



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 874 T2 2006.12.14**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 784 477 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 874.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/04347**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 916 256.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/010411**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.04.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.04.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/47 (2006.01)**

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

315892 30.09.1994 US

(73) Patentinhaber:

**Mount Sinai School of Medicine of the City
University of New York, New York, N.Y., US**

(74) Vertreter:

Jones, Day und Kollegen, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SRIVASTAVA, K., Pramod, Avon, Connecticut
06001, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNOTHERAPEUTISCHE STRESS-PROTEIN-PEPTIDKOMPLEXE GEGEN KREBS**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Anmeldung betrifft allgemein das Gebiet der Krebstherapie, insbesondere der Immuntherapie von menschlichem Krebs.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Es wurde gefunden, dass durch Inzucht erzeugte Mäuse und Ratten prophylaktisch gegen Tumore immunisiert werden können, die aus Mäusen und Ratten mit dem selben genetischen Hintergrund abgeleitet werden (Gross (1943) *Cancer Res.* 3:323-326; Prehn et al. (1957) *J. Natl. Cancer Inst.* 18:769-778; Klein et al. (1960) *Cancer Res.* 20:1561-1572; Old et al. (1962) *Ann NY Acad. Sci.* 101:80-106; als Übersichtsartikel siehe Srivastava et al. (1988) *Immunology Today* 9:78-83). Diese Studien haben nicht nur gezeigt, dass Mäuse, welche mit deaktivierten Krebszellen geimpft wurden, gegenüber einer nachfolgenden Belastung mit lebenden Krebszellen immun geworden sind, sondern haben auch die Existenz von tumorspezifischen Antigenen gezeigt.

[0003] Weitere Studien haben gezeigt, dass das Phänomen von prophylaktisch induzierter Immunität tumorspezifisch ist. Obwohl Mäuse spezifisch gegen diejenigen Tumorzellen immunisiert werden können, welche zu ihrer Immunisierung eingesetzt wurden, so sind diese dennoch empfindlich in Bezug auf Belastungen mit anderen, nicht verwandten Tumoren (Basombrio (1970) *Cancer Res.* 30:2458-2462, Globerson et al. (1964) *J. Natl. Cancer Inst.* 32:1229-1243). Die Tatsache, dass eine Immunogenität gegenüber Krebszellen aufgezeigt werden konnte, hat zu einer Suche nach von den Krebszellen abgeleiteten Molekülen geführt, welche die Resistenz gegenüber der Tumorbelastrung hervorrufen. Der allgemeine Ansatz bestand darin, dass die von den Krebszellen abgeleiteten Proteine aufgetrennt und individuell in Bezug auf ihre Fähigkeit hin getestet wurden, Mäuse gegen diejenigen Krebsarten zu immunisieren, aus welchen die Fraktionen präpariert wurden (siehe Srivastava et al. (1988) *supra*; Old (1981) *Cancer Res.* 41:361-375). Unter Verwendung dieser Methodik wurde eine bestimmte Zahl an Proteinen identifiziert. Ein großer Anteil dieser Proteine ist jedoch mit einer Klasse von Proteinen verwandt, welche als stressinduzierte Proteine oder als Stressproteine bekannt sind (Lindquist et al. (1988) *Annual Rev. Genet.* 22:631-677). Aufgrund der Tatsache, dass Stressproteine zu den in der Natur am meisten erhaltenen und häufigsten Proteinen gehören, erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Kandidaten für tumorspezifische Antigene sind. Nachfolgend wurde gezeigt, dass Stressproteine mit einer Vielzahl von Peptiden in einer nicht-kovalenten Art und Weise assoziieren und dabei Stressprotein-Peptidkomplexe bilden (Gething et al. (1992) *Nature* 335:33-45; Lindquist et al. (1988) *supra*; Young (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8:401-420; Flynn et al. (1991) *Nature* 353:726-730).

[0004] Studien haben auch gezeigt, dass Stressprotein-Peptidkomplexe ihre Immunogenität durch Behandlung mit ATP verlieren (Udono et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1391-1396). Es ist bekannt, dass diese Behandlung die Stressprotein-Peptidkomplexe in die entsprechenden Stressprotein- und Peptid-Komponenten auf trennt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es keine Unterschiede in der Struktur von Stressproteinen gibt, die aus normalen oder aus Tumorzellen abgeleitet werden, sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Stressproteine ein großes Spektrum von Peptiden in einer von ATP abhängigen Art und Weise binden, erscheint es, dass die antigene Wirkung des Stressprotein-Peptidkomplexes nicht vom Stressprotein per se herrührt, sondern von dem Peptid, welches mit dem Stressprotein assoziiert ist.

[0005] Eine der wesentlichen konzeptionellen Schwierigkeiten auf dem Gebiet der Krebsimmunotherapie besteht in der Möglichkeit, dass Formen von menschlichem Krebs, genauso wie Krebs von in Experimenten verwendeten Tieren, in Bezug auf ihre Antigene unterschiedlich sind. Es ist klar, dass es kürzlich aufgefundene Beweise für die Existenz von gemeinsamen Tumorantigenen gibt (Kawakami et al. (1992) *J. Immunol.* 148:638-643; Darrow et al. (1989) *J. Immunol.* 142:3329-3334). Dies kann als ein hoffnungsvolles Anzeichen für die Zukunftsaussichten der Krebsimmunotherapie angesehen werden. Nichtsdestotrotz ist es im Licht der überwältigenden Beweisfülle aus experimentellen und menschlichen Systemen vernünftig, anzunehmen, dass menschliche Tumore eine starke Diversität und Heterogenität in Bezug auf ihre Antigene aufweisen sollten.

[0006] Die Möglichkeit dafür, immunogene Antigene von individuellen Tumoren von Krebspatienten (oder auch „nur“ von einigen verschiedenen Typen von immunogenen Antigenen für den Fall, dass Antigene geteilt werden) zu identifizieren, erscheint so schwierig, dass dies nicht praktikabel erscheint. Konventionelle Krebstherapien basieren typischerweise auf der Isolierung und Charakterisierung von spezifischen Antigen determinanten, welche dann das Ziel für nachfolgende Immuntherapien werden. Obwohl Studien gezeigt haben, dass

Säugetiere prophylaktisch gegen Tumore, welche von Säugetieren mit dem selben genetischen Hintergrund abgeleitet wurden, geimpft werden können, ist es außerdem bis jetzt noch nicht klar gewesen, dass ein Säugetier, welches einen Tumor hat, therapeutisch mit einer Zusammensetzung immunisiert werden kann, welche von dessen eigenem Tumor abgeleitet worden ist, und zwar auf eine Art und Weise, dass ein Krebs, welcher schon zuvor in dem Säugetier existiert hat, behandelt werden kann.

[0007] Entsprechend ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Verfahren für das therapeutische Inhibieren des weiteren Ausbreitens von Tumoren in einem Säugetier bereitzustellen. Das hier beschriebene Verfahren erfordert nicht das Isolieren und das Charakterisieren von spezifischen Antigen determinanten und stellt somit entsprechend einen schnelleren Ansatz für das Herstellen und das Verwenden von immunogenen Zusammensetzungen bereit, welche effektiv das weitere Ausbreiten von spezifischen vorbestimmten Tumoren in Säugetieren inhibiert.

[0008] Diese und andere Aufgaben und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden anhand der nachfolgenden Beschreibung und den Ansprüchen klar.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die Beobachtung, dass Stressproteine die antigenen Peptide der Zellen, von welchen sie abgeleitet werden, begleiten, ermöglicht einen Ansatz, um antigene Peptide für einen bestimmten Tumor einfach zu isolieren. Die Stressprotein-Peptidkomplexe werden dem Tier, welchem sie entnommen wurden, zurückverabreicht, nachdem sie einmal isoliert wurden, um somit eine Antwort des Immunsystems gegen den bereits existierenden Tumor hervorzurufen. Dieser Ansatz vermeidet entsprechend die Notwendigkeit, spezifische Tumorantigene zu isolieren und zu charakterisieren und versetzt den Fachmann somit in die Lage, auf einfache Art und Weise immunogene Zusammensetzungen herzustellen, welche gegen einen zuvor ausgewählten Tumor effektiv sind.

