

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04516 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/705**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07864

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Juli 2001 (09.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 33 245.5 10. Juli 2000 (10.07.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **SINGH-JASUJA, Harpreet** [DE/DE]; Wilhelmstrasse 141, 72076 Tübingen (DE). **SCHILD, Hansjörg** [DE/DE]; Krumme Gasse 9, 72108 Rottenburg (DE).

(74) Anwälte: **OTTEN, Hajo** usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 10 54 62, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF THE HEAT SHOCK PROTEIN GP96

(54) Bezeichnung: VERWENDUNGEN DES HITZESCHOCKPROTEINS GP96

(57) Abstract: The invention relates to the use of gp96 molecules that carry no antigens of interest, for marking and/or activating antigen-presenting cells (APCs), for example dendritic cells, monocytes, macrophages, B cells and peritoneal exudation cells. Said APCs can be loaded with antigens once they have been activated and are used to induce an immune response, or in tumor therapy.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von gp96-Molekülen, die keine interessierenden Antigene tragen, zum Markieren und/oder Aktivieren von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. dendritische Zellen, Monocyten, Makrophagen, B-Zellen und peritoneale Exsudatzellen. Diese APCs können dann nach der Aktivierung mit Antigenen beladen werden und zur Induzierung einer Immunantwort oder im Rahmen einer Tumorthherapie eingesetzt werden.



WO 02/04516 A2

Verwendungen des Hitzeschockproteins gp96

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verwendungen des Hitzeschockproteins gp96.

Hitzeschockproteine sind Proteine, die während eines Hitzeschocks oder als Antwort auf Stress in ihrer Expression hochreguliert werden. Sie fungieren zum einen als Chaperone, sind also am Faltungsprozess von Proteinen beteiligt, und spielen außerdem auf dem Gebiet der Immunologie eine große Rolle bei der sogenannten Antigenprozessierung.

Konventionelle T-Lymphocyten sind darauf angewiesen, daß Antigene in Form von Peptiden präsentiert werden. Diese Funktion übernehmen Antigen-präsentierende Zellen (APCs), die auf ihrer Zellmembran

Antigen-präsentierende Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) tragen. Zu den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) werden bspw. dendritische Zellen, B-Zellen (B-Lymphocyten) und Makrophagen gezählt, diese werden auch als professionelle APCs bezeichnet. Im Zellinneren der APCs werden Proteinantigene mit Hilfe proteolytischer Enzyme zu Peptiden verdaut, die dann auf die MHC-Moleküle geladen werden. Peptide für die MHC Klasse I werden vor allem im Cytoplasma generiert und im endoplasmatischen Retikulum an die MHC-Moleküle gebunden. Peptide für die MHC Klasse II entstehen durch den enzymatischen Verdau in Lysosomen. Die beladenen MHC-Moleküle werden dann an die Zelloberfläche transportiert. T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres membranständigen Antigenrezeptors antigene Peptide zusammen mit diesen klassischen MHC-Molekülen.

Nur die professionellen APCs können native T-Zellen aktivieren, indem sie Antigene auf MHC-Molekülen präsentieren und kostimulierende Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren.

Man unterscheidet zwischen der ruhenden, unreifen APC, die in der Antigenaufnahme spezialisiert ist, und der aktivierten, reifen APC, die in der Antigenpräsentierung spezialisiert ist. APCs können durch verschiedene Reagenzien aktiviert werden, z.B. durch bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS). Solche Bestandteile verursachen in Säugern Fieber, weshalb sie auch als Pyrogene bezeichnet werden. Andere Aktivatoren sind z.B. Cytokine wie TNF-alpha, das im allgemeinen heute in der Forschung zur Aktivierung von APCs verwendet wird.

Es ist seit längerem bekannt, daß das Hitzeschockprotein gp96 eine tumorspezifische Immunantwort vermitteln kann, sofern es aus dem Tumor isoliert wurde, gegen den die Antwort gerichtet werden soll. Beispielsweise wird in einer Maus ein bekannter Tumor induziert, dieser Tumor entnommen und gp96 aus dem Tumor isoliert. Wird dieses gp96 nun im Rahmen einer Immuntherapie einer Maus, die ebenfalls vom gleichen Tumor befallen ist, gespritzt, so zeigt sich, daß der Tumor abgestoßen wird. Im Rahmen einer Immunisierung dagegen wird der Maus gp96 gespritzt und daraufhin der Tumor implantiert bzw. induziert. Es zeigt sich daß der Tumor nicht wachsen kann. gp96 aus Nicht-Tumorgewebe kann diese Immunantwort nicht vermitteln.

Die Tumorspezifität beruht demnach nicht auf gp96 selbst, sondern auf kleinen Peptiden (Antigenen), die an gp96 assoziiert sind. Diese Peptide stellen für das Immunsystem die Informationen dar, die es braucht, um den Tumor zu erkennen. In der heutigen Modellvorstellung wird gp96 von den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen.

Innerhalb der APCs wird also das an gp96-gebundene Antigen-Peptid auf MHC-Moleküle übertragen und diese auf der Oberfläche im Kontext dieser MHC-Moleküle präsentiert. Diese "Kreuzpräsentation" ermöglicht die spezifische Erkennung des Antigen-Peptids durch T-Zellen, die dadurch aktiviert werden. Exogene Antigene umfassen bspw. Proteine, Bakterien und apoptotische Zellen.

gp96 dient demnach als Antigen-Carrier. Mittlerweile ist eine ähnliche Funktion auch für andere Hitzeschockproteine wie hsp70, hsp90, hsp110 und grp170 gezeigt. Da die Immunisierung mit gp96 auch bei Einsatz extrem geringer Mengen erfolgreich funktioniert, ist in der Literatur bereits spekuliert worden, daß APCs spezifi-

sche Rezeptoren besitzen, die gp96 und andere Hitzeschockproteine auf der Oberfläche binden und endozytieren.

Unter allen analysierten hsps hat das ER-interne Hitzeschockprotein gp96 die am besten dokumentierte Geschichte in Bezug auf die Induktion spezifischer CTL- (cytotoxische T-Lymphocyten) Antworten.

Die Sequenz für humanes gp96 ist z.B. aus der Veröffentlichung von R.A. Mazzarella und M. Green (Erp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmatic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP94); J.Biol.Chem. 262:8875-8883 (1987)) bekannt und die Sequenz für Maus-gp96 z.B. aus der Veröffentlichung von R.G.Maki, L.J.Old und P.K. Srivastava (Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:5658-5662 (1990)).

Aus der WO 97/10002 ist ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Krebs und infektiösen Krankheiten mit sensibilisierten APCs bekannt. Hierzu werden die APCs zuerst in vitro mit einem Komplex aus einem Hitzeschockprotein und einem daran gebundenen Antigen-Molekül sensibilisiert und anschließend dem Erkrankten in einer effektiven Menge verabreicht.

