



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 16 280 T2** 2006.09.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 274 454 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/39** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 16 280.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/12950**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 930 632.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/080882**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.04.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.11.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.12.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.09.2006**

(30) Unionspriorität:

| | | |
|-----------------|-------------------|-----------|
| 198839 P | 21.04.2000 | US |
| 834814 | 12.04.2001 | US |

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Chemocentryx, Inc., San Carlos, Calif., US

(72) Erfinder:

**SCHALL, J., Thomas, San Carlos, US; TALBOT,
Dale, San Francisco, US**

(74) Vertreter:

Hoefler & Partner, 81545 München

(54) Bezeichnung: **METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR INDUZIERUNG EINER IMMUNANTWORT**

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

I. Hintergrund

[0001] Immunisierung oder Impfung ist ein weithin eingesetztes Verfahren, um zu prophylaktischen Zwecken eine Immunantwort in einem Antigen auszulösen. So tritt beispielsweise durch Verabreichung einer harmlosen Form eines Antigens eines Erregers, wie zum Beispiel eines abgeschwächten Virus, die Produktion von Antikörpern und die Stimulation von für die harmlose Form des Erregers spezifischen Immunzellen auf. Derzeitige Immunisierungsverfahren sind jedoch nicht für alle Antigene wirksam. Außerdem gibt es eine beachtliche Verzögerung von der Immunisierung bis zu dem Punkt, an dem das Immunsystem für einen Schutz des Probanden sorgt. Folglich sind verbesserte Verfahren und Reagenzien für die Impfung durch die medizinische Gemeinschaft gewünscht.

[0002] WO-A_99 53960 offenbart Medikamente, die ein Antigen und ein Chemokin (als Hilfsstoff) enthalten, das aus einer großen Zahl möglicher Chemokine ausgewählt werden kann.

[0003] In gleicher Weise beschreibt WO-A-99 29728 die Verwendung von Chemokinen und Antigenen zur Herstellung eines Medikaments, und WO-A-99 43839 beschreibt die Verwendung von Chemokinen und Antigenen bei der Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen.

[0004] Keines der obigen Dokumente zeigt jedoch in solchen Zusammensetzungen irgendwelche speziellen Chemokine als besonders vorteilhaft, insbesondere zum Anziehen von dendritischen Zellen und/oder Makrophagen, auf.

II. Zusammenfassung

[0005] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen bereit, die nützlich sind, um Antigen-präsentierende Zellen zu einem Verabreichungsort zu ziehen, sowie neue Impfstoffe und Immunisierungsverfahren. Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden bei der Herstellung eines Medikaments ein Antigen-präsentierendes Zell-Chemotaxin (APC-Chemotaxin) und ein Antigen verwendet, wobei das APC-Chemotaxin ist:

- (a) ein Chemokin, ausgewählt aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;
- (b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder
- (c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

[0006] Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Impfstoffzusammensetzung bereitgestellt, umfassend ein im Wesentlichen gereinigtes Chemokin-Polypeptid und ein antigenes Polypeptid, worin das Chemokin-Polypeptid Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) oder eine Abart davon ist, die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert, oder mC10 oder eine Abart davon, die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert.

[0007] Gemäß einem weiteren Aspekt wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, umfassend ein im Wesentlichen gereinigtes Antigen-präsentierendes Zell-Chemotaxin (APC-Chemotaxin) und ein Antigen, worin das APC-Chemotaxin ist:

- (a) ein Chemokin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;
- (b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder
- (c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

[0008] Optional kann die Zusammensetzung weiterhin einen pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff oder einen üblichen Zusatz enthalten.

[0009] Gemäß einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren zur Formulierung einer Zusammensetzung bereitgestellt, die in der Lage ist, eine Immunantwort in einem vorgegebenen Antigen bei einer Testperson zu induzieren, umfassend das Kombinieren eines Antigen-präsentierenden Zell-Chemotaxins (APC-Chemotaxin), des vorgegebenen Antigens und eines pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff oder eines üblichen Zusatzes, worin das APC-Chemotaxin ist:

- (a) ein Chemokin, ausgewählt aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;
- (b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder
- (c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

[0010] In einer Ausführungsform können das Medikament, der Impfstoff oder die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung weiterhin ein zusätzliches Chemokin umfassen. Insbesondere können das Medikament, der Impfstoff oder die Zusammensetzungen sowohl vMCK-2 als auch mC10 umfassen. Das APC-Chemotaxin kann durch ein Polynucleotid kodiert sein, das durch in vitro-Rekombination der Polynucleotide, die vMCK-2 oder mC10 kodieren, und einem anderen natürlich vorkommenden Chemokin erzeugt wurde.

[0011] Soweit erforderlich können zusätzliche Chemokine ausgewählt werden aus hMIP1 α , hMIP1 α (70aa), mMIP-1 α , hRANTES, hMET-RANTES, mRANTES, hHCC-1, hMPIF-1, hMPIF-1 (22–137), hMPIF-1 (46–137), hMIP-1 δ , hMCP-4, mMCP-5, mMARC, mEotaxin, mMCP-1(JE), mTECK, mMIP-2, mBLC, hLeucotaktin, mMIG, mMIP-1 β , hMCP-2, hMCP-3, vMIP-1, hMIP-3 α , hMIP-3 β , und/oder mMIP-1 γ .

[0012] In einer Ausführungsform kann das Antigen von einem mikrobiellen Erreger oder einem Tumor-assoziierten Antigen stammen. Insbesondere kann der mikrobielle Erreger ein Bakterium oder ein Virus sein. Das APC-Chemotaxin und das Antigen (z.B. Immunogen) können gleichzeitig verabreicht werden (z.B. durch Injektion), zum Beispiel durch Koinjektion des Immunogens und des APC-Chemotaxins. Alternativ kann dem Probanden das Immunogen verabreicht werden, nachdem das APC-Chemotaxin verabreicht wurde.

[0013] Wie erwähnt ist jede der zuvor beschriebenen Zusammensetzungen nützlich, um Antigen-präsentierende Zellen an eine bestimmte Stelle zu ziehen, d.h., eine Stelle mit Antigen-Konzentration, zum Beispiel in oder nahe zu einem festen Tumor.

[0014] Ebenso sind die Zusammensetzungen nützlich, um die immanente Immunantwort des Probanden zu stimulieren.

IV. Definitionen und Abkürzungen

[0015] Wie hierin verwendet ist eine Zellprobe oder Zellpopulation „im Wesentlichen rein“ oder „im Wesentlichen gereinigt“ wenn mindestens ungefähr 75%, vorzugsweise mindestens ungefähr 85%, oftmals mindestens ungefähr 90%, mindestens ungefähr 95% oder mehr der Gesamtzellen in der Probe von einer definierten Art sind (d.h., dass in einem im Wesentlichen reinen Präparat von dendritischen Zellen z.B. mindestens ungefähr 95% der Gesamtanzahl an Zellen dendritische Zellen sind, während in einem im Wesentlichen reinen Präparat von unreifen dendritischen Zellen z.B. mindestens ungefähr 95% der Gesamtanzahl an Zellen unreife dendritische Zellen sind).

[0016] „Polynucleotid“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Desoxyribonucleotid (DNA) oder Ribonucleotid (RNA) entweder in der einfach- oder doppelt-verdrillten Form, und umfasst bekannte Analoge von natürlichen Nucleotiden, die in einer Weise ähnlich den natürlich vorkommenden Nucleotiden wirken können. Der Ausdruck „Polynucleotid-Kodierung“ bezieht sich auf einen Nucleinsäuresequenz, die die Expression eines speziellen Proteins oder Peptids regelt. Die Nucleinsäuresequenz beinhaltet sowohl die DNA-Sequenz, die in die RNA transkribiert wird, als auch die RNA-Sequenz, die in das Protein übersetzt wird. Die Nucleinsäuresequenz beinhaltet sowohl die Nucleinsäuresequenz in voller Länge als auch von der Sequenz in voller Länge abgeleitete Sequenzen in nicht voller Länge.

[0017] Wie hierin verwendet ist ein „Proband“ ein Säugetier wie zum Beispiel ein Primat (z.B. ein menschlicher Patient oder Freiwilliger, oder ein nicht-menschlicher Primat), oder ein anderes Tier wie zum Beispiel eine Ratte, Maus, Nagetier, Kaninchen (z.B. Versuchstiere) und dgl., und einschließlich landwirtschaftlich wichtige Säugetiere wie zum Beispiel, ohne Beschränkung, eine Ziege, Schwein, Kuh, Schaf, Pferd und dgl., und Haustiere wie zum Beispiel Hunde, Katzen und dgl.

[0018] Wie hierin verwendet bezieht sich die „wesentliche Sequenzidentität“ auf zwei oder mehr Sequenzen oder Untersequenzen, die mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80% oder mindestens 90%, 95%, 98% oder 99% Nucleotid- oder Aminosäure-Restidentität aufweisen, wenn sie zur maximalen Übereinstimmung verglichen und abgeglichen werden, gemessen unter Verwendung einer der folgenden Sequenzvergleichsalgorithmen oder durch visuelle Kontrolle. Zwei Sequenzen (Aminosäure oder Nucleotid) können über ihre volle Länge (z.B. die Länge der kürzeren der beiden, wenn sie von deutlich unterschiedlicher Länge sind) verglichen werden oder über eine Untersequenz wie zum Beispiel mindestens ungefähr 50, ungefähr 100, ungefähr 200, ungefähr 500 oder ungefähr 1000 zusammenhängende Nucleotide oder mindestens ungefähr 10, ungefähr 20, ungefähr 30, ungefähr 50 oder ungefähr 100 zusammenhängende Aminosäurereste.

[0019] Beim Sequenzvergleich dient typischerweise eine Sequenz als Referenzsequenz, mit der Testsequen-

zen verglichen werden. Bei der Verwendung eines Sequenzvergleichsalgorithmus werden Test- und Referenzsequenz in einen Computer eingegeben, falls notwendig Untersequenzkoordinaten bestimmt, und es werden Sequenzalgorithmus-Programmparameter bestimmt. Dann berechnet der Sequenzvergleichsalgorithmus basierend auf den bestimmten Programmparametern die prozentuale Sequenzidentität für die Testsequenz(en) relativ zu der Referenzsequenz.

[0020] Eine optimale Angleichung von Sequenzen zum Vergleich kann z.B. durch den lokalen Homologie-Algorithmus von Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, den Homologie-Angleichungs-Algorithmus von Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, durch das Suche-nach-Ähnlichkeit-Verfahren von Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, durch computerisierte Implementierungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA, und TFASTA im Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), oder durch visuelle Kontrolle (vgl. Im Allgemeinen Ausubel et al., oben) durchgeführt werden. Jede dieser Literaturhinweise und Algorithmen wird durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen. Wenn irgendeiner der vorgenannten Algorithmen verwendet wird, werden die Vorgabewerte für „Window“ länge, gap penalty, etc. verwendet.

[0021] Ein Beispiel für einen Algorithmus, der zur Bestimmung der prozentualen Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit geeignet ist, ist der BLAST-Algorithmus, der in Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403–410 beschrieben ist. Software zur Durchführung von BLAST-Untersuchungen ist öffentlich erhältlich durch das National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dieser Algorithmus umfasst zunächst das Identifizieren von hochtreffsicheren Sequenzpaaren (HSPs) durch Identifizierung von kurzen Worten der Länge W in der Fragesequenz, die mit einigen Grenzwert-Punktzahlen T mit positiven Werten entweder übereinstimmen oder diesen genügen, wenn sie mit einem Wort der gleichen Länge in einer Datenbanksequenz abgeglichen werden. T wird als der Nachbarschafts-Wortpunktzahl-Schwellwert bezeichnet (Altschul et al., oben). Diese Eingangs-Nachbarschafts-Worttreffer dienen als Keime zum Auslösen von Suchläufen, um längere HSPs zu finden, die sie enthalten. Die Worttreffer werden dann solange in beide Richtungen entlang jeder Sequenz ausgeweitet als die kumulative Angleichungspunktzahl erhöht werden kann. Eine Ausweitung der Worttreffer in jede Richtung wird gestoppt wenn: die kumulative Ausgleichspunktzahl mit der Menge X von ihrem maximal erreichten Wert abnimmt; die kumulative Ausgleichspunktzahl aufgrund der Akkumulierung einer oder mehrerer Restangleichungen mit negativem Wert auf Null oder darunter fällt; oder das Ende einer der beiden Sequenzen erreicht wird. Die BLAST-Algorithmus-Parameter W, T und X bestimmen die Empfindlichkeit und die Geschwindigkeit der Angleichung. Das BLAST-Programm verwendet als Voreinstellung eine Wortlänge (W) von 11, die BLOSUM62-Punktzahlmatrix (s. Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), Angleichungen (B) von 50, Erwartungen (E) von 10, M = 5, N = -4, und einen Vergleich beider Verdrillungen.

[0022] Abkürzungen: Bei Bezugnahme auf ein Chemokin meint „h“ menschlich und „m“ meint mausartig. In einigen Fällen werden lateinische Buchstaben anstelle der griechischen α , β oder γ verwendet. Folglich meint, wie hierin verwendet, mMIP-1a Maus-MIP-1 α .

III. Figuren

[0023] [Fig. 1](#) zeigt Entwicklungspfade der dendritischen Zellen.

[0024] [Fig. 2](#) zeigt die Sequenz der beispielhaften chimären Chemokine (Sequenz-ID-Nr. 4–7) und Chemokine, von denen diese abgeleitet werden (Sequenz-ID-Nr. 1–3).

V. Detaillierte Beschreibung

[0025] Die Erfindung stellt Zusammensetzungen bereit, die nützlich sind, um Antigen-präsentierende Zellen an eine Stelle zur Verabreichung zu ziehen. In einem Aspekt bietet die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Induzierung oder Verbesserung einer Immunantwort in einem Antigen in einem Probanden. Die Zusammensetzungen und Verfahren sind unter anderem nützlich zur Formulierung von Impfstoffen und für therapeutische und prophylaktische Impfungen (Immunisierungs-)Protokolle und für die Herstellung von nützlichen Antikörpern (z.B. monoklonale Antikörper zur therapeutischen oder diagnostischen Verwendung).

[0026] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die einen Wirkstoff enthalten, der für dendritische Zellen (DCs) und/oder Makrophagen (zusammen bezeichnet als „Antigen-präsentierende Zellen“ oder „APCs“) chemotaktisch ist. Der Einfachheit halber wird der chemotaktische Wirkstoff manchmal

als „APC-Chemotoxin“ bezeichnet, und die Zusammensetzung, die das APC-Chemotoxin enthält (die Hilfsstoffe oder andere Komponenten enthalten kann) wird hierin manchmal als „die chemotaktische Zusammensetzung“ oder „die Zusammensetzung“ bezeichnet.

[0027] In einigen Ausführungsformen der Erfindung ist das APC-Chemotoxin besonders chemotaktisch für festgelegte Zelltypen (z.B. dendritische Zellen) oder Zellentwicklungsstadien (z.B. unreife dendritische Zellen). In in Beziehung stehenden Ausführungsformen ist der Wirkstoff, während er für einige Zellen chemotaktisch ist, nicht chemotaktisch für bestimmte Zelltypen (z.B. Neutrophile) oder Zellentwicklungsstadien (z.B. reife dendritische Zellen). Die Chemotaxie wird bestimmt unter Verwendung einer oder mehrerer der hierin beschriebenen Untersuchungen.

[0028] Die vorliegende Erfindung beinhaltet weiterhin die Verabreichung eines Antigens, zusätzlich zu der chemotaktischen Zusammensetzung. Folglich werden in einer Ausführungsform die chemotaktische Zusammensetzung und ein Antigen an die selbe physikalische Stelle in dem Probanden verabreicht. Zum Beispiel kann das Antigen mit der chemotaktischen Zusammensetzung kombiniert und die Mischung zusammen verabreicht (z.B. injiziert) werden. Alternativ werden das Antigen und die Zusammensetzung separat in dem gleichen Bereich des Probanden verabreicht (z.B. an der gleichen Stelle injiziert, topisch an der gleichen Stelle appliziert, und dergleichen). In einigen Ausführungsformen werden, wie im Detail unten beschrieben, die Zusammensetzung und das Antigen zu unterschiedlichen Zeiten verabreicht.

[0029] Ohne an einen speziellen Mechanismus gebunden sein zu wollen wird angenommen, dass das/die APC-Chemotoxin(e) eine Immunreaktion in dem Antigen durch Erneuern von APCs in Gebieten mit Antigenkontakt begünstigt/begünstigen. Antigene werden durch APCs aufgenommen und teilweise abgebaut. Anschließend zeigt sich ein Teil des abgebauten Antigens auf der Oberfläche des APC mit MHC Klasse I oder II-Molekülen. Solche Zellen stimulieren die Proliferation von entweder zytotoxischen T-Zellen oder Helfer-T-Zellen, oder die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen.

[0030] Es ist offensichtlich dass die Erfindung in einem Aspekt neue Verfahren und Reagenzien bereitstellt, die für die therapeutische und prophylaktische Immunisierung (d.h., die bewusste Provokation, Verbesserung oder Intensivierung einer adaptiven Immunantwort) nützlich sind. Spezielle erwartete Vorteile gegenüber früheren Immunisierungsverfahren beinhalten: eine der Verabreichung eines Antigens folgende beschleunigte Immunantwort in einem Wirt, eine effektivere Antwort auf die Verabreichung von oder die Belastung mit sehr kleinen Mengen eines Antigens (z.B. Giftstoff oder Erreger) aufgrund einer erhöhten Antigenaufnahme durch ACPs, und effektivere Tumorthérapien (z.B. aufgrund einer verbesserten Tumor-Antigenaufnahme durch Wirt-ACPs).

[0031] Wie hierin verwendet meint eine „Immunantwort“ (wenn nicht anders angegeben) eine adaptive Immunantwort in einem spezifischen Antigen. In einem Aspekt beinhaltet eine Immunantwort die konzertierte Aktion von Lymphozyten, Antigen-präsentierenden Zellen, phagozytischen Zellen und verschiedenen löslichen Makromolekülen beim Schutz des Körpers gegen Infektion oder eine andere Belastung mit Fremdmolekülen. Die Immunantwort kann durch Messung von zellulären oder humoralen Antworten gemäß zahlreicher, im Stand der Technik bekannter Untersuchungen (s. z.B. Coligan et al., 1991 (Suppl. 1999), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley & Sons (im folgenden manchmal „Coligan“)) erfasst und quantifiziert werden (z.B. auf die Immunisierung folgend). Zum Beispiel werden, um eine zelluläre Immunantwort zu erfassen, Effekte von T-Zellen-Effektoren gegenüber Zellen, die das Antigen exprimieren, unter Verwendung von Standard-Untersuchungsverfahren, z.B. targetcell killing, Makrophagenaktivierung, B-Zellen-Aktivierung oder Lymphokin-Produktion, erfasst. Humorale Antworten werden durch Erfassen des Auftretens oder Erhöhung im Titer von Antigen-spezifischen Antikörpern unter Verwendung von Routineverfahren wie zum Beispiel ELISA, gemessen. Der Fortschritt der Antikörper-Antwort kann durch Messung der Umschaltung von Klassen (d.h., das Umschalten von einer frühen IgM-Antwort zu einer späteren IgG-Antwort) bestimmt werden.

[0032] Verschiedene Aspekte der Erfindung werden nun genauer beschrieben, um dem Fachmann eine Anleitung zur Verfügung zu stellen.

A. Chemotaktische Zusammensetzungen

[0033] Gemäß der Erfindung wird eine ein APC-Chemotoxin enthaltende Zusammensetzung verabreicht, um eine Immunantwort in einem Probanden zu induzieren oder zu verbessern. In verschiedenen Ausführungsformen zieht das Chemotoxin dendritische Zellen, Makrophagen oder beides an. Besonders nützlich sind Chemotaxine, die dendritische Zellen, insbesondere unreife dendritische Zellen anziehen. In einer besonders nütz-

lichen Ausführungsform weist das Chemotaxin einen hohen Spezifitätslevel für einen bestimmten Zelltyp, Entwicklungsstadium oder beides auf. Folglich zieht in einer Ausführungsform das APC-Chemotaxin unreife dendritische Zellen an, zieht aber nicht eine oder mehrere der folgenden anderen Klassen von Zellen an: reife dendritische Zellen, Neutrophile, T-Zellen, B-Zellen, Eosinophile, Mastzellen, rote Blutkörperchen, und Stammzellen.