[0010] Gemäß des breitesten Aspektes der vorliegenden Erfindung, betrifft diese Erfindung ein Verfahren zum Inhibieren des weiteren Ausbreitens eines zuvor ausgewählten Tumores in einem Säugetier. Das Verfahren umfasst das Verabreichen eines pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoffes in Kombination mit einem immunogenen, gereinigten Stressprotein-Peptidkomplex eines Säugetieres an das Säugetier, welches der Therapie unterzogen wird. Dabei wurde der Komplex aus einer Tumorzelle isoliert, welcher dem Säugetier zuvor entnommen wurde, wobei der Komplex dadurch charakterisiert ist, dass er dazu in der Lage ist, im Säugetier eine Immunabwehr gegen die Tumorzellen, aus denen dieser entnommen wurde, hervorzurufen. Der Komplex wird dann, in einem nachfolgenden Schritt, dem Säugetier zurückverabreicht, und zwar in einer Menge, die ausreichend ist, im Säugetier eine Immunantwort gegen die Tumorzellen hervorzurufen, und somit das weitere Ausbreiten von Tumorzellen, welche sich immer noch in dem Säugetier befinden, zu inhibieren.

[0011] Es ist denkbar, dass dieser Ansatz auch in Kombination mit anderen, konventionellen, Krebstherapien verwendet werden kann, welche beispielsweise die Methoden der Chirurgie, der Strahlungstherapie und der Chemotherapie beinhalten. So kann der Fachmann beispielsweise nach einem operativen Entfernen von Krebsgewebe unter Verwendung der hier beschriebenen Prinzipien Stressprotein-Peptidkomplexe aus dem entfernten Gewebe isolieren und den Komplex dem Säugetier zurückverabreichen. Der Komplex induziert in der Folge eine spezifische Immunantwort gegen jede möglicherweise zurückverbliebenen Tumorzellen, welche nicht operativ entfernt wurden. Dieser Ansatz kann auch so abgewandelt werden, dass er in der Krebstherapie eingesetzt werden kann, falls der primäre Tumor Metastasen in verschiedenen Bereichen des Körpers gebildet hat.

[0012] Der Begriff „Tumor“, wie er vorliegend verwendet wird, ist so zu verstehen, dass damit jedes abnormale oder unkontrollierte Wachstum von Zellen gemeint ist, welches in eine Invasion in normales Zellgewebe resultieren kann. Es ist auch denkbar, dass dieser Begriff abnormales oder unkontrolliertes Wachstum von Zellen betrifft, welche Metastasen gebildet haben, d.h. abnormale Zellen, welche sich von ihrem primären Ort im Körper (d.h. dem primären Tumor) zu einem sekundären Ort ausgebreitet haben, welcher räumlich vom primären Tumor entfernt ist.

[0013] Der Begriff „Stressprotein“, so wie er hier verwendet wird, ist so zu verstehen, dass dieser ein jedes zelluläres Protein betrifft, welches die folgenden Kriterien erfüllt. Es ist ein Protein, dessen intrazelluläre Konzentration zunimmt, wenn eine Zelle einem Stress-Stimulus ausgesetzt ist; welches dazu in der Lage ist, andere Proteine oder Peptide zu binden und welches dazu in der Lage ist, die gebundenen Proteine oder Peptide in der Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und/oder geringem pH freizusetzen. Stress-Stimuli sind bei-

spielsweise Hitzeschock, bei Entzug von Nährstoffen, Störung des Stoffwechsels, Sauerstoffradikale oder Infektion mit intrazellulären Pathogenen, ohne hierauf beschränkt zu sein.

[0014] Die ersten Stressproteine, welche identifiziert wurden, waren die Hitzeschockproteine (Hsp's). Wie ihr Name bereits suggeriert, werden Hsp's typischerweise von einer Zelle in Antwort auf einen Hitzeschock induziert. Drei wesentliche Familien von Säugetier Hsp wurden bis heute identifiziert und umfassen Hsp60, Hsp70 und Hsp90. Die Zahlenwerte stellen das ungefähre Molekulargewicht der Stressproteine in Kilodaltons dar. Die Mitglieder einer jeder dieser Familien werden stark konserviert, siehe beispielsweise Bardwell et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:848-852; Hickey et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9:2615-2626; Jindal (1989) Mol. Cell. Biol. 9:2279-2283, deren Offenbarung vorliegend durch Verweis mit eingeschlossen ist. Mitglieder der Säugetier-Hsp90-Familie, welche bis heute identifiziert wurden, schließen zytosolisches Hsp90 (auch als Hsp83 bekannt) und das Gegenstück betreffend das endoplasmatische Retikulum, Hsp90 (auch als Hsp23 bekannt), Hsp87, Grp94 (auch als ERp99 bekannt) und gp96 ein. Siehe beispielsweise Gething et al. (1992) Nature 355:33-45, dessen Offenbarung vorliegend durch Verweis Bestandteil dieser Offenbarung wird. Mitglieder der Hsp70-Familie, welche bis heute identifiziert sind, schließen ein: Zytosolisches Hsp70 (auch bekannt als p73) und Hsc70 (auch bekannt als p72); das das endoplasmatische Retikulum betreffende Gegenstück BiP (auch bekannt als Grp78); sowie das das Mitochondrium betreffende Gegenstück Hsp 70 (auch bekannt als Grp75), Gething et al. (1992) supra. Bis heute wurden Mitglieder der Säugetier-Hsp60-Familie nur in den Mitochondrien identifiziert, Gething et al. (1992) supra.

[0015] Zusätzlich wurde entdeckt, dass die Hsp-60-, Hsp-70- und Hsp-90-Familien aus Proteinen zusammengesetzt sind, welche bezüglich ihrer Aminosäuresequenz den Stressproteinen verwandt sind und beispielsweise eine Aminosäureidentität von größer als 35% aufweisen, deren Expressions-Niveaus aber nicht durch Stimulus mit Stress geändert werden. Entsprechend ist es denkbar, dass die Definition von Stressproteinen, wie sie hier verwendet wird, auch andere Proteine, Muteine, Analoge und Varianten hiervon umfasst, welche zumindest 35% bis 55%, vorzugsweise 55% bis 75%, und am meisten bevorzugt 75% bis 85% Aminosäureidentität mit Mitgliedern der drei Familien aufweisen, deren Expressions-Niveaus in einer Zelle in Antwort auf einen Stimulus mit Stress stimuliert werden.

[0016] Der Begriff "Peptid", so wie er vorliegend verwendet wird, soll so verstanden werden, dass er eine jede Aminosäuresequenz bedeutet, welche aus einer Tumorzelle eines Säugetieres in der Form eines Stressprotein-Peptidkomplexes isoliert wird.

[0017] Der Begriff "immunogener Stressprotein-Peptidkomplex", so wie er hier verwendet wird, ist so zu verstehen, dass dieser einen jeden Komplex meint, welcher aus einer Tumorzelle eines Säugetieres isoliert werden kann, und welcher ein Stressprotein umfasst, welches nicht kovalent mit einem Peptid assoziiert ist. Der Komplex ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass er so eingesetzt werden kann, dass er im Säugetier eine Immunantwort gegen die Tumorzellen, aus welchen der Komplex abgeleitet wurde, induzieren kann.

[0018] Der Begriff "Immunantwort" ist so zu verstehen, dass dieser einen jeden zellulären Prozess meint, der in dem Säugetier als Antwort auf die Stimulation mit einem Antigen erzeugt wird, und darauf ausgerichtet ist, dass das Antigen aus dem Säugetier eliminiert wird. Die Immunantwort wird typischerweise durch eine oder mehrere Zellpopulationen vermittelt, welche dadurch charakterisiert ist, dass sie lymphozytärer und/oder phagozytärer Natur ist.

[0019] Gemäß eines spezielleren Aspektes der vorliegenden Erfindung, ist das Stressprotein im Stressprotein-Peptidkomplex aus der Gruppe bestehend aus Hsp70, Hsp90 und gp96 ausgewählt. Stressprotein-Peptidkomplexe, welche Hsp70-Peptid-, Hsp90-Peptid- und gp96-Peptidkomplexe beinhalten, können simultan aus einem Ansatz an Tumorzellen isoliert werden, welches einem Säugetier entnommen wurde. Es ist denkbar, dass während der Immunotherapie dem Säugetier einer oder mehrere der zuvor genannten Komplexe verabreicht werden können, um die optimale Immunantwort gegen den Tumor zu stimulieren.

