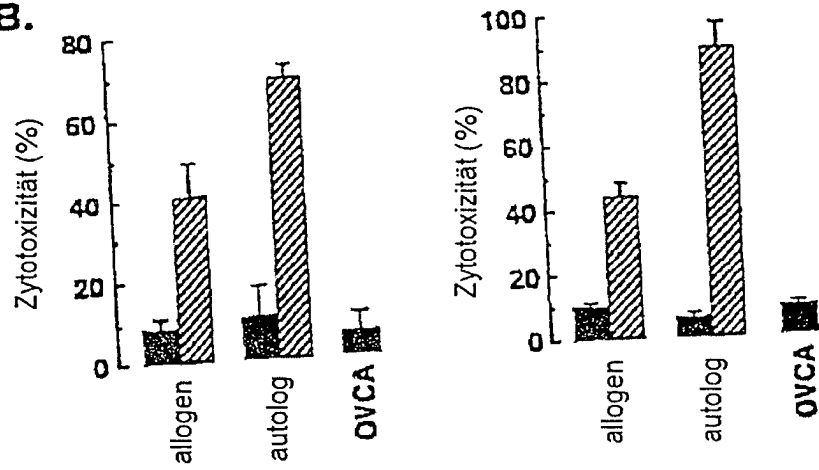


Fig. 12 A.

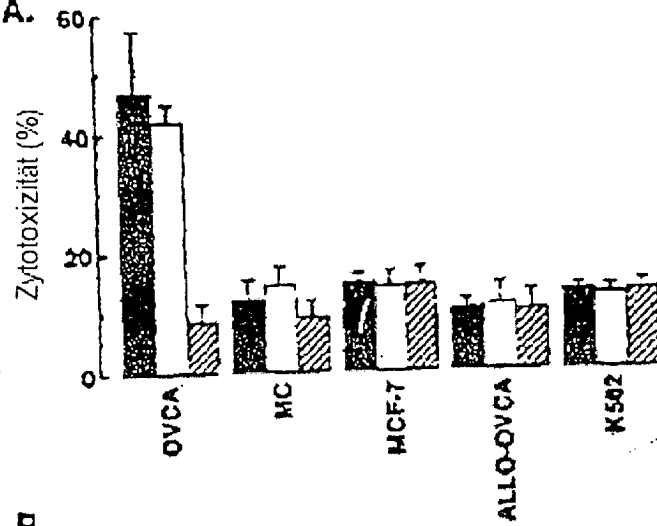


Fig. 12 B.