[0034] APC-Chemotaxine können irgendwelche einer großen Vielfalt von Verbindungen sein, sowohl natürlich vorkommend als auch synthetisch, organisch und anorganisch, und Polymere einschließlich (z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Oligonucleotide und Polynucleotide), kleine Moleküle, Antikörper, Zucker, Fettsäuren, Nucleotid-Analoga, Analoga von natürlich vorkommenden Strukturen (z.B. Peptid-Mimetika, Nucleinsäure-Analoga und dergleichen) und zahlreiche andere Verbindungen. In der vorliegenden Erfindung enthält die Zusammensetzung mindestens eines aus mC10, vMCK-2 oder eine Variante eines vorgenannten Chemokins, wie zum Beispiel ein rekombinantes Polypeptid, hergestellt durch in vitro-Mutation, in vitro-Rekombination oder Umsetzung eines die Chemokine kodierenden Polynucleotids, eines Polynucleotids, das mindestens eines der vorgenannten Chemokine oder Varianten-Moleküle kodiert, oder eine synthetische (d.h., chemisch synthetisierte) Polypeptid-Variante (z.B. Mimetika) eines oder mehrerer dieser Chemokine.

[0035] Reagenzien und Verfahren zum, unter anderem, Identifizieren von APC-Chemotaxinen, und Herstellen und Verabreichen der Zusammensetzungen der Erfindung werden unten beschrieben.

1. Untersuchungen zur Identifizierung von APC-Chemotaxinen

[0036] In einem Aspekt der Erfindung werden die APC-Chemotaxine unter Verwendung von in vivo- oder in vitro-Untersuchungen identifiziert.

a) In vitro-Untersuchungen

[0037] Die in den Verfahren der Erfindung verwendeten APC-Chemotaxine weisen gewisse Eigenschaften auf, die durch in vitro-Chemotaxie-Untersuchungen erfasst werden können. In vitro-Chemotaxie-Untersuchungen sind gut bekannt. Oft werden Migrations-Untersuchungen durch physikalisches Trennen der Zellen von dem Chemo-Lockmittel unter Verwendung einer porösen Membran und dem Ermöglichen, dass sich die Zellen entlang eines Diffusionsgradienten des Chemotaxins directional bewegen, durchgeführt (siehe z.B. Keller, 1972, Agents Actions 2:161-69; Gee A.P., 1984, Mol. Cell. Biochem. 62:5-11; Keller et al., 1974, Antibiot. Chemother. 19:112-25).

[0038] Es ist eine Vielfalt von Untersuchungsanordnungen bekannt und für die Anwendung der vorliegenden Erfindung verwendbar. Am häufigsten werden auf Standardfiltern basierende Untersuchungen verwendet, da sie praktisch, stabil und relativ preiswert sind. Diese auf Standardfiltern basierenden Untersuchungen beinhalten eine klassische oder modifizierte Boyden-Kammer und Varianten (siehe, z.B., Bozarth et al., 1997, Meth. Cell Science, 19:179-187; Frevert et al., 1998, J. Imm. Methods, 213:41-52; Penno et al., 1997, Meth. Cell Science, 19:189-195; O'Leary et al., 1997, Am. J. Resp. Cell and Mol. Bio., 16:267-274; Falk et al., 1980, J. Imm. Methods, 33:239-247; Harvath, et al., 1980, J. Imm. Methods, 37:39-45; Richards et al., 1984, Immunological Communications, 13:49-62; Falk et al., 1982, Infection and Immunity 36:450-454; Harvath et al., 1982, Infection and Immunity 36:443-449). Bei filterbasierten Untersuchungen werden Zellen in einem Fach platziert, das durch einen Filter von dem Chemotaxin-Kandidaten getrennt ist, durch den der Chemotaxin-Kandidaten diffundieren kann. Nach einer Inkubationszeit wird die Anzahl der Zellen (oder der Prozentsatz der Gesamtzellen), die auf oder durch den Filter gewandert sind, bestimmt. Die Migration der Zellen bei einem Level oberhalb des Hintergrunds (d.h., die Migration in Abwesenheit des Chemotaxin-Kandidaten, z.B. lediglich in Gegenwart eines Trägers wie zum Beispiel PBS oder einem Chemotaxiepuffer (unten) zeigt, dass der Chemotaxin-Kandidat für den Zielzelltyp tatsächlich chemotaktisch ist. Umgekehrt, wenn die Anzahl von wandernden Zellen bei oder unterhalb des Hintergrunds liegt, wird der Chemotaxin-Kandidat nicht als chemotaktisch für den Zielzelltyp angesehen.

[0039] Eine geeignete Anordnung zur Ausführung von in vitro-Chemotaxie-Untersuchungen ist eine 96-Well-ChemoTx[®]-Mikroplatte (Neuroprobe Inc. Gaithersburg MD). Das ChemoTx[®]-Instrument weist eine 96-Well-Mikroplatte aus spritzgegossenem gewebekulturartigem, transparenten Polystyren auf. Die Mikroplatte bietet Bodenlöcher für Chemo-Lockstoffe und andere Reagenzien. Anstelle von Deckel "löchern" wird ein umrahmtes Filter benutzt, das jede Zellsuspensions-Probe auf ihre Stelle oben auf dem Filter begrenzt. Die 96 Stellen auf dem Filter entsprechen den 96 Löchern in der Mikroplatte und die Zellsuspensionen, die direkt auf diese Stellen oben auf dem Filter pipettiert werden, sitzen während der Inkubation in halbkugelförmigen Trop-

fen. Nach der Inkubation werden die auf dem Filter und in der Mikroplatte gewanderten Zellen gezählt. Siehe U.S.-Patent Nr. 5,284,753.

[0040] Für die Untersuchung auf chemotaktische Aktivität unter Verwendung einer Vorrichtung wie zum Beispiel der ChemoTx®-Mikroplatten-Vorrichtung werden Chemotaxin-Kandidaten (z.B. ungefähr 30 Mikroliter) bei einer oder mehreren Konzentrationen (z.B. ungefähr 1 nM, ungefähr 10 nM, ungefähr 100 nM, ungefähr 10 ng/ml, ungefähr 100 ng/ml und/oder ungefähr 1 µg/ml) in untere Löcher gegeben, und die Zellen werden auf porösen Polycarbonatfiltern oberhalb der Chemotaxinlösung in jedem Well platziert. Die Filter weisen eine Porengröße von ungefähr 3 µm, oder ungefähr 5 µm auf, so dass lediglich die Zellen, die einem für die Zelle chemotaktischen Wirkstoff ausgesetzt sind in und/oder durch das Filter wandern. Bei der Mikroplatten-Anordnung werden normalerweise ungefähr 20 Mikroliter Zellen (bei ungefähr 1×10^6 bis ungefähr 1×10^7 Zellen pro ml, z.B. 5×10^6 Zellen pro ml) verwendet. Die Zellen werden für eine Zeitspanne inkubiert (z.B. 0,5 bis 6 Stunden, normalerweise 1,5 h, zwischen ungefähr 22°C und ungefähr 39°C, normalerweise 37°C), und den Zellen wird ermöglicht, in oder durch das Filter zu wandern.

[0041] Wenn unter Verwendung einer gereinigten Zellpopulation (z.B. dendritische Zellen, Neutrophile, unreife dendritische Zellen, etc.) in vitro-Untersuchungen durchgeführt werden, werden die Untersuchungsbedingungen normalerweise auf den zu untersuchenden Zelltyp zugeschnitten. So sind beispielsweise Zellen, die relativ plastisch sind, in der Lage, durch bestimmte Filter zu kriechen, während andere im Filter „hängen bleiben“. Folglich können einem für Monozyten chemotaktischen Wirkstoff ausgesetzte Monozyten durch ein 5 µm-Filter wandern (in den Überstand der unteren Kammer), während demgegenüber einem chemotaktischen Wirkstoff ausgesetzte unreife oder reife dendritische Zellen in ein 3 µm- oder 5 µm-Filter wandern, aber in dem Filter zurückgehalten werden (d.h., die Zellen wandern nicht durch das Filter). Mithin können die Wahl des Migrationsuntersuchungsformats und des Quantifizierungsverfahrens abhängig von der Art der untersuchten Zellen variieren. So wird beispielsweise eine Porengröße von 5 µm normalerweise für eine Monozyten-Migrationsuntersuchung verwendet; die Untersuchung wird normalerweise 90 Minuten lang durchgeführt, und die wandernden Zellen (falls es welche gibt) werden in dem Well erfasst. Für reife dendritische Zellen werden ein Filter von 3 µm Porengröße und eine 90-minütige Inkubation verwendet, und die Zellen werden im Filter erfasst. Diese und andere beispielhafte Untersuchungsbedingungen sind in Tabelle 1 gezeigt. Es ist jedoch klar, dass, wie oben angemerkt, eine Anzahl unterschiedlicher Untersuchungsformate und -Bedingungen verwendet werden können, um zu entscheiden, dass ein Wirkstoff chemotaktische Aktivität (z.B. für eine bestimmte Zelle) besitzt (oder nicht). Tabelle 1 bietet auch beispielhafte positive und negative Kontrollstoffe zur Verwendung bei Untersuchungen. Positive Kontrollstoffe sind Wirkstoffe, die, wenn in einer Konzentration von 100 nM verwendet, chemotaktische Aktivität aufweisen. Negative Kontrollstoffe sind Wirkstoffe, die, wenn in einer Konzentration von 100 nM verwendet, keine chemotaktische Aktivität aufweisen.

Tabelle 1

Beispielhafte Untersuchungsparameter sowie positive und negative Kontrollstoffe für In Vitro-Chemotaxie-Untersuchungen

| Zelltyp | Filter | Zeit | Einsatzort | +Kon. | -Kon. |
|------------|--------|------|------------|---------|---------|
| Monozyt | 5 µm | 90 | Well | RANTES | MIP1b |
| immDC | 5 µm | 90 | Filter | RANTES | SLC |
| matDC | 3 µm | 90 | Filter | SLC | RANTES |
| neutro | 3 µm | 60 | Well | IL8 | SLC |
| eosino | 3 µm | 60 | Well | Eotaxin | |
| | | | | IL8 | |
| T-Zelle | 3 µm | 180 | Well | MDC | Eotaxin |
| B-Zelle | 3 µm | 180 | Well | SLC | Eotaxin |
| Makrophage | 5 µm | 90 | Filter | RANTES | SLC |
| | | | (+ Well) | | |

Legende: +Kon. (positiver Kontrollstoff), -Kon. (negativer Kontrollstoff) werden bei Konzentrationen von 100

nM verwendet.

[0042] Die Anzahl der Zellen, die in Gegenwart des Wirkstoffs gewandert sind, kann unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren bestimmt werden. Um Zellen (z.B. dendritische Zellen) zu untersuchen, die in einem Filter aufgefangen wurden, werden die Filter abgekratzt, um nicht festhaftende Zellen (d.h., Zellen, die sich einfach auf der Oberseite des Filters abgesetzt haben) zu entfernen, und die Zellen, die sich in das Filter bewegt haben oder an seiner unteren Oberfläche anhaften, werden quantitativ bestimmt. Für Zellen, die in der Lage sind, durch den Filter zu wandern (z.B. Monozyten) kann der Filter weggenommen werden und die Anzahl der Zellen, die durch den Filter in die „untere“ (Chemotaxin-enthaltende) Kammer gewandert sind, wird bestimmt. Geeignete Zellquantifizierungsverfahren sind wohlbekannt und beinhalten das direkte (mikroskopische) Zählen von gewanderten Zellen, histologische, cytochemische, Immunofluoreszenz- (unter Verwendung von Antikörpern von zellspezifischen oder stadiumspezifischen Markern), und in situ-Anfärbeverfahren, Verwendung von markierten Zellen, und Untersuchungen auf den RNA- oder DNA-Gehalt (z.B. unter Verwendung von Reagenzien wie zum Beispiel CyQuant, Molekularsonden, Eugene-OR, z.B. auf einem lysierten Zellextrakt), Proteingehalt (z.B. unter Verwendung von Anfärbemitteln wie zum Beispiel Hema3), Enzymaktivität (z.B. β -Glucuronidase) und dergleichen. Oftmals ist es günstig, Anfärbemittel auszuwählen, die unter Verwendung von densitometrischen oder Fluoreszenzplattenlesern bestimmt werden können.

[0043] In einigen Ausführungsformen werden verschiedene Konzentrationen des Chemotaxin-Kandidaten verwendet, um über einen Bereich von mindestens 10-fachen, typischerweise mindestens 100-fachen, häufig mindestens 1000-fachen und oft mindestens 10000-fachen Differenzen eine aktive Konzentration zu bestimmen, z.B. mindestens zwei, typischerweise mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen.

[0044] Die Chemotaxie-Untersuchungen können unter Verwendung einer heterogenen Mischung von Zellen (z.B. mononukleare periphere Blutzellen (PBMCs)) oder einer gereinigten Unterpopulation (z.B. unreife DCs, reife DCs, Neutrophile, Monozyten und dergleichen) oder von einem bestimmten Zelltyp abgeleitet Gewebekulturzellen und Charakterisierung dieser Zellen (z.B. THP1 (eine akute monolytische Leukämie-Zelllinie, CEM-akute lymphoblastische Leukämie, T-Lymphoblast-Zelllinie). Wenn eine heterogene Mischung von Zellen verwendet wird, wird normalerweise der Zelltyp oder das Entwicklungsstadium von wandernden Zellen bestimmt (z.B. basierend auf Morphologie, Histologie oder Anfärben von speziellen Markern). Wenn die Untersuchung unter Verwendung einer homogenen Präparation durchgeführt wird (z.B. im Wesentlichen gereinigte Neutrophile), ist es nicht notwendig, den Zelltyp von wandernden Zellen zu bestimmen, da von jedweden Zellen, die zu einem Chemotaxin wandern, angenommen werden kann, dass sie diesem Typ angehören.

[0045] In verschiedenen Ausführungsformen wird ein Chemotaxin-Kandidat als für einen bestimmten Zelltyp chemotaktisch angesehen, wenn der Chemotaxin-Kandidat in einer in vitro-Untersuchung bei einer Konzentration zwischen ungefähr 1 pM und ungefähr 1 μ M, z.B. zwischen ungefähr 1 nM und 500 nM, z.B. 1 nM, ungefähr 10 nM, ungefähr 100 nM, oder zwischen ungefähr 1 pg/ml und ungefähr 10 μ g/ml, z.B. zwischen ungefähr 1 ng/ml und 1 μ g/ml, z.B. ungefähr 10 ng/ml, ungefähr 100 ng/ml oder ungefähr 1 μ g/ml, die Zelle zumindest zweifach, vorzugsweise mindestens vierfach, und oftmals mindestens achtfach häufiger als der „Chemotaxie-Puffer“ (ein negativer Kontrollstoff) anzieht. Der Chemotaxie-Puffer besteht aus 0,1% BSA (Sigma) in HBSS (Life Technologies), mit 1,4 mM Ca^{++} und 1 mM Mg^{++} . HBSS ist Hank's Balanced Salt Solutions (CaCl_2 (0,14 g/l), KCl (0,4 g/l), KH_2PO_4 (0,06 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), NaCl (8 g/l), NaHCO_3 (0,3 g/l), Na_2HPO_4 (0,048 g/l), D-Glucose (1 g/l)). Ein alternativer negativer Kontrollstoff ist PBS. Ein Chemotaxin-Kandidat wird als nicht chemotaktisch für einen Zelltyp angesehen, wenn der Chemotaxin-Kandidat in einer in vitro-Untersuchung bei einer Konzentration von 1 nM, 10 nM, 100 nM, oder 10 ng/l, 100 ng/l oder 1 μ g/l nicht mehr Zellen anzieht (z.B. mindestens so viele, manchmal mindestens 1,5 mal so viel) als der negative Kontrollstoff. In gleicher Weise wird in verschiedenen Ausführungsformen ein Chemotaxin-Kandidat als chemotaktisch für einen bestimmten Zelltyp angesehen, wenn der Chemotaxin-Kandidat, wenn er in einer in vivo-Untersuchung (z.B. intradermale Injektion in eine Maus oder einen Affen) mit 2 μ g, alternativ 10 μ g, oftmals 20 μ g injiziert wird, die Zelle mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens fünffach, und oftmals mindestens zehnfach häufiger anzieht als PBS (ein negativer Kontrollstoff). In verschiedenen Ausführungsformen wird ein Chemotaxin-Kandidat als nicht chemotaktisch für einen Zelltyp angesehen, wenn der Chemotaxin-Kandidat in einer in vivo-Untersuchung, wenn er mit 2 μ g, alternativ 10 μ g, oftmals 20 μ g injiziert wird, nicht mehr Zellen des Typs (z.B. mindestens so viele, manchmal mindestens 1,5 mal so viele) anzieht wie der negative Kontrollstoff. PBS ist phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (KCl (0,2 g/l), KH_2O_4 (0,2 g/l), NaCl (8,0 g/l), Na_2HPO_4 (2,16 g/l)).

[0046] In einigen Ausführungsformen wird ein Wirkstoff als chemotaktisch bestimmt, weil er eine größere chemotaktische Aktivität aufweist als ein bekanntes Chemotaxin (z.B. aus dem Stand der Technik oder durch die

hierin beschriebenen Untersuchungen bekannt).

[0047] Nicht auf Filter basierende Chemotaxie-Untersuchungen können ebenfalls verwendet werden, z.B. kann eine Zellmigrations-Untersuchung unter Verwendung einer monomolekularen Schicht von auf dem Filter als Barriere aufgewachsenen Zellen durchgeführt werden. In anderen Beispielen kann die Zellbeweglichkeit auch durch Beobachten der Bewegung einer einzelnen Zelle unter dem Videomikroskop beurteilt werden. Bei dieser Art Experiment wird der Chemolockstoff durch einen Kapillare zugegeben, und die physikalische Entfernung der lateralen Bewegung der Zelle in Richtung der Quelle des Chemolockstoffs wird aufgezeichnet.

b) In vivo-Untersuchungen

[0048] In einer Ausführungsform können die chemotaktischen Eigenschaften eines Wirkstoffs in Tieren, z.B. Säugetieren wie zum Beispiel nicht-menschlichen Primaten und Mäusen, wie in den Beispielen 2–4, unten, bestimmt werden. Bei einer in vivo-Untersuchung wird der chemotaktische Kandidatenwirkstoff (z.B. 2–20 µm in PBS) dem Tier durch intradermale Injektion verabreicht. Nach einer Zeitspanne (z.B. 24 h, 72 h, 96 h) wird das Tier eingeschläfert, oder es wird eine Biopsie durchgeführt. Das Gebiet um die Einstichstelle wird exzidiert und routinemäßigen histologischen oder immunohistologischen Techniken unterworfen, um die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Zellinfiltration festzustellen, und, falls ein Infiltrat vorliegt, die infiltrierten Zellen (siehe, z.B., mononukleare Zellen, Neutrophile, dendritische Zellen, etc.) zu charakterisieren und zu quantifizieren. Zu allgemeinen histologischen Verfahren siehe, z.B., THE MANUAL OF HISTOLOGIC STAINING METHODS OF THE ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY, von Lee G. Luna, McGraw-Hill, 3. Auflage, 1968 (im folgenden "Luna"). In einer Ausführungsform werden Zellen durch Herstellen gefrorener Sektionen und Anfärben mit zellspezifischen Antikörpern oder zelltyp-spezifischen Kombinationen von Antikörpern unter Verwendung wohlbekannter Verfahren charakterisiert (siehe Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory).