[0020] Es ist denkbar, dass das hier beschriebene Verfahren besonders nützlich für die Behandlung von menschlichem Krebs ist. Es ist jedoch denkbar, dass die hier beschriebenen Verfahren genauso gut für die Immunotherapie in anderen Tieren, beispielsweise in Nutztieren (beispielsweise Rinder, Pferde, Ziegen, Schafe und Schweine) und Haustieren (beispielsweise Katzen und Hunden) nützlich sind.

[0021] Gemäß eines anderen Aspektes der vorliegenden Erfindung ist es denkbar, dass die Immunantwort mit Hilfe einer T-Zellen-Kaskade bewirkt wird, sowie weiter spezifisch mit Hilfe einer zytotoxischen T-Zellen-Kaskade. Der Begriff "zytotoxische T-Zelle", so wie er hier verwendet wird, ist so zu verstehen, dass dieser

eine jede T-Lymphozyte meint, welche den Zelloberflächen-Glykoprotein-Marker CD8 exprimiert, welcher dazu in der Lage ist, eine Target-Zelle aufzufinden und aufzulösen, welche einen Histokompatibilitätskomplex der Klasse I auf der Zelloberfläche aufweist und mit einem intrazellulären Pathogen infiziert ist.

[0022] Gemäß eines anderen Aspektes der vorliegenden Erfindung können die Stressprotein-Peptidkomplexe dem Säugetier in Kombination mit einer therapeutisch aktiven Menge an Cytokin verabreicht werden. So wie der Begriff "Cytokin" vorliegend verwendet wird, betrifft dieser ein jedes abgeschiedenes Polypeptid, welches die Funktion von anderen Zellen beeinflusst, welche eine Immunantwort vermitteln. Entsprechend ist es denkbar, dass der Komplex gemeinsam mit einem Cytokin verabreicht wird, um die Immunantwort, welche gegen den Tumor gerichtet ist, zu erhöhen. Bevorzugte Cytokine schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-9 (IL-9), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-12 (IL-12), Interferon α (IFN α), Interferon β (IFN β), Interferon γ (IFN γ), Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α), Tumor-Nekrosefaktor β (TNF β), Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten/Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor (GM-CSF) sowie transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β).

[0023] Der Komplex kann einem Säugetier unter Verwendung aller Techniken, welche dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden, wenn dieser mit einem konventionellen pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff, Hilfsmittel oder Arzneimittelträger kombiniert wird. Die Dosierung und die Verabreichungsformen der Familie von Stressprotein-Peptidkomplexen wird notwendigerweise von einer Vielzahl von Faktoren abhängen, so wie beispielsweise der Stabilität des Komplexes unter physiologischen Bedingungen, der Effektivität des Komplexes in Bezug darauf, eine Immunantwort hervorzurufen, die Größe und die Verteilung des Tumors sowie das Alter, Geschlecht und Gewicht des Säugetieres, welches der Therapie unterzogen wird.

[0024] Typischerweise sollte der Komplex in einer Menge verabreicht werden, welche dazu ausreicht, im Säugetier eine Immunantwort gegen den Tumor, aus welchem der Komplex abgeleitet wurde, zu initiieren, sowie in einer Menge, welche ausreicht, das weitere Ausbreiten von Tumorzellen im Säugetier zu inhibieren. Die Menge an Stressprotein-Peptidkomplex, welche verabreicht wird, liegt vorzugsweise in dem Bereich von ungefähr 1-1000 Mikrogramm an Komplex pro Kilogramm Körpergewicht des Säugetieres pro Verabreichung, und am meisten bevorzugt im Bereich von ungefähr 100-250 Mikrogramm pro Komplex pro Kilogramm Körpergewicht des Säugetieres pro Verabreichung. Es ist denkbar, dass typische Dosierungen in dem Bereich von ungefähr 5 bis zu ungefähr 20 mg für ein menschliches Subjekt liegen sollten, welches ungefähr 75 kg wiegt. Zusätzlich ist es denkbar, dass die Stärke der Immunantwort dadurch verstärkt wird, dass der Komplex dem Individuum wiederholt verabreicht wird. Dabei erhält das Säugetier vorzugsweise zumindest zwei Dosen des Stressprotein-Peptidkomplexes in wöchentlichen Abständen. Notwendigenfalls kann die Immunantwort zu einem späteren Zeitpunkt durch eine zusätzliche Verabreichung des Komplexes aufgefrischt werden. Es ist jedoch denkbar, dass die optimale Dosierung und der optimale Immunisierungsbereich durch Routineexperimente, wie sie vom Fachmann durchgeführt werden, aufgefunden werden kann.

Detaillierte Beschreibung

[0025] Die Erfindung basiert auf der Beobachtung, dass Stressprotein-Peptidkomplexe antigene Peptide der Zellen, von welchen sie abgeleitet wurden, begleiten. Konventionelle Krebstherapien basieren auf der Isolierung und Charakterisierung von tumorspezifischen Antigenen, welche dann das Ziel für eine spezifische therapeutische Behandlung werden. Wegen der Diversität von Krebs in Säugetieren in Bezug auf Antigene kann das Isolieren und das Charakterisieren von spezifischen Tumorantigenen für einen jeden spezifischen Tumor impraktikabel werden. Die vorliegende Erfindung stellt deshalb eine alternative Herangehensweise zur Krebsimmunotherapie dar, welche die Notwendigkeit des Isolierens und Charakterisierens von tumorspezifischen Antigenen für einen jeden Tumor, der behandelt wird, überflüssig macht.

[0026] Die vorliegend beschriebene Erfindung betrifft ein Verfahren zum Verhindern des weiteren Verbreitens eines vorher ausgewählten Tumors in einem Säugetier. Das Verfahren umfasst das Isolieren oder Erhalten von Tumorzellen aus einem Säugetier, welches einer Behandlung unterzogen wird. Dies wird dadurch einfach erreicht, dass konventionelle chirurgische Verfahren, welche dem Fachmann wohl vertraut sind, eingesetzt werden. Typischerweise werden dem Säugetier Tumorzellen während des routinemäßigen operativen Zurückschneidens des Tumors entnommen. Das Verfahren beinhaltet dann das Isolieren von Stressprotein-Peptidkomplexen aus den entfernten Tumorzellen. Dies wird durch Verwenden eines jeden der unten im Detail beschriebenen Isolierverfahren erreicht. Die Stressprotein-Peptidkomplexe sind dadurch gekennzeichnet, dass sie, wenn sie dem Säugetier zurückverabreicht werden, dazu in der Lage sind, eine spezifische Immunantwort

gegen die selbe Art von Tumorzellen zu initiieren, aus welcher sie abgeleitet wurden. Schließlich umfasst das Verfahren den Schritt, dass die isolierten Stressprotein-Peptidkomplexe in einer Menge dem Säugetier zurückverabreicht werden, die ausreichend ist, um in dem Säugetier eine Immunantwort gegen die Tumorzellen zu erzeugen, wodurch das weitere Verbreiten von Tumorzellen, welche im Säugetier verblieben sind, zu inhibieren.

[0027] Es ist denkbar, dass dieser Ansatz in Kombination mit einer oder mehrerer konventionellen Krebstherapien eingesetzt werden, welche beispielsweise beinhalten, operative Eingriffe, Strahlungstherapie und Chemotherapie. So kann der Fachmann beispielsweise in der Folge eines operativen Entfernens von Krebsgewebe unter Verwendung der hier beschriebenen Prinzipien, den Stressprotein-Peptidkomplex aus dem entfernten Gewebe isolieren und den Komplex dem Säugetier zurückverabreichen. Der Komplex induziert dann im Säugetier eine spezifische Immunantwort gegen diejenigen Tumorzellen, die während der Operation nicht entfernt wurden. Alternativ stellt das hier beschriebene Verfahren einen neuen Ansatz für die Behandlung von Krebs für den Fall dar, dass der primäre Tumor an mehreren Stellen des Körpers Metastasen gebildet hat. So kann beispielsweise ein Stressprotein-Peptidkomplex entweder alleine oder in Kombination mit einem standardmäßig verwendeten Chemotherapeutikum zur Behandlung des Krebses eingesetzt werden, wenn der Krebs Metastasen gebildet hat, und somit eine chirurgische Intervention impraktikabel erscheint.