Singh-Jasuja et al., J.Exp.Med., 2000, 191:1965-1974 konnten zeigen, daß gp96 auf der Oberfläche von APCs an einen oder mehrere noch unbekannte Rezeptoren bindet und diese rezeptorvermittelte Aufnahme essentiell für die Präsentation von gp96-assoziierten Peptiden auf MHC Klasse I-Molekülen und damit für die Aktivierung von T-Zellen ist.

Aus dieser Veröffentlichung ist es bekannt, daß gp96 an einen oder mehrere noch unbekannte Rezeptoren auf menschlichen und Maus-APCs bindet. Wichtig ist hier insbesondere, daß sog. dendritische Zellen (DCs), denen die größten Fähigkeiten als APC nachgesagt werden, gp96 gut binden. Die Bindung von gp96 an Zellen kann nur gemessen werden, wenn das Protein in irgendeiner Form markiert ist, z.B. radioaktiv, enzymatisch oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Im letzteren Fall kann gp96-FITC verwendet werden, also gp96, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-isothiocyanat) markiert wurde.

Vor diesem Hintergrund liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zu Grunde, zumindest eine neue Verwendung für gp96 bereitzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß gp96-Moleküle, die keine interessierenden Antigen-Peptide tragen, zum Markieren und/oder Aktivieren von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) verwendet werden.

Unter "interessierenden" Antigen-Peptiden werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Peptide bezeichnet, die von den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) nicht präsentiert werden oder durch die zumindest keine Immunantwort ausgelöst wird. Im folgenden werden die gp96-Moleküle, die keine interessierenden Antigen-Peptide tragen, als "unbeladene" gp96-Moleküle bezeichnet.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird erfindungsgemäß von einer von den Erfindern der vorliegenden Anmeldung neu entdeckten Funktion von gp96 Gebrauch gemacht. gp96 kann nach Erkenntnis der Erfinder nämlich nicht nur als Antigen-Carrier fungieren, es ist überraschender Weise vielmehr auch unbeladen, d.h. nicht mit Antigen-Peptiden komplexiert, in der Lage, APCs, insbesondere dendritische Zellen

(DCs) und B-Zellen zu aktivieren, so daß diese ihrerseits noch besser in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Bei der Aufnahme von gp96 durch die APCs laufen nach Erkenntnis der Erfinder nämlich zwei Vorgänge simultan ab: zum einen wird auf diese Weise effektiv gp96-assoziiertes Antigen für die Präsentation aufgenommen, zum anderen wird die APC aber auch selbst aktiviert, worauf sie noch besser präsentieren kann.

Nach Erkenntnis der Erfinder aktiviert unbeladenes gp96 humane und Maus-APCs. Dies zeigt sich anhand von Markermolekülen, die bei Aktivierung von bspw. DCs auf der Oberfläche hochreguliert werden: CD86 (B7.2), MHC Klasse II und (nur bei humanen DCs) CD83. Außerdem sekretieren DCs nach Aktivierung mit gp96 Cytokine (Fig. 2b), die wichtige immunregulatorische Funktionen haben. Besonders das Cytokin IL-12 nimmt eine immer wichtigere Bedeutung ein. Unbeladenes gp96 aktiviert auch Maus-B-Zellen, was sich durch die stärkere Expression der Oberflächenmoleküle CD45R/B220, CD86 und MHC-Klasse II (H2-A^b) zeigt.

Von Bedeutung ist auch der Beweis, daß die Aktivierung nicht auf Kontamination von Pyrogenen beruht, z.B. LPS. Die Aktivierung erfolgt nicht bei Denaturierung des gp96 durch Kochen, während LPS sich durch Kochen nicht denaturieren läßt.

Die therapeutische Wirkung der Aktivierung von APCs mit unbeladenen, nicht mit Antigenen beladenem gp96 besteht darin, daß aktivierte APCs als einzige Zellen des Immunsystems in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren.

Eine entscheidende Erkenntnis ist darin zu sehen, daß ruhende APCs gp96 hervorragend binden, nicht aber entweder durch gp96 selbst oder LPS aktivierte APCs, was darauf hindeutet, daß der Rezeptor

für gp96 auf APCs nach ihrer Aktivierung herunterreguliert wird. Die Messung der Bindung erfolgt z.B. durch fluoreszenzmarkiertes gp96, also gp96-FITC. Somit kann gp96-FITC als Detektionsreagenz verwendet werden. Die Bindung bzw. Nichtbindung zeigt den Aktivierungsstatus der APCs an.

Erfindungsgemäß werden unbeladene gp96-Moleküle zum Markieren und/oder Aktivieren von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) verwendet, wobei die APCs vorzugsweise ausgewählt sind aus der Gruppe: Dendritische Zellen (DC), Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und peritoneale Exsudat-Zellen.

Dabei können die gp96-Moleküle als Marker für die Aktivierung und/oder die Reifung und/oder den Differenzierungsstatus der APC, insbesondere von DCs und B-Zellen, und/oder für unreife DCs und B-Zellen verwendet werden.

Es ist ferner bevorzugt, wenn die gp96-Moleküle markiert, vorzugsweise fluoreszenzmarkiert, weiter vorzugsweise FITC-markiert sind.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die gp96-Moleküle aus primären nicht-menschlichen Säugerzellen, vorzugsweise aus Mauszellen, oder aus humanen bzw. murinen Zelllinien, oder aber rekombinant in *Escherichia coli* oder Insektenzellen gewonnen werden.

Hier ist von Vorteil, daß gp96-Moleküle zum einen in beliebiger Menge und zum anderen so hergestellt werden können, daß sie nicht oder nur mit nicht relevanten Antigenen assoziiert sind, die z.B. in genetisch veränderten Mäusen, anderen Säugetieren oder aber in *Escherichia coli* oder Insekten exprimiert werden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die gp96-Moleküle zum Aktivieren der Reifung von APCs, insbesondere DCs oder B-Zellen, verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum in vivo oder in vitro Aktivieren von APCs, insbesondere DCs oder B-Zellen, bei dem gp96-Moleküle, vorzugsweise so wie oben beschrieben verwendet werden. Die gp96-Moleküle können dabei z.B. subkutan oder intradermal injiziert werden.

In diesem Zusammenhang ist es bevorzugt, wenn die APCs vor der Aktivierung ex-vivo mit Antigenen geladen werden, die vorzugsweise ausgewählt sind aus der Gruppe: Tumor-assoziierte, Tumor-spezifische, autoimmunassoziierte, virale und bakterielle Antigene.

Dabei ist es weiter bevorzugt, wenn die APCs in vitro mit gp96-Molekülen alleine oder zusammen mit anderen Faktoren wie TNF-alpha behandelt werden.