2. Charakterisierung von Zelltypen und Herstellung von gereinigten Zellen

[0049] Wie oben angemerkt können angereicherte oder im Wesentlichen gereinigte Zellpopulationen in in vitro-Chemotaxie-Untersuchungen verwendet werden. Diese Zellpopulationen können, abhängig vom gewünschten speziellen Zelltyp, durch eine Vielzahl von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden. Typischerweise werden im Wesentlichen gereinigte Zellpopulationen durch Kultivierung unter speziellen Bedingungen, durch physikalische Charakteristika wie zum Beispiel Verhalten in einem Dichtegradient, durch Sortieren gemäß charakteristischen Markern (z.B. Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (fluorescence activated cell sorting – FACS) unter Verwendung von monoclonalen Antikörpern zu Zelloberflächen-Proteinen, Immunopräzipitation) oder andere Verfahren hergestellt.

[0050] Zellen (z.B. in einer angereicherten Probe in vitro oder in einem Infiltrat in vivo) können histologisch identifiziert werden (siehe, z.B., Luna, oben), durch immunologisches Anfärben und ähnliche Verfahren (siehe, z.B., Harlow, oben; Coligan et al., oben). Tabellen 2A und 2B führen beispielhafte Marker auf, die zur Charakterisierung oder Reinigung (z.B. FACS-Sortierung) von bestimmten Immunsystem-Zellen nützlich sind. Viele andere Marker sind aus dem Stand der Technik bekannt, sowohl für die aufgeführten Zellen und für andere Immunsystem-Zellen wie beispielsweise B-Zellen, T-Zellen, Neutrophile, Eosinophile und andere (siehe, z.B., Janeway-Travers, 1994, IMMUNOBIOLOGY Garland Pub., N.Y.; Paul, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY 3. Aufl., Raven Press N.Y. 1993). Tabelle 2A zeigt bestimmte klassische Zelloberflächen-Marker; Tabelle 2B zeigt bestimmte Chemokin-Rezeptoren, ausgedrückt durch spezielle Zelltypen.

Tabelle 2A

Ausgewählte Zelloberflächen-Marker

| | CD3 | CD14 | CD20 | CD25 | CD68 | CD80 | CD83 | CD86 | HLA-DR | CD1a |
|---------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|---------|---------|------|
| Von Monozyten abgeleitete unreife DCs | - | - | - | - | + | - | - | - | niedrig | hoch |
| Reife DCs | - | - | - | + | | + | + | hoch | hoch | + |
| Makrophagen | | hoch | | | + | | | | | - |
| Monozyten | - | + | - | - | | - | - | niedrig | niedrig | - |

Legende: Tabelle 2A zeigt die Level der Marker, bestimmt durch Anfärben mit einem für den Marker spezifischen Antikörper. „-“, gibt ein Anfärben äquivalent zu einem Isotop-Kontrollantikörper an (ein Isotop-Kontrollantikörper ist eine Antikörper des selben Isotops wie der Anfärbe-Antikörper, der jedoch das in Frage stehende Epitop nicht erkennt). „+“ gibt mindestens um das Zehnfache höhere Anfärbelevel als Isotopenkontrolle an; „niedrig“ gibt ein Anfärben um das 2–5-fache höher als die Isotopenkontrolle an; „hoch“ gibt ein Anfärben um das 10–1000-fache höher als die Isotopenkontrolle an.

Tabelle 2B

| | CC R1 | CC R2 | CC R3 | CC R5 | CC R6 | CC R7 | CXC R1 | CXC R2 | CXC R3 | CXC R4 | CXC R5 | XC R1 |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Unreife DCs | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Reife DCs | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| Monozyten | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |

[0051] Um den Leser weiter zu unterstützen, werden Verfahren zur Herstellung von im Wesentlichen gereinigten Zellzusammensetzungen zur Verwendung in in vitro-Chemotaxie-Untersuchungen unten und in den Beispielen kurz beschrieben. Es ist jedoch klar erkennbar, dass die Erfindung nicht erfordert, dass irgendein besonderes Reinigungsverfahren verwendet werden muss, solange die gewünschten Zellen erhalten werden, und dass dem Fachmann viele Variationen und alternative Verfahren bekannt sind. Des Weiteren ist erkennbar, dass viele andere Reinigungs- und Erkennungsverfahren, einschließlich Verfahren, die für Zellen geeignet sind, die hierin nicht speziell angegeben sind, aus dem Stand der Technik bekannt sind oder entwickelt werden können. Noch weiter ist erkennbar, dass, wenn gewünscht, von Immunsystemgeweben abgeleitete, geklonte Zelllinien bei den hierin beschriebenen Chemotaxie-Untersuchungen verwendet werden können. Allgemeine immunologische, Reinigungs- und Zellkultivierungsverfahren sind beschrieben in Coligan et al., 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley & Sons, einschließlich Ergänzungsbände bis 1999. Wenn nicht anders vermerkt werden Zellen, wenn sie kultiviert werden, bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert.

A) Monozyten

[0052] Geeignete Verfahren zur Reinigung von Monozyten finden sich in Bender et al., 1996, J. Immunol. Methods 196:121–35 (siehe auch U.S. Patent Nr. 5,994,126). In Kürze, Monozyten werden von PBMC durch Anreicherung von T-Zellen unter Verwendung immobilisierter Antikörper gegen einen Pan T-Zellen-Oberflächenmarker CD2 isoliert. Herkömmlicherweise wird eine kommerziell erhältliche Quelle von an magnetische Kügelchen (Dynal) angebrachten CD2-Antikörpern verwendet. Von einem Leukozytenfilm (typischerweise 35 mls enthaltend 400×10^6 PBMC) durch das herkömmliche Ficoll-Gradient-Zentrifugierverfahren isoliertes PBMC wird in MACS-Puffer (hergestellt aus DPBS (HyClone) mit 1% BSA (Sigma)) mit 20×10^6 Zellen pro ml resuspendiert. DPBS ist Dulbecco's phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (CaCl₂ (0,1 g/l), KCl (0,2 g/l), KH₂PO₄ (0,2 g/l), MgCl₂·6H₂O (0,1 g/l), NaCl (8,0 g/l), Na₂HPO₄ (2,16 g/l)). Eine entsprechende Menge von im-

mobilisiertem CD2 + magnetische Kügelchen (typischerweise 10 µl pro 10⁶ Zellen) werden zu den Zellen hinzugegeben. Die Mischung wird 15 Minuten lang unter leichter Rotation bei 4°C inkubiert. Die magnetisch angehängten T-Zellen werden von den nicht markierten Zellen auf einem magnetischen Zellsortierer (Dyna) gemäß den Angaben des Herstellers entfernt. Die nicht markierten Zellen enthalten hauptsächlich Monozyten und B-Zellen.

[0053] Die B-Zellen in der obigen Zubereitung werden durch das herkömmliche Kunststoff-Anhaftungsverfahren entfernt. Kurz gesagt wird dem an T-Zellen verarmten PBMC gestattet, 3 Stunden lang bei 37°C an dem Kunststoff eines T-175-Gewebe-Kultivierungskolben (100 × 10⁶ Zellen/Kolben) (Costar) anzuhafte. Nicht-anhaftende Zellen (größtenteils B-Zellen enthaltend) werden aspiriert. Die Kolben werden drei weitere Male mit DPBS gespült, um nicht-anhaftende Zellen vollständig zu entfernen. Die resultierenden Zellen sind in hohem Maße an Monozyten angereichert (d.h., > 90%).

[0054] Monozyten können auch durch positive Auswahl von CD14-Antigen isoliert werden. Kurz gesagt wird aus peripherem Blut, wie zum Beispiel einem Leukozytenfilm, durch das Standard-Ficoll-Gradient-Zentrifugierverfahren isoliertes PBMC in MACS-Puffer mit 1 × 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Immobilisierte Antikörper gegen das CD14-Oberflächenantigen, wie zum Beispiel CD14+ magnetische Mikrokügelchen (Miltenyi) werden zugegeben (1 µl Kügelchen pro 1 × 10⁶ Zellen), und die Mischung wird bei 4°C 15 Minuten lang inkubiert. Die Monozyten werden von den anderen Zellpopulationen durch Durchleiten der Mischung durch eine positive Auswahlssäule auf einem magnetischen Zellsortierer (Miltenyi) gemäß den Angaben des Herstellers getrennt. Monozyten, die auf der Säule zurückgehalten werden, werden mit MACS-Puffer eluiert, nachdem die Säule aus der MACS-Vorrichtung entfernt wurde. Die Zellen werden DNA durch Zentrifugieren pelletiert und in RPMI plus 10% FCS-Medium zu 10⁶ Zellen pro ml resuspendiert. Die durch dieses Verfahren isolierten Monozyten werden auf dem Wesentlichen demselben Weg kultiviert wie die durch das CD2+-Verarmungsverfahren isolierten.

B. Herstellen von gereinigten Zellpopulationen

[0055] Geeignete Verfahren zur Reinigung von dendritischen Zellen einschließlich der Trennung von reifen und unreifen Populationen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Im Wesentlichen gereinigte dendritische Zellen (einschließlich Unterpopulationen von reifen oder unreifen Zellen) können durch selektive in vitro-Kultur-Bedingungen hergestellt werden.

[0056] Dendritische Zellen sind weit verbreitet in allen Geweben, die Kontakt mit potenziellen Erregern haben (z.B. Haut, Gastrointestinal- und Atmungstrakt, und T-Zellenreiche Gebiete der sekundären Lymphgewebe). In der Haut und dem oberen Atmungstrakt bilden sie ein Gitter hoch arborisierter Zellen (genannt Langerhans-Zellen in der Haut). Nach dem Einfangen von Antigen wandern die dendritischen Zellen in den peripheren Geweben wie zum Beispiel der Haut und des Darms, über die ableitenden Lymphbahnen zu den T-Zellenbereichen der Lymphknoten, wo sie das Antigen, das an der Stelle des Kontakts mit dem Erreger verinnerlicht wurde, präsentieren. Unreife dendritische Zellen wirken so, dass sie Antigene aufnehmen und verarbeiten. Während der nachfolgenden Migration zu dem ableitenden Lymphknoten reift die DC. Die reifen dendritischen Zellen wirken als Haupt-APC, um durch Induzieren der Proliferation des erregerspezifischen zytotoxischen und Helfer-T-Zellen Immunantworten auszulösen.

[0057] Im Wesentlichen gereinigte Populationen von dendritischen Zellen können durch in vitro-Kultivierung hergestellt werden (siehe unten). Zudem gibt es markierte Veränderungen in der Expression des Chemokinrezeptors während der Reifung der dendritischen Zellen, die dazu benutzt werden können, das Zellstadium zu identifizieren (Campbell et al., 1998, J. Cell Biol. 141:1053; Chan et al., 1999, Blood 93:3610; Dieu et al., 1998, J. Exp. Med. 188:373; Kellermann et al., 1999, J. Immunol. 162:3859). Zum Beispiel exprimieren unreife dendritische Zellen überwiegend CCR1, CCR5 und CXCR4. Nach dem Reifen werden diese Rezeptoren, mit Ausnahme von CXCR4, herunterregelt. Siehe auch Tabelle 2B.

[0058] Bei der Kultivierung erleiden unreife Formen von dendritischen Zellen eine Reifung, von der angenommen wird, dass sie analog zu dem ist, was während der Migration von dendritischen Zellen vom Zeitpunkt des Kontakts mit dem Erreger bis zu ihrem Aufenthalt in den sekundären Lymphgeweben auftritt. Menschliche oder dendritische Zellen von Affen verschiedener Entwicklungsstufen können in der Kultivierung von CD14⁺-Blutvorläufern unter Verwendung spezifischer Cytokine erzeugt werden. Eine separate Abstammung von dendritischen Zellen kann von CD34⁺-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark unterschieden werden. Folglich werden in einer Ausführungsform der Erfindung, Unterpopulationen von dendritischen Zellen für in vitro-Untersuchungen zur Identifizierung von chemotaktischen Zusammensetzungen hergestellt (d.h., um che-

motaktische Wirksamkeit und Selektivität gegenüber definierten DC-Unterarten festzustellen). Beispielhafte Unterpopulationen von dendritischen Zellen sind: 1) unreife Zellen, abgeleitet von Peripherblut-Monozyten; 2) reife Zellen, abgeleitet von Peripherblut-Monozyten, und 3) Zellen, die von CD34+-Vorläufern abgeleitet sind. Unterpopulationen werden durch eine Vielfalt von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert oder hergestellt.

[0059] Zum Beispiel werden reife und unreife dendritische Zellen aus PBMCs gemäß Bender et al., oben, hergestellt.

Unreife dendritische Zellen

[0060] Kurz gesagt werden PBMCs unter Verwendung von gegenüber dem Zelloberflächen-Marker CD2 (anwesend auf allen T-Zellen) immobilisierten Antikörpern an T-Zellen verarmt. Es können kommerziell erhältliche CD2+-Dynakügelchen (Dyna) nach Angaben des Herstellers verwendet werden. Die an T-Zellen verarmte Mischung wird durch Inkubation der Zellen auf Gewebekulturqualität-Kunststoff 3 Stunden lang bei 37°C in anhaftende gegenüber nicht-anhaftende Fraktionen getrennt. Anhaftende Zellen heften sich innerhalb der 3 Stunden an die Oberfläche, während die nicht-anhaftenden Zellen in Suspension verbleiben. Nicht-anhaftende Zellen werden behutsam entfernt und anhaftende Zellen (im Allgemeinen CD14⁺-Monozyten) werden in Kultivierungsmedium platziert (z.B. RPMI + 10% FCS), ergänzt mit jeweils 1000 U/ml GM-CSF und IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) („Tag 1“). Zwischen den Tagen 3–7 beginnen die Zellen eine verschleierte Morphologie zu zeigen, und an den Tagen 2, 4 und 6 werden Cytokine aufgefüllt, zu welcher Zeit die Zellen als unreife dendritische Zellen geerntet werden können. In einer Ausführungsform werden Zellen dieses Stadiums *in vitro* isoliert und in der Untersuchung verwendet. Ungefähr 10×10^6 dendritische Zellen werden typischerweise aus 400×10^6 PBMCs erhalten.

[0061] Die unreifen dendritischen von Tag 7 zeigen die typische dendritische Zellmorphologie mit verlängertem Zellkörper und vielen Fortsätzen. Die Größe der Zellen nimmt, verglichen zu den Vorläufer-Monozyten, signifikant zu. Unreife dendritische Zellen können phenotypisch durch Beobachtung ihrer Expression der Zelloberflächenmarker charakterisiert werden.

Reife dendritische Zellen

[0062] Unreife dendritische Zellen (erzeugt aus peripheren Blut-Monozyten oder aus aus Knochenmark abgeleiteten CD34+-Vorläufern) können weiter aktiviert und differenziert werden, um zu reifen dendritischen Zellen zu werden. Zwei Verfahren werden hauptsächlich verwendet: MCM (Makrophagenkonditioniertes Medium) und doppelt verdrillte RNA-Poly (I:C)-Stimulation (Cella et al., 1999, J. Exp. Med. 189:821.9; Verdijk et al., 1999, J. Immunol. 1999 1:57–61).

[0063] Im MCM-Verfahren werden dendritische Zellen von Tag 6 durch Zentrifugieren geerntet und in einem Reifungsmedium mit 10^6 Zellen/ml (z.B. MCM) (bis zu 1:1 mit RPMI enthaltend 10% FCS verdünnt) resuspendiert. GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (1000 U/ml) werden zugegeben. Die Zellen werden drei weitere Tage ohne weitere Zugabe von GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 kultiviert. Als reife dendritische Zellen werden die Zellen von Tag 9 verwendet.

[0064] Im Poly (I:C)-Verfahren, werden unreife dendritische Zellen von Tag 6 geerntet und in dem Standard-Kultivierungsmedium (RPMI plus 10% FCS), ergänzt mit 20 µg/ml Poly(I:C) (Sigma), 1000 U/ml GM-CSF und IL-4 resuspendiert. Die Zellen werden weitere drei Tage ohne zusätzliche Cytokine kultiviert. Zellen von Tag 9 sind reife dendritische Zellen.

[0065] Durch diese beiden unterschiedlichen Verfahren hergestellte reife dendritische Zellen zeigen phenotypische und funktionale Eigenschaften, die sich von denen unreifer dendritischer Zellen oder den Vorläufer-Monozyten unterscheiden (siehe Tabelle 2A). Reife dendritische Zellen aus jeder Präparation werden sorgfältig durch FACS charakterisiert, um sicherzustellen, dass die gewünschten Zelltypen erhalten wurden.

[0066] In besonderem Maße zeigen erzeugte reife dendritische Zellen signifikant höhere Level von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche als unreife Zellen. Die Expressionen von CD 80, CD 83 und CD 86 sind ebenfalls nach oben reguliert. Die Chemokinrezeptor-Expression verändert sich ebenfalls dramatisch während des Reifeprozesses. Zum Beispiel werden CCR1, CCR5 in reifen Zellen scharf nach unten reguliert, während CCR7 nach oben reguliert wird und innerhalb weniger Stunden nach der Zugabe von MCM auf der Zell-Oberfläche erscheint. Funktionsgemäß sind reife dendritische Zellen nicht länger in der Lage, Antigen effizient auf-

zunehmen, erlangen jedoch die Fähigkeit, die Proliferation von naiven T-Zellen und B-Zellen zu stimulieren. Reife dendritische Zellen ändern auch ihr Migrationsverhalten; sie antworten nicht länger auf Liganden von CCR1, CCR2, CCR5 wie zum Beispiel MIP-1 α , RANTES und MIP-1 β . Stattdessen antworten sie auf die CCR7-Liganden SLC und ELC.

MCM-Medien

[0067] MCM wird wie durch Romani et al., J. Immunol. Methods 196:137 beschrieben mit geringen Modifizierungen hergestellt. Kurz gesagt werden Petrischalen (100 mm, Falcon) mit 5 ml menschlichem Ig (10 mg/ml) 30 Minuten lang bei 37°C beschichtet und unmittelbar vor der Verwendung mit PBS 2–3 Mal gewaschen. 50×10^6 PBMC in 8 ml Volumen werden auf mit menschlichem Ig beschichteten Platten 1–2 Stunden lang aufgeschichtet. Nicht-anhaftende Zellen werden gewaschen und verworfen. Die anhaftenden Zellen werden in frischem komplettem Medium (RPMI + 10% normales menschliches Serum) bei 37°C inkubiert und das resultierende Medium (MCM) wird nach 24 Stunden gesammelt. Die TNF- α -Konzentration in dem MCM wird durch das Standard-ELISA-Verfahren bestimmt (z.B. unter Verwendung einer TNF- α -ELISA-Einrichtung (R&D Systems, Minneapolis, MN)). Der endgültige TNF- α -Level in MCM wird durch Vermischen einer geeigneten Menge von MCM mit RPMI mit 10% fötalem Kalbsserum auf 50 U/ml eingestellt.

B) Neutrophile

[0068] Geeignete Verfahren zur Reinigung von Neutrophilen sind aus dem Stand der Technik bekannt. Gemäß eines geeigneten Verfahrens wird, um Neutrophile zu reinigen, ganz frisches Blut (WB) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 1:1 mit 3% Dextran verdünnt, und ihm ermöglicht, sich 30–45 min bei Raumtemperatur abzusetzen. 25 ml des WB plus 25 ml Dextran resultiert in ungefähr 35 ml Überstand nach 30 min. Sedimentation. Der Überstand wird über 12–15 ml Ficoll geschichtet und bei $400 \times g$ 30–40 Minuten lang bei 18–20°C zentrifugiert. Die monomolekulare Zellen und Ficoll-Paque enthaltende Plasma/Thrombozytenschicht wurde durch Absaugung entfernt. Es werden Neutrophile in der weißen Schicht über der Erythrocyten (RBC)-Schicht gefunden. (In einigen Präparationen sind die Neutrophil- und die Erythrocytenschicht vermischt. In diesen Fällen werden die RBCs durch hypotonische Lysis in folgender Weise entfernt: 12,5 ml kaltes 0,2%iges NaCl wird unter Verwirbelung zu dem Neutrophil/RBC-Pellet gegeben. Sofort wird, immer noch unter Verwirbelung, 12,5 ml kaltes 1,6%iges NaCl zugegeben. Die Zellen werden bei $60\text{--}100 \times g$ 10 m lang zentrifugiert und zurückgewonnen. Falls notwendig wird der Lyseschritt wiederholt.) Die resultierenden Neutrophile sind > 95% rein (mit den Eosinophilen als hauptsächlich zurückbleibende Zellen).

D) Makrophagen

[0069] Geeignete Verfahren zur Reinigung von Makrophagen sind aus dem Stand der Technik bekannt. Ein geeignetes Verfahren ist beschrieben in Paluka et al., 1998, „Dendritic cells as the terminal stage of Monozyte differentiation“, J. Imm. 9:4587–95, was in seiner Gänze zu allen Zwecken hierin aufgenommen wird.

E) T-Zellen

[0070] Geeignete Verfahren zur Reinigung von T-Zellen sind aus dem Stand der Technik bekannt. T-Lymphozyten werden routinemäßig hergestellt durch Entfernen von Monozyten aus dem durch das Standard-Ficoll-Gradient-Zentrifugierverfahren (Coligan, oben) hergestellten PBMC. Die Entfernung der Monozyten wird erreicht, indem es dem PBMC ermöglicht wird, sich an die Gewebekulturfläschchen anzuheften. Die nicht-anhaftenden Zellen (Lymphozyten) werden zwei Wochen lang in RPMI + 10% FCS in Gegenwart einer Kombination von PHA (5 μ g/ml) und menschlichem Rekombinant IL-2 (20 ng/ml) kultiviert, und die Zellen werden für die Untersuchung geerntet.

F) B-Zellen

[0071] Geeignete Verfahren zur Reinigung von B-Zellen sind aus dem Stand der Technik bekannt. Hoch gereinigte B-Zellen-Populationen werden durch negative Auslese mit sequenzieller Abreicherung von Monozyten/natürlichen Killer-Zellen und T-Zellen (wie in Current Protocols in Immunology beschrieben) isoliert. Die Abreicherung von Monozyten und NK-Zellen wird unter Verwendung von L-Leucinmethylester (L-LME) durchgeführt. Kurz gesagt wird aus peripherem Blut (z.B. aus einem Leukozytenfilm) durch das Standard-Ficoll-Gradient-Zentrifugierverfahren isoliertes PBMC mit 3×10^6 Zellen/ml in PBS resuspendiert. Frisch hergestelltes L-LME (0,05 M-Lösung in RPMI, kein Serum) wird bei einer Verdünnung von 1:10 zu den Zellen hinzugegeben (endgültig 5 mM). Die Mischung wird 35 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, die Zellen werden durch

Zentrifugieren pelletiert, gefolgt von 3maligem Waschen mit PBS. Die T-Zellen werden durch Rosetting mit Neurominidase-behandelten roten Schafs-Blutzellen (NSRBC) in der folgenden Weise weiterhin abgereichert: die Zellen werden auf 10^7 Zellen/ml in RPMI/10% FCS eingestellt. 5 ml der Zellen werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. 2,5 ml fötales Kalbsserum und 2,5 ml NSRBC werden dem Röhrchen zugegeben. Die Mischung wird 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden DNA mit $150 \times g$ bei Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und die Rosettenbildung voranzutreiben. Die Mischung wird bei 4°C 2 Stunden lang inkubiert. Das Pellet wird behutsam resuspendiert und die Zellsuspension wird mit Ficoll (10 ml) unterschichtet. Das Röhrchen wird mit $400 \times g$ 25 Minuten lang zentrifugiert. Die B-Zellen an der Grenzfläche werden entfernt, pelletiert und dreimal mit HBSS gewaschen. Nach Wiederholung des Rosettierungsschritts werden die B-Zellen in RPMI/10% FCS für Migrationsuntersuchungen resuspendiert.

G) Eosinophile

[0072] Geeignete Verfahren zur Reinigung von Eosinophile sind aus dem Stand der Technik bekannt. Ein Verfahren zur Herstellung von im Wesentlichen gereinigten Eosinophile ist die weitere Isolierung aus dem im Neutrophil-Isolierungsprotokoll oben beschriebenen Präparat. Die Abtrennung von Eosinophilen von Neutrophilen wird erreicht durch ein negatives Auswahlverfahren, wobei immobilisierte Antikörper gegen das CD16-Oberflächenantigen verwendet werden, um die CD16-positiven Neutrophile abzureichern. Kurz gesagt wird die Neutrophilpräparation in MACS-Puffer (1% BSA in DPBS) bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ μ l resuspendiert. Ein gleich großes Volumen von CD16+-Mikrokügelchen (CD16 immobilisiert auf magnetischen Kugeln; Miltenyi Biotech; Auburn, CA) wird mit den Zellen vermischt. Die Mischung wird bei 4°C unter behutsamen Schütteln 30 Minuten lang inkubiert. Die Zellen werden DNA durch eine negative Auswahlssäule hindurch geführt, die die magnetisch gekennzeichneten Neutrophile entfernt (CS-Säule, Miltenyi Biotech; Auburn, CA) LC, Miltenyi), und die Säule wird mit einem Säulenvolumen MACs-Puffer gewaschen. Der Durchfluss und die Waschfraktionen enthalten Eosinophile und werden vereinigt. Die durch dieses Verfahren isolierten Eosinophile sind mehr als 95%ig rein (wie durch FACS bestimmt, z.B. für die Anwesenheit der CD16+-Zellen).

3. Chemokine als chemotaktische Zusammensetzungen

[0073] Wie oben diskutiert können die APC-Chemotaxine irgendeines einer Anzahl von Arten von Verbindungen sein. Oftmals ist das Chemotaxin ein Protein, wie zum Beispiel ein Chemokin, oder ein Protein-Mimetika. Folglich umfasst eine chemotaktische Zusammensetzung ein oder mehrere Chemokine, Chemokin-Analoga, oder Chemokin-kodierende Polynucleotide.

[0074] Chemokine sind Protein hormone, die, unter anderen Aktivitäten, den Verkehr von weißen Blutzellpopulationen regeln, z.B. in den primären Lymphorganen, Blut, Geweben, sekundäre Lymphorganen, Lymphe, und (in manchen Fällen) zurück in den Kreislauf. Über 50 verschiedene Chemokine wurden bis heute in Menschen identifiziert, und es sind zahlreiche Chemokine anderer Säugetiere und durch Säugetier-Virusse kodierte Chemokine bekannt.

[0075] Strukturell werden die bekannten Chemokine in vier Klassen eingeteilt: CC, CXC, C und CX3C, basierend auf der Anzahl und dem Abstand der Amino-terminalen Cysteinreste in einem konservierten Strukturmotiv. Chemokine üben positive Effekte auf die Migration aus durch Anbindung an ein Array von Zelloberflächen-Rezeptoren auf der Oberfläche von Targetleukozyten. Bekannte Rezeptoren stammen aus der „seven transmembrane spanning“, G-Protein-gekoppelten Rezeptor-(7TM GPCR)-Klasse. Von den nahezu 20 charakterisierten menschlichen Chemokin-Rezeptoren (d.h., solche Rezeptoren, für die ein Ligand identifiziert wurde und Bindungs- und/oder Anzeigereignisse gut charakterisiert sind) sind neun CC-Chemokin-Rezeptoren (CCR), sechs sind CXC-Chemokin-Rezeptoren, einer ist ein CX3C-Chemokin-Rezeptor (CX3CR), und einer ist ein C-Chemokin-Rezeptor (vorläufig ‚XCR‘). Zudem ist ein promiskuitiver Chemokin-Rezeptor von umfassender Bindungsspezifität bekannt, ursprünglich bekannt als das Duffy Blutgruppen-Antigen (Duffy Ag, manchmal mit ‚DARC‘ angegeben).

[0076] Chemokin-Proteine können von Lieferanten erhalten werden, z.B. R&D Systems (Minneapolis, MN; http://cytokine.mdsystems.com/cyt_cat/cyt_cat.html), oder können unter Verwendung von auf veröffentlichten Sequenzen (z.B. wie beschrieben in Sambrook et al., 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, (2. Aufl.) Bd. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel et al., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) basierenden Routinetechniken hergestellt werden. Bzgl. neuester Übersichten über Chemokine siehe Ward et al., 1998, Immunity 9:1–11 und Baggiolini et al., 1998, Nature 392:565–568, und die darin zitierten Literaturstellen. Siehe auch CFB (Cytokine Facts Book, 1994, Academic Press Ltd.), Chemokine Facts Book, 1997, Academic Press Ltd. Und die GenBank Protein

Sequenz-Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Zusätzliche Literaturstellen werden unten in Abschnitt 14 angeboten.

[0077] Die in den Zusammensetzungen verwendeten oder die zur Herstellung dieser Zusammensetzungen gemäß der Erfindung verwendeten Chemokine können natürlich sein (d.h., sie weisen die Sequenz eines natürlich vorkommenden Chemokins auf), können das Produkt einer in vitro-Rekombination von natürlich vorkommende Chemokine kodierenden Polynucleotiden sein, oder können synthetische (d.h., chemisch synthetisiert) oder Rekombinationsvarianten von natürlich vorkommenden Chemokin-Sequenzen sein. Chemokine umfassen Sequenzen von Mensch, Primat, Nager, Viren und anderen Spezies. In manchen Ausführungsformen werden xenogene Sequenzen bei den Impfverfahren der Erfindung verwendet (z.B. wenn das wirksamste Chemokin von einer anderen Spezies als der Spezies des zu immunisierenden Probanden stammt), weil jedwede immunogene Effekte wahrscheinlich die Aktivität des Hilfsstoffs verbessern werden.

4. Beispielhafte Chemokin-Zusammensetzungen

[0078] In der vorliegenden Erfindung enthalten die Zusammensetzungen mindestens ein APC-Chemotaxin, ausgewählt aus den Chemokinen vMCK-2 und mC10, Varianten davon, die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht verändern, oder einem Polynucleotid, das eines der obigen kodiert.

[0079] Es wurden in vitro-Chemotaxie-Untersuchungen durchgeführt, um das chemotaktische Profil eines umfangreiches Sets von bekannten Chemokinen zu bestimmen. Eine Anzahl von bekannten Chemokinen sind chemotaktisch für unreife, aber nicht für reife dendritische Zellen, einschließlich: hMIP1 α , hMIP1 α (70aa), mMIP-1 α , hRANTES, hMET-RANTES, mRANTES, hHCC-1, hMPIF-1, hMPIF-1 (22-137), hMPIF-1 (46-137), hMIP-1 δ , hMCP-4, mMCP-5, mMARC, mEotaxin, mMCP-1(JE), mTECK, mMIP-2, mBLC, hLeucotactin, mMIG, und mMIP-1 β . Andere besonders nützliche Chemokine beinhalten hMCP-2, hMCP-3, vMIP-1, hMIP-3 α , hMIP-3 β , und vMCK-2 (siehe Beispiele, unten). Einige Chemokine waren chemotaktisch für unreife dendritische Zellen, waren aber nicht chemotaktisch für Neutrophile und andere in in vitro-Untersuchungen getestete Zelltypen (mC10, mMDC, hMIP-1 β , mMIP-1 γ ; siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

| | Unreife DCs | Reife DCs | Monozyten | Neutrophile | Eosinophile | CEM (T-Zellenlinie) ¹ |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|----------------------------------|
| mC10 | + | - | - | - | - | - |
| mMDC | + | - | - | - | - | - |
| hMIP-1 β | + | - | - | - | - | - |
| mMIP-1 γ | + | - | - | - | - | - |

1. ATCC Nr. CCL-119

5. Homologe und Varianten natürlich vorkommender Chemokine

[0080] In einer Ausführungsform weist ein APC-Chemotaxin die Sequenz natürlich vorkommender Chemotaxin-Moleküle auf oder besitzt eine Aminosäuresequenz mit wesentlicher Aminosäuresequenzidentität zu der Sequenz eines natürlich vorkommenden Chemotaxin-Moleküls. Zum Beispiel können Chemokin-Polypeptide, wie zum Beispiel die oben aufgeführten Chemokine, in einer Weise modifiziert werden, die die chemotaktischen Eigenschaften der natürlich vorkommenden Polypeptide nicht ändert, beispielsweise durch konservative Aminosäuresubstitutionen, Abbrüche (insbesondere an den Endpunkten), kleine interne Zerstörungen, Einfügungen, und dergleichen. Solche Modifikationen können unter Verwendung routinemäßigen Gentechnik-Verfahren vorgenommen werden, z.B. unter Verwendung ortsgerichteter Mutagenese, und die resultierenden Mutanten können bezüglich der chemotaktischen Eigenschaften beurteilt werden (z.B. unter Verwendung der hierin offenbarten Untersuchungen).

[0081] Zudem können rekombinante und synthetische Verfahren verwendet werden, um natürlich vorkommende Chemokin-Moleküle oder -sequenzen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf die oben und in Tabelle

3 genannten) zu modifizieren, um die chemotaktischen Eigenschaften der Polypeptide im Vergleich zu dem/den Mutter-Polypeptid(en) zu verändern.

A. Konstruierte Chemokine

[0082] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung können synthetische, gentechnisch manipulierte oder rekombinante Chemotaxine hergestellt und auf die Fähigkeit, APCs (z.B. dendritische Zellen) zu mobilisieren, untersucht werden. In einer Ausführungsform werden APC-Chemotaxine aus einer Kombination von natürlichen Chemokinen unter Verwendung synthetischer oder rekombinanter DNA-Technologie erzeugt. Zum Beispiel können unterschiedliche Chemokine (z.B. von Mensch, Viren, Maus und dergleichen) rekombiniert werden (z.B. genetisch), um Chimären oder „Hybrikine“ auszubilden, die auf die gewünschte Aktivität (z.B. die Fähigkeit, unreife dendritische Zellen anzuziehen, aber keine Neutrophile, verbesserte Chemolockstoffaktivität bei niedrigeren Konzentrationen) getestet werden. In einer dazu in Beziehung stehenden Ausführungsform werden die Chimären, basierend auf der Sequenz der Mutter- (z.B. natürlich vorkommenden) Chemokinen, chemisch synthetisiert.

[0083] In einer Ausführungsform werden die Sequenzen der interessierenden Chemokin-Polypeptide in vier „Domänen“ aufgeteilt, wie durch den Abstand der Cysteinreste vorgegeben (siehe [Fig. 2](#) und Beispiel 5). Alternativ werden die Sequenzen zum Zwecke der Ausbildung von Hybriden in mehrere „Domänen“ (z.B. 2, 3, 4 oder mehr) beliebiger Länge (typischerweise aber mindestens 5, öfter mindestens 10 Reste) aufgeteilt. Die Sequenzen werden begrifflich rekombiniert, um chimäre Sequenzen zu bilden, in denen ein Bereich eine Sequenz eines ersten Chemokin-Polypeptids und ein zweiter Bereich die Sequenz eines zweiten Chemokin-Polypeptids aufweist, wie in [Fig. 2](#) dargestellt. Chimäre Polypeptide (Hybrikine) mit der chimären Sequenz werden DNA durch routinemäßige synthetische Mittel (oder, alternativ, durch Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken, wie unten beschrieben) hergestellt. Polypeptid-Syntheseverfahren sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt und werden z.B. in U.S. Patent Nr. 4,108,846 beschrieben; siehe auch Caruthers et al., 1980, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 215–223; Horn et al., 1980, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 225–232; Roberge et al., 1995, *Science* 269:202). Falls gewünscht können kurze Polypeptide durch Kondensation des Aminoendes eines Moleküls mit dem Carboxylende des anderen Moleküls vereinigt werden, um eine Peptidbindung zur Bildung eines längeren Polypeptids auszubilden. Das neu synthetisierte Peptid kann zum Beispiel durch präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie im Wesentlichen gereinigt werden (z.B. Creighton, 1983, *PROTEINS, STRUCTURES, AND MOLECULAR PRINCIPLES*, W.H. Freeman and Co., New York NY).

[0084] In einer alternativen Ausführungsform werden die interessierenden Polynucleotid-kodierenden Mutter-Chemokine verarbeitet, um Varianten oder chimäre Chemokine hervorzubringen, wie zum Beispiel die oben beschriebenen (z.B. wird das Polynucleotid in mehrere „Domänen“ aufgeteilt, wie es durch den Abstand der Cysteinreste des kodierten Polypeptids und hybriden Genstrukturen vorgegeben wird), oder es werden chemisch synthetisierte Polynucleotide hergestellt. Die hybriden Gene werden in entsprechende Expressionsvektoren subkloniert und in Wirtszellen (z.B. bakterielle oder eukariotische Zellen) eingeführt (z.B. transfiziert), und die Zellen werden unter Bedingungen kultiviert, bei denen das rekombinante Protein exprimiert wird. Überstände von transfizierten Zellen werden unter Verwendung der oben beschriebenen Untersuchungen auf die gewünschten Chemolockstoff-Eigenschaften untersucht. Techniken zur Beeinflussung und Exprimierung von Nucleinsäuren sind z.B. allgemein beschrieben in Sambrook, et al., 1989, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2. Aufl.), Bd. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory; und Ausubel, et al., (Herg.) (ergänzt bis 1999) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene and Wiley, NY.

[0085] In einer Ausführungsform kann ein chimäres Molekül mindestens 10 zusammenhängende Reste von jedem von mindestens zwei unterschiedlichen natürlich vorkommenden Chemokinen umfassen. Mindestens eines der natürlich vorkommenden Chemokine ist ausgewählt aus mC10 und vMCK-2. Eines, und manchmal zwei oder mehr der weiteren Chemokine können ausgewählt werden aus: hMIP1 α , hMIP1 α (70aa), mMIP-1 α , hRANTES, hMET-RANTES, mRANTES, hHCC-1, hMPIF-1, hMPIF-1 (22–137), hMPIF-1 (46–137), hMIP-1 δ , hMCP-4, mMCP-5, mMARC, hLeucotaktin, mMIG, und mMIP-1 β , hMCP-2, hMCP-3, vMIP-1, hMIP-3 α , hMIP-3 β , vMCK-2, und insbesondere mC10, mMDC, hMIP-1 β , und mMIP-1 γ . In einer Ausführungsform stammen die beiden unterschiedlichen natürlich vorkommenden Chemokine von unterschiedlichen Spezies.

[0086] Derivate natürlich vorkommender Chemokine mit verbesserten dendritischen Zell-Lockstoff-Eigenschaften und verringerter Beschaffung nicht-dendritischer Immunzellen werden unter Verwendung unterschiedlicher Hybride von menschlichen und viralen Chemokinen aufgebaut. Zum Beispiel kann ein APC-Chemotaxin (z.B. ein Chemokin) mit starker dendritischer chemotaktischer Zellaktivität aber unerwünschter neutrophiler chemotaktischer Aktivität mit einem Polypeptid mit schwächerer dendritischer Zellaktivität und keiner

neutrophilen chemotaktischen Aktivität rekombiniert werden, um ein Polypeptid mit starker dendritischer Zellaktivität und keiner neutrophilen chemotaktischen Aktivität zu erzeugen.

B. APC-Chemotaxine, hergestellt durch Gene Shuffling von Chemokin-Polynucleotiden

[0087] In einer Ausführungsform werden Derivate von Chemokinen mit verbesserten Eigenschaften (z.B. die Fähigkeit, unreife dendritische Zellen aber keine Neutrophile anzuziehen, verbesserte Chemolockstoff-Aktivität bei niedrigeren Konzentrationen, und dergleichen) unter Verwendung erzwungener genetischer in vitro-Evolution unter Verwendung irgendeiner von mehreren routinemäßigen Techniken, einschließlich fehleranfälliger PCR oder Rekombination/Gene Shuffling-Ansätze, aufgebaut. Verfahren zur Erzeugung neuer Polypeptide mit gewünschten Aktivitäten durch Gen-"Shuffling" sind aus dem Stand der Technik bekannt. Verschiedene Shuffling-Verfahren sind beschrieben in Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotech.* 8:724–733; Stemmer, 1994, *Nature* 370:389–391; Stemmer et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747–10751; Zhao et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:1307–1308; Cramer et al., 1998, *Nature* 391:288–291; Cramer et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:436–438; Arnold et al., 1997, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58:2–14; Zhang et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504–4509; Cramer et al., 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:315–319; Cramer et al., 1996, *Nat. Med.* 2:100–102; PCT-Veröffentlichungen WO95/22625; WO97/20078; WO97/35957; WO97/35966; WO98/13487; WO98/13485; PCT 98/00852; PCT 97/24239; und U.S. Patente Nr. 5,605,793, 5,811,238 und 5,928,905. Ein Verfahren des Gene Shuffling, das einen Polynucleotid-Erweiterungsprozess an überlappenden Segmenten einer Population von Varianten eines Polynucleotids unter Bedingungen durchführt, wobei ein Segment als eine Matrize zur Erweiterung eines anderen Segments dient, um eine Population von rekombinanten Polynucleotiden zu erzeugen, und Selektion oder Auswahl eines rekombinanten Polynucleotids oder eines Expressionsprodukts davon für eine gewünschte Eigenschaft. Einige Verfahren des Shuffling verwenden zufällige Punktmutationen (typischerweise eingeführt über einen PCR-Verstärkungsschritt) als eine Quelle der Diversität. Die resultierenden Polypeptide werden wie oben beschrieben auf chemotaktische Aktivität getestet.

[0088] In einer Ausführungsform wird die Genumstellung beginnend mit einer Polynucleotid-Kodierung eines speziellen Chemokins (z.B. vMCK-2 oder mC10) durchgeführt. In einer anders gearteten Ausführungsform wird „Familienumstellung“ verwendet (siehe, z.B., Cramer et al., 1998, *Nature* 152:88–91; Chang et al., 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:793–7) und es werden mindestens zwei „Mutter“-Chemokin-kodierende Polynucleotide in der Familienumstellungsreaktion verwendet. Mindestens eines der Mutter-Chemokin-kodierenden Polynucleotide kodiert mC10, vMCK-2 oder eine homologe Spezies davon.

[0089] In einer damit in Beziehung stehenden Ausführungsform kodiert das zweite oder weitere der Mutter-Chemokin-kodierende Polynucleotide ein Chemokin aus der Gruppe hMIP1 α , hMIP1 α (70aa), mMIP-1 α , hRANTES, hMET-RANTES, mRANTES, hHCC-1, hMPIF-1, hMPIF-1 (22–137), hMPIF-1 (46–137), hNIP-1 δ , hMCP-4, mMCP-5, mMARC, mEotaxin, mMCP-1(JE), mTECK, mMIP-2, mBLC, mMIP-1 γ , mMIG, und mMIP-1 β . hMCP-2, hMCP-3, vMIP-1, hMIP-3 α , hMIP-3 β , mMDC, hMIP-1 β und hLeucotaktin.

[0090] In einer Ausführungsform umfasst das resultierende umgestellte („entfaltete“) Molekül mindestens 10 zusammenhängende Reste aus mindestens einem, oftmals mindestens zwei unterschiedlichen natürlich vorkommenden Chemokinen, z.B. solche wie die oben aufgeführten Sets.

C. Andere durch Mutation von Chemokin-Molekülen hergestellte APC-Chemotaxine

[0091] In anderen Aspekten der Erfindung wird ein elterliches APC-Chemotaxin (z.B. Chemokin) durch herkömmliche in vitro-Mutageneseverfahren (z.B. zielgerichtete Mutagenese) (Ausubel, oben) oder in vitro-Genmanipulation von Chemokin-kodierenden Polynucleotiden modifiziert. Die Aktivität der resultierenden Variante kann unter Verwendung von hierin beschriebenen in vitro- und in vivo-Untersuchungen bestimmt werden.

[0092] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein elterliches APC-Chemotaxin-Polypeptid (z.B. ein Chemokin) modifiziert (z.B. durch in vitro-Genmanipulation des Chemokin-kodierenden Polynucleotids), um eine Amino- oder Carboxy-beendete Version des reifen Proteins zu erzeugen. Alternativ kann diese beendete Version des APC-Chemotaxins chemisch synthetisiert oder durch enzymatische Verarbeiten eines natürlich vorkommenden Chemokins hergestellt werden. Zudem können in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung Varianten mit bewahrenden Substitutionen verwendet werden, die die gewünschten Eigenschaften beibehalten. Bewahrende Substitutions-Tabellen, die funktional ähnliche Aminosäuren bereit stellen, sind aus dem Stand der Technik wohlbekannt. So beinhaltet beispielsweise eine beispielhafte Richtlinie, um bewahrende Substitutionen auszuwählen (Originalrest, gefolgt von beispielhafter Substitution): Ala/Gly oder Ser; Arg/Lys; Asn/Gln oder His; Asp/Glu; Cys/Ser; Gln/Asn; Gly/Asp; Gly/Ala oder Pro; His/Asn oder Gln; Ile/Leu

oder Val; Leu/Ile oder Val; Lys/Arg oder Gln oder Glu; Met/Leu oder Tyr oder Ile; Phe/Met oder Leu oder Tyr; Ser/Thr; Thr/Ser; Trp/Tyr; Tyr/Trp oder Phe; Val/Ile oder Leu.

[0093] Eine alternative beispielhafte Richtlinie verwendet die folgenden sechs Gruppen, wobei jede Aminosäuren enthält, die bewahrende Substitutionen füreinander darstellen: 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T); 2) Aspartinsäure (D), Glutaminsäure (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (K); 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); (siehe auch, z.B., Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company; Schulz and Schimer (1979) Principles of Protein Structure, Springer-Verlag).

D. Polypeptid-Mimetika

[0094] Polypeptid-Mimetika sind ebenfalls zur Verwendung in den Verfahren der Erfindung geeignet. Die Begriffe „Mimetika“ und „Peptid-Mimetika“ beziehen sich auf eine synthetische chemische Verbindung, die im Wesentlichen die gleichen strukturellen und/oder funktionellen Charakteristika wie APC-Chemotaxin-Polypeptid der Erfindung aufweist. Der Mimetika kann entweder vollständig aus synthetischen, nicht-natürlichen Analogen von Aminosäuren zusammengesetzt sein, oder ist ein chimäres Molekül aus teilweise natürlichen Peptid-Aminosäuren und teilweise nicht-natürlichen Analogen von Aminosäuren. Der Mimetika kann auch jedwede Menge von natürlichen Aminosäurebewahrenden Substitutionen beinhalten, so lange solche Substitutionen die Struktur und/oder Aktivität des Mimetikas nicht wesentlich ändern. Polypeptid-Mimetika-Zusammensetzungen können jedwede Kombination von nicht-natürlichen strukturellen Komponenten enthalten, die typischerweise aus drei strukturellen Gruppen gebildet werden: a) andere Restbindungsgruppen als die natürliche Amidbindungs („Peptidbindung“)-Gruppen; b) nicht-natürliche Reste anstelle von natürlich vorkommenden Aminosäureresten; oder c) Reste, die sekundäres strukturelles Mimikry induzieren, d.h., eine sekundäre Struktur induzieren oder stabilisieren, z.B. ein beta Turn, gamma Turn, beta Sheet, alpha-Helix-Konfiguration und dergleichen.

[0095] Ein Polypeptid kann als ein Mimetika charakterisiert werden, wenn alle oder einige seiner Reste durch chemische Mittel zusammengefügt werden, die anders sind als natürliche Peptidbindungen. Individuelle Peptid-Mimetika-Reste können durch Peptidbindungen, andere chemische Bindungen oder Verbindungsmittel, wie z.B. Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, bifunktionelle Maleimide, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC), zusammengefügt werden. Verbindungsgruppen, die alternativ zu der traditionellen Amidbindungs („Peptidbindung“)-Verbindungen sein können, beinhalten z.B. Ketomethylen (z.B. $-C(=O)-CH_2-$ für $-C(=O)-NH$), Aminomethylen (CH_2-NH), Ethylen, Olefin ($CH=CH$), Ether (CH_2-O), Thioether (CH_2-S), Tetrazo (CN_4-), Thiazol, Retroamid, Thioamid, oder Ester (siehe, z.B., Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Bd. 7, S. 267–357, „Peptide Backbone Modifications“, Marcell Dekker, NY).

[0096] Ein Polypeptid kann auch dadurch als ein Mimetika charakterisiert werden, dass es alle oder einige nicht-natürliche Reste anstelle von natürlich vorkommenden Aminosäureresten enthält. Nicht-natürliche Reste sind in der wissenschaftlichen und der Patentliteratur gut beschrieben; ein paar beispielhafte nicht-natürliche Zusammensetzungen, die als Mimetika von natürlichen Aminosäureresten und Richtlinien nützlich sind, sind unten beschrieben.

[0097] Mimetika von aromatischen Aminosäuren können erzeugt werden durch Ersetzen durch, z.B. D- oder L-Naphthylalanin; D- oder L-Phenylglycin; D- oder L-2-Thienylalanin; D- oder L-1, -2, 3- oder 4-Pyrenylalanin; D- oder L-3-Thienylalanin; D- oder L-(2-Pyridinyl)alanin; D- oder L-(3-Pyridinyl)alanin; D- oder L-(2-Pyrazinyl)alanin; D- oder L-(4-Isopropyl)phenylglycin; D-(Trifluormethyl)phenylglycin; D-(Trifluormethyl)phenylalanin; D-p-Fluorophenylalanin; D- oder L-p-Biphenylphenylalanin; K- oder L-p-Methoxybiphenylphenylalanin; D- oder L-2-Indol(alkyl)alanine; und D- oder L- alkylalanine, wobei Alkyl substituiertes oder unsubstituiertes Methyl, Ethyl, Propyl, Hexyl, Butyl, Pentyl, Isopropyl, iso-Butyl, sec-isotyl; iso-Pentyl, oder eine nicht saure Aminosäure sein kann. Aromatische Ringe einer nicht-natürlichen Aminosäure beinhalten, z.B., Thiazolyl-, Thiophenyl-, Pyrazolyl-, Benzimidazolyl-, Naphthyl-, Furanyl-, Pyrrolyl-, und Pyridyl- aromatische Ringe.

[0098] Mimetika von sauren Aminosäuren können durch Substitution durch, z.B., nicht-Carboxylat-Aminosäuren erzeugt werden, während eine negative Ladung beibehalten wird; (Phosphono)alanin; sulfatiertes Threonin. Carboxyl-Seitengruppen (z.B. Aspartyl oder Glutamyl) können ebenfalls durch Reaktion mit Carbodiimiden ($R'-N-C-N-R'$), wie z.B. 1-Cyclohexyl-3(2-morpholinyl-(4-ethyl) carbodiimid oder 1-Ethyl-3(4-aza-4-,4-dimethyl-pentyl)carbodiimid selektiv modifiziert werden. Aspartyl oder Glutamyl kann durch Reaktion mit Ammoniumionen ebenfalls zu Asparaginyll- und Glutaminyll-Resten umgesetzt werden.

[0099] Mimetika von basischen Aminosäuren können durch Substitution mit, z.B., (zusätzlich zu Lysin und Arginin) den Aminosäuren Ornithin, Citrullin, oder (Guanidino)-Essigsäure, oder (Guanidino)alkyl-Essigsäure erzeugt werden, wobei Alkyl oben definiert ist. Nitril-Derivate (z.B. enthaltend den CN-Rest anstelle von COOH) kann zu Asparagin oder Glutamin substituiert werden. Asparaginy- und Glutaminy-Reste können zu den korrespondierenden Aspartyl- oder Glutamyl-Resten deaminiert werden.

[0100] Arginin-Rest-Mimetika können durch Reaktion von Arginyl mit, z.B., einem oder mehreren herkömmlichen Reagenzien, einschließlich z.B. Phenylglyoxal, 2,3-Butandion, 1,2-Cyclohexandion, oder Ninhydrin, vorzugsweise unter alkalischen Bedingungen erzeugt werden.

[0101] Tyrosin-Rest-Mimetika können durch Reaktion von Tyrosyl mit, z.B., aromatischen Diazoniumverbindungen oder Tetranitromethan erzeugt werden. N-Acetylimidazol und Tetranitromethan können verwendet werden, um O-Acetyl-Tyrosyl-Spezies bzw. 3-Nitro-Derivate zu bilden.

[0102] Cystein-Rest-Mimetika können erzeugt werden durch Reaktion von Cysteinyl-Resten mit, z.B., alpha-Haloacetaten wie zum Beispiel 2-Chloressigsäure oder Chloracetamid und korrespondierenden Aminen, um Carboxymethyl- oder Carboxyamidomethyl-Derivate zu ergeben. Cystein-Rest-Mimetika können auch erzeugt werden durch Reaktion von Cysteinyl-Resten mit, z.B., Brom-Trifluoracetone, alpha-Brom-beta-(5-imidazolyl)propionsäure; Chloracetylphosphat; N-Alkylmaleimiden, 3-Nitro-2-pyridyl-disulfid; Methyl-2-pyridyl-disulfid; p-Chlorquecksilberbenzoat; 2-Chlorquecksilber-4-nitrophenol; oder Chlor-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol.

[0103] Lysin-Mimetika können erzeugt werden (und es können Amino-terminierte Reste geändert werden) durch Reaktion von Lysinyl mit, z.B., Bernsteinsäure- oder anderen Carbonsäureanhydriden. Mimetika für Lysin und andere alpha-Amino-enthaltende Reste können auch erzeugt werden durch Reaktion mit Imidoestern wie zum Beispiel Methylpicolinimidat, Pyridoxalphosphat, Pyridoxal, Chlorborhydrid, Trinitrobenzolsulfonsäure, O-Methylisoharnstoff, 2,4-Pentandion, und Transamidase-katalysierte Reaktionen mit Glyoxalat.

[0104] Mimetika von Methionin können erzeugt werden durch Reaktion mit, z.B., Methioninsulfoxid. Mimetika von Prolin beinhalten, z.B., Pipecolinsäure, Thiazolidin-Carbonsäure, 3- oder 4-Hydroxy-prolin, Dehydroprolin, 3- oder 4-Methylprolin, oder 3,3-Dimethylprolin. Histidin-Rest-Mimetika können erzeugt werden durch Reaktion von Histidyl mit, z.B., Diethylprocarbonat oder para-Bromphenacylbromid.

[0105] Andere Mimetika beinhalten z.B. solche, hergestellt durch Hydroxylierung von Prolin und Lysin; Phosphorylierung der Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonyl-Resten; Methylierung der alpha-Aminogruppe von Lysin, Arginin und Histidin; Acetylierung des N-terminalen Amins; Methylierung von Hauptketten-Amidresten oder Substitution mit N-Methylaminosäuren; oder Amidierung von C-terminalen Carboxylgruppen. Ein Bestandteil eines natürlichen Polypeptids kann auch durch eine Aminosäure (oder einen Peptid-nachahmenden Rest) der entgegengesetzten Chiralität ersetzt werden. Folglich kann jede Aminosäure, die natürlich in der L-Konfiguration vorkommt (was auch als R oder S bezeichnet werden kann, abhängig von der Struktur der chemischen Einheit), ersetzt werden mit der Aminosäure des selben chemischen strukturellen Typs oder einen Peptid-Mimetika, jedoch von entgegengesetzter Chiralität, im Allgemeinen als D-Aminosäure bezeichnet, was aber zusätzlich auch als R- oder S-Form bezeichnet werden kann.

[0106] Die Mimetika der Erfindung können auch Zusammensetzungen beinhalten, die einen strukturellen Mimetika-Rest enthalten, insbesondere einen Rest, der Sekundärstrukturen induziert oder nachahmt, wie zum Beispiel ein beta turn, beta sheet, alpha-Helix-Strukturen, gamma turns und dergleichen. Zum Beispiel Substitution von natürlichen Aminosäureresten mit D-Aminosäuren; N-alpha-Methylaminosäuren; C-alpha-Methylaminosäuren; oder Dehydroaminosäuren, worin ein Peptid beta turn, gamma turn, beta sheet oder alpha-Helix-Konformationen induzieren oder stabilisieren kann. Beta turn-Mimetikastrukturen sind beschrieben worden, z.B., von Nagai (1985) Tet. Lett. 26:647-650; Feigl (1986) J. Amer. Chem. Soc. 108:181-182; Kahn (1988) J. Amer. Chem. Soc. 110:1638-1639; Kemp (1988) Tet. Lett. 29:5057-5060; Kahn (1988) J. Molec. Recognition 1:75-79. Beta sheet-Mimetikastrukturen wurden beschrieben, z.B., von Smith (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:10672-10674. Zum Beispiel wird ein durch ein cis-Amid-Surrogat, 1,5-disubstituiertes Tetrazol, induziertes Typ-IV-beta von Beusen (1995) Biopolymers 36:181-200 beschrieben. Der Einbau einer achiralen Omega-Aminosäureresten, um Polymethyleinheiten als Substitution für Aminbindungen wird von Banerjee (1996) Biopolymers 39:769-777 beschrieben. Sekundärstrukturen von Polypeptiden können z.B. durch Hochfeld-1H-NMR- oder 2D-NMR-Spektroskopie analysiert werden, siehe, z.B., Higgins (1997) J. Pept. Res. 50:421-435. Siehe auch Hruby (1997) Biopolymers 43:219-266, Balaji et al., U.S. Patent Nr. 5,612,895.

[0107] Spezielle Beispiele von Mimetika, die in das Polypeptid der Erfindung eingebaut werden können bein-

halten solche, die z.B. von Zhang (1998) *Biochemistry* 37:12564–12476 beschrieben wurden, der funktionell aktive (R und S)-gamma-Lactam-konformative Mimetika unter Verwendung eines 3-(R oder S)-Amino-2-oxo-1-pyrrolidin-acetaminorestes anstelle des Pro-Gly des Tridecapeptids *Saccharomyces cerevisiae* alpha-Faktor-Paarungspheromons konstruierte. Brady (1998) *J. Med. Chem.* 41:401–406 verwendete eine Harz-basierte Route für die Synthese eines Thrombin-Inhibitor-Mimetikas mit einer Auswahl von lipophilen Carbonsäureamiden. Baures (1997) *J. Med. Chem.* 40:3594–3600 konstruierte einen Diketopiperazin-konformativen Mimetika in eine L-Prolyl-L-leucylglycinamid-Struktur und in die bicyklische Lactam-PLG-Peptid-Mimetikastruktur des Dopaminrezeptors. Beaulieu (1997) *J. Med. Chem.* 40:2164–2176 verwendete einen Hydroxyethylamidossuccinyl-Kern, um eine Peptid-Mimetika-Struktur zu synthetisieren, um die HIV-Virus-Proteaseaktivität zu hemmen. Misicka (1997) *J. Pept. Res.* 50:48–54 entwickelte Mimetika von Deltorphin I und Dermenkephalin, die Stereoisomere der üblichen Aminosäure beta-Methylphenylalanin enthält, um Peptide mit verbesserter Ligandenbindungsspezifität zu erzeugen.

[0108] Der Fachmann wird erkennen, dass individuelle synthetische Reste und Polypeptide, die Mimetika enthalten, unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren und Methodiken synthetisiert werden können, die in der wissenschaftlichen und der Patentliteratur gut beschrieben sind, z.B. *Organic Synthesis Collective Volumes*, Gilman et al. (Herg.) John Wiley & Sons, Inc., NY. Mimetika enthaltende Polypeptide können auch unter Verwendung von Festphasen-Synthesearbeitsverfahren hergestellt werden, wie z.B. von Di Marchi et al., U.S. Patent Nr. 5,422,426 beschrieben. Die Mimetika der Erfindung können auch synthetisiert werden unter Verwendung kombinatorischen Methodiken. Verschiedene Techniken zur Erzeugung von Peptid- und Peptid-Mimetika-Bibliotheken sind wohl bekannt und beinhalten, z.B., Multipin-, Tea Bag- und split-couple-mix-Techniken, siehe, z.B., al-Obeidi (1998) *Mol. Biotechnol.* 9:205–223; Hruby (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:114–119; Ostergaard (1997) *Mol. Divers.* 3:17–27; Ostresh (1996) *Methods Enzymol.* 267:220–234.

6. Kleine Chemokin-Mimetika

[0109] In einer Ausführungsform werden kleinmolekulige Chemokin-Mimetika verwendet, um APCs zu mobilisieren. Typischerweise werden kleinmolekulige Mimetika unter Verwendung von Screening-Technologien für kleinmolekulige Verbindungen mit hohem Durchsatz identifiziert, die Chemokin-Rezeptoren (CRs) und Übertragungssignal verknüpfen (z.B. Calcium-Ion-Mobilisierung oder andere Chemokin-Rezeptor-vermittelnde Antworten). Zum Beispiel können kleine Moleküle anfangs auf die Fähigkeit gescreent werden, Chemokin-Rezeptoren zu agonisieren, die auf unreife dendritische Zellen und/oder nicht auf andere Zellen exprimiert sind (siehe, z.B., Tabelle 2B). Die Agonisierungsaktivität kann in einer Vielfalt von Arten bestimmt werden, wie zum Beispiel Bestimmen der Ca²⁺-Mobilisierungsantworten auf transfekte Zellen, die geklonte Chemokin-Rezeptoren exprimieren, von denen bekannt ist, dass sie auf APCs vorhanden sind.

[0110] Die chemotaktischen Eigenschaften der Moleküle werden DNA unter Verwendung der oben beschriebenen Untersuchungen bestimmt, und solche mit gewünschter Spezifität (z.B. chemotaktisch für unreife, aber nicht für reife dendritische Zellen) werden in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet.

7. Chemotaktische Zusammensetzungen

[0111] Die chemotaktischen Zusammensetzungen der Erfindung enthalten ein oder mehrere APC-Chemotaxine (oder Chemotaxinkodierende Polynucleotide). In einer Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein APC-Chemotaxin, das ein isoliertes oder rekombinantes Polynucleotid oder Polypeptid ist. In einer Ausführungsform ist/sind das/die APC-Chemotaxin(e) die beherrschenden Spezies (d.h., größer als ungefähr 50 Gew.-%, öfter größer als ungefähr 80 Gew.-% der Gesamtheit der Mitglieder der Molekülklasse in der Zusammensetzung) ihrer Klasse (z.B. Polypeptid, Polynucleotid, Lipid, Carbohydrat) in der Zusammensetzung. In anderen Ausführungsformen ist/sind das/die APC-Chemotaxin(e) „biologisch rein“. Die Worte „isoliert“, „rein“, „im Wesentlichen gereinigt“ oder „biologisch rein“ beziehen sich auf Material, das im Wesentlichen oder hauptsächlich frei von Komponenten ist, die es normalerweise begleiten, wenn es sich im natürlichen Zustand befindet. Folglich enthalten, in einer Ausführungsform, die chemotaktischen Zusammensetzungen der Erfindung APC-Chemotaxine frei von Materialien, die normalerweise bei ihrer in situ-Umgebung damit verknüpft sind (wenn sie natürlich vorkommen). Typischerweise sind die chemotaktischen Zusammensetzungen der Erfindung mindestens 95% rein, üblicherweise mindestens ungefähr 95%. Die Proteinreinheit oder -homogenität kann bestimmt werden durch eine Anzahl von aus dem Stand der Technik wohlbekanntem Mitteln, wie zum Beispiel Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer Proteinprobe, gefolgt von Visualisierung nach Anfärben. Für gewisse Zwecke ist eine hohe Auflösung notwendig und es wird HPLC oder ähnliche Mittel für die Reinigung genutzt.

[0112] In Ausführungsformen können die Zusammensetzungen zusätzlich einen Hilfsstoff oder Träger enthalten, wie beispielsweise unten beschrieben. In allen Fällen beinhaltet die Zusammensetzung ein oder mehrere Antigene (d.h., das Antigen, für das es gewünscht ist, eine Immunantwort zu induzieren oder zu verbessern), wie detaillierter unten besprochen wird. In Ausführungsformen können die Zusammensetzungen einen herkömmlichen Zusatz enthalten. Herkömmliche Zusätze überführen typischerweise lösliche Protein-Antigene in feste Form. Sie enthalten oftmals Bakterien oder bakterielle Produkte. Beispielhafte herkömmliche Zusätze beinhalten Freund's Unvollständiger Zusatz (Freund's Incomplete Adjuvant), Freund's Vollständiger Zusatz (Freund's Complete Adjuvant), Merck-Zusatz 65, AS-2, Alaun, Aluminiumphosphat, Mineralgele wie zum Beispiel Aluminiumhydroxid, und oberflächenaktive Substanzen wie zum Beispiel Lysolecithin, Pluron-Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Keyhole Limpet Hemocyanin, und Dinitrophenol. In einigen Ausführungsformen ist der herkömmliche Zusatz ein Zusatz, der zur Verwendung in menschlichen Patienten geeignet ist.

B. Antigene

[0113] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Auslösen oder Verbessern einer Immunantwort auf ein Antigen, z.B. ein vorbestimmtes oder festgelegtes Antigen, zur Verfügung. Ein Antigen ist ein Molekül, das mit einem Antikörper reagiert. In einigen Ausführungsformen ist das Antigen ein Immunogen. In einigen Ausführungsformen ist das Antigen an einen Proteinträger gebunden. Zum Beispiel sind in einer Ausführungsform der Erfindung ein APC-Chemotaxin und ein Antigen physikalisch gebunden (z.B. als Fusionsprotein ausgebildet, stabil vernetzt unter Verwendung chemischer Vernetzungsmittel, oder über Komplexe wie zum Beispiel Biotin und Streptidin gebunden).

[0114] Typischerweise ist ein Antigen ein Peptid, ein Polypeptid, chemische Verbindung, mikrobieller Erreger, Bakterium (z.B. lebend, abgeschwächt oder inaktiviert), ein Virus (einschließlich inaktivierte Virusteile, modifizierte lebende Virusteile und rekombinante Virusteile), eine rekombinante Zelle, Glycoproteine, Lipoproteine, Glycopeptide, Lipopeptide, Toxoide, Carbohydrate, tumorspezifische Antigene; und andere immunogene Bestandteile von Erregern. In einer Ausführungsform werden Mischungen von zwei oder mehr Antigenen eingesetzt. In einigen Ausführungsformen ist das Antigen biologisch rein.

[0115] In einer Ausführungsform können die Verfahren und Reagenzien der Erfindung dazu verwendet werden, vor einer erwarteten oder möglichen Aussetzung einen Schutz vor exogenen fremden infektiösen krankheitserregenden Stoffen (wie zum Beispiel Bakterien, Virus und dergleichen) zu bieten. In einer dazu in Beziehung stehenden Ausführungsform können die Verfahren und Reagenzien der Erfindung dazu verwendet werden, therapeutische Effekte gegen exogene fremde Krankheitserreger bereit zu stellen, denen ein Individuum ausgesetzt war oder für ein Individuum, das Symptome des Ausgesetztseins zeigt.

[0116] In einer Ausführungsform können die Verfahren und Reagenzien der Erfindung dazu verwendet werden, Krebs zu behandeln, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Melanome, Lungenkrebs, Schilddrüsenkarzinome, Brustkrebs, Nierenzellkarzinome, Kanthome, Hirntumore und Hautkrebs. In einer Ausführungsform ist das Antigen ein Tumor-assoziiertes Antigen (Tumorspezifisches Antigen). Tumorantigene sind Moleküle, insbesondere Zelloberflächenproteine, die in Tumorzellen relativ zu Nicht-Tumor-Geweben (z.B. Telomerase) unterschiedlich exprimiert sind.

[0117] Zur prophylaktischen Verwendung werden die APC-Chemotaxin enthaltenden Zusammensetzungen einem Probanden verabreicht (z.B. in Verbindung mit Antigenen), der anfällig für oder ansonsten von einer Krankheit, z.B. ein Tumor, Krebs, Infektion und dergleichen, gefährdet ist. Zur therapeutischen Verwendung werden Zusammensetzungen, die die APC-Chemotaxine enthalten, einem Probanden verabreicht (z.B. in Verbindung mit Antigenen), sobald eine Krankheit, z.B. ein Tumor, Krebs, Infektion oder dergleichen, entdeckt oder diagnostiziert ist, oder nach chirurgischer Entfernung, z.B. von Tumoren.

[0118] Beispielhafte Antigene oder Impfstoffbestandteile der Erfindung beinhalten Antigene, die von mikrobiellen Erregern wie zum Beispiel Bakterien [z.B. Pertussis (Bordetella pertussis, inaktivierter gesamter Organismus); Cholera (Vibrio cholerae, gesamter getöteter Organismus); Meningitis (Neisseria meningitidis, Polysaccharid aus Organismus); Borreliose (Borrelia burgdorferi, Lipoprotein OspA); Haemophilus B (Haemophilus influenza B, Polysaccharid, Tetanuskonjugat oder OmpC); Lungenentzündung (Streptococcus pneumoniae, kapselförmiges Polysaccharid); Typhus (Salmonella typhi Polysaccharid-Impfstoff, gesamter getöteter Organismus)], Viren einschließlich inaktivierter Virusteile, modifizierte lebende Virusteile, und rekombinante Virusteile zu Influenza-Virus; Hepatitis A; Hepatitis B; Masern; Rötelvirus; Mumps; Tollwut; Poliovirus; japanischer Gehirnhautentzündungsvirus; Rotavirus; Windpocken], Diptherie (Corynebacterium diptheriae) und Tetanus

(Clostridium tetani).

9. Polynucleotid-chemotaktische Zusammensetzungen

[0119] In einem Aspekt werden das APC-Chemotaxin, das Antigen oder beide als DNA geliefert, so dass die Polypeptide in situ erzeugt werden. In einer Ausführungsform ist die DNA „nackt“, wie zum Beispiel in Ulmer et al., Science 259:1745–1749 1993 beschrieben und überprüft von Cohen, 1993, Science 259:1691–1692. Die Aufnahme nackter DNA kann erhöht werden durch Auftragen der DNA auf einen Träger, z.B. biologisch abbaubare Kügelchen, der effektiv in die Zellen transportiert werden kann. In solchen Impfstoffen kann die DNA innerhalb jedes einer Vielzahl von den Fachleuten bekannten Versorgungssystemen vorhanden sein, einschließlich Nucleinsäure-Expressionssysteme, bakterielle und Virus-Expressionssysteme. Techniken zum Einbau von DNA in solche Expressionssysteme sind den Fachleuten wohl bekannt. Siehe, z.B., WO90/11092, WO93/24640, WO93/17706 und U.S. Patent Nr. 5,736,524.

10. Verabreichung von APC-Chemotaxin und Antigen

[0120] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung enthalten ein oder mehrere Antigene (oder Antigen-kodierende Polynucleotide). Die Antigene können in Kombination mit dem APC-Chemotaxin (d.h., in der gleichen Mischung) verabreicht werden. Alternativ können sie separat verabreicht werden.

[0121] Folglich stellt die Erfindung, in einem Aspekt, ein Immunisierungsverfahren zur Verfügung, in dem eine Kombination von einem oder mehreren Antigenen (oder Antigenkodierenden Polynucleotiden) und einem oder mehreren APC-Chemotaxinen (oder APC-Chemotaxin-kodierenden Polynucleotiden) einem Probanden verabreicht werden. Optional wird das Antigen oder APC-Chemotaxin in einem Liefer-Vehikel wie zum Beispiel einem physiologisch akzeptablen Hilfsstoff verabreicht.

A. Verabreichung und Dosis-Planung

[0122] Wie oben angemerkt wird in einer Ausführungsform ein Antigen gleichzeitig mit der chemotaktischen Zusammensetzung verabreicht. In einer alternativen Ausführungsform werden das Antigen und die chemotaktische Zusammensetzung zu unterschiedlichen Zeiten, typischerweise an derselben Stelle, verabreicht. Zum Beispiel kann die chemotaktische Zusammensetzung (ohne das Antigen) zwischen ungefähr 15 m und ungefähr 96 h vor der Verabreichung des Antigens, öfter zwischen ungefähr 15 m und ungefähr 48 h, öfter zwischen ungefähr 24 h und 96 h, oftmals zwischen ungefähr 48 h und 72 h oder zwischen 72 h und 96 h vor der Verabreichung des Antigens verabreicht werden.

[0123] Wenn die chemotaktische Zusammensetzung und eine Antigen-Zusammensetzung an die gleiche Stelle eines Probanden injiziert werden, liegen die Injektionen vorzugsweise innerhalb von 2 cm voneinander entfernt, vorzugsweise innerhalb von 1 cm oder innerhalb von 0,5 cm auf der zweidimensionalen Oberfläche des Körpers. In dieser Ausführungsform sollten die Verabreichungen auch bis zu einer ähnlichen Tiefe und in die gleiche Gewebeschicht vorgenommen werden (d.h., beide Injektionen sollten subkutan oder beide intradermal sein). Für intramuskuläre Injektionen sollte die Tiefe genauer überwacht werden, um eine dreidimensionale äquivalente Platzierung des APC-Chemotaxins und des Antigens innerhalb von 2 cm voneinander, vorzugsweise innerhalb 1 cm, und noch besser innerhalb von 0,5 cm zu erreichen. Dies wird leicht durch Ärzte, Krankenschwestern und anderes medizinisch ausgebildetes Personal erreicht. Die Einstichstelle kann mit wischfester Tinte markiert werden, um dem Arzt zu helfen.

[0124] In einer Ausführungsform wird nur eine Dosis (Verabreichung) der Zusammensetzung gegeben. In einer anderen Ausführungsform wird die erste Verabreichung gefolgt von erhöhten Dosen. Folglich wird in einer Ausführungsform das APC-Chemotaxin in Mehrfachdosen verabreicht, oftmals in Kombination mit der Verabreichung des Antigens (z.B. durch Mitverabreichung). Folglich wird in verschiedenen Ausführungsformen die APC-Chemotaxin-Zusammensetzung einmal, zweimal, dreimal oder mehr als dreimal verabreicht. Die Anzahl der an einen Probanden verabreichten Dosen ist abhängig vom Antigen, dem Ausmaß der Krankheit und der Antwort eines Probanden auf die chemotaktische Zusammensetzung. In einer Ausführungsform der Erfindung tritt eine zweite Verabreichung (Zusatzdosis) der chemotaktischen Zusammensetzung und des Antigens zwischen ungefähr 7 Tagen und 1 Jahr nach der Erstverabreichung auf. In einer Ausführungsform tritt eine zweite Verabreichung (Zusatzdosis) der chemotaktischen Zusammensetzung und des Antigens zwischen ungefähr 14 Tagen und 6 Monaten nach der Erstverabreichung auf. Alternativ tritt eine zweite Verabreichung (Zusatzdosis) der chemotaktischen Zusammensetzung und des Antigens zwischen ungefähr 21 Tagen und 3 Monaten nach der Erstverabreichung auf, oftmals zwischen ungefähr 28 Tagen und 2 Monaten nach der Erstverabrei-

chung. In einer Ausführungsform tritt eine dritte Verabreichung (zweite Zusatzdosis) zwischen ungefähr 14 Tagen und 10 Jahren nach der Erstverabreichung, z.B. zwischen ungefähr 14 Tagen und 3 Jahren nach der Erstverabreichung, oftmals zwischen ungefähr 21 Tagen und 1 Jahr nach der Erstverabreichung, sehr oft zwischen ungefähr 28 Tagen und 6 Monaten nach der Erstverabreichung auf. Nachfolgende Zusatzdosen können in 2-Wochen-Intervallen oder 1-Monats-, 3-Monats- oder 6-Monats- bis 10-Jahresintervallen verabreicht werden.

[0125] Die Fachleute werden erkennen, dass eine Vielzahl von Impfstoff-Verabreichungsdosen und -plänen entwickelt werden kann, basierend auf den oben diskutierten Parametern und aus dem Stand der Technik bekannt, und dass die Bestimmung einer wirksamen Menge und Anzahl der Dosen von Chemotaxinen der Erfindung, Antigenen oder einige Kombinationen von Chemotaxin(en) und Antigen(en) zur Verabreichung sehr wohl innerhalb des Könnens der Fachleute liegt.

E. Wirksame Dosis

[0126] Typischerweise wird eine Menge an APC-Chemotaxin und Antigen an den Probanden verabreicht werden, die ausreichend ist, ein Tier gegen ein Antigen zu immunisieren (d.h., eine „immunologisch wirksame Dosis“ oder eine „therapeutisch wirksame Dosis“). Eine adäquate Menge, um eine „immunologisch wirksame Dosis“ zu erreichen, wird z.B. von der APC-Chemotaxin- und der Antigen-Zusammensetzung, der Art der Verabreichung, des Stadiums und der Schwere der zu behandelnden Erkrankung, dem Gewicht und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten und dem Beurteilungsvermögen des verordnenden Arztes abhängen.

[0127] Die wirksame Dosis von Antigen und APC-Chemotaxin kann in Tiermodellen gestaltet werden, um eine Induzierung einer Immunantwort unter Verwendung von Techniken zu erhalten, die aus dem Stand der Technik wohlbekannt sind. Ein Fachmann kann die Verabreichung an Menschen, basierend auf Tierdaten auf einfache Weise optimieren. Wenn das APC-Chemotaxin ein Protein ist, wie zum Beispiel ein Chemokin, liegt eine Dosis typischerweise zwischen ungefähr 1 fg und ungefähr 100 µg, oftmals zwischen ungefähr 1 pg und ungefähr 100 µg, öfter zwischen ungefähr 1 ng und ungefähr 50 µg, und üblicherweise zwischen ungefähr 100 ng und ungefähr 50 µg. In einigen Ausführungsformen liegt die Dosis zwischen ungefähr 1 fg und ungefähr 100 µg pro kg Körpergewicht des Probanden, oftmals zwischen ungefähr 1 pg und ungefähr 100 µg, öfter zwischen ungefähr 1 ng und ungefähr 50 µg, und üblicherweise zwischen ungefähr 100 ng und ungefähr 50 µg pro kg Körpergewicht des Probanden.

[0128] Die Menge an Antigen, das verabreicht wird, wird mit der Identität und den Charakteristika des Antigens variieren. In einer Ausführungsform enthält eine chemotaktische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung ein oder mehrere Antigene und ein oder mehrere Chemotaxine bei einem molaren oder Gewichtsverhältnis von Chemotaxin zu Antigen von ungefähr 1:1000 oder größer. In einer anderen Ausführungsform liegt das Verhältnis von Chemotaxin zu Antigen in der Zusammensetzung zwischen ungefähr 1:10 und 1:1000. In einer anderen Ausführungsform liegt das Verhältnis von Antigen zu Chemotaxin in der Zusammensetzung zwischen ungefähr 1:10 und 1:1000, oder größer als 1:1000 oder größer. In einer anderen Ausführungsform liegt das Verhältnis von Antigen zu Chemotaxin in der Zusammensetzung zwischen ungefähr 1:10 und 10:1.

C. Träger, Hilfsstoffe, herkömmliche Zusätze, Art der Verabreichung

[0129] Die APC-Chemotaxin enthaltenden Zusammensetzungen der Erfindung kann, wie hierin beschrieben, auf einer Vielzahl von Wegen verabreicht werden. In verschiedenen Ausführungsformen enthält die chemotaktische Zusammensetzung Träger und Hilfsstoffe (d.h., pharmazeutisch akzeptable Hilfsstoffe) (einschließlich aber nicht beschränkt auf Puffer, Carbohydrate, Mannitol, Proteine, Polypeptide oder Aminosäuren wie zum Beispiel Glycin, Antioxidanzien, bakteriostatische Mittel, Chelatbildner, Suspensionsmittel, Verdickungsmittel und/oder Konservierungsstoffe), nach Bedarf andere pharmazeutisch akzeptable Hilfssubstanzen, um sich an physiologische Bedingungen anzunähern, wie zum Beispiel puffernde Agenzien, die Tonizität anpassende Agenzien, Benetzungsmittel und dergleichen, und/oder einen herkömmlichen Zusatz (z.B. wie oben diskutiert). Man erkennt dass, während jeder geeignete, den Fachleuten bekannte Träger verwendet werden kann, um die Zusammensetzungen dieser Erfindung zu verabreichen, die Art des Trägers abhängig von der Art der Verabreichung variieren wird. Verbindungen können auch unter Verwendung wohl bekannter Techniken mit Liposomen eingekapselt werden. Biologisch abbaubare Mikrokügelchen können ebenfalls als Träger für die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden. Geeignete biologisch abbaubare Mikrokügelchen sind zum Beispiel offenbart in den U.S. Patenten Nr. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,835,763; 5,814,344 und 5,942,252.

[0130] Die Zusammensetzungen der Erfindung können durch herkömmliche, gut bekannte Sterilisqqati-

onstechniken sterilisiert oder kann steril gefiltert werden. Die resultierenden wässrigen Lösungen können so wie sie sind zur Benutzung verpackt oder gefriergetrocknet werden, wobei die gefriergetrocknete Zubereitung mit einer sterilen Lösung vor der Verabreichung vereinigt wird.

[0131] Die APC-Chemotaxin-Zusammensetzung der Erfindung kann auf einer Vielzahl von Wegen verabreicht werden, einschließlich durch Injektion (z.B. intradermal, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal und dergleichen), durch Inhalation, durch topische Verabreichung, durch Suppositorien, unter Verwendung eines transdermalen Pflasters, oral.

[0132] Wenn die Verabreichung mittels Injektion durchgeführt wird, können das/die Chemotaxin(e) in wässrigen Lösungen formuliert sein, vorzugsweise in physiologisch kompatiblen Puffern wie zum Beispiel Hanks-Lösung, Ringer-Lösung, oder physiologischem Kochsalz-Puffer. Die Lösung kann Formulierungsmittel wie zum Beispiel Suspendierungs-Stabilisierungs- und/oder Dispergierungsmittel enthalten. Alternativ kann die chemotaktische Zusammensetzung vor der Benutzung zur Konstitution mit einem geeigneten Vehikel wie zum Beispiel sterilem, pyrogenfreiem Wasser in Pulverform vorliegen.

[0133] Wenn die Verabreichung durch Inhalation durchgeführt wird, können das/die Chemotaxin(e) in der Form eines Aerosolsprays aus unter Druck stehenden Packungen oder einem Zerstäuber, mit Hilfe eines geeigneten Treibgases, z.B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas abgegeben werden. Im Falle eines unter Druck stehenden Aerosols kann die Dosierungseinheit durch Bereitstellen eines Ventils zum Abgeben einer abgemessenen Menge bestimmt werden. Kapseln und Patronen z.B. aus Gelatine zur Verwendung in einem Inhalator oder Insufflator können so formuliert werden, dass sie eine Pulvermischung des Proteins und einer geeigneten Pulverbasis wie zum Beispiel Lactose oder Stärke enthalten.

[0134] Wenn die Verabreichung durch topische Verabreichung erfolgt, kann die chemotaktische Zusammensetzung als Lösungen, Gels, Heilsalben, Cremes, Suspensionen und dergleichen formuliert werden, wie es aus dem Stand der Technik wohl bekannt ist. In einigen Ausführungsformen geschieht die Verabreichung mittels eines transdermalen Pflasters.

[0135] Wenn die Verabreichung durch ein Suppositorium erfolgt (z.B. rektal oder vaginal), können die Zusammensetzungen auch in Zusammensetzungen formuliert werden, die eine herkömmliche Suppositorium-Basis enthalten.

[0136] Wenn die Verabreichung oral erfolgt, kann eine Zusammensetzung einfach durch Kombinieren des Chemotaxins mit aus dem Stand der Technik wohl bekannten pharmazeutisch akzeptablen Trägern formuliert werden. Es kann ein fester Träger wie zum Beispiel Mannitol, Lactose, Magnesiumstearat und dergleichen verwendet werden; solche Träger versetzen das Chemotaxin in die Lage, als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gels, Sirups, dünner Brei, Suspensionen und dergleichen, zur oralen Nahrungsaufnahme durch einen zu behandelnden Probanden formuliert zu werden. Für orale feste Formulierungen wie zum Beispiel Pulver, Kapseln und Tabletten umfassen geeignete Hilfsstoffe Füllmittel wie zum Beispiel Zucker, Cellulose-Zubereitungen, Granulierungsmittel und Bindemittel.

11. Impfung zur monoklonalen und polyklonalen Antikörper-Produktion

[0137] Verfahren zur Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper, einschließlich Bindungsfragmente (z.B. F(ab)₂) und Einzelkettenversionen, sind den Fachleuten wohl bekannt. Siehe, z.B., Coligan, 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Green, NY; und Harlow und Lane, 1989, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, NY. Viele Antigen sind jedoch nicht in der Lage, eine adäquate Antikörperantwort in Tieren auszulösen. In einer Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Chemotaxin und ein Antigen enthaltende Zusammensetzung wie hierin beschrieben einem Tier verabreicht, wobei es auf diese Weise die Immunantwort in dem Tier induziert oder verbessert. Polyklonale oder monoklonale Antikörper werden anschließend durch Standardtechniken hergestellt.

12. Stimulation der immanenten Immunantwort

[0138] In einem anderen Aspekt der Erfindung werden die Zusammensetzungen der Erfindung einem Probanden verabreicht, um die immanente Immunantwort zu stimulieren. Die immanente Immunantwort ist die anfängliche Verteidigung des Körpers gegen Krankheitserreger und wird durch eine Vielzahl von Zellen einschließlich APCs (dendritische Zellen und die Makrophagen) ausgelöst. Diese Zellen exprimieren Oberflä-

chen- und Zytoplasma-Rezeptoren, die Moleküle fremder Herkunft erkennen (z.B. bakterielle und Virus-Nucleinsäuren, Proteine, Carbohydrate). Nach der Erkennung dieser Signale lösen die dendritischen Zellen und Makrophagen eine Defensivantwort aus, die die Freisetzung von Cytokinen (einschließlich Interferonen, TNF-alpha, und IL12) und Chemokinen beinhaltet, die Zellen wie zum Beispiel dendritische Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und Granulocyten zur Stelle des Problems ziehen.

[0139] Es wird angenommen, dass die Zusammensetzungen der Erfindung nicht nur nützlich sind, um dendritische Zellen und andere Zellen zu der Stelle der Verabreichung zu ziehen, sondern dass die Zusammensetzungen auch dazu dienen, diese Zellen zu auslösenden Elementen der immanenten Immunantwort zu stimulieren, um einen nicht-spezifischen Schutz zu verleihen, während der Körper die anwendbare Antwort generiert.

[0140] Folglich wird in einer Ausführungsform eine Zusammensetzung der Erfindung vor oder nach dem einer vorweggenommenen Infektion Ausgesetztsein verabreicht.

13. Kits

[0141] In einem Aspekt stellt die Erfindung Kits zur Verfügung, die in einem Paket oder Behälter das folgende enthalten: (1) eine erfindungsgemäße APC-Chemotaxin-Zusammensetzung; (2) einen pharmazeutisch akzeptablen Zusatz oder Hilfsstoff; (3) ein Antigen (z.B. ein biologisch reines Antigen); (4) Instruktionen zur Verabreichung. Die Positionen (1)–(3) befinden sich typischerweise in einem Behälter wie zum Beispiel einer Ampulle, und können eingefroren oder gefriergetrocknet sein. Ausführungsformen, in denen sich zumindest die Komponenten (1) und (3) im selben Behälter befinden, werden ebenfalls in Erwägung gezogen.

14. Ausgewählte Chemokin-Literaturstellen

mM1P-1 α

Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermsen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp Med.* 1988 Jun 1;167(6):1939–44.

hMET-RANTES

Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5): 2599–603.

mRANTES

Schall TJ, Simpson NJ, Mak JY. Molecular cloning and expression of the murine RANTES cytokine: structural and functional conservation between mouse and man. *Eur J Immunol.* 1992 Jun;22(6):1477–81

mMCP-5

Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med.* 1997 Jan 6;185(1):99–109

mMARC

Thirion S, Nys G, Fiten P, Masure S, Van Damme J, Opdenakker G. Mouse macrophage derived monocyte chemoattractant protein-3: cDNA cloning and identification as MARC/FIC. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jun 15;201(2):493–9

mEotaxin

Rothenberg ME, Luster AD, Leder P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Sep 12;92(19):8960–4.

mMCPI (JE)

Van Damme J, Decock B, Bertini R, Conings R, Lenaerts JP, Put W, Opdenakker G, Mantovani A. Production and identification of natural monocyte chemoattractant protein from virally infected murine fibroblasts. Relationship with the product of the mouse competence (JE) gene. *Eur J Biochem.* 1991 Jul 1;199(1):223–9.

MTECK

Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster SS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilben DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Inununity.* 1997 Aug;7(2):291–301

mMIP-2

Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, McClain J, Sherry B, Fabre M, van Deventer S, Cerami A. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med.* 1990 Sep 1;172(3):911–9.

mBLC

Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-Cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):799–803.

mMIP-1 γ

Poltorak AN, Bazzoni F, Smirnova I, Alejos E, Thompson P, Luheshi G, Rothwell N, Beutler B. MIP-1 γ : molecular cloning, expression, and biological activities of a novel CC chemokine that is constitutively secreted in vivo. *Inflamm.* 1995;45(3):207–19

raMIG

Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Jul; 87(14):5238–42.

mMIP1- β

Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D, Cerami A. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med.* 1988 Dec 1;168(6):2251–9.

vMIP-1

Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward OS, Reitz MS. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat Med.* 1997 10 Mar;3(3):287–92

mC10

Orlofsky A, Berger M.S., and Prystowsky M.B. Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes. *Cell Regulation, Vol 2,* p403–412, 1991.

mMDC

Schaniel C, E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink, and P. Sideras. Activated Murine B Lymphocytes and Dendritic Cells Produce a Novel CC Chemokine which Acts Selectively on Activated T Cells. *J. Exp. Med.,* Volume 188, Number 3, August 3, 1998 451–463

hLeukotactin

Youn BS, Zhang SM, Lee EK, Park DH, Broxmeyer HE, Murphy PM, Locati M, Pease JE, Kim KK, Antol K,

Kwon BS. Molecular cloning of leukotactin-1: a novel human beta chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J Immunol.* 1997 Dec 1;159(11):5201–5

hMIP-1 β

Lipes, M.A. et al., (1988) Identification, cloning, and characterization of an immune activation gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:9704.

hMCP-2

Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):59–65.

hMCP-3

Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):59–65.

hMIP-3 α

Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiyama H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2.

hMIP-3 β

Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *J Biol Chem.* 1997 May 23;272(21):13803–9

hRANTES

Schall, T. et al., (1988) A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J. Immunol.* 141:1018.

hMIP1 α

Obaru K, Fukuda M, Maeda S, Shimada K. A cDNA clone used to study mRNA inducible in 10 human tonsillar lymphocytes by a tumor promoter. *I Biochem (Tokyo).* 1986 Mar;99(3):88594.

hM1P1 α (70aa)

Irving et al., 1990, Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nuc. Acid Res.* 18:3261–70

hHCC-1

Schulz-Knappe P, Magert HJ, Dewald B, Meyer M, Cetin Y, Kubbies M, Tomczkowski J, Kirchhoff K, Raida M, Adermann K, et al. HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J Exp Med.* 1996 Jan 1;183(1):295–9.

hMPIF-1

Forssmann U, Delgado MB, Ugucioni M, Loetscher P, Garotta G, Baggiolini M. CKbeta8, a novel CC chemokine that predominantly acts on monocytes. *FEBS Lett.* 1997 May 25 19;408(2):211–6

hMPIF-1 (22–137)

Youn BS, Zhang SM, Broxineyer HE, Cooper S, Antol K, Fraser 1J- Jr, Kwon BS. Characterization of CKbeta8 and CKbeta8-1: two alternatively spliced forms of human beta-chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3118–26.

hMPIF-1 (46–137)

Macphee CH, Appelbaum ER, Johanson K, Moores KE, Imburgia CS, Fornwald J, Berkhout T, Brawner M, Groot PH, O'Donnell K O'Shannessy D, Scott G, White JR. Identification of a truncated form of the CC chemokine CK beta-8 demonstrating greatly enhanced biological activity. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6273–9.

hMIP-1δ

Wang, W. et al., (1998) Molecular cloning and functional characterization of human MIP-1 delta, a new C-C chemokine related to mouse CCF-18 and C10. *J. Clin. Immunol*. 18(3):214.

hMCP-4

Ugucconi, M. et al., (1996) Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med*. 183:2379.

m6Ckine

Hedrick JA, Zlotnik A. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol*. 1997 Aug 15;159(4):1589–93.

hSDF1α

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*. 1993 Jul 30;261(5121):600–3.
Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2305–9.

hSDF1β

Tashiro K, Tada H, Henker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type 1 membrane proteins. *Science*. 1993 Jul 30;261(5121):600–3.

mSDF1α

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA- A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1101–9.

vMCK-2

Saederup N, Lin YC, Dairaghi DJ, Schall TJ, Mocarski ES. Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Sep 14;96(19):10881–6.
MacDonald MR, Bumey MW, Resnick SB, Virgin HW. Spliced mRNA encoding the murine cytomegalovirus chemokine homolog predicts a Beta chemokine of novel structure. *J Virol*. 1999 May;73(5):3682–91.

[0142] Siehe auch, GenBank, z.B. Zugang Nr. P10147 (hMIP1α), Zugang Nr. P10855 30 (mMIP-1α), Zugang Nr. P13501 (hRANTES), Zugang Nr. P30882 (mRANTES), Zugang Nr. Q16627 (hHCC-1), Zugang Nr. P55773 (hMPIF-1), Zugang Nr. Q16663 (hM1P-1δ), Zugang Nr. Q99616 (hMCP-4), Zugang Nr. Q32431 (mMCP-5), Zugang Nr. Q03366 (mMARC), Zugang Nr. P48298 (mEotaxin), Zugang Nr. P10148 (mMCP-1(JE)), Zugang Nr. Q35903 (mTECK), Zugang Nr. P10889 (mMIP-2), Zugang Nr. AF044196 (mBLC), Zugang Nr. P18340 (mMIG), Zugang Nr. P14097 (mMIP-1β), Zugang Nr. P80075 (hMCP-2), Zugang Nr. P80098 (hMCP-3), Zugang Nr. P78556 (hMIP-3a), Zugang Nr. Q99731 (hMIP-3β), Zugang Nr. P27784 (mC10), Zugang Nr. AJ238238 (mM-DC), Zugang Nr. P13236 (hMIP-1β), und Zugang Nr. P51670 (mMIP-1γ).

15. Beispiele

Beispiel 1

Chemotaxie-Untersuchungen

[0143] Die Chemotaxie-Untersuchungen werden unter Verwendung gereinigter Zellen und einem 96-Well-Chemotaxie-Mikrokammer (ChemoTx[®], NeuroProbes, Inc., Gaithersburg MD) durchgeführt. In dieser Untersuchung wird ein poröser Polycarbonatfilter verwendet, um sowohl die Bildung eines Chemolockstoff-Gradienten über den Filter zu gestatten als auch den Zellen zu gestatten, in den Filter oder durch ihn hindurch in das untere Well zu wandern.

[0144] Um eine Chemotaxie-Untersuchung für unreife dendritische Zellen durchzuführen, werden 29 µl eines Kandidaten oder eines bekannten APC-Chemotaxins bei 0, 1, 10 und 100 nM CHECK-Konzentrationen in die Löcher der unteren Kammer platziert. Der Filter wird auf das obere Ende der Kammer platziert, so dass der Chemo-Lockstofflösung die Unterseite des Filters berührt. Unreife dendritische Zellen von Tag 7 wurden geerntet, einmal mit Chemotaxie-Puffer gewaschen, der 0,1% BSA (Sigma) in HBSS (Life Technology) mit Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺) enthält, und schließlich in Chemotaxie-Puffer bei 5×10^6 pro ml resuspendiert. Es werden 20 Mikroliter Zellen vorsichtig auf den Filter gegeben. In einem Gewebekultur-Inkubator wird 90 Minuten lang bei 37°C die Migration weitergehen lassen. Die Migration wird beendet durch Entfernen von nicht gewanderten Zellen auf dem oberen Ende des Filters mittels eines Gummischlägers. Der Filter wird von der Vorrichtung entfernt und mit DPBS gespült. (Die untere Kammer wird mikroskopisch untersucht, um festzustellen, ob irgendwelche Zellen in die Löcher gewandert sind. Falls eine signifikante Anzahl von Zellen in den Löchern vorhanden ist, wird die Quantifizierung sowohl in den Löchern als auch im Filter durchgeführt.) Um Zellen zu erfassen, die während der Migrationsuntersuchung der unreifen dendritischen Zellen in den Polycarbonatfilter gewandert sind, wird der Filter nach Entfernung aus der Vorrichtung und Waschen mit DPBS (Hyclone) und mit einer Zellanfärbelösung wie zum Beispiel dem Hema3-Anfärbekit (Fisher Scientific) angefärbt. Der Filter wird nacheinander in die drei separaten Lösungen eingetaucht, jeweils für ungefähr 5 Sekunden. Nach der letzten Lösung wird der Filter mehrmals mit Wasser gewaschen. Der Filter wird an der Luft trocknen gelassen und das Signal wird durch Auslesen des Filters auf einem Plattenleser (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Das Ausmaß der Migration wird berechnet als das Verhältnis der Absorption zwischen den Löchern mit Chemolockstoff und den Löchern mit Chemotaxie-Puffer allein.

Beispiel 2

Chemokin-Injektion in Mäuse

[0145] Diese Beispiel beschreibt eine in vitro-Untersuchung, in der die Fähigkeit von verschiedenen Chemokinen, dendritische Zellen anzuziehen, demonstriert wird.

[0146] Die folgenden Chemokine wurden von R&D Systems (Minneapolis, MN) erhalten: MCP2, MCP3, MIP1β, MIP1α, Rantes, mMIG, mMDC, mC10, vMIP1. Jedes Chemokin (2 µg in PBS) wurde intradermal in eine andere BALB/c-Maus injiziert. Ein Maus erhielt eine Kontrollinjektion von PBS ohne ein Chemokin. 72 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse eingeschläfert und das Gebiet um die Injektionsstelle wurde herausgeschnitten und der Immunhistologie unterworfen. Gefrorene Abschnitte wurden mit anti-DEC-205-Antikörper angefärbt (erhältlich von Bio-Whittaker Molecular Applications, Rockland, ME; Kraal et al. 1986, J. Exp. Med. 163:981), der ein für dendritische Zelle spezifisches Oberflächenmolekül erkennt. Jedem Abschnitt wurde eine relative Anfärbenummer auf einer Skala von 0 bis 5 zugeordnet (= = niedrigste Infiltration, 5 = höchste Infiltration). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

[0147] Verschieden Chemokine lösten nach 72 Stunden eine DEC-205+ (dendritische Zelle)-Infiltration an der Injektionsstelle aus, wenn sie intradermal in die Maus injiziert wurden. Von diesen zeigten MCP3, MIP3β, mMIG, mMDC, mC10 und Virus-MIP1 eine DC-Infiltration, wobei MCP3, mMDC und mC10 die beste Infiltration zeigten.

Tabelle 4

| Chemokin | DC-Infiltration |
|----------|-----------------|
| MCP2 | 0 |
| MCP3 | 3 |
| MIP1b | 0 |
| MIP3a | 0 |
| MIP3b | 1 |
| Rantes | 0 |
| MMIG | 2 |
| mMDC | 3 |
| mC10 | 4 |
| vMIP1 | 0 |
| PBS | 0 |

Beispiel 3

Chemokin-Injektion in Rhesusaffen

[0148] Dieses Beispiel zeigt, dass gewisse Chemokine, die einem nicht-menschlichen Primaten intradermal injiziert werden, mononukleare Infiltration zu der Stelle der Injektion auslösen.