[0028] Es ist denkbar, dass die vorliegende Erfindung von besonderem Nutzen für die Immunotherapie von menschlichem Krebs ist, es ist jedoch auch denkbar, dass die hier beschriebenen Verfahren zur Behandlung von Krebs eingesetzt werden können, wie er beispielsweise in Nutztieren (beispielsweise Rinder, Pferde, Schafe, Ziegen und Schweine) und Haustieren (beispielsweise Katzen und Hunden) auftritt.

[0029] Der Hauptvorteil, den dieser Ansatz gegenüber konventionellen Methoden aufweist, besteht darin, dass es nicht notwendig ist, tumorspezifische Antigene für jeden Tumor zu isolieren und zu charakterisieren. Wenn der Stressprotein-Peptidkomplex einmal isoliert wurde, wird dieser einfach ohne weitere Charakterisierung dem Säugetier zurück verabreicht. Da die Prozeduren zum Isolieren der immunogenen Komplexe Routine sind und dem Fachmann wohl bekannt sind, kann der Fachmann schnell und auf einer routinemäßigen Basis eine spezifische immunogene Zusammensetzung für jedes Individuum, welches behandelt wird, "maßschneidern".

[0030] Ein weiterer Vorteil des vorliegenden Verfahrens gegenüber früheren Methoden besteht darin, dass das Zurückverabreichen von gereinigten Stressprotein-Peptidkomplexen an das Individuum, von welchem sie abgeleitet wurden, das Risiko des Beimpfens des Säugetieres, welches der Therapie unterzogen wird, mit Stoffen, welche möglicherweise eine transformierende Wirkung haben (beispielsweise transformierende DNA) und/oder mit immunosuppressiven Agentien, welche ein Problem sein können wenn der Komplex in einem biochemisch undefinierten Tumor oder Tumorextrakt vorliegt, ausschaltet. Zusätzlich können Stressprotein-Peptidkomplexe auch in Abwesenheit von Hilfsstoffen eine signifikante Immunität gegen Tumore induzieren. Entsprechend ist die Verfügbarkeit von Hilfsstoffen, welche gegebenenfalls die immunotherapeutischen Eigenschaften des Komplexes weiter verbessern können, keine Vorbedingung um eine signifikante Immunantwort zu induzieren.

[0031] Es ist denkbar, dass die vorliegende Methode in der Behandlung einer Vielzahl von Tumoren eingesetzt werden kann, beispielsweise für Tumore, die mesenchymen Ursprunges sind (Sarkoma), beispielsweise Fibrosarkom, Myxosarkom, Liposarkom, chondroblastisches Sarkom, osteogenes Sarkom, Angiosarkom, Endotheliom, Lymphangiosarkom, Synovialsarkom, Mesotheliosarkom, Ewing-Sarkom, myelogene Leukämie, monozytäre Leukämie, bösartiges Lymphom, lymphozytäre Leukämie, Plasmozytom, Leiomyosarkom und Rhabdomyosarkom.

[0032] Zusätzlich ist es denkbar, dass dieses Verfahren in der Behandlung von Tumoren eingesetzt werden kann, die ihren Ursprung im Epithel haben (Karzinome), so wie beispielsweise schuppenartige Zellen oder epidermale Karzinome, Basalzellenkarzinome, Schweißdrüsenkarzinome, Talgdrüsenkarzinome, Adenokarzinome, papillare Karzinome, papillare Adenokarzinome, Cystadenokarzinome, medullare Karzinome, undifferenzierte Karzinome (Simplexkarzinome), bronchiogene Karzinome, bronchiale Karzinome, Melanokarzinome, Nierenzellenkarzinome, heptazelluläre Karzinome, Gallenwegskarzinome, papillare Karzinome, Übergangszellenkarzinome, schuppenartige Zellenkarzinome, Chorionkarzinome, Seminome, embryonale Karzinome, bösartige Teratome und Teratokarzinome. Generische Verfahren, welche in der Herstellung von Zusammensetzungen nützlich sind, die effektiv sind, um eine Immunantwort gegen diese Tumoren zu induzieren, werden vorliegend weiter unter im Detail diskutiert.

[0033] Ohne zu wünschen, an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, ist es denkbar, dass die Stressprotein-Peptidkomplexe eine Immunantwort gegen die Tumorzellen stimulieren, aus welchen sie gewonnen wurden mit Hilfe einer T-Zellen-Kaskade. Frühere Experimente haben gezeigt, dass Mäuse, welche prophylaktisch mit Stressprotein-Peptidzusammensetzungen immunisiert wurden, welche aus einem Tumor abgeleitet wurden, der derselben Linie von Mäusen oder Ratten seinen Ursprung hat, eine immunologische Resistenz gegen den Tumor entwickeln, aus welchem diese isoliert wurden. Andererseits entwickeln die Mäuse jedoch keine Immunität gegen Tumore, welche bezüglich der Antigene verschieden sind. Weiterhin rufen Stressprotein-Peptidkomplexe, welche aus normalem Gewebe gewonnen wurden, keine Resistenz gegen irgendeinen der getesteten Tumore hervor. Siehe beispielsweise Srivastava et al. (1984) *Int. J. Cancer* 33:417; Srivastava et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3407; Palladino et al. (1987) *Cancer Res.* 47:5074; Feldweg et al. (1993) *J. Cell Biochem. Suppl.* 17D:108 (Abst.); Udono et al. (1993) *J. Cell. Biochem. Suppl.* 17D:113 und Udono (1993) *J. Exp. Med.* 178:1391-1396. Es wurde jüngst gezeigt, dass prophylaktische Immunität typischerweise mit Hilfe einer T-Zellenkaskade bewirkt wird, spezifischer durch eine zytotoxische T-Zellenkaskade. Siehe beispielsweise Blachere et al. (1993) *J. Immunother.* 14:352-356. Entsprechend ist es denkbar, dass die Stressprotein Komplexe ihren therapeutischen Effekt mit Hilfe eines ähnlichen Mechanismus bewirken, ganz spezifisch über eine zytotoxische T-Zellenkaskade.

[0034] Es ist denkbar, dass die Stressproteine-Peptidkomplexe typischerweise direkt aus dem Tumorgewebe isoliert werden, welches dem zu behandelnden Säugetier entnommen wurde. Unter bestimmten Umständen kann jedoch die Menge an verfügbarem Tumorgewebe für die Isolation des Komplexes limitiert sein. Entsprechend ist es denkbar, dass entnommene Tumorgewebe unter Verwendung von dem Fachmann wohlbekanntesten Techniken zur Isolierung des Stressprotein-Peptidkomplexes vermehrt werden. Beispielsweise kann entnommenes Tumorgewebe entweder *in vivo* vermehrt werden, beispielsweise durch Transfizieren einer nackten Maus mit einer Probe des Tumorgewebes, oder *in vitro* beispielsweise durch serielles Verarbeiten der Tumorzellen in Kulturen. Die vermehrten Tumorzellen können anschließend geerntet und als Startmaterial für die Isolierung des Stressprotein-Peptidkomplexes verwendet werden.

[0035] Stressproteine, welche in der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können definiert werden als ein jedes zelluläres Protein, welches die folgenden Bedingungen erfüllt: Es ist ein Protein, dessen intrazelluläre Konzentration sich erhöht, wenn eine Zelle einem Stress-Stimulus ausgesetzt wird. Es ist weiterhin fähig, andere Proteine oder Peptide anzubinden und es ist fähig, die gebundenen Proteine oder Peptide in der Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) oder bei einem geringen pH freizusetzen.

[0036] Die ersten Stressproteine, welche identifiziert wurden, waren die Hsp's, welche in einer Zelle als Antwort auf einen Hitzeschock synthetisiert werden. Bis heute sind drei wesentliche Familien an Säugetier-Hsp bekannt, welche identifiziert wurden und welche Hsp60, Hsp70 und Hsp90 beinhalten, wobei die Zahlenwerte das ungefähre Molekulargewicht der Stressproteine in Kilodalton angeben. Für viele Mitglieder dieser Familie wurde später aufgefunden, dass diese auch in Antwort auf andere Stress-Stimuli induziert werden können, beispielsweise durch, ohne hierauf begrenzt zu sein, Zurückhalten von Nährstoffen, Stören des Stoffwechsels, Sauerstoffradikale und Infektion mit intrazellulären Pathogenen. Siehe beispielsweise Welch (Mai 1993) *Scientific American* 56-64; Young (1990) *supra*; Craig (1993) *Science* 260:1902-1903; Gething et al. (1992) *supra*; und Lindquist et al. (1988) *supra*, deren Offenbarung vorliegend durch Verweis Bestandteil dieser Offenbarung ist. Es ist denkbar, dass Säugetier-Stressproteine, welche zu allen drei Familien gehören, in der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützlich sein können.