Die Erfindung betrifft ferner nach dem neuen Verfahren hergestellte APCs sowie deren Verwendung zur Induzierung einer Immunantwort gegen die Antigene, mit denen sie ex vivo beladen wurden.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von gp96-Molekülen zur Induzierung einer Toleranz und/oder einer TH2-Typ-Antwort und/oder einer TH1-Typ-Antwort gegen Antigene, vorzugsweise gegen Antigene, die ausgewählt sind aus der Gruppe: Tumor-assoziierte, Tumor-spezifische, autoimmunassoziierte, virale und bakterielle Antigene.

Es ist bevorzugt, wenn nicht aktivierte APCs mit stark exprimierten gp96-Rezeptor verwendet werden, der vorzugsweise über markierte, vorzugsweise fluoreszenzmarkierte gp96-Moleküle detektiert wird, und derartige APCs in diesem nicht aktivierten Zustand durch Substanzen wie bspw. Cytocahlsin D arretiert werden.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der neuen APCs im Rahmen einer Tumorthherapie und/oder -prävention, eine therapeutische Zusammensetzung mit diesen APCs und einem therapeutisch akzeptierbaren Träger, sowie ein Kit mit erfindungsgemäß zu verwendenden gp96-Molekülen und den erforderlichen Reagenzien.

Erfindungsgemäß wird gp96 also nicht als Antigen-Carrier benutzt, sondern als Aktivator von APCs, insbesondere DCs und B-Zellen. Die APCs können dann mit dem gewünschten Antigen ex vivo beladen und nach der Aktivierung durch gp96 dem Patienten zur Therapie wieder gespritzt werden.

Wird gp96-FITC als Detektionsmittel eingesetzt, um den Aktivierungs- bzw. Differenzierungszustand von antigenpräsentierenden Zellen zu ermitteln, lassen diese APCs sich entsprechend ihrer Bindung von gp96-FITC und damit entsprechend ihres Expressionslevels des gp96-Rezeptors in verschiedene Kategorien unterteilen, die bei der Tumorthherapie relevant sind.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur in vitro Präparation von DCs aus aus dem Blut isolierten Monozyten und/oder aus dem Knochenmark präparierten Stammzellen, bei dem die Monozyten und/oder Stammzellen mit gp96-Molekülen allein oder in Kombination mit Wachstumsfaktoren wie bspw. GM-CSF behandelt werden.

Die Erfinder haben nämlich erkannt, daß gp96-Moleküle in der Lage sind, derartige Vorläuferzellen zu DCs zu differenzieren.

In Anbetracht des Obigen haben die gegenwärtigen Erfinder die Wirkung von unbeladenem gp96 auf die DC-Reifung und die T-Zellaktivierung getestet und konnten überraschend zeigen, daß mit gp96 behandelte unreife DCs TNF-alpha und IL-12 sekretieren und sich in den reifen Phänotyp umwandeln, wobei sie in dem Fall von humanen DCs erhöhte Levels von CD86-, MHC Klasse II- und CD83-Molekülen exprimieren. Diese Änderung beim Phänotyp hat funktionale Konsequenzen, welche bspw. durch die Zunahme bei der Aktivierung von allophenen T-Zellen sichtbar gemacht werden.

Interessanterweise verlieren die DCs nach der Reifung ihre Fähigkeit, exogenes gp96 zu binden. Der gp96-Rezeptor auf reifen DCs wird herunterreguliert, was nahelegt, daß sich dieser Rezeptor ähnlich verhält wie andere Rezeptoren, die an der Antigenaufnahme beteiligt sind, wie der Scavenger-Rezeptor CD36, der Mannose-Rezeptor oder die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den verringerten Fähigkeiten von reifen DCs, Antigen aufzunehmen.

Weiterhin zeigen die Erfinder, daß unbeladenes gp96 dazu in der Lage ist, B-Zellen zu aktivieren, was durch die stärkere Expression der Oberflächenmoleküle CD45R/B220, CD86 und MHC-Klasse II (H2-A^b) belegt wird.

Beispiele von Ergebnissen sind wie folgt in den Figuren gezeigt:

Fig. 1: gp96 aktiviert humane dendritische Zellen.

Humane dendritische Zellen wurden in vitro aus CD14+-PBMCs nach 7 Tagen mit GM-CSF und IL-4 präpariert und für 24 h mit gp96, hitzebehandeltem gp96, LPS oder hitzebehandeltem LPS inkubiert. A: CD86-Expressionslevels von DCs, die mit gp96/LPS behandelt wurden (ausgefülltes Histogramm), oder nicht behandelten DCs (in grau; die schwarze Linie stellt einen isotypen Kontrollantikörper dar, welcher für alle Behandlungen dieselbe Fluoreszenzintensität zeigte). B zeigt den Prozentsatz hoch CD86- (wie in A durch den Markierungsbalken angegeben) und Aktivierungsmarker CD83-exprimierender DCs nach Behandlung mit den verschiedenen Effektormolekülen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Fig. 2: gp96 aktiviert dendritische Mauszellen.

Dendritische Mauszellen wurden aus Knochenmark von C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen nach 7 Tagen mit GM-CSF präpariert. A: Die Behandlung mit 30 und 100 µg/ml gp96 und 2 µg/ml LPS und hitzebehandeltem LPS führte nach 24 h zu einer Hochregulierung von CD86 (gemessen durch FACS-Doppelfärbung mit CD11c- und CD86-Antikörpern), während hitzebehandeltes gp96 die DCs nicht aktivierte. B: Überstände aus dem obigen Experiment wurden durch ELISA auf den Gehalt der Cytokine IL-12 und TNF-alpha hin analysiert (was ähnliche Ergebnisse wie in A zeigte). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von jeweils drei Versuchen. Die Ergebnisse repräsentieren wenigstens drei unabhängige Experimente.

Fig. 3: Dendritische humane und Mauszellen, die durch gp96 aktiviert wurden, sind in der Lage, eine starke Vermehrung von alloreaktiven T-Zellen zu induzieren.

Humane DCs wurden präpariert und für 24 h wie oben beschrieben mit 30 µg/ml gp96, hitzebehandeltem gp96 oder 2 µg/ml LPS behandelt. Nach einem gründlichen Waschen wurden diese vorbehandelten DCs mit 1×10^5 PBMCs eines anderen Spenders für 4 Tage in anderen Stimulator/Responder-Verhältnissen inkubiert (gezeigt ist das Verhältnis 1:30). Die Vermehrung der T-Zellen wurde durch Zugabe von 1 µCi 3H-Thymidin für 16 h getestet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von jeweils drei Versuchen an. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Ähnliche Ergebnisse wurden für BALB/c-Maus-DCs erhalten, die eine Vermehrung von C57BL/6 T-Zellen induzierten (Daten nicht gezeigt).

Fig. 4: Aktivierte DCs regulieren den gp96-Rezeptor herunter.