[0149] Kodierte, sterile Chemokine (2 µg in PBS) wurden unter Betäubung intradermal (100 µl Injektionsvolumen) in den Oberarm eines Rhesusaffen injiziert. In jedem Fall wurden zwei Affen jeweils zwei Injektionen des selben Chemokins an zwei unterschiedlichen Stellen (z.B. linker Arm gegen rechter Arm) verabreicht. Nach 72 Stunden wurde eine Einstichstelle einer Stanzbiopsie unterzogen und in eine Rand- und eine Zentrumsprobe aufgeteilt und beide Proben wurden für die Immunhistologie vorbereitet. Nach 96 Stunden wurde die andere Einstichstelle einer Ausstanzbiopsie unterzogen und in eine Rand- und eine Zentrumsprobe aufgeteilt und beide Proben wurden für die Immunhistologie vorbereitet. Jede Zeile in Tabelle 5 repräsentiert ein einzelnes Tier. Ein Abschnitt des präparierten Gewebes wurde durch Hematoxylin und Eosin angefärbt und es wurden mononukleare Zellen basierend auf zellulärer Morphologie (z.B. mononuclear im Gegensatz zu polynuclear) identifiziert. GM-CSF (200 µg-Dosen) und Rantes (20 µg-Dosen) wurden als positive Kontrollstoffe verwendet. Die Injektion von PBS und die Analyse von nicht-injizierten Geweben wurden als negativer Kontrollstoff verwendet.

[0150] Die mononukleare Infiltration wurde punktemäßig auf der Basis der folgenden Skala von 0 bis 5 bewertet: 0= es wurde ein sehr mildes perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet; 1= es wurde ein mildes perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet; 2= es wurde ein mildes/moderates perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet; 3= es wurde ein moderates perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet; 4= es wurde ein ausgedehntes perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet; 5= es wurde ein blühendes perivaskuläres mononukleares entzündungshemmendes Infiltrat überall in der Haut beobachtet. Zwischenwerte sind angegeben, z.B. repräsentiert „2/3“ eine Punktzahl zwischen 2 und 3.

[0151] Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt. GM-CSF (200 µg-Dosen) zeigte bei 72 Stunden ein Infiltrationslevel zwischen 2 und 3. RANTES (20 µg)-Dosierung zeigte bei 72 Stunden ein Infiltrationslevel zwischen 2 und 3. Zusätzliche intern kodierte Proben von RANTES (20 µg-Dosen) zeigten ein Infiltrationslevel von bis zu 2. Negative Kontrollstoffe (PBS) wiesen üblicherweise ein Infiltrationslevel von 0 auf.

[0152] Von den getesteten Chemokinen zeigten MCP-2, MCP-3, MIP-1β, MIP3α, MIP3β, Rantes, mMIG, mMDC, mC10 und Virus-MIP1 mononukleare Infiltration, wobei mMDC, mC10 und Virus-MIP1 die höchsten Infil-

trationslevel aufwiesen. Im Allgemeinen wurde nach 72 Stunden eine größere Infiltration als nach 96 Stunden beobachtet.

Tabelle 5

| Chemokin | 72 h | | 96 h | |
|------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|
| | Zentrum | Rand | Zentrum | Rand |
| GM-CSF (200µg) * | 0 | 0 | 3 | 2/3 |
| Rantes (20 µg) * | 0/1 | 1 | 2/3 | 1/2 |
| MCP2 | 1/2 | 1 | 1/2 | 1 |
| MCP2 | 1 | 0/1 | 0 | 0 |
| MCP3 | 1/2 | 0 | Nicht bestimmt | 0 |
| MCP3 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1 |
| MIP1b | 0 | 0/1 fokal | 1 | 0 |
| MIP1b | 1/2 fokal | 0/1 | 0 | 0 |
| MIP3a | 1 | 1/2 | 0/1 | 0/1 |
| MIP3a | 2 | 1/2 fokal | 1/2 | 0/1 |
| MIP3b | 2 | 1 | 0 | 1/2 |
| MIP3b | 1/2 | 1/2 fokal | 2 | 1/2 fokal |
| Rantes | 0 | 2 | 0 | 1/2 fokal |
| Rantes | 1/2 | 0/1 | 1/2 fokal | 0/1 |
| mMIG | 0/1 | 1 | 0/1 | 0/1 |
| mMIG | 0 | 0/2 fokal | 0 | 0/1 |
| mMDC | 1/2 | 1/2 | 0 | 1 |
| mMDC | 0/1 | 2/3 fokal | 2 | 2/3 fokal |
| mC10 | 3/4 | 1/2 | 1/2 fokal | 1 |
| mC10 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 fokal |
| vMIP1 | 2 | 0/1 | 0/1 | 1 |
| vMIP1 | 2 | 1/2 | 2/3 | 2/3 |

Legende: „*“ verwendet als positive Kontrollstoffe. Jede horizontale Reihe repräsentiert einen eigenen Rhesusaffen und die Histologie-Punktwerte der von jedem Tier untersuchten 4 Proben. „Fokal“ ein Gefäß in dem Abschnitt zeigte herausragende perivaskuläre Entzündung (d.h., ein Abschnitt des Objektträgers um das Gefäß herum zeigte eine herausragende Infiltration, während der Rest des Objektträgers mehr oder weniger normal war). „Zentrum“ und „Rand“ betreffen woher der Gewebeabschnitt kam. „Zentrum“-Gewebeabschnitte wurden

an der Stelle der intradermalen Injektion entnommen; „Rand“-Gewebeabschnitte wurden weiter von der Injektionsstelle weg entnommen, in Richtung des Rands der durch die Injektion erzeugten Quaddeln.

Beispiel 4

Chemokin-Injektion in Rhesusaffen

[0153] In einem zweiten Experiment wurden unterschiedliche Mengen (ungefähr 8, 2,4 oder 0,8 µg in 100 µl PBS) von unterschiedlichen Chemokinen unter Betäubung intradermal in Rhesusaffen injiziert. 24 und 48 Stunden später wurden unter Verwendung einer aseptischen Technik 6 mm Haut-Ausstanzbiopsien entnommen, dann halbiert und für die Analyse präpariert. Ein Teil der Biopsie wurde in OCT-Verbindung eingebettet, schockgefroren und bei -70°C gelagert. Der andere Teil der Biopsie wurde in Formalin fixiert und in Paraffinwachs eingebettet; anschließend wurden Abschnitte mit Hematoxylin und Eosin angefärbt und mikroskopisch auf Zellinfiltration in die Haut untersucht (Tabelle 6). Als negativer Kontrollstoff wurden den Affen Chemokine injiziert, denen PBS fehlte.

[0154] Die mononukleare Zellinfiltration in die Haut wurde wie folgt punktemäßig auf der Basis einer Skala von 0 bis 4 bewertet: 0, keine Infiltration; 1, leichte Infiltration; 2, moderate Infiltration; 3, beachtliche Infiltration; 4, schwere Infiltration. Wie in Tabelle 6 gezeigt, verursachten die Chemokine mC10 und vMCK-2 eine beachtliche mononukleare Infiltration, insbesondere zu dem 24-Stunden-Zeitpunkt. Es war bemerkenswert, dass ein durch ein Maus-Virus kodiertes Chemokin (vMCK-2) starke Aktivität in Primatenzellen zeigte. Infiltrierende Zellen wurden hauptsächlich im Fettgewebe beobachtet, obwohl auch im subkutanen Bereich, und, im Fall von mCVK-2 bei 48 Stunden, in der Collagen-Matrix der oberflächlichen Haut Zellen festgestellt wurden. Die Chemokine mMDC und vMIP-1 verursachten weniger Entzündung als mC10 und vMCK-2.

Tabelle 6

| Chemokin | 24 h | 48 h |
|----------------|------|------|
| | | |
| mC10: 0,8 µg | 2 | 0 |
| 2,4 µg | 1 | 2 |
| 8 µg | 3 | 2 |
| | | |
| mMDC: 0,8 µg | 2 | 0 |
| 2,4 µg | 0 | 0 |
| 8 µg | 2 | 0 |
| | | |
| vMIP-1: 0,8 µg | 0 | 0 |
| 2,4 µg | 1 | 0 |
| 8 µg | 0 | 0 |
| | | |
| vMCK-2: 0,8 µg | 2 | 2 |
| 2,4 µg | 2 | 2 |
| 8 µg | 4 | 3 |

Design von Hybrikinen

[0155] „Hybrikinen“ sind chimäre Chemokin-Polypeptide, die designt werden, um neue Moleküle mit den entsprechenden gewünschten und verbesserten Qualitäten zu erzeugen. Üblicherweise ist die Aminosäuresequenz eines gewünschten Hybrikins bestimmt, und das Molekül wird durch chemische Synthese hergestellt. In diesem Beispiel wurden die Sequenzen der Chemokine hMCP-2, mC10 und mMDC begrifflich in funktionelle Domains, basierend auf dem Abstand der invarianten Cysteinreste, aufgeteilt. Chimäre Sequenzen wurden durch Swappen von Domains zwischen diesen Molekülen hergestellt. Der Amino-Termini-Bereich (alle Aminosäuren des reifen nativen Protein-Amino-Terminus des ersten konservierten Cysteinrestes) wurde auf den verbleibenden Abschnitt eines anderen Chemokinmoleküls gewappt, um Hybride zu kreieren. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, die Amino-Termini-Bereiche zwischen mC10 und hMCP-2, um zwei neue Moleküle zu kreieren: die mC10/hMCP2- und hMCP2/mC10-„Hybrikin“-Moleküle. Zusätzlich werden die Amino-Endpunktbereiche zwischen mMDC und hMCP-2 gewappt, um zwei zusätzliche neue Moleküle zu kreieren: die mMDC/hMCP2- und hMCP2/mMDC-„Hybrikin“-Moleküle. Diese Polypeptide wurden chemisch unter Verwendung der klassischen Fmoc-Peptid-Chemie synthetisiert. Die Polypeptide werden in in vitro- und in vivo-Chemotaxie-Untersuchungen verwendet, um ihre chemotaktischen Eigenschaften zu bestimmen.

[0156] Die vorliegende Erfindung stellt neue Verfahren und Materialien bzgl. APC-chemotaktischer Zusammensetzungen und therapeutischer und prophylaktischer Immunisierung zur Verfügung. Während spezielle Beispiele bereit gestellt wurden ist die obige Beschreibung erläuternd und nicht einschränkend. Den Fachleuten werden bei der Durchsicht dieser Beschreibung viele Variationen der Erfindung deutlich werden.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Antigen-präsentierenden Zell-Chemotaxins (APC-Chemotaxin) und eines Antigens bei der Herstellung eines Medikaments, wobei das APC-Chemotaxin ist:

- (a) ein Chemokin, ausgewählt aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;
- (b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder
- (c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung ferner ein zusätzliches Chemokin enthält.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung sowohl vMCK-2 als auch mC10 enthält.

4. Verwendung nach Anspruch 1, worin das APC-Chemotaxin durch ein Polynucleotid kodiert ist, das durch in vitro-Rekombination von Polynucleotiden, die vMCK-2 oder mC10 kodieren und einem anderen natürlich vorkommenden Chemokin erzeugt wird.

5. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Antigen von einem mikrobiellen Erreger stammt oder ein Tumor-assoziiertes Antigen ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, worin der mikrobielle Erreger ein Bakterium oder ein Virus ist.

7. Verwendung nach Anspruch 1, worin das APC-Chemotaxin vMCK-2 ist.

8. Verwendung nach Anspruch 1, worin das APC-Chemotaxin mC10 ist.

9. Verwendung nach Anspruch 1, worin das APC-Chemotaxin ein vMCK-2 kodierendes Polynucleotid ist.

10. Verwendung nach Anspruch 1, worin das APC-Chemotaxin ein mC10 kodierendes Polynucleotid ist.

11. Impfstoffzusammensetzung, umfassend ein im Wesentlichen gereinigtes Chemokin-Polypeptid und ein antigenes Polypeptid, worin das Chemokin-Polypeptid Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) oder eine Abart davon ist, die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert, oder mC10 oder eine Abart davon, die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert.

12. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 11, worin das Chemokin-Polypeptid vMCK-2 ist.

13. Impfstoffzusammensetzung nach Anspruch 11, worin das Chemokin-Polypeptid mC10 ist.

14. Zusammensetzung, umfassend ein im Wesentlichen gereinigtes Antigen-präsentierendes Zell-Chemotaxin (APC-Chemotaxin) und ein Antigen, worin das APC-Chemotaxin ist:

(a) ein Chemokin, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;

(b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder

(c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 14, weiterhin umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff oder einen üblichen Zusatz.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 14, weiterhin umfassend ein zusätzliches Chemokin.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 14, die sowohl vMCK-2 als auch mC10 enthält.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das Antigen von einem mikrobiellen Erreger stammt oder ein Tumorassoziertes Antigen ist.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin der mikrobielle Erreger ein Bakterium oder ein Virus ist.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das APC-Chemotaxin vMCK-2 ist.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das RPC-Chemotaxin mC10 ist.

22. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das APC-Chemotaxin ein vMCK-2 kodierendes Polynucleotid ist.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin das APC-Chemotaxin ein mC10 kodierendes Polynucleotid ist.

24. Verfahren zur Formulierung einer Zusammensetzung, die in der Lage ist, eine Immunantwort in einem vorgegebenen Antigen bei einer Testperson zu induzieren, umfassend das Kombinieren eines Antigen-präsentierenden Zell-Chemotaxins (APC-Chemotaxin), des vorgegebenen Antigens und eines pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff oder eines üblichen Zusatzes, worin das APC-Chemotaxin ist:

(a) ein Chemokin, ausgewählt aus Maus-Cytomegalovirus Chemokin-2 (vMCK-2) und mC10;

(b) eine Abart von (a), die die chemotaktischen Eigenschaften des Polypeptids nicht ändert; oder

(c) ein (a) oder (b) kodierendes Polynucleotid.

25. Verfahren nach Anspruch 24, worin das vorgegebene Antigen von einem mikrobiellen Erreger stammt oder ein Tumor-assoziiertes Antigen ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, worin der mikrobielle Erreger ein Bakterium oder ein Virus ist.

27. Verfahren nach Anspruch 24, worin das APC-Chemotaxin vMCK-2 ist.

28. Verfahren nach Anspruch 24, worin das APC-Chemotaxin mC10 ist.

29. Verfahren nach Anspruch 24, worin das APC-Chemotaxin ein vMCK-2 kodierendes Polynucleotid ist.

30. Verfahren nach Anspruch 24, worin das APC-Chemotaxin ein mC10 kodierendes Polynucleotid ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

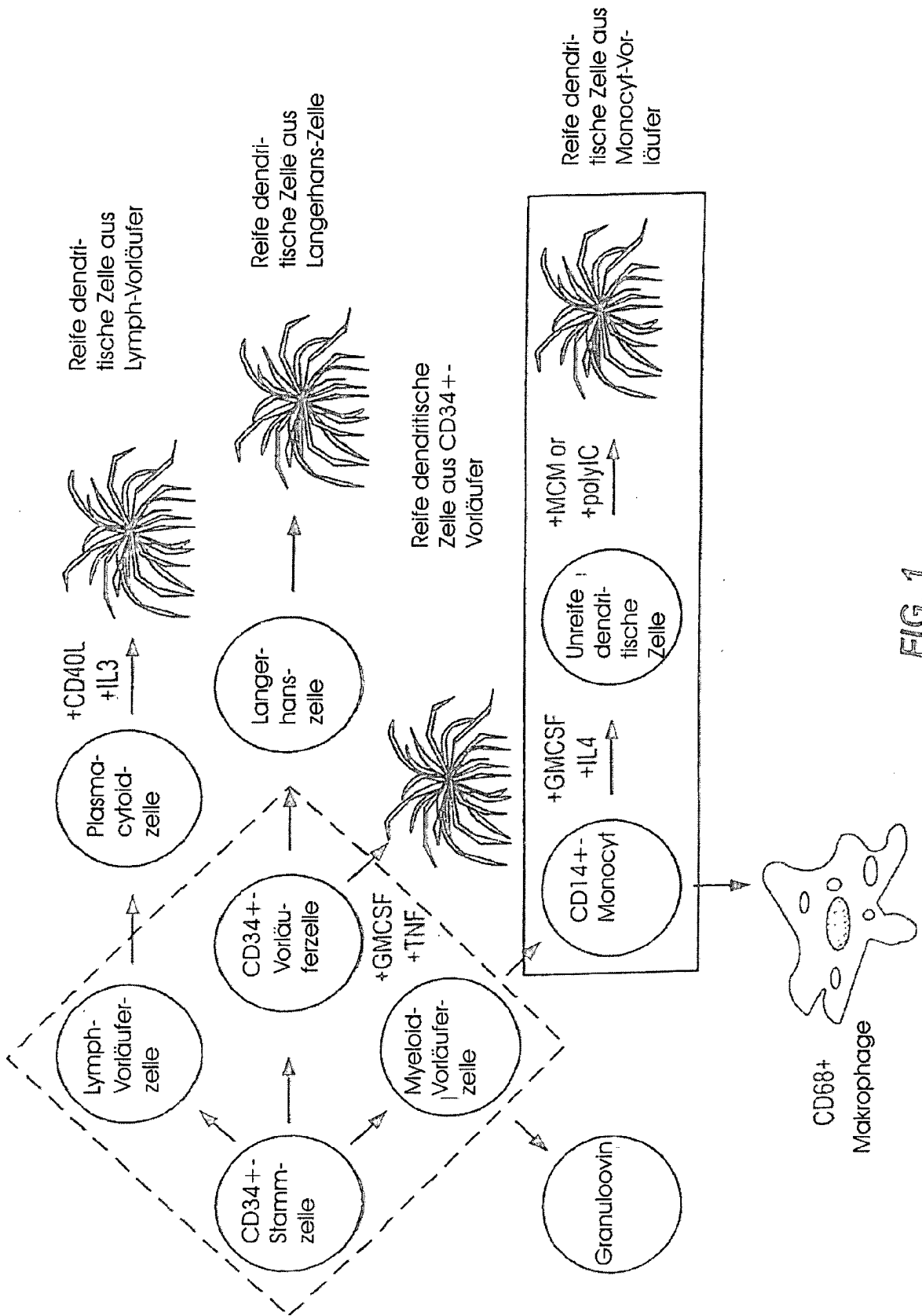


FIG. 1.

```

hmCP-2      QPDSVSIPIIT C_C FNVINRKIPIQRLSYTRITNIQ C PKEAVIFKIQRGKEV C ADPKERWVRDSMKHILDQIFQNLKP
mC10        GLIQEMEKEEDRRYNPPIIHQGFQDTSSD C_C FSYATQ IPCKRFI YYFPTSGG C IKPGIIFISRRGTQV C ADPSDRRVQRCLSTLKQGPRSGNKVIA
mMDC        GPYGANVEDSI C_C ODYIRHPLPS RLVKEFFWTSKS C RKPGVVLITVKNRDI C ADPROVHVKKLLHKLS

mC10/hmCP2 GLIQEMEKEEDRRYNPPIIHQGFQDTSSD C_C FNVINRKIPIQRLSYTRITNIQ C PKEAVIFKIQRGKEV C ADPKERWVRDSMKHILDQIFQNLKP
hmCP2/mC10 QPDSVSIPIIT C_C FSYATQ IPCKRFI YYFPTSGG C IKPGIIFISRRGTQV C ADPSDRRVQRCLSTLKQGPRSGNKVIA

mitMDC/hmCP2 GPYGANVEDSI C_C FNVINRKIPIQRLSYTRITNIQ C PKEAVIFKIQRGKEV C ADPKERWVRDSMKHILDQIFQNLKP
hmCP2/mitMDC QPDSVSIPIIT C_C ODYIRHPLPS RLVKEFFWTSKS C RKPGVVLITVKNRDI C ADPROVHVKKLLHKLS

```

FIG. 2.