[0037] Die wesentlichen Stressproteine sammeln sich in sehr hohen Mengen in gestressten Zellen an, liegen aber auch bei geringen oder mittleren Konzentrationen in Zellen vor, die keinem Stress ausgesetzt wurden. Beispielsweise ist das hochinduzierbare Säugetier-Hsp70 bei normalen Temperaturen kaum nachweisbar, wird aber eines der am meisten aktiv synthetisierten Proteine in der Zelle, wenn diese einem Hitzeschock ausgesetzt wird (Welch et al. (1985), *J. Cell. Biol.* 101:1198-1211). Im Gegensatz hierzu sind Hsp90- und Hsp60-Proteine bei Normaltemperaturen sehr häufig in den meisten, aber nicht in allen, Säugetierzellen und können durch Hitze noch weiter induziert werden (Lai et al. (1984), *Mol. Cell. Biol.* 4:2802-10; van Bergen en Henegouwen et al. (1987), *Genes Dev.*, 1:525-31).

[0038] Mitglieder der Säugetier-Hsp90-Familie, welche bis zum heutigen Datum identifiziert wurden, beinhalten zytosolisches Hsp90 (auch bekannt als Hsp83) und die das endoplasmatische Retikulum betreffende Gegenstücke Hsp90 (auch bekannt als Hsp83), Hsp87, Grp94 (auch bekannt als ERp99) und gp96 (Gething et al. (1992) *supra*). Mitglieder der Hsp70-Familie, welche bis zum heutigen Datum identifiziert wurden, schließen ein: Zytosolisches Hsp70 (auch bekannt als p73) und Hsc70 (auch bekannt als p72), das das endoplasmatische Retikulum betreffende Gegenstück BiP (auch bekannt als Grp78) und das Mitochondrien-Gegenstück

Hsp70 (auch bekannt als Grp75), Gething et al. (1992) supra. Bis heute wurden Mitglieder der Säuger-Hsp60-Familie nur in den Mitochondrien identifiziert, Gething et al. (1992) supra.

[0039] Stressproteine gehören zu denjenigen existierenden Proteinen, welche am meisten konserviert sind. So hat beispielsweise DnaK, das Hsp70 aus *E. coli*, eine ungefähr 50 %ige Aminosäuresequenzidentität mit Hsp70-Proteinen aus Eukaryoten (Bardwell et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:848-852). Die Hsp60- und die Hsp90-Familien zeigen in ähnlicher Art und Weise ein hohes Niveau an intrafamiliärer Beständigkeit (Hickey et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9:2615-2626; Jindal (1989) Mol. Cell. Biol. 9:2279-2283). Zusätzlich wurde entdeckt, dass die Hsp60-, Hsp70- und Hsp90-Familien aus Proteinen zusammengesetzt sind, welche in Bezug auf ihre Sequenz den Stressproteinen verwandt sind, beispielsweise dadurch, dass sie eine Aminosäureidentität haben, die größer ist als 35%, wobei aber deren Expressionsniveau nicht durch Stress verändert wird. Deshalb ist es denkbar, dass die Definition von Stressproteinen so wie sie hier verwendet wird, andere Proteine, Muteine, Analoge und Varianten hiervon umfasst, welche zumindest 35 % bis 50 %, vorzugsweise 55 % bis 75 % und am meisten bevorzugt 75 % bis 85 % an Aminosäureidentität mit Mitgliedern der drei Familien aufweisen, deren Expressionsniveaus in einer Zelle in Antwort auf einen Stress-Stimulus erhöht sind.

[0040] Die immunogenen Stressprotein-Peptidkomplexe der vorliegenden Erfindung können einen jeden Komplex beinhalten, welcher ein Stressprotein enthält, welches nicht kovalent mit einem Peptid assoziiert ist, welcher dazu in der Lage ist, eine Immunantwort in einem Säugetier zu induzieren. Bevorzugte Komplexe beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Hsp70-Peptid-, Hsp90-Peptid- und gp96-Peptidkomplexe. Beispielsweise kann das Säugetier-Stressprotein gp96, welches das Gegenstück zu zytosolischem Hsp90 bezüglich des endoplasmatischen Retikulums ist, in Anwendung der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0041] Typische Prozeduren zum Isolieren von Stressprotein-Peptidkomplexen, welche in der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind im Folgenden in Detail angegeben.

Reinigung von Hsp70-Peptidkomplexen

[0042] Die Reinigung von Hsp70-Peptidkomplexen wurde bereits früher beschrieben, siehe beispielsweise Udono et al. (1993) supra.

[0043] Zu Beginn werden die Tumorzellen in drei Volumina eines 1X Lysispuffers bestehend aus 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH7), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) suspendiert. Dann wird der Niederschlag (Pellet) auf Eis Ultraschall ausgesetzt, bis > 99 % der Zellen aufgelöst (lysed) sind, wie mit Hilfe mikroskopischer Beobachtung bestimmt wird. Alternativ zum Ultraschallverfahren können die Zellen auch durch mechanisches Zerschlagen aufgelöst werden, wobei bei diesem Ansatz die Zellen typischerweise in 30 mM Natriumbicarbonat pH 7.5, 1 mM PMSF resuspendiert werden und auf Eis für 20 Min. inkubiert und dann in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert werden bis > 95 % der Zellen aufgelöst sind.

[0044] Anschließend wird das Lysat bei 1000 G für 10 Min. zentrifugiert, um nicht aufgebrochene Zellen, Kerne und zellulären Überschuss zu entfernen. Der resultierende Überstand wird bei 100.000 G für 90 Min. rezentrifugiert, der Überstand dann gesammelt und mit Con A-Sepharose gemixt, welches mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) enthaltend 2 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺ ins Gleichgewicht gebracht ist. Für den Fall, dass die Zellen durch mechanische Einwirkung aufgelöst werden, wird der Überstand vor dem Mischen mit Con A-Sepharose mit gleichen Volumina von 2X Lysispuffer verdünnt. Dem Überstand wird es dann erlaubt, über den Zeitraum von 2-3 Stunden bei 4°C an die Con A-Sepharose anzubinden. Das Material, welches nicht anbindet, wird geerntet und für den Zeitraum von 36 Stunden einer Dialyse ausgesetzt (dreimal, 100 Volumina jedesmal), und zwar gegen 10 mM Tris-Azetat pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 mM PMSF. Anschließend wird das Dialysat bei 17.000 rpm (Sorvall SS34 Rotor) zentrifugiert, und zwar für 20 Min. Anschließend wird der resultierende Überstand geerntet und auf eine Mono-Q-FPLC-Kolonnen, welche mit 20 mM Tris-Azetat pH 7.5, 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol im Gleichgewicht befindlich ist, aufgebracht. Die Kolonne wird dann mit einem Gradienten von 20 mM bis 500 mM an NaCl entwickelt und die eluierten Fraktionen werden mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Electrophorese (SDS-PAGE) fraktioniert sowie durch Immunoblotting charakterisiert, und zwar unter Verwendung eines geeigneten anti-Hsp70-Antikörpers (sowie beispielsweise clone N27F3-4 von StressGen).

[0045] Fraktionen, welche stark immunoreaktiv in Bezug auf den anti-Hsp70-Antikörper sind, werden zusammengeführt, und die Hsp70-Peptidkomplexe werden mit Ammoniumsulfat ausgefällt, ganz speziell mit einem 50 %-70 Ammoniumsulfatschnitt. Das hieraus resultierende Ausfällungsprodukt wird dann geerntet, und zwar

durch Zentrifugieren bei 17.000 rpm (SS34 Sorvall Rotor), und wird mit 70% Ammoniumsulfat gewaschen. Das gewaschene Ausfällungsprodukt wird dann löslich gemacht und alles verbleibende Ammoniumsulfat wird mit Hilfe von Gelfiltration auf einer Sephadex^R G25-Kolonnen (Pharmacia) entfernt.