Aus Knochenmark stammende DCs aus C57BL/6-Mäusen zeigen eine heterogene Population aktivierter (hoch CD86-positiv auf FL-2) und nicht aktivierter (gering CD68-positiv) CD11c-positiver DCs. OVA-FITC als Kontrollprotein band überhaupt nicht, während gp96-FITC nur an nicht aktivierte DCs band (untere Felder). Die oberen Felder zeigen die CD11c-Expression der DC-Präparation und die Bindung von gp96-FITC. Die Werte geben Prozentsätze der gesamten Zellen in dem bestimmten Quadranten an. Die Ergebnisse repräsentieren drei verschiedene Experimente.

Fig. 5: gp96 aktiviert Maus-B-Zellen

Primäre B-Zellen wurden aus Milzzellen von C57BL/6-Mäusen isoliert. Die Behandlung mit 50 µg/ml gp96 führte zu einer Hochregu-

lierung von CD86 (graue Balken) und MHC-Klasse II (H2-A^b) - Molekülen (schwarze Balken). Die Aktivierung ist vergleichbar der durch LPS. Hitzeinaktiviertes gp96 zeigt wie die Negativkontrolle (Medium) keine Aktivierung, somit kann ausgeschlossen werden, daß LPS-Kontaminationen in der gp96-Präparation für die Aktivierung verantwortlich sind. Das Diagramm zeigt aktivierte B-Zellen in Prozent, markiert durch CD 45R/B220 in Kombination mit CD86 bzw. MHC-Klasse II (H2-A^b).

Beispiel 1: Materialien & Methoden

Erzeugung dendritischer Zellen

Das Medium, welches durchgehend verwendet wurde, war Iscove's Modifiziertes Dulbecco-Medium (IMDM, BioWhittaker, Verviers, Belgien), das mit 2 mM L-Glutamin (GibcoBRL Life Technologies, Paisley, UK), 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco), 10% FCS (PAA, Linz, Österreich) und Cytokinen wie unten angegeben ergänzt war. Unreife Maus-DCs wurden aus Knochenmark von C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen gemäß Inaba et al., J. Exp. Med. 1992, 176: 1693-1702 erzeugt. Kurz gesagt wurden Knochenmarkszellen mit 150 U/ml GM-CSF (PeproTech, London, UK) für 6-8 Tage inkubiert, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Ungefähr 90-100% aller Zellen in dem FACS(r)-Fenster, die für Monozyten verwendet wurden, waren DCs, wie durch Durchflußzytometrie mit Antikörpern bestimmt wurde (die von Pharmingen, San Diego, CA, erhalten wurden): diese waren CD11c-, CD86- und MHC Klasse II-positiv und CD14-negativ. Humane unreife dendritische Zellen wurden gemäß Bender et al., J. Immunol. Methods 1996, 196: 121-135 aus PBMCs präpariert.

Kurz gesagt wurden CD14+-Monozyten durch ein Anhaften für 1 h an Kulturschalen und gründliches Waschen gereinigt; die Monozyten wurden für 6-8 Tage mit 1000 IU/ml IL-4 und 800 IU/ml GM-CSF inku-

biert, wobei die Cytokine alle drei Tage erneuert wurden. Die Zellen, welche auf diese Weise erzeugt wurden, zeigten bis zum Tag 12 eine große Anzahl von Dendriten und waren nur leicht adhärent. Sie exprimierten CD1a, wenig CD14, CD86, HLA-DR und sehr wenig CD83 auf ihrer Oberfläche, wie durch Antikörper (Pharmingen) bestimmt wurde.

Herstellung von unbeladenen gp96-Molekülen

Gp96 wurde aus einer Mycoplasma-freien IGELa2-Mauszelllinie wie in Arnold et al., J. Exp. Med. 1995, 182: 885-889 beschrieben gereinigt. FPLC-Fraktion, welche den Fraktionen, die gemäß Western-Blot kein gp96 enthielten, vorausgingen und folgten, werden als „flankierende Fraktionen“ bezeichnet (zur Verfügung gestellt von Immatics Biotechnologies, Tübingen). Endotoxin, das in den gp96-Präparationen vorliegen könnte, wurde durch ein Limulus-Amöbozytenlysat-Kit (QCL-1000, BioWhittaker) gemäß den Richtlinien getestet, die von der US Food and Drug Administration (FDA) veröffentlicht wurden. Der Endotoxingehalt, der in allen Fällen bestimmt wurde, lag bei oder unterhalb von 0,05 EU/µg gp96. Zum Nachweis von möglichen Mycoplasma-Verunreinigungen der IGELa2-Zelllinie und der gp96-FPLC-Fraktion wurde das „Mycoplasma Plus“-Kit von Stratagene, La Jolla, CA, verwendet.

Sofern die so hergestellten gp96-Moleküle noch mit Peptiden komplexiert sind, können die antigenen Peptide oder Komponenten durch ATP-Inkubation oder durch Inkubation in einem Puffer mit niedrigem pH-Wert von den endogenen Hitzeschockprotein-Komplexen abgespalten werden. Hierzu wird der Hitzeschockprotein-Peptid-Komplex also entweder mit 10 mM ATP und 3 mM MgCl₂ bei 37 °C für 1 h inkubiert, oder aber der Komplex wird 0,2%-iger Trifluoressigsäure (TFA) für 1 Stunde bei 4°C ausgesetzt, um die Proteine abzuspalten. Die Proben werden dann auf ein Centricon-10 Filter-Säulchen mit einer

Ausschlußmembran (Millipore) gegeben und zentrifugiert, um so die Peptide von den Hitzeschockproteinen zu trennen (siehe T. Ishii et al., Isolation of MHC Class I-Restricted Tumor Antigen Peptide and its Precursors Associated with Heat Shock Protein hsp 70, hsp90, gp96; J. Immunol., 162:1303-1309 (1999)).

Stimulation der dendritischen Zellen

Maus- und humane DCs wurden durch Zugabe von 30 bis 100 µg/ml gp96 oder 2 µg/ml LPS (aus *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) für 24 h stimuliert. In einigen Fällen wurden gp96 oder LPS bei 95°C für wenigstens 20 min vorbehandelt.

Cytokinnachweis

Maus IL-12 (p40) und TNF-alpha (wurden in Kulturüberständen unter Verwendung von Standard-Sandwich-ELISA-Protokollen gemessen. Antikörper und rekombinante Standards beider Cytokine wurden von Pharmingen erhalten. Der Einfang-Antikörper wurde an die ELISA-Platte (MaxiSorb™ Nunc, Roskilde, Dänemark) gebunden, der biotinylierte Nachweisantikörper wurde von Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase erkannt und durch ein ABTS-Substrat (Sigma), das bei 415 nm emittierte, nachgewiesen.

Stimulation alloreaktiver T-Zellen

Humane oder BALB/c-DCs wurden in einer Platte mit 96 Vertiefungen wie oben beschrieben stimuliert, gründlich gewaschen und mit PBL aus einem anderen Spender bzw. C57BL/6-Milzzellen für 4 Tage bei verschiedenen Responder/Stimulator-Verhältnissen inkubiert. Am Tag 4 wurde 1 µCi 3H-Thymidin pro Vertiefung zugegeben, die Zellen wurden nach weiteren 16 h geerntet und das eingebaute 3H-Thymidin

wurde nachgewiesen, indem ein Wallac 1450-MicroBetacounter verwendet wurde.