[0046] Der Hsp70-Peptidkomplex kann bis zur offensichtlichen Homogenität unter Verwendung dieser Methode aufgereinigt werden. Typischerweise kann 1 mg an Hsp70-Peptidkomplex in reiner Form aus 1 g an Zellen/Gewebe gewonnen werden.

Reinigung von Hsp90-Peptidkomplexen

[0047] Zu Beginn werden die Tumorzellen in drei Volumina eines 1X Lysispuffers bestehend aus 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) suspendiert. Dann wird der Niederschlag (Pellet) auf Eis Ultraschall ausgesetzt, bis > 99 % der Zellen aufgelöst (lysed) sind, wie mit Hilfe mikroskopischer Beobachtung bestimmt wird. Alternativ zum Ultraschallverfahren können die Zellen auch durch mechanisches Zerschlagen aufgelöst werden, wobei bei diesem Ansatz die Zellen typischerweise in 30 mM Natriumbicarbonat pH 7.5, 1 mM PMSF resuspendiert werden und auf Eis für 20 Min. inkubiert und dann in einen Dounce-Homogenisator homogenisiert werden bis > 95 % der Zellen aufgelöst sind.

[0048] Anschließend wird das Lysat bei 1000 G für 10 Minuten zentrifugiert, um nicht aufgebrochene Zellen, Kerne und anderen zellulären Überschuss zu entfernen. Der resultierende Überstand wird bei 100.000 G für 90 Minuten rezentrifugiert, der Überstand dann geerntet und mit Con A-Sepharose gemischt, welche mit PBS, enthaltend 2 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺, ins Gleichgewicht gebracht ist. Für den Fall, dass die Zellen durch mechanisches Aufschlagen aufgelöst werden, wird der Überstand vor dem Mischen mit Con A-Sepharose mit gleichen Volumina an 2X Lysispuffern verdünnt. Dem Überstand wird es dann erlaubt, an die Con A-Sepharose für 2-3 Stunden bei 4°C anzubinden. Das Material, welches nicht anbindet, wird geerntet und für den Zeitraum von 36 Stunden (dreimal, 100 Volumina jedesmal) der Dialyse gegen 10 mM Tris-Azetat pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 mM PMSF ausgesetzt. Anschließend wird das Dialysat bei 17.000 rpm (Sorvall SS34 Rotor) zentrifugiert, und zwar für 20 Min. Dann wird der resultierende Überstand geerntet und auf eine Mono-Q-FPLC-Kolonnen aufgebracht, welche mit einem Lysispuffer ins Gleichgewicht gebracht ist. Die Proteine werden dann eluiert, und zwar unter Verwendung eines Salzgradienten von 200 mM bis 600 mM an NaCl.

[0049] Die eluierten Fraktionen werden dann mit Hilfe von SDS-PAGE fraktioniert, und Fraktionen, welche die Hsp90-Peptidkomplexe enthalten, werden mit Hilfe von Immunoblotting unter Verwendung eines anti-Hsp90-Antikörpers, so wie beispielsweise 3G3 (Affinity Bioreagents), identifiziert. Unter Verwendung dieser Methode können Hsp90-Peptidkomplexe bis hin zur offensichtlichen Homogenität aufgereinigt werden. Typischerweise können 150-200 µg an Hsp90-Peptidkomplexen auf diese Art und Weise aus 1 g an Zellen/Gewebe gereinigt gewonnen werden.

Reinigung von gp96-Peptidkomplexen

[0050] Zu Beginn werden die Tumorzellen in drei Volumina eines 1X Lysispuffers bestehend aus 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) suspendiert. Dann wird der Niederschlag (Pellet) auf Eis Ultraschall ausgesetzt, bis > 99 % der Zellen aufgelöst (lysed) sind, wie mit Hilfe mikroskopischer Beobachtung bestimmt wird. Alternativ zum Ultraschallverfahren können die Zellen auch durch mechanisches Zerschlagen aufgelöst werden, wobei bei diesem Ansatz die Zellen typischerweise in 30 mM Natriumbicarbonat pH 7.5, 1 mM PMSF resuspendiert werden und auf Eis für 20 Min. inkubiert und dann in einen Dounce-Homogenisator homogenisiert werden bis > 95 % der Zellen aufgelöst sind.

[0051] Anschließend wird das Lysat bei 1000 G für 10 Minuten zentrifugiert, um nicht aufgebrochene Zellen, Kerne und andere zelluläre Rückstände zu entfernen. Der resultierende Überstand wird bei 100.000 G für 90 Minuten rezentrifugiert, der Überstand anschließend geerntet und mit Con A-Sepharose gemischt, wobei diese als Aufschlammung vorliegt, welche mit PBS, enthaltend 2 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺, im Gleichgewicht befindlich ist. Für den Fall, dass die Zellen durch mechanisches Aufschlagen aufgelöst werden, wird der Überstand vor dem Mischen mit Con A-Sepharose mit gleichen Volumina von 2X Lysispuffer verdünnt. Dem Überstand wird es dann erlaubt, an Con A Sepharose über den Zeitraum von 2-3 Stunden bei 4°C anzubinden. Die Aufschlammung wird dann in eine Kolonne gepackt und mit 1X Lysispuffer gewaschen, bis der OD₂₈₀ auf die Grundlinie fällt. Anschließend wird die Kolonne mit 10% α-Methylmannosid (α-MM) mit einem Volumen entsprechend dem 1/2 Kolonnenbett gewaschen. Die Kolonne wird mit Parafilm versiegelt und bei 37°C für 15

Min. inkubiert. Die Kolonne wird anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, der Parafilm wird vom Boden der Kolonne entfernt und es werden 5 Kolonnen Volumina an α -MM der Kolonne aufgegeben. Das Eluat wird dann fraktioniert und mit Hilfe von SDS-PAGE charakterisiert. Typischerweise ist der resultierende gp96-Peptidkomplex ungefähr 60 bis 95% rein, jeweils abhängig vom Zelltyp und dem Verhältnis an Gewebe zu Lysis-puffer, welches eingesetzt wird.

[0052] Im Fall, dass weitere Aufreinigung erforderlich ist, kann die Probe auf eine Mono-Q-FPLC-Kolonne aufgegeben werden, wobei diese mit einem Puffer ins Gleichgewicht gebracht ist, welcher 5 mM Natriumphosphat bei einem pH-Wert von 7 enthält. Die Proteine werden dann aus der Kolonne mit einem 0-1 M NaCl-Gradienten eluiert. Die gp96-Fraktion eluiert zwischen 400 mM und 550 mM NaCl.

[0053] In einer alternativen Verfahrensweise kann die gp96-Fraktion, welche aus dem 100.000 G Niederschlag isoliert wurde, in 5 Volumina an PBS resuspendiert werden, wobei dieses 1 % Natriumdeoxycholat (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) enthält, und auf Eis für 1 Stunde inkubiert wird. Die resultierende Suspension wird für den Zeitraum von 30 Min. bei 20.000 G zentrifugiert und der resultierende Überstand wird geerntet und der Dialyse mit verschiedenen Wechsellängern an PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) der Dialyse ausgesetzt um die Detergentien zu entfernen. Das resultierende Dialysat wird für den Zeitraum von 90 Min. bei 100.000 G zentrifugiert und der Überstand wird weiter aufgereinigt. Dann werden sowohl Calcium als auch Magnesium dem Überstand zugefügt, um die endgültige Konzentration von 2 mM zu erhalten. Anschließend wird die Probe auf eine Mono-Q-HPLC-Kolonne aufgegeben, wobei diese mit einem Puffer, der 5 mM Natriumphosphat bei pH = 7 enthält, ins Gleichgewicht gebracht ist. Dann werden die Proteine mit einem 0-1 M NaCl-Gradienten eluiert. Die gp96-Fraktion eluiert zwischen 400 mM und 550 mM NaCl.

[0054] Die gp96-Peptidkomplexe können unter Verwendung dieser Prozedur bis hin zur offensichtlichen Homogenität aufgereinigt werden. Typischerweise können unter Verwendung dieses Verfahrens ungefähr 10-20 μg an gp96 aus 1 g an Zellen/Gewebe isoliert werden.