FACS-Analyse

Eine Anfärbung der Zelloberfläche wurde durchgeführt, indem Antikörper wie oben beschrieben, Ovalbumin-FITC oder gp96-FITC (freundlicherweise von Immatics Biotechnologies, Tübingen, zur Verfügung gestellt) verwendet wurden, welche mit den Zellen für 30 min auf Eis in IMDM, das 10% FCS enthielt, inkubiert wurden. Tote Zellen wurden durch PI-Färbung ausgeschlossen. Alle FACS(r)-Analysen wurden auf einem FACSCalibur(r) (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durchgeführt, wobei eine Cell Quest Software verwendet wurde.

Beispiel 2: unbeladenes Gp96 induziert die Reifung humaner DCs

Um die Wirkung von unbeladenem gp96 auf phänotypische Veränderungen der DCs zu untersuchen, wurden unreife DCs durch Inkubation humaner PBMCs für 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 erzeugt. Für weitere 24 h wurden gp96 oder LPS als eine positive Kontrolle zu den Kulturen zugegeben. Wie in Figur 1 gezeigt ist, induzierte gp96 wie auch LPS eine Reifung der DCs, welche nun erhöhte Levels an CD83 und CD86 auf ihrer Oberfläche zeigten. Eine Denaturierung von gp96 durch Wärme zerstörte dessen Fähigkeit, DCs zu aktivieren, wogegen LPS durch diese Behandlung nicht betroffen wurde. Diese letzteren Beobachtungen sind ein starkes Argument für eine gp96-vermittelte DC-Aktivierung, die keine Folge einer Endotoxinkontamination, sondern das Ergebnis der Bindung von nativem gp96 an seinen Rezeptor ist. Dieses wurde weiterhin durch den Befund gestützt, daß die gp96-flankierenden Fraktionen aus der FPLC-Reinigung (denen gp96 fehlte) keine DC-Reifung induzierten und daß sich normales Medium und gp96 in ihrem Endotoxingehalt nicht unterschieden, wie durch

den Limulus-Amöbozyten-Testkit gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde gp96 aus einer Zelllinie gereinigt, die nicht mit Mycoplasma infiziert war. Es ist wichtig, dieses festzustellen, da vor kurzem gezeigt wurde, daß der Überstand von Mycoplasma-infizierten Zellen in der Lage ist, eine DC-Reifung zu induzieren. BSA und Concanavalin A, welche als Kontrollproteine in ähnlichen Mengen wie gp96 zugegeben wurden, aktivierten die DCs nicht (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 3: unbeladenes Gp96 induziert die Reifung von Maus-DCs

Eine vergleichbare gp96-vermittelte Aktivierung wurde ebenfalls erhalten, indem aus Knochenmark von Mäusen stammende DCs verwendet wurden. Eine Inkubation unreifer DCs mit unbeladenem gp96 bei verschiedenen Konzentrationen induzierte eine hitzelabile Reifung von DCs, wie durch eine erhöhte Expression von CD86-Molekülen (Figur 2A) und MHC Klasse II-Molekülen (Daten nicht gezeigt) sichtbar gemacht wurde. Zusätzlich zu der Expression von Reifungsmarkern auf der Zelloberfläche induziert gp96 ebenfalls die Sekretion der entzündungsfördernden Cytokine IL-12 und TNF-alpha (Figur 2B). Wiederum ist die Wirkung wärmeempfindlich und beruht nicht auf Endotoxinverunreinigungen, die in unseren gp96-Präparationen möglicherweise vorhanden sind.

Beispiel 4: Gp96-aktivierte DCs induzieren eine starke T-Zellvermehrung

Um zu erforschen, ob die gp96-vermittelte DC-Reifung funktionale Konsequenzen hat, wurden DCs, die durch gp96 oder LPS reifen gelassen wurden, für 4 Tage mit allogenen PBMCs inkubiert, und die Zellvermehrung wurde durch Inkubation mit 3H-Thymidin bestimmt. Wie in Figur 3 gezeigt ist, induzierten DCs, die entweder nach LPS- oder gp96-Aktivierung für 24 h einen reifen Phänotyp zeigten,

3fach besser die T-Zellvermehrung als unreife DCs, die nur mit Medium inkubiert wurden. Wie schon vorher beobachtet wurde, ist die gp96-vermittelte Wirkung wärmeempfindlich, da DCs, die mit gekochtem gp96 inkubiert wurden, keine erhöhte T-Zellstimulationsfähigkeit zeigten. Eine vergleichbare T-Zellvermehrung wurde beobachtet, indem Maus-DCs und allogene Milzzellen verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 5: Reife DCs exprimieren verringerte Levels des gp96-Rezeptors

Die Reifung von DCs induziert eine Hochregulierung von MHC Klasse II-, CD83- und CD86-Molekülen, was zu einer erhöhten T-Zellvermehrung führt. Zusätzlich sind die DCs, wenn sie einmal aktiviert sind, nicht in der Lage, weiterhin gp96-vermittelte Stimuli zu empfangen. Wie in Figur 4 gezeigt ist, binden alle CD11c-positiven Maus-DCs gp96, nicht aber Ovalbumin. Jedoch sind nur unreife DCs, die niedrige Levels an CD86 exprimieren, in der Lage, gp96 zu binden. Da gp96 mit Peptiden aus der Zelle, aus welcher es isoliert wurde, komplexiert ist, und DCs in der Lage sind, diese Peptide auf MHC Klasse I-Molekülen überkreuz zu präsentieren, kann nicht mehr erwartet werden, daß reife DCs in der Lage sind, gp96-assoziierte Peptide für T-Zellen zu präsentieren.

Beispiel 6: Unbeladenes gp96 aktiviert primäre Maus-B-Zellen

Primäre B-Zellen wurden aus Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen durch negative magnetische Depletion (MACS™, Miltenyi Biotech) mit Hilfe eines Antikörpers gegen CD43, der an super-paramagnetischen Microbeads konjugiert worden war (Miltenyi Biotech), isoliert. CD43 wird von allen Milzzellen außer ruhenden, peripheren B-Zellen exprimiert. Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt durch Zugabe von 50 µg/ml gp96 zu 300.000 B-Zellen. Als Negativkontrolle dienen unbe-

handelte B-Zellen ("Medium"), als Positivkontrolle 2 μ g/ml Lipopolysaccharid (LPS, Sigma-Aldrich). Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wird auch hitzeinaktiviertes gp96 (20 min bei 95°C, "gp96 gekocht") getestet. Die Auswertung erfolgt wahlweise nach 2 oder 3 Tagen in der Durchflußzytometrie (FACSCalibur, Becton-Dickinson) durch Messung der Oberflächenmoleküle CD45R/B220, CD86 und MHC Klasse II mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Becton-Dickinson Pharmigen). Wie in Figur 5 gezeigt ist, werden primäre Maus-B-Zellen durch unbeladenes gp96 aktiviert. Dies ist durch die stärkere Expression der Oberflächenmoleküle CD45R/B220, CD86 und MHC Klasse II (H2-Ab) im Vergleich zur Expression dieser Antigene bei nur mit Medium behandelten Zellen ("Medium") gezeigt. Hitzeinaktiviertes gp96 ("gp96 gekocht") zeigt ebenso wie Medium keine Aktivierungs-Wirkung, wodurch ausgeschlossen werden kann, daß LPS-Kontaminationen in der gp96-Präparation für die Beobachtungen verantwortlich sind.

Beispiel 7: Schlußfolgerung

Die obigen Experimente zeigen, daß das ER-interne Hitzeschockprotein gp96 auch unbeladen in der Lage ist, die Reifung von Maus- und humanen DCs sowie von B-Zellen zu induzieren. Diese Beobachtung ist besonders bemerkenswert im Lichte der früheren Befunde, wo von gp96 gezeigt wurde, daß es spezifisch an DCs bindet, was zu einer auf die MHC Klasse I beschränkten Kreuzpräsentation gp96-assoziiierter Peptide führte. Der Befund des Herunterregulierens des gp96-Rezeptors auf der Oberfläche reifer DCs erlaubt außerdem die ersten Spekulationen über die Natur des gp96-Rezeptors, der auf DCs exprimiert wird. Mögliche Kandidaten sind endozytische Rezeptoren wie der Scavenger-Rezeptor CD36 oder die Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha\text{v}\beta 5$, von welchen allesamt gezeigt wurde, daß diese bei der DC-Reifung herunterreguliert werden.

Die Erfindung liefert den ersten Beweis, daß gp96 nicht nur ein Peptid-Carrier, welcher die assoziierten Peptide zu professionellen APCs dirigiert, sondern ebenfalls ein direkter Aktivator der DCs und B-Zellen ist. Gp96 könnte daher als ein Gefahrensignal wirken, wenn es aus nekrotischen oder gestreßten Zellen freigesetzt wird, welche sowohl unspezifische als auch spezifische Stimuli an das Immunsystem abgeben.

Wenn sie einmal aktiviert sind, verlieren die DCs die Fähigkeit, neue gp96-komplexierte Peptide aufzunehmen, und gewinnen die Fähigkeit, effizient mit T-Zellen zu kommunizieren, welche für die präsentierten MHC/Peptid-Komplexe spezifisch sind. Diese Situation ähnelt stark derjenigen, die anfangs für die Präsentation von löslichen Antigenen auf MHC Klasse II-Molekülen beobachtet wurde, wo beschrieben wurde, daß DCs in einem Zustand der Antigenpräsentation „arretiert“ sind und bei der Aktivierung der T-Zellen hocheffizient sind.

Dieses neue Merkmal von gp96 liefert eine zusätzliche, bisher unbekannte, Erklärung für dessen hohe Immunogenität und wird es erlauben, seine Anwendung bei der Induktion spezifischer Immunantworten in vivo zu verbessern.

Patentansprüche

1. Verwendung von gp96-Molekülen, die keine interessierenden Antigene tragen, zum Markieren und/oder Aktivieren von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs).
2. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die APCs ausgewählt sind aus der Gruppe: Dendritische Zellen (DCs), Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und peritoneale Exsudat-Zellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gp96-Moleküle als Marker für die Aktivierung und/oder die Reifung und/oder den Differenzierungsstatus der APCs, insbesondere von DCs und B-Zellen, und/oder für unreife DCs und B-zellen verwendet werden.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die gp96-Moleküle markiert, vorzugsweise fluoreszenzmarkiert, weiter vorzugsweise FITC-markiert sind.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die gp96-Moleküle aus humanen und anderen Säugerzelllinien sowie aus Insekten-Zelllinien, aus primären, nicht-menschlichen Säugerzellen, vorzugsweise aus Mauszellen, sowie rekombinant in Escherichia coli oder in Insekten gewonnen werden.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gp96-Moleküle zum Aktivieren der Reifung von APCs, insbesondere DCs und B-Zellen verwendet werden.
7. Verfahren zum Aktivieren von APCs in vitro, bei dem unbeladene gp96-Moleküle, vorzugsweise wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 verwendet werden.
8. Verfahren zum Aktivieren von APCs in vivo, z.B. durch subkutane oder intradermale Injektion von gp96-Molekülen.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die APCs vor der Aktivierung ex-vivo mit Antigenen beladen werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigene ausgewählt sind aus der Gruppe: Tumor-assoziierte, Tumor-spezifische, autoimmunassoziierte, virale und bakterielle Antigene.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die APCs in vitro mit gp96-Molekülen allein oder zusammen mit anderen Faktoren wie beispielsweise TNF-alpha behandelt werden.
12. APCs, hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11.
13. Verwendung der APCs aus Anspruch 12 zur Induzierung einer Immunantwort gegen die Antigene.

14. Verwendung von unbeladenen gp96-Molekülen zur Induzierung einer Toleranz und/oder einer TH2-Typ-Antwort und/oder einer TH1-Typ-Antwort gegen Antigene, vorzugsweise gegen Antigene, die ausgewählt sind aus der Gruppe: Tumor-assoziierte, Tumor-spezifische, autoimmunassoziierte, virale und bakterielle Antigene.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß nicht aktivierte APCs mit stark exprimiertem gp96-Rezeptor verwendet und anschließend mit Hilfe fixierender Substanzen wie bspw. Cytochalasin D in diesem nicht aktivierten Zustand arretiert werden.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der gp96-Rezeptor über markierte, vorzugsweise fluoreszenzmarkierte gp96-Moleküle detektiert wird.
17. Verwendung der APCs aus Anspruch 11 im Rahmen einer Tumorthherapie und/oder -prävention.
18. Therapeutische Zusammensetzung mit APCs nach Anspruch 11 und einem therapeutisch verträglichen Träger.
19. Kit mit wie in den Ansprüchen 1 bis 6 zu verwendenden gp96-Molekülen und den erforderlichen Reagenzien.
20. Verfahren zur in vitro Präparation von DCs aus aus dem Blut isolierten Monozyten und/oder aus dem Knochenmark präparierten Stammzellen, bei dem die Monozyten und/oder Stammzellen mit gp96-Molekülen allein oder in Kombination mit Wachstumsfaktoren wie bspw. GM-CSF behandelt werden.

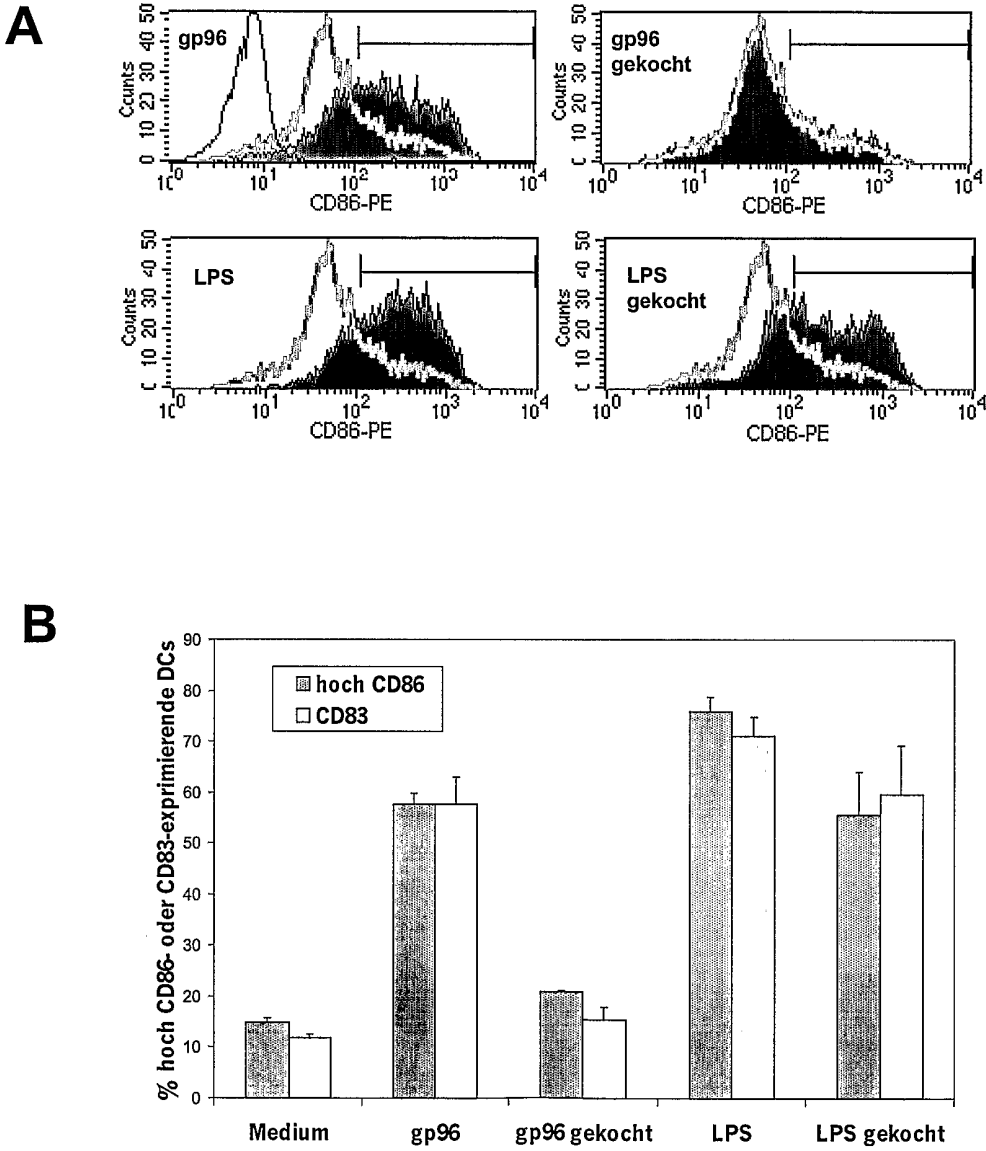


Fig. 1

2 / 5

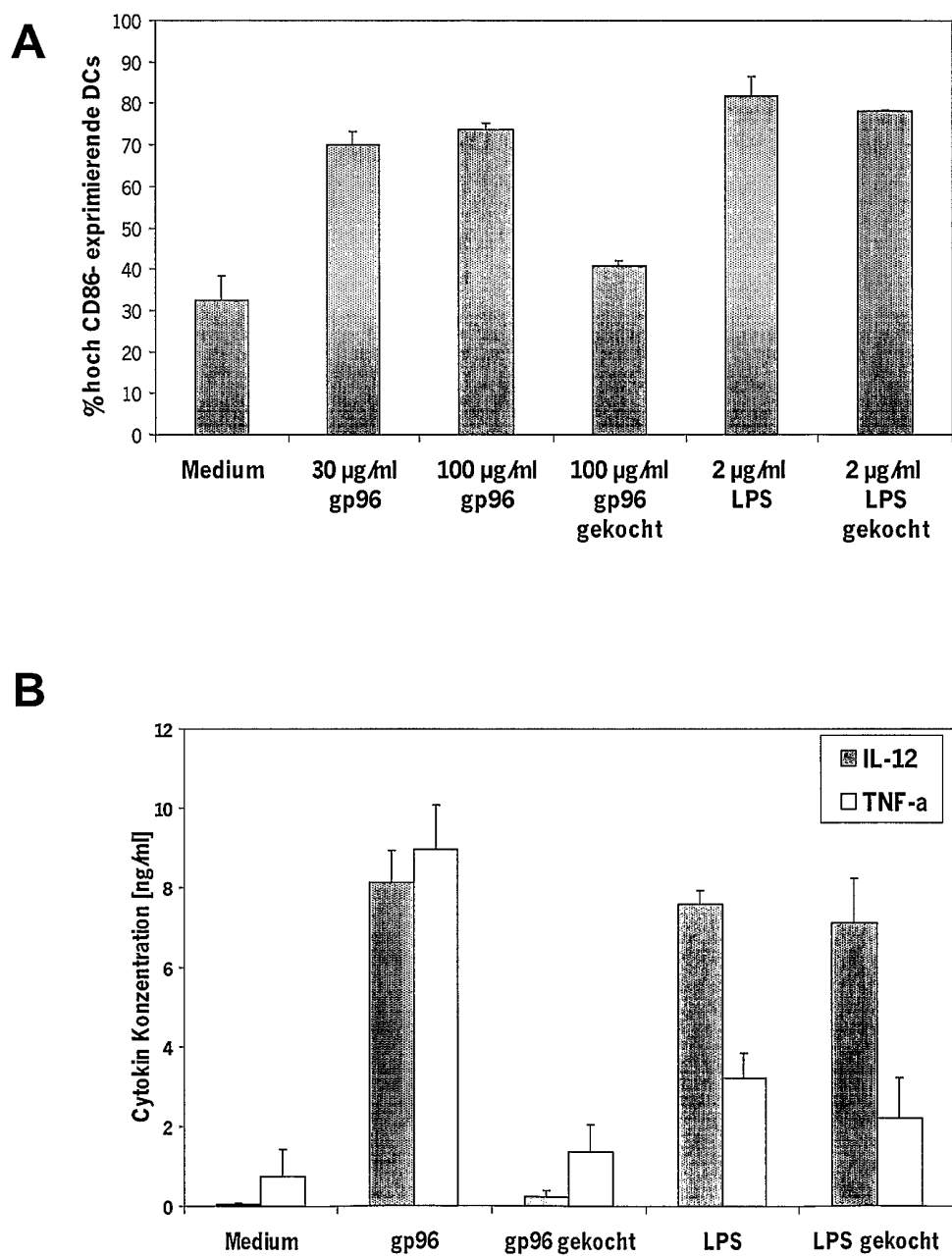


Fig. 2

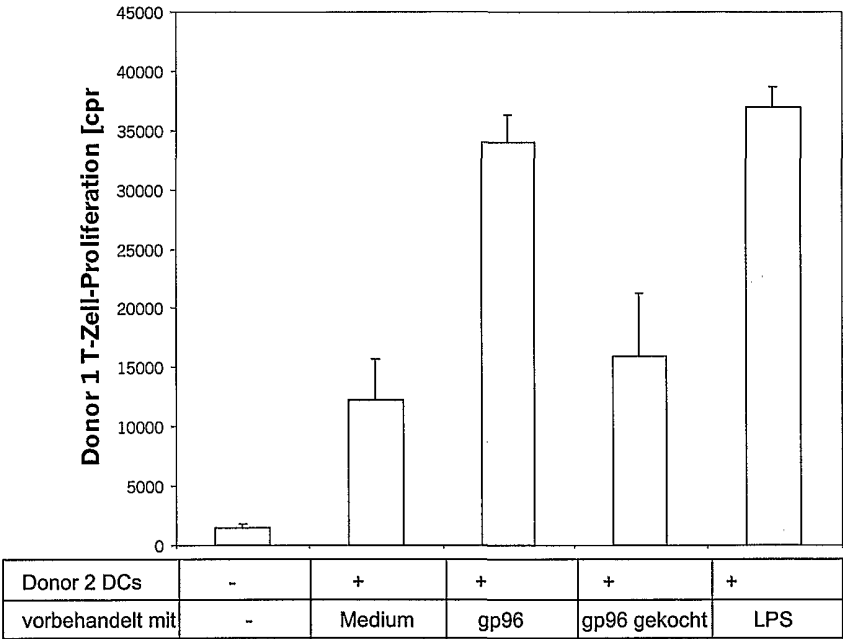


Fig. 3

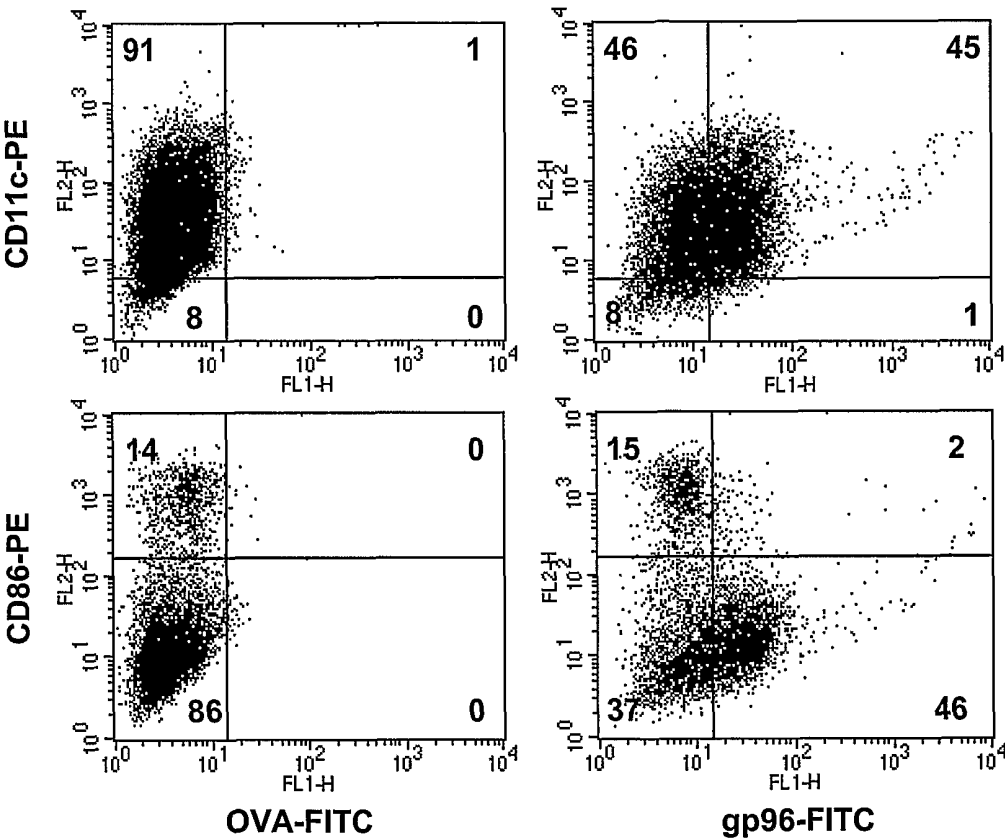


Fig. 4

5 / 5

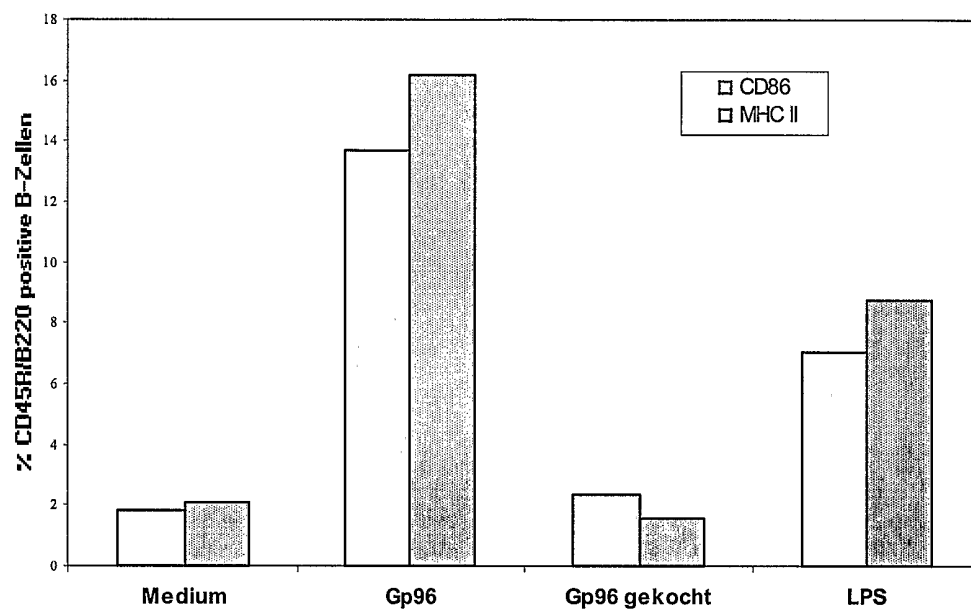


Fig. 5