Formulierung und Verabreichung der Komplexe

[0055] Sind die Stressprotein-Peptidkomplexe einmal aus dem entfernten Tumor aufgereinigt worden, so werden sie dem Säugetier, welches der Behandlung unterzogen wird, zurückverabreicht, um im Säugetier eine Immunantwort gegen die Tumorzellen, aus welchen der Komplex isoliert wurde, zu stimulieren. Die Stressprotein-Peptidkomplexe gemäß der vorliegenden Erfindung können entweder gelagert werden oder für die Verabreichung durch Mischen mit physiologisch akzeptablen Trägern, Hilfsstoffen oder Stabilisatoren zubereitet werden. Diese Materialien sollten für den beabsichtigten Benutzer bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht-toxisch sein.

[0056] Für den Fall, dass der Komplex wasserlöslich ist, kann dieser in einem geeigneten Puffer formuliert werden, beispielsweise PBS (5 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7.1) oder anderen physiologisch kompatiblen Lösungen. Alternativ und für den Fall, dass der resultierende Komplex eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln hat, kann dieser dann mit einem nicht-ionischen oberflächenaktiven Agens, so wie beispielsweise Tween oder Polyethylenglycol, formuliert werden.

[0057] Nützliche Lösungen für die orale oder parenterale Verabreichungen können gemäß einer jeden der Methoden, welche der Fachmann der Pharmazie kennt, hergestellt werden, so wie diese beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A., Hrsg.), Mack Pub., 1990, beschrieben sind. Formulierungen können beispielsweise Polyalkylenglykol, so wie Polyethylenglykol, Öle pflanzlichen Ursprunges, hydrogenisierte Naphthalene und ähnliche enthalten. Formulierungen für die direkte Verabreichung können insbesondere enthalten: Glycerin und andere Zusammensetzungen hoher Viskosität. Weitere nützliche Hilfsstoffe, um das Freisetzen des Stressprotein-Peptidkomplexes in vivo zu kontrollieren, können sein: Biokompatible, vorzugsweise bioresorbierbare Polymere, einschließlich beispielsweise Hyaluronsäure, Collagen, Tricalciumphosphat, Polybutyrat, Polylaktid, Polyglykolid und Laktidglykolidcopolymere.

[0058] Formulierungen für das Inhalieren können als Trägerstoffe beispielsweise Lactose enthalten. Wässrige Lösungen können beispielsweise enthalten: Polyoxyethylen-9-Laurylether, Glycocholat und Deoxycholat. Ölhaltige Lösungen können für die Verabreichung in Form von Nasentropfen nützlich sein. Gele können topisch intranasal verabreicht werden.

[0059] Die hier bereitgestellten Verbindungen können in pharmazeutischen Zusammensetzungen durch Beimischung von pharmazeutisch akzeptablen nichttoxischen Bindemitteln und Trägerstoffen zusammen formu-

liert werden. Zusätzlich können die Formulierungen optional auch einen oder mehrere Hilfsstoffe enthalten. Bevorzugte Hilfsstoffe schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf: Pluron-Tri-Blockcopolymer, Muramyl-Dipeptide und deren Derivate, entgiftetes Endotoxin, Saponin und dessen Derivate so wie beispielsweise QS-21 und Liposome. Die vorliegende Erfindung sieht es weiter vor, dass Formulierungen mit kontinuierlicher Freisetzung verwendet werden, in welchen der Komplex über einen längeren Zeitraum freigesetzt wird.

[0060] Der Verabreichungsmodus der Familie von Stressprotein-Peptidkomplexen, wie diese gemäß der vorliegenden Erfindung zubereitet worden sind, wird notwendigerweise von der Stabilität des Komplexes unter physiologischen Bedingungen abhängen, sowie von der Größe und der Verteilung des Tumors innerhalb des zu behandelnden Säugetieres. Die bevorzugte Dosierung des zu verabreichenden Komplexes wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch von Variablen abhängen wie der Größe und der Verteilung des Tumors, dem Alter, Geschlecht und Gewicht des beabsichtigten Empfängers, dem insgesamt vorliegenden Gesundheitszustand der betreffenden Einzelperson, der relativen biologischen Effizienz des Komplexes, der Formulierung für den Komplex, der Anwesenheit und der Art von Trägerstoffen in der Formulierung und der Verabreichungsweise.

[0061] Allgemein gesprochen können die Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung für die parenterale Verabreichung in einer wässrigen physiologischen Pufferlösung ungefähr 0,001 bis 10 % Gewicht pro Volumen an Verbindung enthalten. Bevorzugte Dosierungsbereiche reichen von ungefähr 1 bis ungefähr 1000 Mikrogramm an Komplex pro Kilogramm Körpergewicht des Rezipienten pro Verabreichung. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform reicht der Bereich von ungefähr 100 bis ungefähr 250 Mikrogramm an Komplex pro Kilogramm Körpergewicht des Rezipienten pro Verabreichung. Insbesondere ist es denkbar, dass eine typische Dosierung im Bereich von ungefähr 5 mg bis ungefähr 20 mg für ein menschliches Subjekt mit einem Gewicht von 75 kg beträgt. Diese Größen können jedoch jeweils in Abhängigkeit von den Hilfsstoffen, welche gleichzeitig mit dem Komplex verabreicht werden, variieren.

[0062] Der Komplex bildet vorzugsweise einen Teil einer wässrigen Lösung, welche unter Verwendung von Standardprozeduren verabreicht werden kann, beispielsweise intravenös, subkutan, intramuskulär, intraorbital, über die Augen, intraventrikulär, intrakranial, intrakapsulär, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, über die Mundschleimhäute, rektal, vaginal, über die Nase oder als Aerosol. Die wässrige Lösung ist vorzugsweise physiologisch akzeptabel, so dass die Lösung zusätzlich zur Anlieferung des gewünschten Komplexes im Säugetier dieses nicht anderweitig nachteilig beeinflusst, insbesondere nicht die elektrolytische und/oder Volumen-Bilanz des Säugetiers. Das wässrige Medium für den Komplex kann somit normale physiologische Salzlösung (0,9 % NaCl, 0,15 M), pH 7-7,4 oder andere pharmazeutisch akzeptable Salze umfassen.

[0063] Vorzugsweise sollte der Rezipient dreimal in zweiwöchigen Intervallen geimpft werden. Notwendigenfalls kann Antwort zu einem späteren Zeitpunkt durch eine weitere Verabreichung des Komplexes aufgefrischt werden. Es ist denkbar, dass die optimale Dosierung und der optimale Impfplan für jeden Stressprotein-Peptidkomplex und unter Verwendung der Techniken, die dem Fachmann wohlbekannt sind, empirisch bestimmt werden kann.

[0064] Verschiedene Cytokine, Antibiotika und andere bioaktive Agentien können mit den Stressprotein-Peptidkomplexen gemeinsam verabreicht werden. So können beispielsweise verschiedene bekannte Cytokine so wie beispielsweise Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-9 (IL-9), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-12 (IL-12), Interferon α (IFN α), Interferon β (IFN β), Interferon γ (IFN γ), Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α), Tumor-Nekrosefaktor β (TNF β), Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten/Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor (GM-CSF) und transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β) gemeinsam mit den Komplexen verabreicht werden, um somit die physiologische Antwort (response) zu maximieren. Es ist jedoch vorhersehbar, dass andere, bis jetzt noch nicht entdeckte, Cytokine in der vorliegenden Erfindung effektiv sein können. Zusätzlich können konventionelle Antibiotika mit den Stressprotein-Peptidkomplexen gemeinsam verabreicht werden. Die Auswahl an geeigneten Antibiotika wird jedoch von der jeweils zu behandelnden Krankheit abhängig sein.

Beispiel I

[0065] Gemäß des vorliegenden Beispiels werden C57BL/6 und C3H Mäuse von ungefähr 100 g Gewicht von Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me. gekauft. Anschließend werden bösartige Tumorzellen subkutan in die Mäuse injiziert, um experimentelle Tumore in den Mäusen zu induzieren. Spezifisch werden bösartige Spindelzellkarzinomzellen 6139 subkutan in die C3H Mäuse injiziert, bösartige Maus-Lewis-Lungenkarzinomzellen werden subkutan in C57BL/6 Mäuse injiziert und bösartige Maus-B16-Melanomzellen werden subkutan in

C57BL/6 Mäuse injiziert.

[0066] Eine Probe des Tumorgewebes wird entfernt, sobald die Tumore auf eine solche Größe angewachsen sind, dass sie sowohl sichtbar als auch fühlbar sind. Zur Kontrolle wird normales, nicht bösartiges Gewebe aus einigen Mäusen, welche die experimentellen Tumore haben, entnommen.

[0067] Dann werden die gp96-Peptid-, Hsp90-Peptid- und Hsp70-Peptidkomplexe werden aus sowohl den normalen als auch aus den einem Tumor entnommenen Gewebeproben isoliert, und zwar unter Verwendung der oben beschriebenen Methoden. Sind die Komplexe einmal isoliert, werden sie mit PBS kombiniert und den Mäusen, aus welchen die Komplexe entnommen wurden, zurück verabreicht. Normalerweise werden 6 Mäuse in jedem Experiment getestet. Die Experimente werden unter Verwendung eines Planes wie unten gezeigt durchgeführt:

<u>Experiment</u>	<u>den Mäusen zurückverabreichte Zusammensetzung</u>
1	gp96-Peptid
2	Hsp70-Peptid
3	Hsp90-Peptid
4	gp96-Peptid und Hsp70-Peptid
5	gp96-Peptid und Hsp90-Peptid
6	Hsp70-Peptid und Hsp90-Peptid
7	Hsp70-Peptid, Hsp90-Peptid und gp96-Peptid
8	nur Puffer

[0068] Gemäß einer Serie an Experimenten werden die Komplexe aus Tumorzellen entnommen, wobei in einer zweiten Serie die Komplexe normalen Zellen entnommen werden. Die Mäuse werden dreimal in wöchentlichen Intervallen mit 20 Mikrogramm (Gesamtgewicht) der/des vorausgewählten Komplexe/Komplexes geimpft. Während der Therapie wird die Größe eines jeden Tumors täglich gemessen. Nach 4 Wochen werden die Mäuse getötet, und die Entwicklung des Tumors wird histologisch untersucht. Zusätzlich werden die getöteten Mäuse auf die Anwesenheit oder die Abwesenheit von Metastasen untersucht.

[0069] Es wird erwartet, dass die Tumore in Mäusen, welche mit Komplexen behandelt werden, die aus normalem Gewebe gewonnen werden, weiter wachsen und Metastasen bilden. Im Gegensatz hierzu wird erwartet, dass die Tumore in den Mäusen, welche mit Komplexen behandelt werden, welche aus dem Tumorgewebe stammen, ein langsames Wachstum als die Tumore in den Tieren der Kontrollgruppe aufweisen, und in einigen Fällen wird erwartet, dass die Tumormasse kleiner wird und der Tumor Remissionserscheinungen während der Therapie zeigt.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur Verwendung als ein Medikament zur Behandlung eines Menschen, der einen Tumor hat, umfassend immunogene gereinigte menschliche Stress-Protein-Peptid Komplexe, die aus menschlichen Tumorzellen isoliert sind, wobei die Peptide nicht-kovalent mit den Stress-Protein assoziiert sind.

2. Zusammensetzung aus Anspruch 1, wobei die Komplexe in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger vorliegen.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Behandlung eines Menschen von welchem die besagten Tumorzellen erhalten wurden.

4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Stress-Proteine in den Komplexen Mitglieder der Hsp60 Familie, der Hsp70 Familie oder der Hsp90 Familie sind.

5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Komplexe von Tumorgewebe stammen, welches dem besagten Menschen entnommen wurde.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der zu behandelnde Tumor Metastasen gebildet hat.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der zu behandelnde Tumor ein Melanomkarzinom, ein hepatozelluläres Karzinom, eine myelogene Leukämie oder ein Karzinom der Nierenzellen ist.
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Komplexe in einer Menge vorhanden sind, die zur Behandlung des Menschen effektiv sind.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Behandlung des Menschen das Verabreichen der Zusammensetzung in einer Menge im Bereich von 1 bis 1000 Mikrogramm des Komplexes pro Kilogramm Körpergewicht des Menschen pro Verabreichung umfaßt.
10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Behandlung des Menschen das Verabreichen der Zusammensetzung in einer Menge im Bereich von 100 bis 250 Mikrogramm des Komplexes pro Kilogramm Körpergewicht des Menschen pro Verabreichung umfaßt.
11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur wiederholten Verabreichung.
12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Zusammensetzung außerdem Cytokin umfaßt.
13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das Cytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TNF β , G-CSF, GM-CSF and TGF- β .
14. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur gemeinsamen Verabreichung mit Cytokin.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, wobei das Cytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TNF β , G-CSF, GM-CSF and TGF- β .
16. Verwendung einer Zusammensetzung umfassend immunogene gereinigte menschliche Stress-Protein-Peptid Komplexe, die aus menschlichen Tumorzellen isoliert sind, wobei die Peptide nicht-kovalent mit den Stress-Proteinen assoziiert sind, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Menschen, der einen Tumor hat.
17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Behandlung eines Menschen, von dem die besagten Tumorzellen erhalten wurden.
18. Verwendung einer Zusammensetzung umfassend immunogene gereinigte Säugetier-Stress-Protein-Peptid Komplexe, die aus Säugetier-Tumorzellen isoliert sind, wobei die Peptide nicht-kovalent mit den Stress-Proteinen assoziiert sind, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Säugetieres, das einen Tumor hat.
19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Behandlung eines Säugetieres, von dem die besagten Tumorzellen erhalten wurden.
20. Verwendung nach Anspruch 16 oder 18, wobei die Stressproteine in den Komplexen Mitglieder der Hsp60 Familie, der Hsp70 Familie oder der Hsp90 Familie sind.
21. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Tumorzellen des Säugetieres von einem Haustier erhalten wurden.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Komplexe Tumorgewebe des besagten Säugetieres entnommen wurden.
23. Verwendung nach Anspruch 16 oder 18, wobei der zu behandelnde Tumor Metastasen gebildet hat.

24. Verwendung nach Anspruch 16 oder 18, wobei der zu behandelnde Tumor ein Melanomkarzinom, ein heptazelluläres Karzinom, eine myelogene Leukämie oder ein Karzinom der Nierenzellen ist.

25. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend:

- a) eine therapeutisch effektive Menge an gereinigten menschlichen Stressprotein-Peptid Komplexen, welche aus menschlichem Tumorgewebe, welches einem Menschen entnommen wurde, isoliert sind, wobei die Peptide nicht kovalent mit dem Stressprotein assoziiert sind; und
- b) ein pharmazeutisch akzeptabler Träger.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 25, wobei die Stressproteine gp96 sind.

27. Zusammensetzung umfassend eine therapeutisch effektive Menge an gereinigten menschlichen Stress-Protein-Peptid Komplexen, welche aus einer menschlichen Tumorzelle isoliert werden, wobei die Peptide nicht-kovalent mit dem Stressprotein assoziiert sind und die Stressproteine in den Komplexen Hsp90 sind.

28. Zusammensetzung umfassend eine therapeutische effektive Menge an gereinigten menschlichen Stress-Protein-Peptid Komplexen, welche aus einer menschlichen Tumorzelle isoliert sind, wobei die Peptide nicht-kovalent mit dem Stress-Protein assoziiert sind und die Stress-Proteine in den Komplexen Hsp70 sind.

29. Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei die Hsp90-Peptid Komplexe bis zu offensichtlicher Homogenität gereinigt sind.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei die Hsp70-Peptid Komplexe bis zu offensichtlicher Homogenität gereinigt sind.

31. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 27, 28, 29 oder 30, wobei die Komplexe in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger vorliegen.

32. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder Anspruch 25, wobei die Stressproteine in den Komplexen Hsp70 sind.

33. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder Anspruch 25, wobei die Stressproteine in den Komplexen Hsp90 oder gp96 sind.

34. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder Anspruch 25, wobei die Komplexe mehr als einen von Hsp70-Peptid Komplexen, Hsp90-Peptid Komplexen und gp96-Peptid Komplexen umfassen.

35. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die Stressproteine in den Komplexen Hsp70 sind.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die Stressproteine in den Komplexen Hsp90 oder gp96 sind.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die Komplexe mehr als einen von Hsp70-Peptid Komplexen, Hsp90-Peptid Komplexen und gp96-Peptid Komplexen umfassen.

38. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder Ansprüche 25 bis 32 weiterhin umfassend einen oder mehrere Hilfsstoffe, chemotherapeutisches Agens oder Antibiotikum.

39. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder 25 bis 32, weiterhin umfassend Saponin.

40. Zusammensetzung nach Anspruch 39, wobei das Saponin QS-21 ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen