



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 503 T2** 2009.04.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 244 466 B1**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 503.5**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/04925**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 985 660.0**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/047543**  
(86) PCT-Anmeldetag: **22.12.2000**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **05.07.2001**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.2002**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2008**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.04.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**9930616**      **24.12.1999**      **GB**

(73) Patentinhaber:  
**The Mathilda and Terence Kennedy Institute of  
Rheumatology Trust, London, GB**

(74) Vertreter:  
**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,  
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:  
**FOXWELL, Brian, London, GB; FELDMANN, Marc,  
London, GB**

(54) Bezeichnung: **AKTIVIERUNG DES IMMUNSYSTEMS DURCH EINEN ANTIGEN UND EINEN NF-kappaB AUSLÖSER**

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

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

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Aktivierung des Immunsystems durch Verwenden von Induktoren von NF- $\kappa$ B (auch: NF- $\kappa$ B) und die Verwendung dieser Induktoren zum Behandeln von Infektionskrankheiten und Krebs.

**[0002]** Die Antigenpräsentation stellt einen entscheidenden Schritt in der Auslösung einer Immunantwort dar, und dendritische Zellen (DC) sind anerkannter Maßen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen für naive T-Zellen. Dies liegt zum Teil an ihrer hohen Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen (Hart (1997) *Blood* 90, 3245–3287). Allerdings ist wenig über die biochemischen Wege bekannt, die die Antigen-präsentierende Funktion regulieren, was zum Teil an der Schwierigkeit des Transfizierens der DCs liegt. Unter Verwendung eines Inhibitors des I $\kappa$ B-Abbaus, PSI, der eine wirksame Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erbringt, zeigen die Erfinder hierin die Aufhebung der Fähigkeit der DCs, eine gemischte Lymphozytenreaktion zu induzieren. Der Mechanismus unterdrückte die DC-Funktion und verminderte die Antigenpräsentation, die an der Herabregulierung vielfacher Schritte beteiligt sind, einschließlich kostimulatorischer Moleküle (CD86 und CD80), HLA Klasse II (DQ > DR) als auch Zytokinen wie IL-12. Darüber hinaus waren die an solche DCs exponierten T-Zellen nicht dazu in der Lage, durch nachfolgende Zusammentreffen mit normalen DCs stimuliert zu werden. Diese Ergebnisse heben NF- $\kappa$ B als ein wirksames Ziel für die Blockierung der Antigenpräsentation hervor.

**[0003]** Dendritische Zellen sind von hoher Bedeutung in der Präsentation von Antigen an naive T-Zellen bei der primären Immunantwort. Sie sind von Knochenmark abgeleitete Zellen, die in den frühen 1970er Jahren erstmals beschrieben wurden von Steinman und Cohn (1973) *J. Exp. Med.* 179, 1109. Untersuchungen an dendritischen Zellen wurden zunächst durch die Schwierigkeit behindert, sie in ausreichenden Zahlen zu isolieren, doch wurde dieses Problem zum Teil durch die Feststellung überwunden, dass ein Subset der DCs in vitro durch Züchten von CD34<sup>+</sup>-Zellen oder humanen Monozyten mit GM-CSF und IL-4 generiert werden konnte. Diese gezüchteten DCs weisen den Phänotyp von unreifen DCs auf und können zu in hohem Maße MHC, in hohem Maße CD80/86 exprimierenden Zellen durch Inkubation mit TNF $\alpha$  oder LPS herangereift werden (Bender et al. (1996) *J. Immunol. Methods* 196,121; Romani et al. (1996) *J. Immunol. Methods* (1996) 196,137; Reddy et al. (1997) *Blood* 90, 3640).

**[0004]** DCs können auch von einem post-koloniebildende Einheit CD14<sup>+</sup>-Intermediat in dem peripheren Blut abgeleitet sein. DCs wandern an periphere Stellen in der Haut, Schleimhaut, Milz und Thymus. Sie

sind in einer Vielfalt von klinisch bedeutsamen Prozessen impliziert worden, einschließlich der Allo-transplantat-Abstoßung, atopischen Störungen, Autoimmunität und Antitumor-Immunität.

**[0005]** DCs können ex vivo aus CD34<sup>+</sup>-Stammzellen oder peripheren CD14<sup>+</sup>-Blutmonozyten unter Verwendung von Zytokinen, hauptsächlich GM-CSF, IL-4 und TNF $\alpha$ , gezüchtet werden. Scabolsc et al. (1995) *J. Immunol.* 154, 5651–5661. DCs aus diesen beiden Quellen sind immunkompetent und können exogen präsentiertes Antigen aufnehmen, es prozessieren und dann an zytotoxische T-Zellen präsentieren (Grabbe et al. (1995) *Immunology Today* 16, 117–121; Girolomoni & Ricciardi-Castagnoli (1997) *Immunology Today* 18, 102–104). DCs können eine Antigen-spezifische Tumormunität übertragen, die in vivo generiert wird (Kwak et al (1995) *Lancet* 345, 1016–1020), und autologe DCs, die mit Tumorantigen ex vivo gepulst sind, können eine messbare Antitumor-Wirkung induzieren (Hsu et al (1996) *Nature Medicine* 2, 52–58). DCs können unter Verwendung eines groben Tumormembran-Lysats, gereinigter Peptide oder Peptidfragmente, wirksam gepulst werden. Die ex vivo-Expansion autologer dendritischer Zellen von Patienten, die Beladung mit einem Peptidantigen und die Reinfusion als adoptive Immuntherapie ist zum Beispiel beschrieben in WO/00/26249.

**[0006]** Die Wichtigkeit der Antigenpräsentation in der Generierung der Immunantwort wurde durch den Nachweis bestätigt, dass die Blockierung der Antigenpräsentation Immunantworten herabreguliert, und dass sie in der Behandlung von Tiermodellen der Erkrankung nützlich ist. So sind Antikörper zu der murinen MHC Klasse II zur Behandlung einer experimentellen allergischen Enzephalomyelitis verwendet worden (Smith et al. (1994) *Immunology* 83, 1), und die Blockierung der CD80/86 kostimulatorischen Moleküle mit Antikörpern oder CTLA4-Ig Fusionsprotein ist bei Transplantaten oder Tiermodellen der Arthritis nützlich (Lu et al. (1999) *Gene Ther.* 6, 554–563). Dies hat zu einer Suche nach neuen Wegen der Herabregulierung der Antigenpräsentierung geführt, die bei Erkrankungen des Menschen oder bei der Transplantation nützlich sein kann.

**[0007]** Es ist spekuliert worden, dass NF- $\kappa$ B in das Immunsystem involviert ist. Dies ist zum Beispiel in der Abhandlung von Baeuerle P. A. und Henkel T. zusammengefasst (Annual Reviews in Immunology, 1994, Bd. 12, S. 141–179). Allerdings hat niemand gezeigt, dass NF- $\kappa$ B in der Aktivierung und Hemmung des Immunsystems tatsächlich entscheidend ist, da die Wirkungen der Aktivierung oder Inaktivierung von NF- $\kappa$ B auf Antigen-präsentierende Zellen bisher nicht für eine Untersuchung zugänglich waren. Die Erfinder haben erstmals die Schlüsselrolle von NF- $\kappa$ B in der Immunantwort nachgewiesen.

**[0008]** Die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B-artigen Proteins resultiert aus einer posttranslationalen Modifikation, die die Translokalisierung des zuvor gebildeten Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma zu dem Nukleus zulässt. Diese Translokalisierung wird durch die Phosphorylierung und den Abbau eines Inhibitorproteins, bezeichnet als I $\kappa$ B, kontrolliert, welches einen Komplex mit NF- $\kappa$ B bildet und es dadurch in dem Zytoplasma hält. Die Stimulierung der Zelle durch geeignete Signale führt zu der Modifikation von I $\kappa$ B, was wiederum zu seiner Dissoziation und/oder dem Abbau von NF- $\kappa$ B führt.

**[0009]** Die Bindung des I $\kappa$ B-Proteins an NF- $\kappa$ B maskiert das nukleare Lokalisationssignal (NLS) von NF- $\kappa$ B. Auf die Stimulierung der Zelle mit spezifischen Agenzien hin, die von dem Zelltyp und dem Stadium der Zellentwicklung abhängen, wird I $\kappa$ B in einer Weise modifiziert, die die Bindung an NF- $\kappa$ B unmöglich macht, was zur Dissoziation von NF- $\kappa$ B von I $\kappa$ B führt.

**[0010]** NF- $\kappa$ B ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer 50 kD Untereinheit (p50) und einer 65 kD Untereinheit (p65). Die cDNAs für p50 und p65 sind kloniert worden und als über eine Region von 300 Aminosäuren homolog gezeigt worden.

**[0011]** Vor kurzem ist ein weiteres Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie, Rel B, als ein Immediate Early Response-Gen aus Serum-stimulierten Fibroblasten kloniert worden.

**[0012]** Sowohl p50 als auch p65 sind zur Bildung von Homodimeren fähig, wenn auch mit unterschiedlichen Eigenschaften: während p50-Homodimere eine starke DNA-Bindungsaffinität aufweisen, die Transkription jedoch nicht transaktivieren können, können p65-Homodimere lediglich schwach an DNA binden, sind aber zur Transaktivierung fähig. P50 wird als der Amino-terminale Teil des 110 kD Vorläufers (p110) synthetisiert, welches keine DNA-Bindungs- und Dimerisationsaktivität aufweist. Der Carboxyl-terminale Teil enthält acht Ankyrin-Wiederholungen, ein Motiv, das in mehreren Proteinen gefunden wird, die an der Zellzyklus-Kontrolle und -Differenzierung beteiligt sind.

**[0013]** Fünf I $\kappa$ B-Familienmitglieder sind identifiziert worden: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , p105/I $\kappa$ B $\gamma$ , p110/I $\kappa$ B $\Delta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  (Baeuerle und Baltimore, Cell 1996, Bd. 87, S. 13–20). Alle I $\kappa$ B-artigen Familienmitglieder enthalten vielfache Ankyrin-Wiederholungen, die für die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung essentiell sind.

**[0014]** Die Erfinder haben festgestellt, dass viele der Schlüsselmerkmale der entzündlichen Reaktion in humanen Makrophagen und in dem rheumatoiden Synovium von dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B abhängig waren. Die Erfinder haben den Proteosomin-

hibitorischen Wirkstoff PSI untersucht, der ursprünglich als ein Inhibitor der Chymotrypsin-artigen Aktivität des Proteosoms beschrieben wurde. Es wurde festgestellt, dass die Produktion vieler proentzündlicher Mediatoren, wie etwa TNF $\alpha$ , IL-6, IL-2, von NF- $\kappa$ B abhängig waren (hemmbar durch AdV I $\kappa$ B $\alpha$ , wie beschrieben in PCT/GB98/02753), wohingegen die anti-inflammatorischen Zytokine und Mediatoren, namentlich IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist, IL-11, nicht beeinflusst wurden. Dies legte uns nahe, dass NF- $\kappa$ B akkurat zwischen diesen beiden Klassen der Mediatoren trennte, wodurch sich die Frage erhob im Hinblick auf die enge Verwandtschaft des inflammatorischen Systems und des Immunsystems, welche Rolle NF- $\kappa$ B in der Induktion der Immunität innehaben könnte.

**[0015]** Die Erfinder untersuchten zunächst die Wirkung des Proteosom-inhibitorischen Wirkstoffs PSI, welcher keine Anwendung der Gentherapie erforderlich macht. Dieser ist für die Hemmung des I $\kappa$ B-Abbaus und folglich die NF- $\kappa$ B-Aktivierung der immunstimulatorischen Funktion der dendritischen Zellen bekannt, was das frühe Schlüsselereignis in der Generierung einer primären Immunantwort darstellt.

**[0016]** Sie berichten, dass die PSI-Behandlung reifer, von Monozyten abgeleiteter DCs ihre Fähigkeit hemmte, eine T-Zellproliferation in der gemischten Lymphozytenreaktion zu induzieren. Um den Mechanismus dieser Wirkung zu beleuchten, wurde eine Zelloberflächenanalyse, Zytokin-Assays und Cokulturen vorgenommen, welche nahe legten, dass eine Blockierung von NF- $\kappa$ B es den immunsuppressiven Mechanismen erlaubt, in der Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen operativ zu werden.

**[0017]** Außerdem haben die Erfinder gezeigt, dass die Veränderungen zu einer anergen Reaktion führen. Das heißt, sie führen zu der Unfähigkeit, eine Immunantwort, selbst nach der Entfernung der ursprünglich hemmenden Verbindung, zu produzieren.

**[0018]** Die Erfinder haben außerdem erkannt, dass NF- $\kappa$ B auch als ein Ziel zur Induzierung oder Modellierung einer Immunantwort verwendet werden kann. Dies ist unerwartet, da durch Feuillard et al. (1996) Eui. J Immunol 26, 2547–2551; Granelli Piperno et al. (1995) Proc Natl. Acad. Sci. USA 92, 10948 gezeigt worden ist, dass NF- $\kappa$ B in DCs bereits aktiviert ist, und folglich wäre eine weitere Aktivierung nicht als nützlich erwartet worden.

**[0019]** Ein erster Aspekt der Erfindung stellt die Verwendung (a) eines NF- $\kappa$ B-Induktors oder eines Vektors bereit, umfassend Nukleinsäure, die für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, der operativ geknüpft ist an regulatorische Elemente, die für die Expression der Nukleinsäure erforderlich sind, und (b) eines antige-

nen Moleküls oder Polynukleotids, das für ein antigenes Molekül kodiert, für die Herstellung von Medikament(en) zur Stimulierung der Antigenpräsentation oder Stimulierung einer Immunantwort.

**[0020]** Eine pharmazeutisch wirksame Dosis meint eine Menge, die ausreicht, um die gewünschte Reaktion in einem Säuger zu induzieren. Diese Menge kann durch routinemäßige klinische und experimentelle Versuche bestimmt werden, wie sie im Fachgebiet bekannt sind.

**[0021]** Mit Säuger meinen wir irgendeinen Säuger, doch insbesondere einen Menschen.

**[0022]** Wie aus den Beispielen der hierin angegebenen NF- $\kappa$ B-Aktivatoren klar ist, ist es bevorzugt, dass der Aktivator in die Zelle eindringt und innerhalb der Zelle agiert, d. h. als ein intrazellulärer NF- $\kappa$ B-Aktivator agiert, zum Beispiel ein intrazellulärer Modulator der intrazellulären Signalereignisse, die zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen.

**[0023]** "Operativ geknüpft" bezieht sich auf eine Juxtaposition in einer Weise, dass die normale Funktion der Komponenten erfüllt werden kann. Somit bezieht sich eine Kodierungssequenz, die an regulatorische Elemente "operativ geknüpft" ist, auf eine Konfiguration, bei der die Nukleinsäuresequenz, die für den Induktor von NF- $\kappa$ B kodiert, unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen exprimiert werden kann.

**[0024]** "Regulatorische Sequenzen" bezieht sich auf Nukleinsäuresequenzen, die für die Expression einer operativ verknüpften Kodierungssequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Zum Beispiel sind die regulatorischen Sequenzen, die für eukaryotische Zellen geeignet sind, Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer.

**[0025]** "Vektoren" meint ein DNA-Molekül, umfassend eine einzelsträngige, doppelsträngige, zirkuläre oder extrem spiralisierte (supercoiled) DNA. Zu geeigneten Vektoren zählen Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Pockenviren und bakterielle Plasmide. Retrovirale Vektoren sind Retroviren, die replizieren, indem sie ihr Genom in das des Wirts willkürlich integrieren. Geeignete retrovirale Vektoren sind beschrieben in WO 92/07573.

**[0026]** Ein Adenovirus ist ein lineares doppelsträngiges DNA-Virus. Geeignete adenovirale Vektoren sind beschrieben bei Rosenfeld et al., Science, 1991, Bd. 252, S. 432.

**[0027]** Adeno-assoziierte Viren (AAV) zählen zu der Parvovirus-Familie und bestehen aus einer einzelsträngigen DNA von etwa 4–6 Kb.

**[0028]** Pockenvirus-Vektoren sind große Viren und weisen mehrere Stellen auf, in die Gene inseriert werden können. Sie sind wärmostabil und können bei Raumtemperatur gelagert werden. Sicherheitsstudien zeigen, dass Pockenvirus-Vektoren replikationsdefekt sind und nicht von Wirt zu Wirt oder in die Umgebung übertragen werden können.

**[0029]** Vektoren, die Nukleinsäure umfassen, die für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, können in einen Säuger in der Form von Liposomen in einer im Fachgebiet bekannten Weise eingeführt werden. Alternativ können Liposome in der Form von Aerosolen verwendet werden, um in den Körper auf dem Wege der Schleimhautmembran oder Lunge zu gelangen. Solche Techniken sind im Fachgebiet bekannt.

**[0030]** Immunoliposome (Antikörper-gesteuerte Liposome) sind besonders nützlich im Anzielen von Zelltypen, die ein Zelloberflächenprotein überexprimieren, für das Antikörper verfügbar sind, wie mit dendritischen Zellen oder Vorläufern möglich, zum Beispiel unter Verwendung von Antikörpern zu CD1, CD14 oder CD83 (oder ein anderes dendritisches Zell- oder Vorläuferzell-Oberflächenmolekül, wie oben angegeben). Für die Herstellung von Immunoliposomen wird MPB-PE (N-[4-(p-Maleimidophenyl)-butyryl]-phosphatidylethanolamin) gemäß der Methode von Martin & Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286–288 synthetisiert. MPB-PE wird in die liposomalen Doppelschichten eingebaut, um eine kovalente Kopplung des Antikörpers, oder Fragments davon, an die liposomale Oberfläche zu ermöglichen. Das Liposom wird in bequemer Weise mit der DNA oder einem anderen genetischen Konstrukt der Erfindung für die Übertragung an die Zielzellen beladen, zum Beispiel durch Bilden der Liposomen in einer Lösung der DNA oder anderen genetischen Konstrukts, gefolgt von der sequenziellen Extrusion durch Polycarbonat-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,6  $\mu$ m und 0,2  $\mu$ m unter Stickstoffdrücken von bis zu 0,8 MPa. Nach der Extrusion wird das umfangene DNA-Konstrukt von dem freien DNA-Konstrukt durch Ultrazentrifugation bei 80.000  $\times$  g für 45 min getrennt. Frisch hergestellte MPB-PE-Liposome in desoxygeniertem Puffer werden mit frisch präpariertem Antikörper (oder dem Fragment davon) gemischt, und die Kopplungsreaktionen werden in einer Stickstoffatmosphäre bei 4°C unter konstanter Ende über Ende-Rotation über Nacht vorgenommen. Die Immunliposome werden von unkonjugierten Antikörpern durch Ultrazentrifugation bei 80.000  $\times$  g für 45 min getrennt. Die Immunliposomen können injiziert werden, zum Beispiel intraperitoneal oder direkt in eine Stelle, an der die Zielzellen vorhanden sind, zum Beispiel subkutan.

**[0031]** Die Erfindung stellt die Stimulierung der Antigenpräsentation oder die Stimulierung einer Immunantwort in einem Säuger, zum Beispiel einem Men-

schen, durch Verabreichen einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines NF- $\kappa$ B-Induktors (welcher ein intrazellulärer Induktor der APC-, z. B. der DC-Funktion, ist) bereit.

**[0032]** Ein "intrazellulärer Enhancer der APC-Funktion" ist ein Enhancer der Antigenpräsentierenden Zellfunktion, wie etwa ein Enhancer der DC-Funktion, und kann ein Enhancer der intrazellulären Signalgebung innerhalb der APC sein.

**[0033]** Der Begriff "APC-Funktion" beinhaltet die Fähigkeit, Antigen zu präsentieren, die Fähigkeit, MHC Klasse II zu exprimieren, die Fähigkeit, Zelloberflächenmoleküle, wie etwa kostimulatorische Moleküle einschließlich CD80 und DC86, zu exprimieren, die Fähigkeit, Zytokine zu produzieren, und die Fähigkeit, Anergie anstelle einer Aktivierung zu induzieren. Mit "intrazellulärer Signalgebung innerhalb der APC" beziehen wir die Kommunikation zwischen der Membran und dem Nukleus, die Signalgebung, die die Genexpression kontrolliert (einschließlich der Expression von CD80 und CD86) und die Kontrolle der zytoskeletalen Organisation mit ein.

**[0034]** Um Zweifel auszuschließen, Zytokine und Moleküle, die ein CPG-Motiv enthalten, sind keine intrazellulären Induktoren oder Enhancer der APC-Funktion, da sie extrazellulär agieren.

**[0035]** Vorzugsweise werden die Medikamente der Erfindung zur Behandlung (einschließlich prophylaktisch) von Infektionskrankheiten oder Krebsarten durch Stimulieren des Immunsystems des Säugers verwendet. Zu Infektionskrankheiten zählen auf Prionen bezogene Erkrankungen, einschließlich spongiformer Enzephalopathien. Die Medikamente können zu Behandlung (einschließlich prophylaktisch) von Erkrankungen oder Zuständen verwendet werden, die durch abweichende Typen und/oder abweichend hohe Mengen an (schädlichen) Molekülen, zum Beispiel Polypeptiden, im Körper gekennzeichnet sind, zum Beispiel Mengen an Entzündungsvermittlern (zum Beispiel Zytokin), die mit einer chronischen Entzündung assoziiert sind; Abbauprodukten oder Zellen oder Bindegewebsmatrix, zum Beispiel Fibronectin-Fragmenten; Beta-Amyloid-Polypeptid (assoziiert mit der Alzheimer-Krankheit). Die Stimulierung einer Reaktion des Immunsystems auf solche Moleküle kann die Beseitigung der Moleküle aus dem Körper unterstützen und dadurch in der Aufhebung oder Verhütung des Zustands hilfreich sein.

**[0036]** Es ist bevorzugt, wenn das Krebsantigen eines der folgenden ist oder zumindest ein Epitop davon darin vorhanden ist:

i) Normale zelluläre Proteine, die in abnormal hohen Mengen in Tumoren exprimiert werden; z. B. Cyclin D1 in einer Vielfalt von Tumoren; Cyclin E in Brustkrebs; mdm 2 in einer Vielfalt von Tumo-

ren; EGF-R, erb-B2, erb-B3, FGF-R, Insulin-artiger Wachstumsfaktor-Rezeptor, Met, myc, p53 und BCL-2 werden alle in verschiedenen Tumoren exprimiert.

ii) Normale zelluläre Proteine, die in Tumoren mutiert sind; z. B. Ras-Mutationen in einer Vielfalt von Tumoren; p53-Mutationen in einer Vielfalt von Tumoren; BCR/ABL-Translokation in CML und ALL; CSF-1-Rezeptormutationen in AML und MDS; APC-Mutationen in Dickdarmkrebs; RET-Mutationen in MEN2A, 2B und FMTC; EGFR-Mutationen in Gliomen; PML/RARA-Translokation in PML; E2A-PBX1-Translokation in prä-B-Leukämien und in akuten Kinderleukämien.

iii) Viral kodierte Proteine in Tumoren, die mit einer viralen Infektion assoziiert sind; z. B. humane Papillomavirus-Proteine in Gebärmutterhalskrebs; Epstein-Barr-Virusproteine in B-Zell-Lymphomen und Hodgkin-Lymphom; HTLV-1-Proteine in adulter T-Zell-Leukämie; Hepatitis B- und C-Virusproteine in hepatozellulärem Karzinom; Herpes-artige Virusproteine in Kaposi-Sarkom.

iv) HIV-kodierte Proteine bei HIV-infizierten Patienten.

**[0037]** Folglich lassen sich die obigen Krebs-assoziierten Antigene in drei Hauptkategorien unterteilen: (i) normale Selbstantigene, die in hohen Mengen in Tumorzellen exprimiert werden; (ii) mutierte Selbstantigene, die in Tumorzellen exprimiert werden; (iii) virale Antigene, die in mit einer Virusinfektion assoziierten Tumoren exprimiert werden. Kategorie (i) ist bevorzugt.

**[0038]** Drei Subtypen sind in Kategorie (i) enthalten:

- a) normale zelluläre Proteine, die überexprimiert werden;
- b) Proteine, die in einer Gewebe-spezifischen Weise in normalen Zellen, aber auch in Tumoren, exprimiert werden; und
- c) Proteine, die embryonale Antigene sind, die in den meisten adulten Geweben stumm sind, doch in Tumoren abweichend exprimiert werden.

**[0039]** Beispiele von b) und c) sind:

- b) Gewebe-spezifische Differenzierungsantigene als Ziele für Tumor-reaktive CTL, wie etwa GATA-1, IKAROS, SCL (exprimiert in der hämatopoetischen Zelllinie und bei Leukämien); und Immunoglobulin-konstante Regionen (für die Behandlung von multiplem Myelom); und
- c) Wilms-Tumor-Antigen 1 (WT1) für die Behandlung von Leukämien und Wilms-Tumor und karzi-noembryonale Antigene (CEA, ein fötales Protein) für Leber- und Dünndarmtumoren.

**[0040]** Bei einer Ausführungsform kann das Krebs-assoziierte Antigen durch ein Rohextrakt einer Tumorprobe bereitgestellt werden.

**[0041]** Die Überexpression von Onkogen-kodierten Proteinen in Humantumoren und mutierten Onkogenen, die in Humantumoren exprimiert werden, ist beschrieben bei Stauss & Dahl (1995) Tumour Immunology, Dalgleish/Browning, Kapitel 7, wie hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen.

**[0042]** Demnach ist es bevorzugt, wenn die zu behandelnde Erkrankung des Patienten Krebs ist, noch bevorzugter irgendeines von Brustkrebs; Blasenkrebs; Lungenkrebs; Prostatakrebs; Schilddrüsenkrebs; Leukämien und Lymphomen, wie CML, ALL, AML, PML; Dickdarmkrebs; Gliom, Seminom; Leberkrebs; Bauchspeicheldrüsenkrebs; Blasenkrebs; Nierenkrebs; Gebärmutterhalskrebs; Hodenkrebs; Kopf- und Nackenkrebs; Eierstockkrebs; Neuroblastom und Melanom.

**[0043]** CML ist eine chronische myelozytische Leukämie; ALL ist eine akute lymphoblastische Leukämie; AML ist eine akute myelozytische Leukämie; und PML ist eine promyelozytische Leukämie.

**[0044]** Alternativ kann der Patient irgendeine Erkrankung oder das Risiko dafür aufweisen, die durch ein Pathogen verursacht ist, insbesondere ein Bakterium, Hefe, Virus, Trypanosom und ähnliches. Es ist bevorzugt, wenn die Erkrankung durch eine chronische Infektion mit einem Pathogen verursacht ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, wenn das Pathogen ein solches ist, das durch das Immunsystem des Wirts nicht ohne weiteres beseitigt wird.

**[0045]** Es ist bevorzugt, wenn die Erkrankung eine virale Infektion ist; noch bevorzugter eine Erkrankung, die durch irgendeines von HIV, Papillomavirus, Epstein-Barr-Virus, HTLV-1, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Herpesvirus oder irgendein Virus, das eine chronische Infektion bewirkt, verursacht ist. Es ist besonders bevorzugt, wenn das Virus HIV ist.

**[0046]** Abnormal erhöhte Mengen eines durch Zellen produzierten Hormons kommen bei einigen Erkrankungen vor, wie etwa bestimmten Arten der Schilddrüsenerkrankung. Somit kann die Methode der Erfindung angewendet werden, um die Ablation von Zellen zu fördern, die erhöhte Mengen des Hormons produzieren. Das Antigen kann das Hormon oder die biosynthetischen Enzyme sein, die an der Synthese des Hormons beteiligt sind, welches durch die Zelle überproduziert wird.

**[0047]** Patienten mit einer bakteriellen Infektion, insbesondere einer Infektion, die eine chronische Infektion bewirkt, können in nützlicher Weise behandelt werden. Die bakterielle Infektion kann eine intrazelluläre Infektion sein. Somit kann die Methode in der Behandlung von Tuberkulose nützlich sein.

**[0048]** Die Erfinder haben erkannt, dass die Schlüs-

selrolle von NF- $\kappa$ B es ihm gestattet, zur Produktion eines Anstiegs der Immunreaktion innerhalb des Säugers, zum Beispiel des Menschen, stimuliert zu werden.

**[0049]** Eine Verstärkung der Immunantwort bei Patienten mit einer Infektionskrankheit oder Krebs oder einem Zustand, der durch abweichende Typen und/oder abweichend hohe Mengen an Molekülen in dem Körper gekennzeichnet ist, wird in der Behandlung des Patienten durch Verstärken der körpereigenen Immunantwort auf die Infektionskrankheit oder den Krebs oder den Zustand hilfreich sein.

**[0050]** Zu bevorzugten NF- $\kappa$ B-Induktoren zählen MEKK1, NIK, IKK1, IKK2, TRAF2, TRAF5, TRAF6, TAK, TPL-2 oder Rel B oder andere NF- $\kappa$ B-Untereinheiten, z. B. p65 oder cRel. Fragmente und Muteine solcher Induktoren, die zum Induzieren eines NF- $\kappa$ B fähig sind, können ebenfalls verwendet werden. Die Induktoren können durch geeignete Vektoren kodiert und in die Zellen eines zu behandelnden Patienten eingeführt werden.

**[0051]** Ein bevorzugter NF- $\kappa$ B-Induktor kann eine dominant-negative Mutante von MyD88 sein (d. h. zur Hemmung der Signalgebung durch Wildtyp-MyD88-Moleküle fähig sein, zum Beispiel in einer Zelle, in der Wildtyp- und inhibitorische MyD88-Moleküle vorhanden sind). Die Inhibition kann aus der Blockierung der Interaktion von endogenem Wildtyp-MyD88 mit einem Bindungspartner des endogenen MyD88, zum Beispiel einem Toll-Like Rezeptor (TLR), entstehen. Die dominant-negative Mutante kann MyD88<sup>lpr</sup> sein (Burns et al. (1998) J. Biol. Chem. 273 (20), 12203–12209) oder ein Fragment von MyD88, dem eine Todesdomäne fehlt (siehe Burns et al. (1998) und die darin im Überblick angegebenen Referenzen). Das MyD88 (myeloide Differenzierungsprotein) wird als eine modulare Organisation aufweisend betrachtet, bestehend aus einer N-terminalen Todesdomäne (DD), getrennt durch einen kurzen Linker von einer C-terminalen Toll-Domäne (im Überblick wiedergegeben bei Burns et al. (1998)). Die N-terminale DD steht in Bezug zu einem Motiv von etwa 90 Aminosäuren, die als Protein-Protein-Interaktionen mit anderen DD-Sequenzen vermittelnd erachtet wird, die entweder Homo- oder Heterodimere bilden (Boldin et al (1995) J. Biol. Chem. 270, 387–391).

**[0052]** Das inhibitorische MyD88-Molekül kann ein MyD88-Molekül sein, das weniger fähig als MyD88, vorzugsweise im Wesentlichen unfähig ist, an eine DD zu binden, zum Beispiel die DD von MyD88 oder von IRAK. Zum Beispiel kann das inhibitorische MyD88 weniger fähig als MyD88, vorzugsweise im Wesentlichen unfähig dazu sein, via die DD zu dimerisieren. Das inhibitorische MyD88-Molekül kann eine verkürzte Version von MyD88 sein, zum Beispiel ein

MyD88-Molekül, in welchem die gesamte oder ein Teil der Domäne, bezeichnet als Todesdomäne, deletiert ist. Es kann ein mutiertes MyD88-Molekül sein, zum Beispiel ein MyD88-Molekül, das in der DD mutiert ist, zum Beispiel mit einer nicht-konservativen Mutation. Zum Beispiel kann es an der Position äquivalent zu Phe56 des Vollängen-Maus-MyD88 mutiert sein, zum Beispiel zu Asn. Es kann das mutierte MyD88-Molekül sein, bezeichnet als MyD88lpr, wie oben angemerkt, in welchem die N-terminalen 53 Aminosäuren von MyD88 ebenfalls abwesend sind. Burns et al (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12203–12209. MyD88lpr weist eine Punktmutation auf (F56N; Mausequenz-Nummerierung), wenn zu Wildtyp-MyD88 verglichen, zum Beispiel Maus-Wildtyp-MyD88. Diese Punktmutation befindet sich in der DD und verhindert die Dimerisation der DD (Burns et al. (1998)). Die Mutation entspricht der Ipr<sup>cp</sup>-Mutation, die bekannter Maßen die zytotoxische Signalgebung von Fas beseitigt, vermutlich durch Zerstörung der Konformation der DD-Domäne (Nagata (1994) *Semin Immunol* 6, 3–8; Huang et al. (1996) *Nature* 384, 638–641).

**[0053]** Die Konstrukte für das Wildtyp-MyD88 und das dominant-negative MyD88 (MyD88-lpr) sind veröffentlicht worden (Burns K. et al. *J. Biol. Chem.* 1998), doch wird MyD88-lpr fälschlicherweise als eine einzelne Aminosäure-Mutation in seiner Todesdomäne beschrieben, wo Phe<sup>56</sup> zu Asn mutiert ist. Diese Mutation entspricht der Ipr<sup>cp</sup>-Mutation, die in der Todesdomäne des Fas-Liganden vorhanden ist, welche seine Stromabwärts-Signalgebung durch Zerstören der Konformation der Todesdomäne beseitigt. Tatsächlich ist, zusätzlich zu der Punktmutation, eine Deletion in seiner N-terminalen Domäne von 53 Aminosäuren vorhanden (1–159 Basenpaare der Genbank-Sequenz fehlen). Diese Deletion resultiert zum Teil aus der fehlenden Todesdomäne.

**[0054]** Es ist bevorzugt, dass das inhibitorische MyD88 eine funktionale Toll-Domäne umfasst, d. h. eine Toll-Domäne, die zum interagieren mit einer Toll-Domäne fähig ist, zum Beispiel der Toll-Domäne eines Wildtyp-MyD88, zum Beispiel eines Mensch- oder Maus-Wildtyp-MyD88 oder eines TLR. Es ist bevorzugt, dass das inhibitorische MyD88 die Vollängen-MyD88-Toll-Domäne umfasst. Eine Vollängen-Toll-Domäne kann für die Interaktion der Toll-Toll-Domänen erforderlich sein.

**[0055]** Methoden zum Messen der Protein-Protein-Interaktionen (und deren Verstärkung oder Zerstörung) werden den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt sein. Geeignete Methoden zur Messung der DD- und Toll-Toll-Interaktionen sind ebenfalls beschrieben bei Burns et al (1998). Geeignete Methoden können zum Beispiel Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionen, Ko-Reinigung, ELISA, Ko-Immunitätspräzipitation, Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-Tech-

niken und Oberflächenplasmon-Resonanzmethoden umfassend. Somit kann ein MyD88-Molekül als zur Bindung an oder Interaktion mit einer DD oder Toll-Domäne fähig erachtet werden, wenn eine Interaktion zwischen dem MyD88-Polypeptid und einem Polypeptid, umfassend eine DD- oder Toll-Domäne, mittels ELISA, Ko-Immunitätspräzipitation oder Oberflächenplasmon-Resonanzmethoden oder mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktion oder Ko-Reinigungsmethode nachgewiesen werden kann. Die bevorzugte Methode ist die Oberflächenplasmonresonanz.

**[0056]** Die vorbereitende Arbeit weist darauf hin, dass MEKK1 NF- $\kappa$ B induzieren und APC verstärken kann, wie etwa die DC-Funktion. Es ist bevorzugt, dass der Induktor zum Induzieren von NF- $\kappa$ B in DCs oder Vorläufern davon fähig ist.

**[0057]** Somit stellt die Erfindung ein Molekül bereit, umfassend (1) einen Abschnitt (modulierenden Abschnitt), umfassend oder kodierend einen Induktor von NF- $\kappa$ B, und (2) einen Abschnitt, umfassend oder kodierend ein antigenes Molekül (antigener Abschnitt). Insbesondere stellt die Erfindung ein Polynukleotid bereit, das für ein Antigen und einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert. Vorzugsweise ist oder umfasst das Molekül eine DNA-Vakzine, die für ein Antigen und einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert. Die DNA-Vakzine kann ein rekombinantes Polynukleotid umfassen, das einen Abschnitt umfasst, der für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, und einen Abschnitt, der für ein antigenes Molekül kodiert. Alternativ kann das antigenes Molekül auf einem separaten Polynukleotid-Molekül kodiert sein; dies ist weniger bevorzugt.

**[0058]** Bevorzugte Enhancer sind MEKK und eine dominant-negative Mutante von MyD88, zum Beispiel MyD88lpr.

**[0059]** Es wird anerkannt werden, dass die bevorzugten Enhancer/Induktoren, wie oben beschrieben, in den Vakzinen der Erfindung verwendet werden können.

**[0060]** Das antigenes Molekül kann mehr als eine Kopie von ein oder mehreren Epitopen umfassen. Zum Beispiel kann es eine einzelne Kopie einer einzelnen Epitop-bildenden Aminosäuresequenz umfassen, zum Beispiel eine Sequenz von zwischen etwa 8 und 30 Aminosäuren, vorzugsweise etwa 10 bis 18 Aminosäuren, noch bevorzugter etwa 15 Aminosäuren in der Länge. Es kann vielfache Kopien solcher Epitop-bildenden Sequenz, oder einzelne oder vielfache Kopien mindestens zweier verschiedener Epitop-bildender Sequenzen umfassen. Die antigenen Sequenzen können zur Bildung einer Domäne-artigen Struktur verkettet werden, oder können an unterschiedlichen Punkten in ein Träger-Polypeptid eingebracht werden. Das Polynukleotid kann ein oder mehrere unterschiedliche antigenes Moleküle ko-

dieren, von denen jedes ein oder mehrere antigene Abschnitte oder Epitope aufweisen kann.

**[0061]** DNA-Vakzinen, die einen Induktor von NF- $\kappa$ B zur Verwendung in der Erfindung kodieren, umfassen DNA-Sequenzen, in die ein Antigen von Interesse inkorporiert ist, das von einem Pathogen, z. B. Hepatitis A, B, C etc., HIV, HTLV, Influenza, Tuberkulose, Malaria abgeleitet ist oder alternativ ein Krebs-spezifisches Antigen oder abweichende Moleküle wie Beta-Amyloid, wie oben erörtert, oder ein Prion ist. Außerdem umfassen solche Vakzinen auch einen Induktor von NF $\kappa$ B, möglicherweise zwei oder mehrere Induktoren von NF $\kappa$ B für die maximale Wirkung. Sowohl Antigen als auch Aktivator wären unter der Kontrolle geeigneter Promotorsequenzen zur Regulierung der Expression von Antigen und Aktivatoren. Der Vektor zur Verwendung in der Stimulierung einer Immunreaktion umfasst eine Nukleinsäuresequenz, die für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, operativ geknüpft an regulatorische Elemente, die für die Expression dieser Sequenz erforderlich sind. Der Vektor kann einen induzierbaren Promotor umfassen, um die Generierung einer verstärkten Immunreaktion durch die erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu ermöglichen.

**[0062]** Die Verwendung rekombinanter Polyepitop-Vakzinen für den Transfer multipler CD8 CTL-Epitope ist beschrieben bei Thomson et al. (1996) J. Immunol. 157, 822–826 und WO 96/03144. Bezüglich der vorliegenden Erfindung mag es erwünscht sein, in eine einzelne Vakzine ein Peptid (oder eine Nukleinsäure, die für ein Peptid kodiert) aufzunehmen, wobei das Peptid in beliebiger Reihenfolge ein oder mehrere antigene Aminosäuresequenzen (zum Beispiel jeweils von zwischen etwa 8 und 18 Aminosäuren in der Länge) umfasst, die zum Beispiel von einem Tumor-assoziierten Antigen abgeleitet sind, und ein CD4 T-Zell-stimulierendes Epitop (wie etwa von Tetanus-Toxoid). Solche "Perlenketten"-Vakzinen sind typischerweise DNA-Vakzinen.

**[0063]** Das antigene Molekül kann ein Epitop umfassen, das auf transformierten oder kanzerösen Zellen vorhanden ist (d. h. ein Tumor-assoziiertes Antigen oder Epitop, zum Beispiel das MAGE-1-Antigen, das von einem hohen Anteil der humanen Melanomentumoren produziert wird (van der Bruggen et al. (1991) Science 254, 1643)). Alternativ kann es ein Epitop umfassen, das auf einem pathogenen Organismus vorhanden ist, zum Beispiel einem Virus, oder auf einer Zelle (vorzugsweise einer menschlichen Zelle), die durch einen pathogenen Organismus infiziert ist, zum Beispiel eine viral infizierte Zelle, wie oben angemerkt.

**[0064]** Das Epitop kann ein T-Zell-Epitop sein, d. h. ein Epitop, das zum Induzieren einer T-Zell-Reaktion (TH-1-Reaktion), vorzugsweise einer zytotoxischen

CD8+ T-Zell-Reaktion, doch alternativ einer CD4+ Helfer-T-Zell-Reaktion (TH-2-Reaktion), fähig ist, wie den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt ist. Eine zytotoxische T-Zell-Reaktion kann in bestimmten Fällen unerwünscht sein, zum Beispiel dann, wenn das Antigen ein mykobakterielles Antigen ist (zum Beispiel ein Mycobacterium tuberculosis- oder M. leprae-Antigen).

**[0065]** Der Induktor oder Antigen kann eine peptidomimetische Verbindung sein, zum Beispiel eine peptidomimetische Verbindung entsprechend einem Polypeptid-Induktor, wie oben erörtert.

**[0066]** Der Begriff "Peptidomimetikum" bezieht sich auf eine Verbindung, die die Konformation und erwünschten Merkmale eines bestimmten Peptids als einem therapeutischen Agens nachahmt, aber das potenziell unerwünschte Merkmale vermeidet. Zum Beispiel ist Morphin eine Verbindung, die oral verabreicht werden kann und die ein Peptidomimetikum des Peptids Endorphin ist.

**[0067]** Die therapeutischen Anwendungen unter Beteiligung von Peptiden können aufgrund des Fehlens der oralen Bioverfügbarkeit und des proteolytischen Abbaus begrenzt sein. Typischerweise werden Peptide beispielsweise in vivo durch Exo- und Endopeptidasen schnell abgebaut, was im Allgemeinen sehr kurze biologische Halbwertszeiten ergibt. Ein anderer Mangel der Peptide als potenziellen therapeutischen Agenzien ist das Fehlen der Bioverfügbarkeit über die orale Verabreichung. Der Abbau der Peptide durch proteolytische Enzyme im Magen-Darm-Trakt stellt mit einiger Wahrscheinlichkeit einen wichtigen beitragenden Faktor dar. Das Problem ist jedoch komplizierter, da erkannt worden ist, dass selbst kleine, zyklische Peptide, die nicht einer schnellen Inaktivierung der Metaboliten unterliegen, nichts desto trotz eine schlechte orale Bioverfügbarkeit zeigen. Dies ist wahrscheinlich auf den schlechten Transport quer durch die Darmmembran und die schnelle Clearance aus dem Blut durch hepatische Extraktion und anschließende Exkretion in den Darm zurückzuführen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass vielfache Amidbindungen die orale Bioverfügbarkeit beeinflussen können. Es wird vermutet, dass die Peptidbindungen, die die Aminosäure-Reste in der Peptidkette verknüpfen, auseinander brechen können, wenn der Peptidwirkstoff oral verabreicht wird.

**[0068]** Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Ansätze für das Design und die Synthese von Peptidomimetika. Bei einem Ansatz, wie etwa beschrieben von Sherman und Spatola, J. Am. Chem. Soc., 112: 433 (1990), sind ein oder mehrere Amidbindungen in einer im Wesentlichen isoterischen Weise durch eine Vielfalt chemisch funktioneller Gruppen ersetzt worden. Dieser schrittweise Ansatz hat einige Erfolge da-

rin erzielt, dass aktive Analoga erhalten worden sind. In einigen Fällen haben sich diese Analoga als längere biologische Halbwertszeiten aufweisend erwiesen als ihre natürlich vorkommenden Gegenstücke. Nichts desto trotz weist dieser Ansatz Einschränkungen auf. Die erfolgreiche Ersetzung mehr als einer Amidbindung ist selten gewesen. Folglich sind die resultierenden Analoga anfällig für eine enzymatische Inaktivierung an anderer Stelle im Molekül geblieben. Bei Ersetzung der Peptidbindung ist es bevorzugt, dass die neue Linkerkomponente im Wesentlichen dieselbe Ladungsverteilung und im Wesentlichen dieselbe Planarität wie eine Peptidbindung aufweist.

**[0069]** Retro-inverso-Peptidomimetika, in denen die Peptidbindungen umgekehrt sind, können mittels im Fachgebiet bekannter Methoden synthetisiert werden, wie etwa jenen, die beschrieben sind bei Mézière et al. (1997) *J. Immunol.* 159 3230–3237. Dieser Ansatz bezieht die Herstellung von Pseudopeptiden ein, die Veränderungen unter Einbeziehung des Rückgrats, und nicht der Orientierung der Seitenketten, enthalten. Retro-inverso-Peptide, die NH-CO-Bindungen anstelle von CO-NH-Peptidbindungen enthalten, sind viel resistenter gegenüber einer Proteolyse.

**[0070]** Bei einem anderen Ansatz ist eine Vielfalt unkodierter oder modifizierter Aminosäuren, wie etwa D-Aminosäuren und N-Methyl-Aminosäuren, zur Modifizierung der Säuger-Peptide verwendet worden. Alternativ ist eine angenommene bioaktive Konformation durch eine kovalente Modifikation, wie etwa eine Zyklisierung, oder durch Einbau von  $\gamma$ -Lactam oder andere Arten von Brücken, stabilisiert worden. Siehe z. B. Veber et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2636 (1978) und Thursell et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 111: 166 (1983).

**[0071]** Ein häufiges Thema bei vielen der Synthesestrategien ist die Einführung irgendeiner zyklischen Komponente in ein Peptid-basiertes Gerüst gewesen. Die zyklische Komponente schränkt den konformationellen Raum der Peptidstruktur ein, und dies führt häufig zu einer erhöhten Affinität des Peptids für einen bestimmten biologischen Rezeptor. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Strategie ist der, dass die Einführung einer zyklischen Komponente in ein Peptid auch dazu führen kann, dass das Peptid eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber zellulären Peptidasen erlangt.

**[0072]** Ein Ansatz für die Synthese von zyklischen stabilisierten Peptidomimetika ist die Ringschlussmetathese (RCM). Diese Methode bezieht die Schritte des Synthetisierens eines Peptid-Vorläufers und dessen Kontaktieren mit einem RCM-Katalysator ein, um ein konformationell restringiertes Peptid zu erhalten. Geeignete Peptid-Vorläufer können zwei oder mehr ungesättigte C-C-Bindungen enthalten. Die Methode

kann unter Anwendung von Festphasen-Peptidsynthese-Techniken durchgeführt werden. Bei dieser Ausführungsform wird der Vorläufer, der an einem festen Träger verankert ist, mit einem RCM-Katalysator kontaktiert und das Produkt dann von dem festen Träger abgespalten, um ein konformationell restringiertes Peptid zu erhalten.

**[0073]** Polypeptide, bei denen eines oder mehrere der Aminosäurereste chemisch modifiziert werden, bevor oder nach das Polypeptid synthetisiert wird, können als Antigen verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Funktion des Polypeptids, nämlich die Produktion einer spezifischen Immunantwort in vivo, im Wesentlichen unverändert bleibt. Zu solchen Modifikationen zählen die Bildung von Salzen mit Säuren oder Basen, insbesondere physiologisch akzeptablen organischen oder anorganischen Säuren und Basen, die einen Ester oder Amid einer endständigen Carboxylgruppe bilden, und die Anlagerung von Aminosäure-Schutzgruppen, wie etwa N-t-Butoxycarbonyl. Solche Modifikationen können das Polypeptid vor dem Stoffwechsel in vivo schützen.

**[0074]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül bereit, umfassend (1) einen modulierenden Abschnitt, der einen NF- $\kappa$ B-Induktor umfasst oder kodiert, und (2) einen antigenen Abschnitt, der ein antigenes Molekül umfasst oder kodiert.

**[0075]** Einer oder beide Abschnitte in diesen Aspekten der Erfindung kann außerdem einen translokalisierenden Abschnitt und/oder einen Zell-bindenden Abschnitt umfassen.

**[0076]** Der Zell-bindende Abschnitt ist vorzugsweise zur Bindung an eine dendritische Zelle oder einen Vorläufer davon fähig. Der translokalisierende Abschnitt kann in der Internalisierung des Moleküls oder zumindest des antigenen Abschnitts davon und vorzugsweise des Signalgebungs-inhibierenden oder -verstärkenden Abschnitts hilfreich sein. Somit können exogen zugeführte Peptide an ein HIV-tat-Peptid geknüpft werden. Dies kann sie in den MHC Klasse I-Weg für die Präsentation durch CTL lenken (siehe zum Beispiel Kim et al. (1997) *J. Immunol.* 159, 1666–1668). Chimäre Moleküle, die entsprechend der vorliegenden Erfindung adaptiert werden können, sind beschrieben in WO 95/31483.

**[0077]** Dendritische Zellen können durch die Expression der CD80, CD86, CD40, CD1a, HLA-DR und/oder CD83-Zelloberflächenmoleküle charakterisiert werden. Unreife dendritische Zellen können CD34<sup>+</sup> oder CD14<sup>+</sup> sein. Somit kann der Zell-bindende Abschnitt zur Bindung von einem oder mehreren dieser Zelloberflächenmoleküle fähig sein (zum Beispiel ein Antikörper, der zur Bindung an solch ein Molekül fähig ist).

**[0078]** Unreife DCs zeigen einen erhöhten Antigen-eintrag und -prozessierung. Sie zeigen hohe intrazelluläre MHC Klasse I und II; eine erhöhte Endozytose und Phagozytose; hohe CCR1, CCR5 und CCR6; geringe CCR7; hohe CD68; geringe CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86; und keine DC-LAMP.

**[0079]** Reife DCs zeigen eine erhöhte Antigen-Prozessierung. Sie zeigen hohe Oberflächen-MHC Klasse I und II; eine geringe Endozytose und Phagozytose; geringe CCR1, CCR5 und CCR6; hohe CCR7; geringe CD68; hohe CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 und CD86; hohe DC-LAMP; und hohes p55-Fascin.

**[0080]** Solch ein Zell-bindender Abschnitt kann in der Steuerung jegliches NF- $\kappa$ B-Induktors, wie hierin beschrieben, wie zum Beispiel Nukleinsäure oder DNA-Vakzine, zu einer APC, wie etwa einer DC oder unreifen DC, nützlich sein.

**[0081]** Vorzugsweise ist das Polynukleotid oder die DNA-Vakzine zum Exprimieren des/der kodierten Polypeptids/e in dem Patienten fähig, noch bevorzugter in einer APC, wie etwa einer DC oder unreifen DC, des Patienten. Das/die Polypeptid(e), zum Beispiel der NF- $\kappa$ B-Induktor/Aktivator, oder Antigen, wie zutreffend, kann von irgendeinem geeigneten Polynukleotid (genetischen Konstrukt) exprimiert werden, wie hierin beschrieben, und an den Patienten verabreicht werden. Typischerweise umfasst das genetische Konstrukt, welches das Polypeptid exprimiert, die Polypeptid-kodierende Sequenz, die an einen Promotor operativ geknüpft ist, welcher das transkribierte Polynukleotid-(z. B. mRNA)-Molekül in einer Zelle des Patienten exprimieren kann, welches zum Synthetisieren des Polypeptids translatiert werden kann. Geeignete Promotoren werden den Fachleuten des Gebiets bekannt sein und können Promotoren für die ubiquitäre Expression umfassen, zum Beispiel für Housekeeping-Gene oder für Gewebe-spezifische Gene, was davon abhängt, wo die Exprimierung des Polypeptids gewünscht wird (zum Beispiel in dendritischen Zellen oder Vorläufern davon). Vorzugsweise wird ein dendritischer Zell- oder ein dendritischer Vorläuferzell-selektiver Promotor verwendet, doch ist dies nicht wesentlich, insbesondere dann nicht, wenn der Transfer oder die Aufnahme des Polynukleotids auf die ausgewählten Zellen, d. h. dendritische Zellen oder Vorläufer, zielgerichtet wird.

**[0082]** Promotoren, die für dendritische Zellen selektiv sein können, können Promotoren von den CD36- oder CD83-Genen sein.

**[0083]** Das Targeting der Vakzine zu spezifischen Zellpopulationen, zum Beispiel Antigenpräsentierenden Zellen, kann zum Beispiel entweder durch die Injektionsstelle, die Verwendung von Targeting-Vektoren und Transfersystemen oder die selektive Reini-

gung solch einer Zellpopulation von dem Patienten und die ex vivo-Verabreichung des Peptids oder der Nukleinsäure, erreicht werden (zum Beispiel können dendritische Zellen sortiert werden, wie beschrieben bei Zhou et al. (1995) *Blood* 86, 3295–3301; Roth et al. (1996) *Scand. J. Immunology* 43, 646–651). Außerdem können Targeting-Vektoren einen Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotor umfassen, der die Expression des Antigens an eine geeignete Stelle steuert.

**[0084]** Wie oben angemerkt, kann die Verwendung eines induzierbaren Promotors erwünscht sein. Es wird zuerkannt werden, dass die Möglichkeit erwünscht sein kann, die Expression des/der Polypeptids/e (zum Beispiel des NF- $\kappa$ B-Aktivators/Induktors) in der Zelle zeitweilig zu regulieren. Somit mag es erwünscht sein, dass die Expression des/der Polypeptids/e direkt oder indirekt (siehe unten) unter der Kontrolle eines Promotoren steht, der zum Beispiel durch die Konzentration eines kleinen Moleküls reguliert sein kann, das dem Patienten verabreicht werden kann, wenn die Aktivierung oder Unterdrückung (in Abhängigkeit davon, ob das kleine Molekül die Aktivierung oder Unterdrückung des Promotors bewirkt) der Expression des Polypeptids gewünscht wird. Es wird anerkannt werden, dass dies von besonderem Nutzen sein kann, wenn das Expressionskonstrukt stabil ist, d. h. zum Exprimieren des Polypeptids (in der Gegenwart irgendwelcher erforderlicher regulatorischen Moleküle) in der Zelle für einen Zeitraum von wenigstens einer Woche, ein, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht Monaten oder mehr fähig ist. Ein bevorzugtes Konstrukt der Erfindung kann einen regulierbaren Promotoren umfassen. Zu Beispielen der regulierbaren Promotoren zählen solche, auf die in den folgenden Publikationen Bezug genommen wird: Rivera et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(15), 8657–62 (Kontrolle durch Rapamycin, einem oral bioverfügbaren Arzneistoff, unter Verwendung zweier separater Adenovirus- oder Adeno-assoziierten Virus-(AAV)-Vektoren, wobei einer ein induzierbares humanes Wachstumshormon-(hGH)-Zielgen und der andere einen bipartiten Rapamycin-regulierten Transkriptionsfaktor kodiert); Magari et al. (1997) *Clin. Invest.* 100(11), 2865–72 (Kontrolle durch Rapamycin); Bueler (1999) *Biol. Chem.* 380(6), 613–22 (Überblick über Adeno-assoziierte virale Vektoren); Bohl et al. (1998) *Blond* 92(5), 1512–7 (Kontrolle durch Doxycyclin in Adeno-assoziiertem Vektor); Abruzzese et al. (1996) *J Mol Med* 74(7), 379–92 (Überblick über Induktionsfaktoren, z. B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zytostatika, Bestrahlung, Hitzeschock und assoziierte responsive Elemente). Tetracyclin-induzierbare Vektoren können ebenfalls verwendet werden. Diese werden durch ein relativ nicht-toxisches Antibiotikum aktiviert, von dem gezeigt worden ist, dass es für die Regulierung der Expression in Säugerzellkulturen nützlich ist. Ebenso können Steroid-basierte Induktoren nützlich sein, insbesondere,

da der Steroid-Rezeptor-Komplex in den Nukleus eindringt, wohingegen der DNA-Vektor vor der Transkription abgetrennt werden muss.

**[0085]** Dieses System kann durch Regulieren der Expression auf zwei Ebenen weiter verbessert werden, zum Beispiel unter Verwendung eines Gewebe-spezifischen Promotors und eines Promotors, der durch einen exogenen Induktor/Repressor kontrolliert ist, zum Beispiel einen kleinmolekuligen Induktor, wie oben erörtert und den Fachleuten des Gebiets bekannt. Somit kann eine Ebene der Regulation die Bindung des entsprechenden Polypeptid-kodierenden Gens an einen induzierbaren Promotor einbeziehen, wohingegen eine weitere Ebene der Regulation die Verwendung eines Gewebe-spezifischen Promotors zum Antreiben des Gens, das für den erforderlichen induzierbaren Transkriptionsfaktor kodiert, welcher die Expression des Polypeptids (zum Beispiel NF- $\kappa$ B oder Induktor/Aktivator-kodierendes Gen) von dem induzierbaren Promotor kontrolliert. Die Kontrolle kann außerdem durch das Zelltyp-spezifische Targeting des genetischen Konstrukts verbessert werden.

**[0086]** Die Anwendungen oder Konstrukte der Erfindung können zum Beispiel in APCs, wie etwa dendritischen Zellen, die in vitro generiert sind, evaluiert werden, wie den Fachleuten des Gebiets bekannt, bevor sie in Volltieren evaluiert werden. Geeignete Methoden sind in Beispiel 1 beschrieben.

**[0087]** Die genetischen Konstrukte der Erfindung können unter Anwendung von im Fachgebiet wohl bekannten Methoden präpariert werden.

**[0088]** Die Vakzinen und Vektoren der Erfindung (therapeutische Moleküle der Erfindung) können mit geeigneten, pharmazeutisch akzeptablen Trägern, Füllstoffen oder anderen Zusatzstoffen formuliert werden. Sie können mittels irgendeiner geeigneten Methode verabreicht werden, wie etwa intramuskulär, intravenal, oral, anal, intranasal etc. Die subkutane oder intramuskuläre Verabreichung kann bevorzugt sein. Es wird anerkannt werden, dass ein Induktor, zum Beispiel ein kleinmolekuliger Induktor, wie oben erörtert, vorzugsweise oral verabreicht werden kann.

**[0089]** Es mag erwünscht sein, eine Fläche, die Zielzellen umfasst, lokal mit dem geeigneten Darreichungsvehikel, das das therapeutische Molekül, zum Beispiel das genetische Konstrukt, umfasst, für einen Zeitraum zu perfundieren; außerdem oder alternativ kann das Darreichungsvehikel oder therapeutische Molekül direkt in zugängliche Bereiche, die Zielzellen umfassen, zum Beispiel subkutan injiziert werden. Methoden zur Darreichung genetischer Konstrukte, zum Beispiel adenoviraler Vektor-Konstrukte, an Zellen eines Patienten werden den Fachleuten des Ge-

biets wohl bekannt sein.

**[0090]** Insbesondere kann ein adoptives Therapieprotokoll angewendet oder eine Genpistole verwendet werden, um das Konstrukt an dendritische Zellen, zum Beispiel in die Haut, zu verabreichen.

**[0091]** Ein adoptiver Therapieansatz wird beschrieben, welcher die folgenden Schritte umfasst: (1) Gewinnen von Antigen-präsentierenden Zellen oder Vorläufern davon, vorzugsweise dendritischen Zellen oder Vorläufern davon, von dem Patienten; (2) Kontaktieren der Antigen-präsentierenden Zellen mit einem NF- $\kappa$ B-Induktor/-Aktivator, wie hierin beschrieben, und des Antigens, auf das eine Immunantwort erforderlich ist, oder der chimären Moleküle oder Polynukleotide, wie oben erörtert, ex vivo; und (3) Wiedereinführen der derart behandelten Antigen-präsentierenden Zellen in den Patienten.

**[0092]** Geeigneter Weise sind die dendritischen Zellen autologe dendritische Zellen, die mit einem NF- $\kappa$ B-Aktivator und einem Antigen gepulst werden. Die T-Zell-Therapie unter Verwendung von autologen dendritischen Zellen, die mit Peptiden von einem Tumorasoziierten Antigen gepulst werden, ist beschrieben bei Murphy et al (1996) *The Prostate* 29, 371–380 und Tjua et al. (1997) *The Prostate* 32, 272–278.

**[0093]** Die Antigen-präsentierenden Zellen, wie etwa dendritische Zellen, werden mit einem Polynukleotid kontaktiert, welches für den NF- $\kappa$ B-Aktivator/Induktor kodiert. Das Polynukleotid kann jegliches geeignete Polynukleotid sein, wobei bevorzugt ist, dass es zum Transduzieren der dendritischen Zellen fähig ist, was somit zur Aktivierung der Antigenpräsentation durch die Antigen-präsentierende Zelle führt.

**[0094]** Bequemer Weise kann das Polynukleotid in einem viralen Polynukleotid oder Virus bestehen, wie oben angemerkt. Zum Beispiel ist von Adenovirus-transduzierten dendritischen Zellen gezeigt worden, dass sie eine Antigen-spezifische Antitumor-Immunität in Beziehung zu MUC1 induzieren (siehe Gong et al. (1997) *Gene Ther.* 4, 1023–1028). Ähnlich können Adenovirus-basierte Systeme verwendet werden (siehe zum Beispiel Wan et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8, 1355–1363); können retrovirale Systeme verwendet werden (Specht et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1213–1221 und Szabolcs et al. (1997) *Blood* 90, 2160–2167); kann auch der Partikel-vermittelte Transfer zu dendritischen Zellen angewendet werden (Tuting et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27, 2702–2707); und kann außerdem RNA verwendet werden (Ashley et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1177–1182).

**[0095]** Die APCs, wie etwa dendritische Zellen, kön-

nen von dem Patienten stammen (d. h. autologe dendritische Zellen) oder von einem gesunden Individuum oder Individuen (MHC-passend oder -nicht-passend), in vitro wie oben angegeben behandelt werden, gefolgt von der adoptiven Therapie, d. h. der Einführung der derart manipulierten dendritischen Zellen in vivo, die dann CTL-Reaktionen aktivieren können. Mit "gesundem Individuum" meinen wir, dass das Individuum generell von gutem gesundheitlichem Allgemeinzustand ist, vorzugsweise ein kompetentes Immunsystem besitzt, und noch bevorzugter nicht an irgendeiner Erkrankung leidet, auf die ohne weiteres getestet und detektiert werden kann.

**[0096]** Es ist bevorzugt, wenn zwischen etwa  $10^3$  und  $10^{11}$  DCs an den Patienten verabreicht werden; bevorzugter zwischen  $10^6$  und  $10^7$  DCs.

**[0097]** Die APCs, wie etwa DCs, können auf irgendeinem bequemen Wege verabreicht werden. Es ist bevorzugt, wenn die DCs intravenös verabreicht werden. Es ist außerdem bevorzugt, wenn die DCs lokal an die Stelle der Erkrankung verabreicht werden (wie etwa ein Tumor oder eine lokale virale oder bakterielle Infektion). Die lokale Verabreichung ist bei Krebs besonders bevorzugt. Bequemer Weise werden die DCs in eine Arterie verabreicht, die die Stelle der Erkrankung oder das Gewebe, in welchem die Erkrankung lokalisiert ist, versorgt.

**[0098]** Die Zellen (oder die Vakzine) können an einen Patienten verabreicht werden, der auf die Erkrankung mittels irgendeiner anderen Methode behandelt wird. Obschon die beschriebene Behandlungsmethode alleine angewendet werden kann, ist es somit erwünscht, sie als eine Adjuvans-Therapie anzuwenden.

**[0099]** Die APCs, wie etwa DCs, oder Vakzine können vor, während oder nach der anderen Therapie verabreicht werden.

**[0100]** Ist die zu behandelnde Erkrankung ein Krebs, so ist es bevorzugt, wenn der Krebs mit einer herkömmlichen Therapie oder mittels Chirurgie behandelt worden ist, derzeit behandelt wird oder behandelt werden wird, und außerdem mittels der Erfindung. Bequemer Weise wird, in Abhängigkeit von der Therapie, der Krebs mittels Radiotherapie oder mittels Chemotherapie behandelt.

**[0101]** Ist die zu behandelnde Erkrankung eine Infektion durch ein Pathogen, so ist es bevorzugt, wenn die Infektion mit einer herkömmlichen Therapie oder mittels Chirurgie behandelt worden ist, derzeit behandelt wird oder behandelt werden wird.

**[0102]** Weist der zu behandelnde Patient eine HIV-Infektion auf, so ist es bevorzugt, wenn die Erfindung als ein Adjuvans zu einer anderen Behandlung

angewendet wird, zum Beispiel der Behandlung mit einem reversen Transkriptase-Inhibitor, wie etwa AZT oder 3TC oder einer Kombinationstherapie, zum Beispiel HART (hoch aktive retrovirale Therapie).

**[0103]** Wird die adoptive Immuntherapie der Erfindung zur Behandlung eines festen Tumors angewendet, so ist es bevorzugt, wenn die APCs, wie etwa DCs oder Vakzine, als die erste post-chirurgische Behandlung verabreicht werden.

**[0104]** Wird die adoptive Immuntherapie der Erfindung zur Behandlung von Leukämie angewendet, so ist es bevorzugt, wenn die APCs, wie etwa DCs oder Vakzine, nach der Radiotherapie oder Chemotherapie verabreicht werden. Es ist ebenso bevorzugt, wenn Leukämie-Patienten auch mit den DCs in Kombination mit einer Knochenmarkstransplantation behandelt werden.

**[0105]** Krebstherapie, zum Beispiel die adoptive Immuntherapie, kann in der Kontrolle oder Eliminierung einer minimalen Resterkrankung anstelle der Reduktion der „bulk disease“ (Tumorgroße von 6 cm oder mehr) am wirksamsten sein. Es ist nachvollziehbar, dass die Immuntherapie die Ausmaße der „bulk disease“ aufgrund des Zustroms von zytotoxischen T-Lymphozyten temporär erhöhen kann. Der Umfang und die Masse der Erkrankung kann im Anschluss an die Therapie überwacht werden, darf aber nicht als ein formaler Endpunkt angewendet werden. Patienten werden in der routinemäßigen Weise langfristig nachuntersucht, um sicherzugehen, dass keine langfristigen unerwünschten Ereignisse manifest werden.

**[0106]** Zu weiteren Darreichungs- oder Targeting-Strategien können die folgenden zählen. Eine ballistische Druckluft-betriebene DNA/Protein-beschichtete Nanopartikel-Penetration (zum Beispiel unter Verwendung eines BioRad-Geräts) von Zellen in Kultur oder in vivo kann angewendet werden. Die Konstrukte für den Transfer sollten vorzugsweise Zelltyp-spezifische Promotoren aufweisen.

**[0107]** Für die parenterale Verabreichung geeignete Formulierungen umfassen wässrige und nicht-wässrige sterile Injektionslösungen, die Antioxidanzien, Puffer, Bakteriostatika und Solute enthalten können, die die Formulierung isotonisch mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers machen; und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, die Suspendiermittel und Verdickungsmittel enthalten können. Die Formulierungen können in Dosis-einheiten- oder Vielfachdosen-Behältern, zum Beispiel versiegelten Ampullen und Phiolen, präsentiert werden und können in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) Zustand gelagert werden, wobei sie lediglich die Zugabe des sterilen Flüssigträgers, zum Beispiel Wasser für Injektionen, unmittelbar vor der Anwendung erfordern. Extemporane Injektionslösungen und Suspensionen

können aus sterilen Pulvern, Körnchen und Tabletten in einer Weise hergestellt werden, wie sie den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt ist. Nasensprays können ein nützliches Format darstellen.

**[0108]** Die Dosis des Konstrukts beispielsweise hängt von der Größe des Konstrukts und dem Zweck ab, für den es verabreicht wird. Im Allgemeinen wird der Bereich ausgehend von dem Oberflächenbereich des zu behandelnden Gewebes berechnet. Die wirksame Dosis des Konstrukts kann von der Größe des Konstrukts und dem verwendeten Transfervehikel/Targeting-Methode und der chemischen Zusammensetzung des Oligonukleotids abhängen, doch kann eine geeignete Dosis durch den Fachmann zum Beispiel unter Nutzung der Daten von den Tier- und in vitro-Testsystemen, wie oben angegeben, bestimmt werden.

**[0109]** Das Konstrukt kann beispielsweise an den Patienten systemisch sowohl für therapeutische als auch prophylaktische Zwecke verabreicht werden. Das Konstrukt kann zum Beispiel mittels irgendeiner wirksamen Methode verabreicht werden, wie oben beschrieben, zum Beispiel parenteral (z. B. intravenös, subkutan, intramuskulär) oder mittels einer oralen, nasalen oder anderen Methode, die dem Konstrukt zum Beispiel das Eintreten und Zirkulieren in dem Blutstrom des Patienten erlaubt. Systemisch verabreichtes Konstrukt wird vorzugsweise zusätzlich zu lokal verabreichtem Konstrukt gegeben, doch zeigt es auch einen Nutzen in der Abwesenheit der lokalen Verabreichung.

**[0110]** Es wird angenommen, dass die Aufnahme der Nukleinsäure und die Expression des kodierten Polypeptids durch dendritische Zellen den Mechanismus des Priming der Immunantwort darstellen kann; allerdings werden dendritische Zellen möglicherweise nicht transfiziert, sind aber nach wie vor wichtig, da sie exprimierte Peptid von transfizierten Zellen in dem Gewebe aufnehmen können.

**[0111]** Es ist bevorzugt, wenn die Vakzine, wie etwa DNA-Vakzine, in den Muskel verabreicht wird. Es ist ebenso bevorzugt, wenn die Vakzine auf oder in die Haut verabreicht wird.

**[0112]** Wie oben angemerkt, stellt die Erfindung ein Kit-of-parts oder eine Zusammensetzung oder ein chimäres Molekül bereit, umfassend (1) einen modulierenden Abschnitt, der einen NF- $\kappa$ B-Induktor umfasst oder kodiert, und (2) einen antigenen Abschnitt, der ein antigenes Molekül umfasst oder kodiert.

**[0113]** Bezüglich irgendeines der vorangegangenen Aspekte der Erfindung, insbesondere eine Vakzine, wie zuvor beschrieben, oder solch ein Kit, chimäres Molekül oder Zusammensetzung, umfasst das antigene Molekül vorzugsweise ein Epitop, das auf trans-

formierten oder kanzerösen Zellen oder auf einem pathogenen Organismus, oder auf einer Zelle, die durch einen pathogenen Organismus infiziert ist, vorhanden ist.

**[0114]** Somit stellt die Erfindung einen Impfstoff bereit, der gegen Krebs, oder Krebs- oder Krebstumorzellen, oder gegen einen pathogenen Organismus oder eine mit einem pathogenen Organismus infizierte Zelle wirksam ist, umfassend eine wirksame Menge eines NF- $\kappa$ B-Induktors, wie oben beschrieben, oder eines Polynukleotid, das für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, und außerdem umfassend ein Antigen oder Polynukleotid, das für ein Antigen kodiert, mit einem Epitop, das auf den Krebs- oder Tumorzellen, oder dem pathogenen Organismus oder der mit einem pathogenen Organismus infizierten Zelle vorhanden ist. Der Impfstoff ist vorzugsweise eine Nukleinsäure-Vakzine.

**[0115]** Mit einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, umfassend einen NF- $\kappa$ B-Induktor, Vakzine, Molekül, Polynukleotid, Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül nach einem der vorangehenden Aspekte der Erfindung und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

**[0116]** Die Erfindung stellt außerdem einen Impfstoff, Molekül, Polynukleotid, Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül nach einem der vorangehenden Aspekte der Erfindung zur Verwendung in der Medizin bereit. Die Erfindung stellt darüber hinaus die Verwendung eines Impfstoffs, Moleküls, Polynukleotids, Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimären Moleküls nach irgendeinem der vorangehenden Aspekte der Erfindung in der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Patienten, der einer Stimulierung der Antigenpräsentation bedarf, bereit.

**[0117]** Es wird klar sein, dass die Erfindung Medikamente zum Abtöten von Zielzellen in einem Patienten bereitstellt, welche Zielzellen ein erstes Epitop abweichend exprimieren, wobei die Methode die Schritte des Kontaktierens ex vivo von APCs, wie etwa dendritischen Zellen, die von einem Patienten erhalten sind, mit (1) einem NF- $\kappa$ B-Induktor und (2) dem Epitop oder mit einem Polynukleotid oder Expressionsvektor, der für das Epitop kodiert, umfasst.

**[0118]** Die Zielzellen können Krebszellen sein.

**[0119]** Um Zweifel auszuschließen, umfasst, wo immer der Begriff "dendritische Zelle" oder "dendritische Zellen" verwendet wird, der Begriff jegliche geeignete Antigenpräsentierende Zelle, sofern nicht der Zusammenhang anderes nahe legt. Es ist bevorzugt, dass die Antigen-präsentierende Zelle eine dendritische Zelle ist.

**[0120]** Im Folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben werden.

#### LEGENDEN ZU DEN FIGUREN

**[0121] Fig. 1.** Zellebensfähigkeit von mit PSI behandelten DCs. Reife DCs wurden entweder unbehandelt belassen oder mit verschiedenen Dosen an PSI für 4 h behandelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in RPMI 1640, supplementiert wie beschrieben, ohne Monozyten-Konditionsmedium gezüchtet. 6 Tage nach der Behandlung wurden die Zellen in PBS resuspendiert, das 10 µg/ml an Propidiumiodid (PI) enthielt, und mittels FACScan analysiert.

**[0122] Fig. 2.** Immunstimulatorische Kapazität von DC, behandelt mit dem Proteosom-Inhibitor Cbz-Ile-Glu(O-tert-Bytyl)-Ala-Leucinal (PSI). Reife DCs wurden mit PSI (0,1 µM: ▲), (0,5 µM: ■), (1 µM: ●) oder ohne PSI (o) für 4 Stunden behandelt. Nach dem Waschen wurden verschiedene Anzahlen aus jeder Kategorie der DCs und 10<sup>5</sup> Zellen der Allo-Lymphozyten auf einer 96-Well-Platte ausplattiert. Die Proliferation wurde am Tag 6 unter Anwendung des <sup>3</sup>H-TdR-Aufnahmeassay bestimmt. (Jeder Punkt stellt den Mittelwert +/- SEM aus fünf separaten Experimenten dar).

**[0123] Fig. 3.** Die Wirkung von PSI auf die Expression der Oberflächenantigene wurde unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, HLA-DR, CD86 (PE-konjugiert); Pharmingen, San Diego, CA) am Tag 6 nach der PSI-Behandlung untersucht. Populationen von unbehandelten (grüne Linie) PSI (0,1 µM) behandelten (blaue gepunktete Linie), PSI (1 µM) behandelten (rote gepunktete Linie) wurden mit den oben aufgelisteten MoAbs phänotypisiert und mittels FACScan (Becton Dickinson) analysiert.

**[0124] Fig. 4.** Ausbleiben des Wiedererlangens der Proliferationsreaktion in Allo-MLR. Reife DCs wurden mit Vehikel (A) oder PSI (1 µM) (B) für 4 h behandelt. Nach dem Waschen wurden abgestufte Anzahlen jeder behandelten DC und 10<sup>5</sup> Zellen von Allo-Lymphozyten auf einer 96-Well-Platte mit Vehikel (o, ●), 2 ng/ml an IL-2 (□, ■) oder 10 g/ml an Anti-CD28-Ab (Δ, ▲) ausplattiert. Die Proliferation wurde am Tag 6 unter Anwendung des <sup>3</sup>H-TdR-Aufnahmeassays bestimmt. (Jeder Punkt steht für den Mittelwert +/- SEM aus drei separaten Experimenten).

**[0125] Fig. 5.** Mit PSI vorbehandelte DCs hemmen die Wachstumsfähigkeit von Lymphozyten in Allo-MLR. Reife DCs wurden mit PSI behandelt, wie oben beschrieben. Nach dem Waschen wurde jede DC zum Erhalt verschiedener Zusammensetzungen gemischt: nur Vehikel-behandelte DC (o), ¼ der Anzahl der PSI-behandelten DC, gemischt mit ¼ Vehikel-behandelten DC (●), 1/8 der Anzahl der PSI-behandelten DC, gemischt mit Vehikel-behandelten DC

(■) oder nur PSI-behandelte DC (▲). Abgestufte Anzahlen aus jedem Gemisch und 10<sup>5</sup> Zellen von Allo-Lymphozyten wurden auf einer 96-Well-Platte ausplattiert. Die Proliferation wurde am Tag 6 mittels eines <sup>3</sup>H-TdR-Aufnahmeassays bestimmt.

**[0126] Fig. 6.** Beeinträchtigte Reaktion auf Allo-Lymphozyten, vorkultiviert mit PSI-behandelten oder nicht-behandelten DCs. Lymphozyten wurden mit 1/10 der Anzahl der PSI-behandelten (●, ▲) oder nicht-behandelten DC (o, Δ) ko-kultiviert. Nach 2 Tagen wurden jede DC mit CD83, C86-beschichteter Platte entfernt. Die Lymphozyten wurden für weitere 4 Tage unter Verwendung von Vehikel-behandelten DC (o, ● oder PSI-(1 µM)-behandelten DC (Δ, ▲) gezüchtet. Die Proliferation wurde mittels eines <sup>3</sup>H-TdR-Aufnahmeassays bestimmt. (Jeder Punkt steht für den Mittelwert +/- SEM aus drei separaten Experimenten).

**[0127] Fig. 7.** Verminderte Expression von Oberflächenantigenen auf Allo-Lymphozyten durch PSI-vorbehandelte DCs. Lymphozyten wurden für 6 Tage bei denselben Bedingungen wie dem Allo-MLR-Experiment unter Verwendung von Vehikel-behandelten DC (grüne Linie) oder PSI-(1 µM)-behandelten DC (rote Linie) gezüchtet. Die jeweiligen Lymphozyten wurden mit MoAbs, CD3, CD25 (PE-konjugiert; Pharmingen), (CD54) (PE-konjugiert; Serotec), CD50 (FITC-konjugiert; Serotec) phänotypisiert und mittels FACScan analysiert.

**[0128] Fig. 8.** Zytokin-Produktion von Allo-Lymphozyten, ko-kultiviert mit Vehikel-behandelten oder PSI-behandelten DC. Reife DC wurden mit Vehikel oder PSI (1 µM) wie oben beschrieben behandelt. Allo-Lymphozyten und die jeweiligen DC wurden bei 2 × 10<sup>5</sup> Zellen pro Well auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und mit PMA (10 nM) stimuliert oder unstimuliert belassen für 49 h. Die Überstände wurden auf IL-2, IL-4 und Interferon-γ mittels ELISA analysiert.

**[0129] Fig. 9.** Zytokin-Produktionen von DC, behandelt mit Vehikel oder PSI. Reife DC wurden mit Vehikel oder PSI (1 µM) behandelt, wie oben beschrieben. Die jeweiligen DC und Allo-Lymphozyten wurden bei 2 × 10<sup>5</sup> Zellen pro Well auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und mit PMA (10 nM) stimuliert oder unstimuliert belassen für 48 h. Die Überstände wurden auf IL-6, IL-8, IL-12 und TNFα mittels ELISA analysiert.

**[0130] Fig. 10.** Expression von MEKK-1a verstärkt die Antigenpräsentation von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen in dem allogenen MIR stark. Kurz gesagt wurden dendritische Zellen durch Züchten von peripheren Blutmonozyten mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 mg/ml IL-4 generiert. Am Tag 5 wurden sie für 2 Stunden mit einem Adenovirus ohne Insert oder MEKK-1 kodierend (MOI 100:1) infiziert

oder wurden uninfiziert belassen. Nach 2 Tagen wurden  $10^4$  dendritische Zellen mit  $10^5$  gereinigten allo-genen T-Zellen für 5 Tage in 96-Well-Flachboden-platten gezüchtet, über Nacht mit  $0,5 \mu\text{Ci/Well}$  gepulst und am folgenden Tag geerntet. Dendritische Zellen, die MEKK-1 kodierte, waren 4-mal wirksamer im Induzieren der T-Zellproliferation als uninfizierte DC, wo-hingegen dies auf dendritische Zellen, die mit einem Adenovirus ohne Insert infiziert waren, nicht zutraf.

**Fig. 11:** Expression von dominant-negativem Inhibi-tor von MyD88 (MyD88lpr) in dendritischen Zellen induziert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

**[0131]** Unreife DCs wurden aus peripheren Blutmo-nozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus ohne Insert (Ad0) oder einem Adenovirus, das dominant-negatives MyD88 (AdMyD88lpr) kodierte, infiziert. Eine Multiplizität der Infektion von 100 wurde angewendet. Nach 6 h und 24 h der Expression wurden die Zellen lysiert und ihre Nuklearextrakte auf die NF- $\kappa$ B DNA-bindende Aktivität mittels EMSA untersucht. Überraschenderweise konnte die Expression von MyD88lpr aus sich selbst heraus die NF- $\kappa$ B-Aktivierung induzieren, was in völligem Gegensatz zu dem steht, was bisher fest-gestellt worden ist.

**Fig. 12:** Expression von dominant-negativem (Inhibi-tor), doch nicht Wildtyp-MyD88 induziert die TNF $\alpha$ -Produktion aus sich selbst heraus und inhibiert nicht die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion in dendriti-schen Zellen.

**[0132]** Unreife DC wurden aus peripheren Blutmo-nozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal (Ad $\beta$ -gal) kodierte, einem Adenovirus, das für domi-nant-negatives MyD88 (Adler) kodierte, und einem Adenovirus, das für Wildtyp MyD88 (AdMyD88wt) ko-dierte, infiziert. Adoll hat sich als nicht-funktional er-wiesen und sollte ignoriert werden. Eine Multiplizität der Infektion von 100 wurde angewendet. Nach 24 h wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Über-raschenderweise konnte die Expression von domi-nantnegativem MyD88 die TNF $\alpha$ -Produktion von dendritischen Zellen aus sich selbst heraus in der Ab-wesenheit einer zusätzlichen Stimulation induzieren. Darüber hinaus konnte sie eine LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion nicht hemmen, ein Befund, der im Gegensatz zu bisherigen Befunden steht.

**Fig. 13:** Expression von Wildtyp-MyD88 hebt die MyD88-lpr-(dominantnegativ)-induzierte TNF $\alpha$ -Pro-duktion in dendritischen Zellen auf.

**[0133]** Unreife DC wurden aus peripheren Blutmo-nozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal (Ad $\beta$ -gal) kodierte, einem Adenovirus, das für Wild-tyt-MyD88 (AdMyD88wt) kodierte, und einem Ade-novirus, das für dominant-negativen MyD88 (AdMyD88lpr) kodierte, infiziert. In einigen Fällen wurde eine Doppelinfection durch Adler und Ad $\beta$ -gal oder AdMyD88wt bei Verhältnissen von 1:1 und 1:5 angewendet. Eine Multiplizität der Infektion von 100 wurde für die Einzelinfektionen angewendet. Nach 24 h wurden die Überstände entfernt und analysiert. Überraschenderweise konnte die Expression von do-minant-negativem MyD88 die TNF $\alpha$ -Produktion der dendritischen Zellen aus sich selbst heraus, in der Abwesenheit einer zusätzlichen Stimulation, induzie-ren. Wildtyp-MyD88 war zur Hemmung der TNF-Produktion, wie durch MyD88lpr induziert, fähig.

**Fig. 14:** Expression von dominant-negativem MyD88 in dendritischen Zellen erhöht die Antigen-spezifi-sche T-Zellproliferation.

**[0134]** Unreife DC wurden aus peripheren Blutmo-nozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus ohne Insert (Ad0), ei-nem Adenovirus, das für grün fluoreszierendes Pro-tein als einem Prototyp-Antigen (AdGFP) kodierte, und einem Adenovirus, das für GFP, verknüpft mit dem dominantnegativen MyD88 (AdGFP-lpr) kodier-te, infiziert. Nach 48 h wurden abgestufte Dosen der dendritischen Zellen mit  $2 \times 10^4$  Antigen-spezifischen T-Zellen gezüchtet, und die Proliferation wurde am Tag 3 gemessen. Die Übertragung des Antigen-GFP auf dendritische Zellen induzierte eine Antigen-spezi-fische T-Zellproliferation, die durch Expression des dominant-negativen MyD88 erhöht war. Dies steht in Übereinstimmung mit unserem unerwarteten Ergeb-nis, dass die Hemmung der MyD88-Aktivität in dendritischen Zellen eine dendritische Zellaktivierung induziert.

**Fig. 15:** Expression von dominant-negativem MyD88 in dendritischen Zellen verstärkt die allogene ge-mischte Lymphozytenreaktion (MIR).

**[0135]** Unreife DC wurden aus peripheren Blutmo-nozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus ohne Insert (Ad0) und einem Adenovirus, das die dominant-negative Form

von MyD88 (Adler) kodierte, infiziert. Nach 48 h wurden abgestufte Dosen der dendritischen Zellen mit  $1 \times 10^5$  allogenen T-Zellen gezüchtet, und die Proliferation wurde am Tag 6 gemessen. Die Expression des dominant-negativen MyD88 erhöht die allogene T-Zellproliferation, ein Befund, der für eine verstärkte DC-Antigenpräsentation indikativ ist.

**Fig. 16:** Expression von dominant-negativem MyD88 in dendritischen Zellen erhöht die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86).

**[0136]** Unreife DC wurden aus peripheren Blutmonozyten nach 5-tägiger Kultur mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 generiert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, oder wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für GFP kodierte, und mit einem Adenovirus, das für dominant-negativen MyD88 (Adler) kodierte, infiziert. Nach 48 h wurden die dendritischen Zellen entnommen und für CD80 und CD86 angefärbt, zwei sehr wichtige kostimulatorische Moleküle, die für eine effiziente Antigen-präsentierende Funktion erforderlich sind. Die Expression der dominantnegativen Form von MyD88 erhöht die CD80- und CD86-Zelloberflächenexpression, was für die erhöhte Antigen-präsentierende Funktion der dendritischen Zellen indikativ ist.

**Fig. 17:** Expression von dominant-negativem MyD88 in Makrophagen induziert die p38 MAPK-Phosphorylierung.

**[0137]** Humane Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten durch Zugabe von 100 ng/ml M-CSF für 2–3 Tage in 5% FCS RPMI differenziert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal kodierte, infiziert, oder mit einem Adenovirus, das für dominant-negatives MyD88 (Adler) kodierte, infiziert. Eine MOI von 100 (oder 50 in einem Fall) wurde wie gezeigt angewendet. Nach 6, 24 und 48 h wurden die Zellen lysiert und die Extrakte auf die p38 MAPK-Aktivität unter Anwendung des Western Blotting und Phospho-p38 MAPK-spezifischer Antikörper untersucht. Unerwarteter Weise induzierte die Expression von dominant-negativem MyD88 die p38 MAPK-Aktivität in humanen Makrophagen.

**Fig. 18:** Expression von dominant-negativem MyD88 in Makrophagen induziert die IRAK-Phosphorylierung.

**[0138]** Humane Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten durch Zugabe von 100 ng/ml M-CSF für 2–3 Tage in 5% FCS RPMI differenziert. HELA-Zellen, gezüchtet in 5% FCS DMEM, wurden ebenfalls verwendet. Beide Zelltypen wurden uninfiziert belassen, in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal kodierte, einem Adenovirus, das für Wildtyp-MyD88 kodierte, oder ei-

nem Adenovirus, das für dominant-negativen MyD88 (AdMyD88lpr) kodierte, infiziert. Eine MOI von 100 wurde angewendet. Nach 5 min oder 12 h wurden die Zellen lysiert und die Extrakte auf IRAK und Phospho-IRAK unter Anwendung des Western Blotting untersucht. In HELA-Zellen wurde von der Expression des dominant-negativen MyD88 (MyD88-lpr) festgestellt, dass sie die IL-1-induzierte Aktivierung von IRAK hemmte. Unerwarteter Weise induziert jedoch die Expression von dominant-negativem MyD88 die IRAK-Aktivität in humanen Makrophagen, die durch die Zugabe von LPS nicht erhöht ist. Dieser Befund legt nahe, dass die MyD88-Aktivität auch für ein inhibitorisches Signal in Makrophagen (doch nicht in HELA-Zellen) erforderlich ist, das die IRAK-Phosphorylierung hemmt, und ihre Blockade führt zur Aktivierung von IRAK.

**Fig. 19:** Expression von dominant-negativem MyD88 in Makrophagen induziert die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung.

**[0139]** Humane Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten durch Zugabe von 100 ng/ml M-CSF für 2–3 Tage in 5% FCS RPMI differenziert. Die Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal kodiert, oder einem Adenovirus, das für dominant-negatives MyD88 (Adler) kodiert, infiziert. Eine MOI von 100 wurde angewendet. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Extrakte auf Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  unter Anwendung des Western Blotting untersucht. Unerwarteter Weise induziert die Expression von dominant-negativem MyD88 die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung in humanen Makrophagen.

**Fig. 20:** Expression von dominant-negativem, nicht jedoch Wildtyp-MyD88 in Makrophagen induziert die TNF $\alpha$ -, IL-6- und IL-8-Produktion in der Abwesenheit irgendeines Stimulus.

**[0140]** Humane Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten durch Zugabe von 100 ng/ml M-CSF für 2–3 Tage in 5% FCS RPMI differenziert. Dann wurden sie uninfiziert belassen, in Serum-freiem Medium mit einem Kontroll-Adenovirus, das für  $\beta$ -Gal kodiert, infiziert, mit einem Adenovirus, das für Wildtyp-MyD88 kodiert, infiziert, oder mit einem Adenovirus, das für dominant-negativen MyD88 (Adler) kodiert, infiziert. Eine MOI von 100 wurde angewendet. (a) Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und auf die TNF $\alpha$ , IL-6- und IL-8-Zytokin-Produktion in der Abwesenheit irgendeiner weiteren Stimulierung untersucht. Die Zytokin-Produktion konnte in Zellen detektiert werden, die für dominant-negativen MyD88 kodierten, jedoch nicht in Zellen, die für Wildtyp-MyD88 kodierten, oder Kontrollzellen. Dies legte nahe, dass die Blockierung der MyD88-Aktivität in Makrophagen, wie auch in dendritischen Zellen, doch nicht in HSF oder HUVEC, zur Aktivierung der Zellen und der Freisetzung von inflammatorischen

Zytokinen führt. (b) bei 0 h, 4 h, 24 h und 48 h der Expression wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf TNF, IL-6 und IL-8 untersucht. Lediglich die Ergebnisse von den Zellen, die für dominant-negativen MyD88 (MyD88-Ipr) kodierten, sind gezeigt, da Kontrollzellen oder Zellen, die für Wildtyp-MyD88 kodierten, Hintergrund-Levels der Zytokin-Produktion aufwiesen.

## MATERIALIEN UND METHODEN

### 1. Reagenzien

**[0141]** Humaner rekombinanter GM-CSF und TNF $\alpha$  waren jeweils freundliche Gaben von Dr. Glenn Larsen (GI) und Dr. D. Tracey (BASF). Humanes rekombinantes IL-4 wurde erworben von R&D Systems (Minneapolis, USA). PMA, LPS und Ionomycin wurden erhalten von Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Der Proteosominhibitor Cbz-Ile-Glu(O-tert-Butyl)-Ala-Ceremal (PSI) wurde erhalten von Calbiochem (Nottingham, UK). M-CSF wurde erhalten von dem Genetics Institute (Boston, USA).

### 2. Präparation der peripheren mononuklearen Blutzellen

**[0142]** Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtezentrifugation von Leukophere-Reste von gesunden Freiwilligen erhalten (North London Blood Transfusion Service, Colindale, UK). Die heparinisierten Reste wurden 2X mit HBSS verdünnt, und 25 ml wurden vorsichtig über gleiche Volumina an Ficoll-Hypaque-Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norwegen) in sterilen 50 ml-Röhrchen vor der Zentrifugation für 30 Minuten bei 2.000 rpm bei Raumtemperatur geschichtet. Nach der Zentrifugation wurde die Grenzflächenschicht entnommen und zweimal mit HBSS gewaschen (zentrifugiert für 10 Minuten bei 2.000 rpm). Die PBMC wurden dann gesammelt und in 30 ml RPMI, enthaltend 5% FCS, resuspendiert.

### 3. Isolierung der T-Zellen und Monozyten aus peripherem Blut und Kultur von HeLa-Zellen

**[0143]** T-Zellen und Monozyten aus peripherem Blut wurden erhalten von PBMC nach der Zelltrennung in einem Beckmann JE6 Elutriator. Die Elutriation wurde in RPMI, enthaltend 1% FCS (Elutriationsmedium), vorgenommen. Die Reinheit der Lymphozyten und Monozyten wurde durch Flusszytometrie unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Anti-Human-Antikörpern gegen CD45, CD3, CD14 und CD19 ausgewertet (Becton Dickinson, Oxford, UK). Die Fraktionen der T-Lymphozyten enthielten typischerweise ~80% CD3-exprimierende Zellen, ~6% CD19-exprimierende Zellen und < 1% CD14-exprimierende Zellen. Die Monozyten-Fraktionen bestanden routinemäßig aus > 85% CD14-exprimieren-

den Zellen, < 0,5% CD19-Zellen und < 3% CD3-exprimierenden Zellen. Die HeLa-Zellen wurden in 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin-DMEM gehalten.

### 4. Differenzierung von Monozyten mit M-CSF für die adenovirale Infektion

**[0144]** Um die adenovirale Infektion zu optimieren, wurden frisch elutrierte Monozyten bei  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 10 cm-Petrischalen (Falcon, UK) mit 100 ng/ml an M-CSF (Genetics Institute, Boston, USA) gezüchtet. Nach 2–3 Tagen wurden sie mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenenten Zeilen zu entfernen, und die verbliebenen adhärenenten Monozyten wurden mit 10 ml einer Zelldissoziationslösung (Sigma, UK) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde zweimal in RPMI, enthaltend 5% FCS, gewaschen, und die Zellebensfähigkeit (90%) wurde mittels Trypanblau-Ausschluss ausgewertet. Die Zellen waren zu diesem Stadium zu 99% CD14-positiv anhand der FACS-Färbung und wurden bei  $1 \times 10^6$ /ml in 24-Well- oder 48-Well-Flachboden-Gewebekulturplatten (Falcon, UK) für weitere Experimente gezüchtet.

### 5. Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen

**[0145]** Frisch elutrierte Monozyten wurden bei  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 10 cm-Petrischalen (Falcon, UK) in 5% FCS RPMI, supplementiert mit 50 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 für 5–6 Tage gezüchtet. Am Tag 3 wurden die Zytokine wieder ergänzt. Diese Methode bietet mehrere Vorteile im Vergleich zu der Differenzierung von dendritischen Zellen direkt aus Blut oder Knochenmarks-Vorläufern. Davon abgesehen, dass sie einfach ist und eine hohe Anzahl von Zellen erbringt, erzeugt sie eine homogene Population von Zellen mit einem stabilen "unreifen DC"-Phänotyp. Dieser Phänotyp kann durch Zugabe von TNF $\alpha$  (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) oder Monozytenkonditioniertem Medium (50% v/v) für weitere 2–3 Tage zu den DC bis zur Reife getrieben werden.

### 6. Monozyten-konditioniertes Medium

**[0146]** Ig-beschichtete Platten (100 mm, Falcon) wurden unmittelbar vor der Verwendung durch die Zugabe von 5 ml humanem Gamma-Globulin (10 mg/ml, Sigma Chemical Co.) für 10 min präpariert. Die Platten wurden dreimal mit RPMI 1640 Medium (Serum-frei) vor der Verwendung gewaschen. Elutrierte Monozyten ( $3 \times 10^7$ ) wurden über die Ig-beschichteten Platten für 1 h in 7 ml-Volumina geschichtet. Nicht-adhärenente Zellen wurden gewaschen, und an Gamma-Globulin haftende Zellen wurden in frischem komplettem RPMI 1640 Medium bei 37°C für 24 h inkubiert.

## 7. Adenovirale Vektoren und ihre Vermehrung

**[0147]** Rekombinante, replikationsdefekte adenovirale Vektoren, die für *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase (Ad $\beta$ -gal) kodierten oder die kein Insert (Ad0) besaßen, wurden bereitgestellt von Dr. A. Byrnes und Dr. M. Wood (Oxford University, UK). Das GFP-exprimierende Adenovirus (AdGFP) wurde durch Doppelrekombination von AdTrack mit AdEasy-1 adenoviralem Plasmid, bereitgestellt von Prof. B. Vogelstein (The Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, Md.), generiert. AdMyD88wt und AdMyD88lpr wurden von Plasmiden generiert, die bereitgestellt waren von Dr. Xu (University of Texas, Southwestern) und Dr. K. Burns (Lausanne, Schweiz). Insbesondere wurde pAdTrackCMV für AdMEKK-1wt verwendet, wohingegen für AdMyD88wt und AdMyD88lpr ein pAdTrackCMV Vektor-Derivat, bezeichnet als AdTrackCMVKS17, verwendet wurde. pAdTrackCMVKS17 wurde durch Entfernen der EcoRI-Stelle von AdTrackCMV als auch seiner multiplen Klonierungsstelle (MCS) und durch Inserieren der größeren multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBCSK(+) (Stratagene) konstruiert. Rekombinante Viren wurden in BJ5183-Bakterienzellen generiert, die mittels der Hitzeschockmethode mit 1  $\mu$ g an linearisierten pAdTrackCMV-MEKK1wt-, AdTrackCMVKS17-MyD88wt- oder AdTrackCMVKS17-My88lpr-Konstrukten und 100 ng an replikationsdefektem adenoviralem Vektor pAdEasy-1 transformiert waren. Positive rekombinante Klone wurden anhand ihrer Resistenz gegen Kanamycin selektioniert. Nach der Selektion wurde extrahierte DNA für die Virusvermehrung in den 293 humanen embryonalen Nierenzellen verwendet. Die Viren wurden mittels Ultrazentrifugation durch zwei Cesiumchlorid-Gradienten gereinigt, wie beschrieben bei He et al. (He T. C. et al. (1998) Science 281: 1509–12). Die Titer der Virusvorräte wurden durch Plaque-Assay in HEK 293-Zellen nach der Exposition für 1 Stunde in Serum-freiem DMEM-Medium (Gibco BRL) bestimmt und anschließend mit einem (1,5%) Agarose/2xDMEM mit 4% FCS-Gemisch (v/v 1:1) überschichtet und für 10–14 Tage inkubiert. (He T. C. et al. (1998) Science 281: 1509–12).

## 9. Adenovirale Infektion von Zellen

**[0148]** M-CSF-differenzierte Makrophagen und unreife oder reife dendritische Zellen wurden gesammelt, gezählt und wieder ausplattiert. Dann wurden sie in Serum-freiem RPMI mit replikationsdefekten Adenoviren infiziert, die das Gen von Interesse überexprimierten. Eine Multiplizität der Infektion von 100 für Makrophagen und unreife DC, und 300 für reife DC, wurde angewendet. Nach 2 h wurde das Virus entfernt und wurden die Zellen in komplettem Medium für weitere 1–2 Tage gezüchtet, um eine Überexpression des Proteins von Interesse zu ermöglichen. Dann wurden sie in weiteren Experimenten verwen-

det.

## 10. Etablierung von Antigen-spezifischen T-Zelllinien

**[0149]** Grün fluoreszierendes Protein wurde erworben von Clontech. Um Antigen-spezifische polyklonale T-Zelllinien zu etablieren, wurden  $1 \times 10^6$  PBMC/ml mit Antigen (1  $\mu$ g/ml für grün fluoreszierendes Protein oder 5  $\mu$ g/ml für Tetanus-Toxoid) für 7 Tage und dann mit IL-2 bei 20 ng/ml für weitere 10–14 Tage gezüchtet. Alle 4 Tage wurde IL-2 wieder ergänzt. Dies führte zur Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen und Zelltod der meisten anderen Zellpopulationen, die in PBMC vorhanden waren. Nach 17–21 Tagen der Kultur wurde ein Restimulierungsschritt durch Züchten der T-Zellen mit autolog bestrahltem PBMC bei einem Verhältnis von 1:1 und frischem Antigen in der Abwesenheit von IL-2 aufgenommen. Nach 4 Tagen wurde IL-2 für weitere 10–14 Tage zugegeben. Dieser Restimulierungszyklus wurde mindestens 4-mal wiederholt, bevor die Antigen-spezifischen T-Zellen in weiteren Experimenten verwendet wurden.

## 11. Proliferationsassays von Antigen-spezifischen T-Zellen

**[0150]** Um die Spezifität der Antigen-spezifischen T-Zelllinien auszuwerten, wurden  $1 \times 10^5$  Antigen-spezifische T-Zellen mit  $1 \times 10^5$  autologen bestrahlten PBMC und verschiedenen Konzentration an Antigen in 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten gezüchtet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit [ $^3$ H]-Thymidin über Nacht gepulst und am folgenden Tag geerntet.

**[0151]** Um die durch dendritische Zellen induzierte Antigen-spezifische T-Zellproliferation zu messen, wurden  $1 \times 10^5$  Antigen-spezifische T-Zellen mit abgestuften Dosen an bestrahlten oder Mitomycin-behandelten dendritischen Zellen gezüchtet, die ungepulst waren, mit Antigen gepulst waren, uninfiziert oder mit Adenovirus infiziert waren. Der [ $^3$ H]-Thymidin-Einbau wurde nach 2 Tagen gemessen. Alle Antigen-spezifischen Proliferationsassays wurden im Triplikат vorgenommen.

## 12. Gemischte Lymphozytenreaktion (MIR)

**[0152]** Um die immunstimulatorische Kapazität von nicht-bestrahlten oder bestrahlten (3.000 rad von einer  $^{137}$ Cs-Quelle) DCs zu untersuchen, wurden uninfizierte, Adenovirusinfizierte, LPS-behandelte oder Monozyten-konditionierte Medium-behandelte DCs in abgestuften Dosen mit  $1 \times 10^5$  allogenen elutrierten T-Zellen im Quadruplikat in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte (Falcon) gezüchtet. Die Proliferation wurde am Tag 5 durch den Thymidin-Einbau nach einer 16 h Pulsierung mit [ $^3$ H]-Thymidin (0,5  $\mu$ Ci/Well; Amersham Life Science, UK) gemessen.

## 13. Zytokin-Analyse

**[0153]** Die Zellen wurden mit Vehikel oder 1  $\mu\text{M}$  PSI für 4 h vorbehandelt oder mit adenoviralen Vektoren für 2 h infiziert. PSI-behandelte DC wurden dann direkt in den Experimenten verwendet, wohingegen infizierte Zellen für 2 Tage weiter gezüchtet wurden, um das Erfolgen der Überexpression des relevanten Proteins zu ermöglichen. 24 h nach der Stimulierung der Zellen wurden Kulturüberstände gesammelt und eingefroren aufbewahrt. Die Zytokinmengen in den Zellkultur-Überständen wurden mittels standardmäßiger 2- oder 3-schichtiger Sandwich-ELISA-Techniken unter Verwendung spezifischer monoklonaler und polyclonaler Antikörper für TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 und IFN $\gamma$  gemessen. Die Antikörper-Paare und Standards für diese Assays wurden bezogen von Pharmingen, mit Ausnahme der IL-12-Reagenzien, die eine Gabe des Genetics Institute (Boston, USA) waren.

## 14. Immunfluoreszenz-Färbung und Flusszytometrie

**[0154]** Für die FACS-Färbung wurden die Zellen zunächst geerntet. Für adhärenente Zellen, bei denen die Oberflächenrezeptoren intakt sein müssen, wurde warmes 2% EDTA in PBS-Lösung für 20 min bei 37°C verwendet. Nachdem die Zellen in Lösung waren, wurden sie einmal gewaschen und dann in eiskaltem FACS-Waschpuffer resuspendiert. Alle nachfolgenden Inkubationen wurden bei 4°C vorgenommen. Für jede Analyse wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit dem relevanten Antigen-spezifischen Antikörper oder der Isotyp-Kontrolle für 30 min inkubiert und dann zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann mittels Flusszytometrie untersucht. Die Zellen waren für die Analyse auf einem FACScan-Flusszytometer (Becton Dickinson) unter Verwendung des CellQuest (Becton Dickinson) bereit. Direkt konjugierte monoklonale Antikörper zu HLA-DR, HLA-A, B, C, CD80, CD86, CD3, CD14 und CD25 wurden bezogen von Pharmingen, San Diego, USA.

## 15. Präparation von zytosolischen Proteinextrakten

**[0155]** Zytosolische Extrakte wurden zur Untersuchung der biochemischen Ereignisse, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, mittels Western Blotting präpariert. Adhärenente Zellen wurden von der Gewebekulturplatte/Kolben in frisches PBS geschabt und mittels Zentrifugation (13.000 g für 10 Sekunden bei 4°C) geerntet. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch Zentrifugation ähnlich pelletiert und einmal mit frischem PBS gewaschen. Nach dem Weggießen der Überstände wurde eine entsprechende Menge an eiskaltem hypotonischen Lysepuffer (Whiteside S. T. et al. (1992). *Nucleic Acids Res.* 20: 1531–8) zugegeben, in Abhängigkeit von der Anzahl der zu lysierenden Zellen (50–100  $\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^6$  Zellen). Nach der

Inkubation auf Eis für 10 Minuten wurden die Lysate zentrifugiert (13.000 g, 5 Minuten, 4°C), um die Kerne und Zelltrümmer zu entfernen. Die klaren Lysate wurden dann in frische Röhrchen übertragen, eingefroren und bei –20°C für die nachfolgende Abschätzung der Proteinkonzentration und Verwendung im Western Blotting gelagert.

## 16. Präparation der nuklearen Proteinextrakte

**[0156]** Nukleare Proteinextrakte wurden präpariert, um die NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung und Translokation von dem Zytosol zu dem Nukleus und seine DNA-Bindungsfähigkeit zu untersuchen. Nach der Lyse der Zellen in hypotonischem Lysepuffer (siehe Abschnitt) wurden die Kerne durch Zentrifugation (13.000 g für 5 Minuten bei 4°C) pelletiert, einmal in hypotonischem Lysepuffer gewaschen, um kontaminierende zytosolische Proteine zu entfernen, und dann in hypertonischem Extraktionspuffer für 1–2 Stunden bei 4°C unter Bewegen resuspendiert. Hypotonischer Lysepuffer hindert die Proteine am Auswaschen aus dem Nukleus während der Lyse, wohingegen hypertonischer Extraktionspuffer die nukleare Membran porös macht, was den nuklearen Proteinen das Entkommen in die Lösung ermöglicht. Nach der Zentrifugation (13.000 g für 10 Minuten bei 4°C) wurden Überstände, die das nukleare Protein enthielten, in frische Röhrchen übertragen und bei –70°C gelagert. Diese Präparationsmethode der nuklearen Extrakte basiert auf der von Whiteside S. T. et al. (1992). *Nucleic Acids Res.* 20: 1531–8.

## 17. Immunpräzipitation

**[0157]** Für die Immunpräzipitation von IRAK wurden zytosolische Extrakte mit 3  $\mu\text{g}$  an Anti-IRAK-Antikörper für 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  an 50% Protein G-Sepharose-Aufschlammung (Amersham) zugesetzt und für weitere 2 h unter Schütteln stehen gelassen. Anschließend wurde an Protein G-Sepharose gebundene IRAK gesammelt, viermal gewaschen, in Western Blot-Ladepuffer resuspendiert, für 5 min gekocht und dann sofort für das Western Blotting verwendet.

## 18. Proteinkonzentrationsassay

**[0158]** Bevor die zytosolischen oder nuklearen Extrakte in irgendeinem weiteren experimentellen Verfahren (z. B. Western Blotting, elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Assays) verwendet wurden, war die Bestimmung ihrer Proteinkonzentration erforderlich, um sicherzugehen, dass äquivalente Mengen an Protein in jeder Probe vorhanden waren. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bradford-Assay bewertet. Kurz gesagt wurden 20  $\mu\text{l}$  der entsprechend verdünnten Extrakte in Triplikaten in eine 96-Well-Gewebekulturplatte, zusammen mit 20  $\mu\text{l}$  einer Reihe an BSA-Konzentrationen (Sigma, UK)

im Bereich von 10–1.000 µg/ml, die als ein Standard dienen sollten, zugesetzt. 200 µl des Bradford-Reagenz wurden dann jedem Well zugegeben, und die Absorbanz wurde bei 595 nm in einem Spektrophotometer (Multiscan Bichromatic, Labsystems) gemessen. Aus der linearen Standardkurve, die durch den Bereich der BSA-Konzentrationen gebildet wurde, wurden die Proteinmengen in den zytosolischen und nuklearen Extrakten bestimmt.

#### 19. Western Blotting und elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungs-Assay

**[0159]** Zytosolische Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf einem 10% (w/v) Polyacrylamidgel getrennt, gefolgt von dem Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen. IκBα und IRAK wurden unter Verwendung von Antikörpern detektiert, die von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) bzw. Upstate Biotechnology (USA) bezogen waren, wohingegen die phosphorylierten Formen von IκBα, p38 und p42/44 MAPK mittels Antikörpern von New England Biolabs detektiert wurden.

### ERGEBNISSE

#### 1. PSI hemmt die immunstimulatorische Funktion von DCs.

**[0160]** PSI ist ein Inhibitor der Proteosom-Aktivität und ist als solcher zur Hemmung eines induzierten IκB-Abbaus und der nachfolgenden NF-κB-Aktivierung fähig. Wir verwendeten PSI, um die Funktion von NF-κB in der Aktivität dendritischer Zellen (DC) insbesondere in Bezug auf die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen. Wir haben bereits zuvor gezeigt, dass PSI zur Hemmung der NF-κB-Aktivierung bei Konzentrationen von bis zu 1 µM fähig ist. Um die Wirkung von PSI auf die DC-Lebensfähigkeit zu testen, wurden reife DCs mit Konzentrationen an PSI im Bereich von 0,1 µM bis 5 µM inkubiert. Konzentrationen von > 5 µM zeigten eine gewisse Toxizität ([Fig. 1](#)), wie mittels der Propidiumiodid-(PI)-Färbemethode beurteilt, und so wurden funktionale Studien lediglich über den Bereich von 0,1 bis 2 µM vorgenommen, wobei 1 µM in den meisten Experimenten verwendet wurde. Um die Rolle des NF-κB in der DC-Funktion zu beurteilen, wurden reife DCs mit 0,3 µM, 0,5 µM oder 1 µM PSI für 3 Stunden inkubiert und die Zellen gewaschen. Da PSI ein aktiviertes Peptid ist, das irreversibel an die Proteosomen bindet, kann die Funktion der DCs über einen Zeitraum von 6 Tagen der MLR trotz des kurzen Zeitraums der Wirkstoffexposition ausgewertet werden.

**[0161]** Die Exposition von T-Zellen an mit PSI behandelte DCs (PSI-DC) in einem allogenen MLR-Assay wies eine grundlegende Wirkung auf die Reaktion der Lymphozyten auf, die mit der PSI-Konzentra-

tion titrierbar war. Es wurde festgestellt, dass zwar die Vorbehandlung der DCs mit PSI bei 0,1 µM keine nachweisbare Wirkung zeigte, doch 0,5 µM und 1 µM zu einem Versagen der T-Zellen, als Reaktion auf die Aktivierung hin zu proliferieren, führte ([Fig. 2](#)).

2. PSI vermindert die Oberflächenexpression von Molekülen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind.

**[0162]** T-Zellen in der MLR erkennen HLA Klasse II-Antigene, von denen HLA-DR das am reichlichsten vorhandene ist, weshalb seine Expression 6 Tage nach der PSI-Behandlung ausgewertet wurde. Eine minimale Wirkung (mittels FACS) auf DR wurde bei 0,1 µM PSI festgestellt, doch wurde eine größere Verminderung bei 1 µM gefunden ([Fig. 3](#)). CD86 ist das wichtigste kostimulatorische Molekül, das auf DCs exprimiert wird, und seine Expression war ebenfalls vermindert auf nahezu Hintergrund-Levels bei 1 µM PSI ([Fig. 3](#)).

3. Inhibierte MIR mit PSI-behandelten dendritischen Zellen wird durch IL-2 oder Anti-CD28-Antikörper nicht gerettet.

**[0163]** Es gibt zwei breite Möglichkeiten bezüglich des Mechanismus der geringen proliferativen Reaktion von T-Zellen auf PSI-DC. Eine davon ist, dass diese DCs nicht stimulatorisch sind und die T-Zellen aus diesem Grunde nicht reagieren. Die zweite ist, dass die T-Zellen durch Prozesse der Toleranz- oder aktiven Immunregulation aktiv "abgeschaltet" worden sind. Um einen Ansatz für die Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu finden, haben wir versucht, die T-Zellen mit IL-2 oder Anti-CD28 bei Konzentrationen von 2 ng/ml IL-2 oder 10 µg/ml Anti-CD28 zu stimulieren.

**[0164]** Das IL-2 oder Anti-CD28 wurde zu demselben Zeitpunkt hinzugefügt, zu dem die T-Zellen und DCs ausplattiert wurden. Die Proliferation wurde am Tag 6 ausgewertet und ergab, dass IL-2 eine sehr geringfügige Wirkung auf die Wiederherstellung der Proliferation zeigte, wobei diese allerdings unabhängig von der Anzahl der DCs und unabhängig von der PSI-Behandlung war ([Fig. 4a](#)).

**[0165]** Derselbe Grad der Immunstimulation wurde mit unbehandelten DCs erreicht ([Fig. 4b](#)). Anti-CD28 zeigte keine restorative Wirkung, die angesichts der Herabregulierung des Haupt-CD28-Liganden CD86 durch PSI erwartet worden war ([Fig. 3](#)). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit multiplen Mechanismen und führten so zu weiteren Experimenten.

4. Inhibition der DC-induzierten MLR durch mit PSI vorbehandelte DCs.

**[0166]** Eine Methode zum Nachweisen, ob PSI-DC

inhibitorische Effekte erzeugen, besteht im Züchten von T-Zellen mit einem Gemisch aus mit PSI-behandelten und -unbehandelten DCs. Waren die PSI-DC lediglich nicht-stimulatorisch, so sollten mit PSI behandelte DCs minimale Wirkungen auf die proliferative Reaktion zeigen. Allerdings wurde festgestellt, dass das Vorhandensein von lediglich 1/8 oder 1/4 PSI-DC zu einer 3–5-fachen Verminderung der Reaktion führte, wie aus dem Gefälle der proliferativen Reaktionskurven beurteilt ([Fig. 5](#)). Als nächstes untersuchten wir, ob die Exposition an PSI-DC eine langfristige Unempfindlichkeit in den T-Zellen induzieren würde. Die T-Zellen wurden an normale oder PSI-DCs exponiert, wie zuvor beschrieben, woraufhin die T-Zellen gesammelt wurden und mit einer DC für ein zweites Mal behandelt und die proliferative Reaktion gemessen wurde ([Fig. 6](#)). Die an normale DCs exponierten T-Zellen reagierten in beiden Fällen, und wie erwartet reagierten die T-Zellen nicht auf zwei Runden mit PSI-DC. Allerdings waren auch T-Zellen, die mit PSI-DC vor den normalen DCs stimuliert worden waren, zur Reaktion unfähig ([Fig. 6](#)). Dies würde darauf hinweisen, dass diese Wirkungen der Exposition an PSI-DC verlängert sind und dass die T-Zellen einen nicht-reaktiven oder anergen Zustand annehmen. Wie erwartet, versagten auch T-Zellen, die an PSI-DC bei der zweiten Runde nach den normalen DC exponiert wurden, darin, zu proliferieren.

5. Zellflächenoberflächenantigen-Analyse von T-Lymphozyten, die an PSI-behandelte dendritische Zellen exponiert wurden.

**[0167]** Um in den Mechanismus der Wirkung von PSI-behandelten DC vorzudringen, analysierten wir T-Lymphozyten nach 6-tägigen Kulturen. Wie angenommen, waren die Ausbeuten an T-Zellen geringer. Die Zelloberflächen-Expression von CD3 war vermindert. Am dramatischsten war jedoch die deutliche Verminderung der CD25-Expression, die im Vergleich zu den Kontrollen nahezu beseitigt war ([Fig. 7](#)).

**[0168]** Die Expression der an der Zelloberflächen-Adhäsion beteiligten Moleküle, wie etwa CD11a (LFA-1) und eines seiner Rezeptoren ICAM-1 CD54, wurde analysiert. Beide waren auf PSI-behandelte Lymphozyten vermindert, wobei CD54 bis zu einem ähnlichen Grade wie CD3 vermindert war, wohingegen die CD11a-Expression lediglich marginal reduziert war ([Fig. 7](#)).

6. Exposition von T-Zellen an PSI-DC führt zu der Produktion von IL-4, doch nicht von IL-2 oder IFN $\gamma$

**[0169]** Die Produktion von Zytokinen stellt eine der Schlüsselreaktionen von T-Zellen auf die Stimulierung mit DCs dar, wobei IL-2, IFN $\gamma$  und IL-4 exprimiert werden ([Fig. 8](#)). Wir haben daher untersucht,

welche Art von Reaktion auf der Exposition an PSI-DC hin eintritt. IL-2 und das Schlüssel-Th1-Zytokin, IFN $\gamma$ , wurden als Reaktion auf PSI-DC nicht produziert. Die Produktion von IL-4 blieb jedoch uneinträchtigt. Diese Daten würden nahe legen, dass PSI-DC zur Übertragung einiger Signale auf T-Zellen fähig sind. Dies würde unsere vorherige Beobachtung stützen, dass PSI-DC eine Art von unempfindlichem Zustand in den T-Zellen induziert, von dem angenommen wird, dass er ein aktives Signal erfordert.

7. DC-Produktion von TNF, nicht jedoch von IL-8, wird durch PSI inhibiert.

**[0170]** Wir untersuchten außerdem die Wirkung von PSI auf Zytokine, die durch die DCs auf eine MLR hin produziert werden. Die TNF-, und zu einem geringeren Umfang die IL-6-Expression, wurde von PSI-DC während der MLR inhibiert. Im Gegensatz dazu war die IL-8-Produktion uneinträchtigt ([Fig. 9](#)). Wie die Ergebnisse bezüglich der T-Zelle zeigt dies die diskriminierende Natur der PSI-Behandlung auf und weist darauf hin, dass NF- $\kappa$ B eine Rolle in der TNF- und IL-6-Expression, doch nicht in der von IL-8, spielt.

8. Aktivierung von DCs mit MEKK1 führt zu einer verstärkten MLR-Reaktion.

**[0171]** Da die Inhibition des NF- $\kappa$ B die Funktion der DCs hemmt, wurde die Wirkung einer potenziellen Aktivierung von DCs unter Verwendung von NF- $\kappa$ B-stimulierenden MEKK untersucht. Die Aktivierung kodierender MEKK1 wurde zum Infizieren der DCs bei einer MOI von 150:1 angewendet. Wenn in einer MLR angewendet, so waren diese MEKK1 DCs 4-mal aktiver als normale DCs ([Fig. 10](#)).

9. MyD88lpr aktiviert NF- $\kappa$ B

**[0172]** Wir haben festgestellt, dass ein potenter Induktor von NF- $\kappa$ B ein Mutein von MyD88 ist, das eine Deletion der ersten 53 Aminosäuren und eine Punktmutation Phe56Asn enthält, bezeichnet als MyD88lpr. MyD88lpr ist normalerweise für den Toll-like Rezeptor-Signalweg, zum Beispiel mit IL-1-Rezeptoren, inhibierend (1). Wir haben jedoch beobachtet, dass die Einführung von MyD88lpr durch adenovirale Vektoren in unreife DCs eine potente Aktivierung der nuklearen NF- $\kappa$ B-Aktivität induziert, die sechs Stunden nach der Infektion mit Admyd88, und noch stärker 24 Stunden nach der Infektion, detektierbar ist ([Fig. 11](#)).

10. MyD88lpr induziert die TNF-Produktion durch unreife DCs

**[0173]** Wie mit MEKK1 waren wir daran interessiert, zu sehen, ob MyD88lpr ebenfalls die DC-Funktion aktivieren würde. Die Infektion der unreifen DCs mit Admyd88lpr führte zur spontanen Produktion von

TNF durch die Zellen 24 Stunden nach der Infektion. Darüber hinaus zeigte MyD88lpr keine inhibierende Wirkung auf die LPS-induzierte TNF-Produktion. MyD88wt induzierte die TNF-Produktion in DCs nicht ([Fig. 12](#)).

#### 11. MyD88lpr erhöht die Antigenpräsentation durch DCs

**[0174]** Da die Inhibition von NF- $\kappa$ B die Funktion der DCs hemmt, wurde die Wirkung einer potenten Aktivierung der DCs unter Verwendung des NF- $\kappa$ B-stimulierenden MyD88lpr untersucht. Unreife DCs wurden mit AdMyd88lpr (das auch GFP exprimiert), AD0 oder AdGFP (grün fluoreszierendes Protein) infiziert. Nach 24 Stunden wurden verschiedene Konzentrationen der infizierten DCs mit  $2 \times 10^4$  GFP Antigen-spezifischen T-Zellen gezüchtet und die Reaktion als Proliferation der T-Zellen nach drei Tagen gemessen. Die Übertragung von GFP auf dendritische Zellen induzierte eine Antigen-spezifische T-Zellproliferation, die durch MyD88lpr erhöht war ([Fig. 14](#)). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der TNF-Produktion durch Myd88lpr, wie in den vorausgegangenen Figuren gezeigt ([Fig. 11](#) und [Fig. 12](#)).

#### 12. Myd88lpr verstärkt auch die DC-induzierte allogene gemischte Lymphozytenreaktion (MIR)

**[0175]** Ein weiterer Test des Effekts der Aktivität von NF- $\kappa$ B auf die Funktion von DC bestand in der Untersuchung der MLR-Response. Unreife DCs wurden mit AD0 und Admyd88lpr infiziert, und nach 48 Stunden wurden abgestufte Dosen der infizierten DCs mit  $10^5$  allogenen T-Zellen gezüchtet und die Reaktionen als Proliferation nach sechstägiger Kultur gemessen. Die Infektion mit Admyd88lpr verstärkt die MLR-Response gegenüber der von AD0 oder uninfizierten Zellen. Dies war bei geringeren DC-Zahlen am deutlichsten bemerkbar, wenn die Reaktion der Kontrollen lediglich gleich der von T-Zellen alleine war, bei denen die MyD88lpr-exprimierende DC-Response höher war ([Fig. 15](#)).

#### 13. MyD88lpr-Expression erhöht die Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86.

**[0176]** Die Expression der Zelloberflächenmoleküle CD80 und CD86 ist für die Antigenpräsentierende Funktion von DC wichtig. In [Fig. 16](#) zeigen wir, dass die Expression von MyD88lpr in DC (durch adenovirale Infektion) die Expression sowohl von CD80 als auch CD86 erhöhte, wenn verglichen zu uninfizierten DCs oder mit Kontroll-Virus infizierten Zellen.

#### 14. MyD88lpr aktiviert auch andere signalgebende Moleküle über NF- $\kappa$ B hinaus.

**[0177]** Wir haben gezeigt, dass MyD88lpr ein poten-

ter Induktor von NF- $\kappa$ B ist. Wir haben auch beobachtet, dass dieses Molekül weitere Signalwege, diesmal in Makrophagen, wie etwa p38 MAPK, eine Kinase, die bekanntermaßen an Zellmechanismen wie der Kontrolle der Zytokin-Expression beteiligt ist, aktivieren konnte ([Fig. 17](#)). Darüber hinaus aktivierte MyD88lpr in Makrophagen auch IRAK1, ein Schlüsselement der TRL- und IL-1R-signalgebenden Mechanismen ([Fig. 18](#)).

### LITERATURNACHWEISE

1. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. di Marco, L. French und J. Tschopp. 1998. MyD88, an adapter Protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 273, Nr. 20: 12203.

### DISKUSSION

**[0178]** Die Behandlung der DC mit PSI, einem Proteosominhibitor, bei Konzentrationen, die zur Blockierung der Induktion von NF- $\kappa$ B fähig sind, wurde als die proliferative Reaktion in der MLR reduzierend gezeigt. Dies legt nahe, dass die NF- $\kappa$ B-Funktion in der Stimulierung von ungeprimten T-Zellen in der MLR beteiligt ist. Da die Spezifität von PSI für das Proteosom besteht, könnte es folglich die Funktion anderer Transkriptionsfaktoren potenziell beeinträchtigen, obschon dies in den ursprünglichen Veröffentlichungen nicht berichtet wurde, die die Wirkung dieses Wirkstoffs beschrieben (Traenckner et al. (1994) *EMBO J.* 13, 5433–5441; Traenckner & Baeuerle (1995) *J. Cell. Sci. Suppl.* 19, 79–84 und Haas et al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63, 395–404). Weitere unabhängige Experimente zur Verifizierung der Rolle von NF- $\kappa$ B unter Anwendung anderer Ansätze werden erforderlich sein, und wir haben Studien unter Anwendung einer Infektion der DCs mit einem Adenovirus, das I $\kappa$ B $\alpha$  unter der Kontrolle des CMV-Promotors überexprimiert, eingeleitet. Diese I $\kappa$ B $\alpha$ -Überexpression hemmt NF- $\kappa$ B, und hemmt außerdem die Antigen-präsentierende Funktion der dendritischen Zellen (Yoshimura et al., unveröffentlichte Daten), was mit den hierin vorgestellten Daten kompatibel ist.

**[0179]** Der Mechanismus der PSI-behandelten DC-reduzierten Immunogenität wurde auf verschiedenen Ebenen ausgewertet und es stellte sich heraus, dass vielfache Aspekte der Antigen-präsentierenden Zellfunktion in DCs herabreguliert waren. Zunächst sind die Wirkungen auf die Expression der Zelloberflächenmoleküle, durch die DCs die T-Zellen stimulieren, untersucht worden, und eine deutliche Verminderung in der Expression von HLA-DR und CD86, beides Moleküle, die sowohl für die Antigenerkennung als auch die CD28-Aktivierung wichtig sind, wurde festgestellt. Reduktionen in von DCs abgeleiteten Zytokinen, wie etwa IL-12 und TNF $\alpha$ , die beide bekanntermaßen für die frühe Aktivierung von T-Zel-

len wichtig sind, wurden ebenfalls festgestellt. Im Gegensatz dazu war die Produktion anderer Zytokine, wie etwa IL-6 oder IL-8, in T-Zell/DC-Cokulturen nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass PSI-behandelte DC eine verminderte Expression aller drei Hauptklassen von Molekülen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind – dem Ziel der T-Zell-Erkennung (HLA-DR), den kostimulatorischen Molekülen (CD86) als auch den immunstimulatorischen Zytokinen (IL-12 und TNF $\alpha$ ) – zeigen.

**[0180]** Weitere Fragen bezüglich des Mechanismus des Fehlens der T-Zell-proliferativen Reaktion wurden aufgenommen. Es könnte einfach am Fehlen der Immunogenität der DCs liegen, oder alternativ könnte es an der Induktion einer Form von immunologischer Toleranz oder der Immunregulation liegen. Der Mechanismus wurde durch Cokultur-Experimente weiter analysiert, indem PSI-behandelte DCs zu unbehandelten DCs gegeben wurden, und die Wirkung des Gemischs auf ungeprimte T-Zellen in der MLR analysiert wurde. Es wurde festgestellt, dass dann, wenn lediglich 1/8 (12,5%) PSI-behandelte DCs zu unbehandelten DCs gegeben werden, eine signifikante Verminderung in der Dosis-Wirkungs-Kurve der Proliferation vorliegt, die äquivalent zu 3–5-mal weniger aktiven DCs ist. Dieses Ergebnis, ebenso wie die Tatsache, dass IL-2 und Anti-CD28 darin versagten, diese T-Zellen zu stimulieren (Daten nicht gezeigt), zeigt auf, dass eine inhibitorische (immunmodulatorische) Wirkung von PSI-behandelten DCs auf die T-Zell-Funktion vorliegt. Außerdem induzierte die Exposition von T-Zellen an mit PSI vorbehandelte DCs grundlegende Veränderungen in der Expression der T-Zell-Oberflächenmarker, wie am Tag 6 der Cokultur analysiert: es lag eine reduzierte Expression von DC3 vor, nahezu beseitigte CD25 und eine gewisse Reduktion der ICAM-1 und LFA-1. Ähnliche Wirkungen wurden in einer Vielfalt von Toleranzmodellen berichtet, Zanders et al. (1983) *Nature* 303, 625–627; Zanders et al. (1985) *J. Immunol.* 15, 302–305; Park et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 15, 302–305; und Waldmann & Cubbold (1998) *Ann. Rev. Immunol.* 16, 619–644, und so fragten wir, ob PSI-behandelte DCs eine immunologische Toleranz induzierten. Dies wurde ausgewertet, indem zunächst allogene T-Zellen an PSI-behandelte DCs für 2 Tage exponiert und dann entfernt wurden, indem ein „Panning“ mit Anti-CD83 und Anti-CD86 vorgenommen wurde. Die T-Zellen wurden dann für 4 Tage an normale DCs/oder PSI-behandelte DCs von demselben Spender exponiert, und ihr Versagen im Ansprechen bedeutet den Nachweis, dass eine zumindest „lang anhaltende“ (4–6 Tage) immunologische Toleranz induziert worden ist. Die formale Definition von Toleranz umfasst die „Antigen-Spezifität“, die bei dieser Art von Experiment nicht formal getestet werden konnte, die aber später in einer unabhängigen Reihe von Experimenten unter Verwendung von T-Zelllinien, die auf ein lösliches Antigen, Tetanus-To-

xoid, ansprechen, verifiziert worden ist (Calder et al., unveröffentlichte Daten). Der Ausdruck „immunologische Toleranz“ ist in diesem Zusammenhang jedoch angemessen, da eine nochmalige Provokation mit DCs von demselben Spender vorgenommen worden ist.

**[0181]** In einem anderen Satz von Experimenten wurde die Funktion der T-Zellen, die an PSI-behandelte DCs exponiert wurden, weiter ausgewertet. Die T-Zell-Zytokinproduktion war deutlich verändert. Somit war die IL-2-Produktion um mehr als 90% gehemmt, ebenso wie die IFN $\gamma$ -Produktion, Befunde, die ebenfalls mit der Induktion der Toleranz kompatibel sind. IL-2 und IFN $\gamma$  sind „Th1“-Zytokine, da von Interesse war, dass die Expression des „Th2“-Zytokins, IL-4, nicht verändert war. Dies legt nahe, dass die Induktion der immunsuppressiven Wirkung/Toleranz, wie durch PSI-behandelte DCs induziert, durch das Th1-Subset restringiert werden kann. Weitere Studien mit gereinigten Th1- und Th2-T-Zellen sind erforderlich, um diesen Punkt zu klären.

**[0182]** Die hierin berichteten Studien, und weitere Experimente unter Verwendung eines Adenovirus, das den endogenen NF- $\kappa$ B-Induktor I $\kappa$ B $\alpha$  überexprimiert (Yoshimura et al., unveröffentlichte Daten), zeigen, dass NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Regulierung der Antigenpräsentation spielt. Dies passt gut mit dem früheren Befund zusammen, dass NF- $\kappa$ B für die DC-Reifung essenziell ist, Rescigno et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 2175–2180. Dies stimmt auch mit dem Konzept überein, dass NF- $\kappa$ B der Hauptmechanismus ist, mittels dessen eine angeborene Immunität in eine spezifische Immunität translatiert wird. Das so genannte „Gefahrssignal“, welches das Immunsystem aktiviert, Matzinger (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12, 991–1045; Janeway et al. (1996) *Curr. Biol.* 6, 519–522, und das über eine breite Vielfalt mikrobieller oder anderweitig gesundheitsschädlicher Agenzien aktiviert wird, scheint daher die Aktivierung von NF- $\kappa$ B einzubeziehen. Dies ist für LPS bereits bewiesen worden, welches TLR4 zum Induzieren der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfordert, Chow et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 10689–10692.

**[0183]** Im Zusammenhang mit der Regulierung der Antigenpräsentation ist es beachtenswert, dass alle 3 Aspekte, die Expression des Ziels für die T-Zellen (MHC), kostimulatorische Moleküle (CD86) als auch das Induzieren von Zytokinen (IL-12, TNF $\alpha$ ) allesamt koordiniert durch NF- $\kappa$ B reguliert werden. Dies führt zu der offensichtlichen Voraussage, dass Wirkstoffe, die NF- $\kappa$ B blockieren (wie PSI), nützliche immunsuppressive Agenzien in vivo sein können, was eindeutig von ihrem Toxizitätsprofil abhängt. PSI wird wahrscheinlich zu toxisch für die systemische Anwendung sein, könnte aber nichts desto trotz zum Perfundieren von Zielorganen, wie etwa Nieren, nützlich sein, um die APC-Funktion vor der Transplantation zu blockie-

ren. Eine interessante Folge aus dieser Arbeit ist, dass die bewusste Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine gute Strategie für einen nützlichen Adjuvans-Effekt für Impfstoffe liefern könnte. Experimente zur Testung dieser Hypothese sind im Gange.

**[0184]** Weitere Studien sind im Gange, um den exakten Mechanismus weiter zu analysieren, mittels dessen PSI-behandelte DCs die T-Zellfunktion beeinflussen:

1. Eine Blockierung von NF- $\kappa$ B in Antigen-präsentierenden Zellen ist für die T-Zellfunktion unter Verwendung von PSI oder anderen Proteosominhibitoren, z. B. anderen Inhibitoren von NF- $\kappa$ B, z. B. cDNA-Inhibitoren wie I $\kappa$ B, Antisense zu NF $\kappa$ B, Wirkstoffinhibitoren wie ..., inhibitorisch.
2. Blockierung von NF- $\kappa$ B in DCs induziert eine Toleranz in T-Zellen.
3. Verwendung von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren in der:
  - Autoimmunität
  - Transplantation
  - Allergie
4. Folgerichtigkeit – wenn die NF- $\kappa$ B-Inhibition die Antigenpräsentation blockiert und die Toleranz fördert, dann wird die NF- $\kappa$ B-Stimulierung die Antigenpräsentation herauf regulieren. Dies kann in einer Anzahl möglicher Weisen erreicht werden, wie etwa der Aktivierung von Wegen, die NF- $\kappa$ B stimulieren, um eine Vakzination zu verstärken. Diese beziehen die Verwendung von Adenoviren oder anderen Gentransfervektoren von MEKK1, NIK, IKK2, dominant-negativen Mutanten von MyD88, TRAF2, TRAF6, ein. Diese Sequenzen könnten in dasselbe genetische Konstrukt aufgenommen werden wie jenes, das für das Antigen kodiert, gegen welches die Immunisierung gewünscht wird. Die NF- $\kappa$ B-Stimulierung kann auch in der Modulierung der Immunantwort in einem allergischen Patienten nützlich sein, um das TH1:TH2-Reaktionsgleichgewicht zu einer TH1-Reaktion hin zu verlagern.

**[0185]** Wir glauben, dass die Ergebnisse zeigen, dass PSI einen anergen Zustand in DCs erzeugt. Das heißt, der Wirkstoff induziert einen lang anhaltenden Zustand der Unansprechbarkeit der DCs gegenüber Antigenen.

**[0186]** Die Konsequenz aus den obigen Beobachtungen ist, dass durch Aktivieren eines intrazellulären Signalweges, wie etwa NF- $\kappa$ B, in DCs, die Zelle aktiviert und die Antigen-präsentierende Funktion verstärkt werden würde. Wir haben dies unter Verwendung der NF- $\kappa$ B-aktivierenden intrazellulären Signalmoleküle MEKK1 und MyD88lpr getestet. MEKK1 ist zuvor als ein Aktivator von NF- $\kappa$ B unter anderen Wegen beschrieben worden und die Einführung von MEKK1 in DCs unter Verwendung von adenoviralen Vektoren induzierte die Aktivierung der DC-Funktion, wie mittels MLR gemessen.

**[0187]** Wir haben außerdem beobachtet, dass ein Mutein von MyD88, MyD88lpr, normalerweise ein Inhibitor der Signalgebung durch TLR und IL-1-Rezeptoren, ebenfalls NF $\kappa$ B in DCs aktivierte. Wenn in DCs exprimiert, verstärkte MyD88lpr die Antigenpräsentierende Funktion von DCs, wie mittels MLR gemessen, oder unter Verwendung von Antigen-spezifischen T-Zellen als auch der Induzierung der Zytokin-Produktion. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, dass in Assoziation mit Antigenen die intrazellulären Signalmoleküle, wie NF- $\kappa$ B, als potente Adjuvantien wirken können. Dies könnte einen neuen Ansatz für das Impfstoff-Design liefern. Die Tatsache, dass MyD88lpr auch p38 MAPK aktiviert, würde implizieren, dass andere Signalmoleküle, die DCs aktivieren, ebenfalls zu diesem Zweck verwendet werden könnten.

### Patentansprüche

1. Verwendung (a) eines NF- $\kappa$ B-Induktors oder eines Vektors, umfassend Nukleinsäure, die für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, der operativ geknüpft ist an regulatorische Elemente, die für die Expression der Nukleinsäure erforderlich sind, und (b) eines antigenen Moleküls oder Polynukleotids, das für ein antigenes Molekül kodiert, für die Herstellung von Medikament(en) zur Stimulierung der Antigenpräsentierung oder Stimulierung einer Immunantwort.
2. Verwendung nach Anspruch 1 für die Behandlung einer Infektionskrankheit oder einer Krebsform.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Induktor ausgewählt ist aus MEKK1, NIK, IKK2, TRAF2, TRAF5, TRAF6, TAK, einer dominant-negativen Mutante von Myd88, TP L-2, IRAK, Toll-Rezeptoren und Rel B, und Fragmenten oder Proteinen davon, die zur Induzierung von NF- $\kappa$ B fähig sind.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Vektor ein Adenovirus oder Lentivirus ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Induktor in Form einer DNA-Vakzine vorliegt.
6. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Induktor auf Antigen-präsentierende Zellen (APCs) oder Vorläufer davon zielgerichtet wird.
7. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Medikament APCs oder Vorläufer davon umfasst, die dem Induktor in vitro ausgesetzt werden.
8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei die APCs dendritische Zellen sind.

9. Polynukleotid, das ein antigenes Molekül und einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert.

10. Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül, umfassend (1) einen modulierenden Abschnitt, der einen NF- $\kappa$ B-Induktor umfasst oder kodiert, und (2) einen antigenen Abschnitt, der ein antigenes Molekül umfasst oder kodiert.

11. Verwendung, Polynukleotid, Kit-of-parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das antigene Molekül ein Epitop umfasst, das auf transformierten oder kanzerösen Zellen oder auf einem pathogenen Organismus, oder auf einer Zelle, die durch einen pathogenen Organismus infiziert ist, oder in einem Polypeptid, das bei Alzheimer-Krankheit oder einer spongiformen Enzephalopathie exprimiert wird, vorhanden ist.

12. Impfstoff, geeignet zur Verwendung gegen Krebs- oder Tumorzellen, oder gegen einen pathogenen Organismus oder eine mit einem pathogenen Organismus infizierte Zelle oder Alzheimer-Krankheit oder eine spongiforme Enzephalopathie, welcher Impfstoff eine wirksame Menge eines NF- $\kappa$ B-Induktors oder eines Polynukleotids, das für einen NF- $\kappa$ B-Induktor kodiert, umfasst, und außerdem umfassend ein Antigen oder Polynukleotid, das für ein Antigen kodiert, mit einem Epitop, das auf den Krebs- oder Tumorzellen, oder dem pathogenen Organismus oder der mit einem pathogenen Organismus infizierten Zelle vorhanden ist oder in einem Polypeptid, das mit Alzheimer-Krankheit oder einer spongiformen Enzephalopathie assoziiert ist, vorhanden ist.

13. Impfstoff nach Anspruch 12, wobei der Impfstoff eine Nukleinsäure-Vakzine ist.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Impfstoff nach Anspruch 12 oder 13, ein Polynukleotid, Kit-of parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül nach einem der Ansprüche 9 bis 11 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

15. Impfstoff, Polynukleotid, Kit-of Parts, Zusammensetzung oder chimäres Molekül nach einem der Ansprüche 9 bis 13 zur Verwendung in der Medizin.

16. Methode zur Herstellung eines Medikaments, das zur Abtötung von Zielzellen in einem Patienten geeignet ist, welche Zielzellen atypischerweise ein Epitop exprimieren, umfassend die Schritte des Kontaktierens, ex vivo, von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs), die von einem Patienten erhalten sind, mit (1) einem NF- $\kappa$ B-Induktor, und (2) dem Epitop oder einem Polynukleotid oder einem Expressionsvektor, der das Epitop kodiert.

17. Methode nach Anspruch 16, wobei die Zielzellen Krebszellen sind.

18. Verwendung eines Impfstoffs, Polynukleotids, Kit-of Parts, Zusammensetzung oder chimären Moleküls nach einem der Ansprüche 9 bis 13 in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Säugers, der der Stimulierung einer Immunantwort bedarf und/oder der einer Behandlung einer Infektionskrankheit oder von Krebs oder Alzheimer-Krankheit oder einer spongiformen Enzephalopathie bedarf.

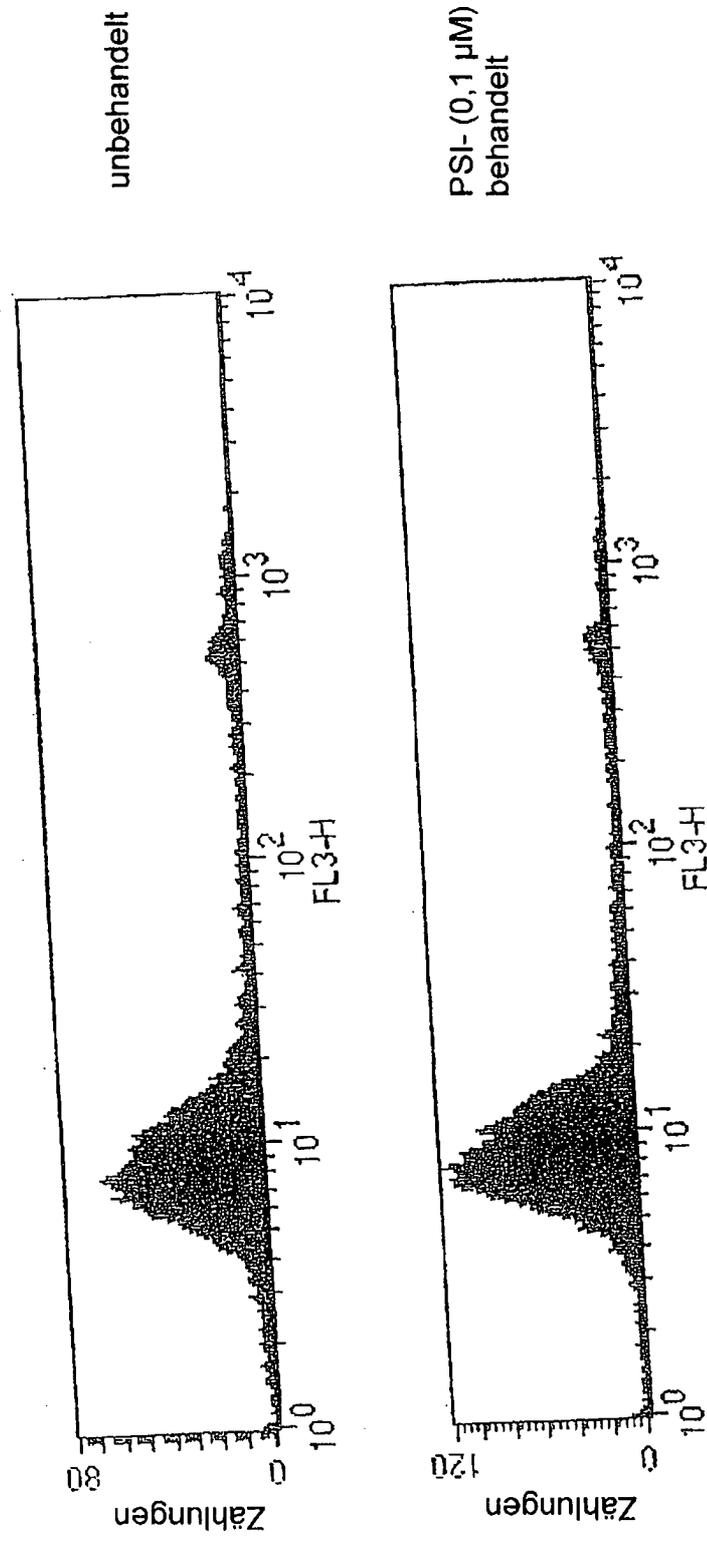
19. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung eines Patienten, der der Stimulierung der Reifung und Aktivierung von APCs bedarf.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Medikament für die Verabreichung an einen Menschen geeignet ist.

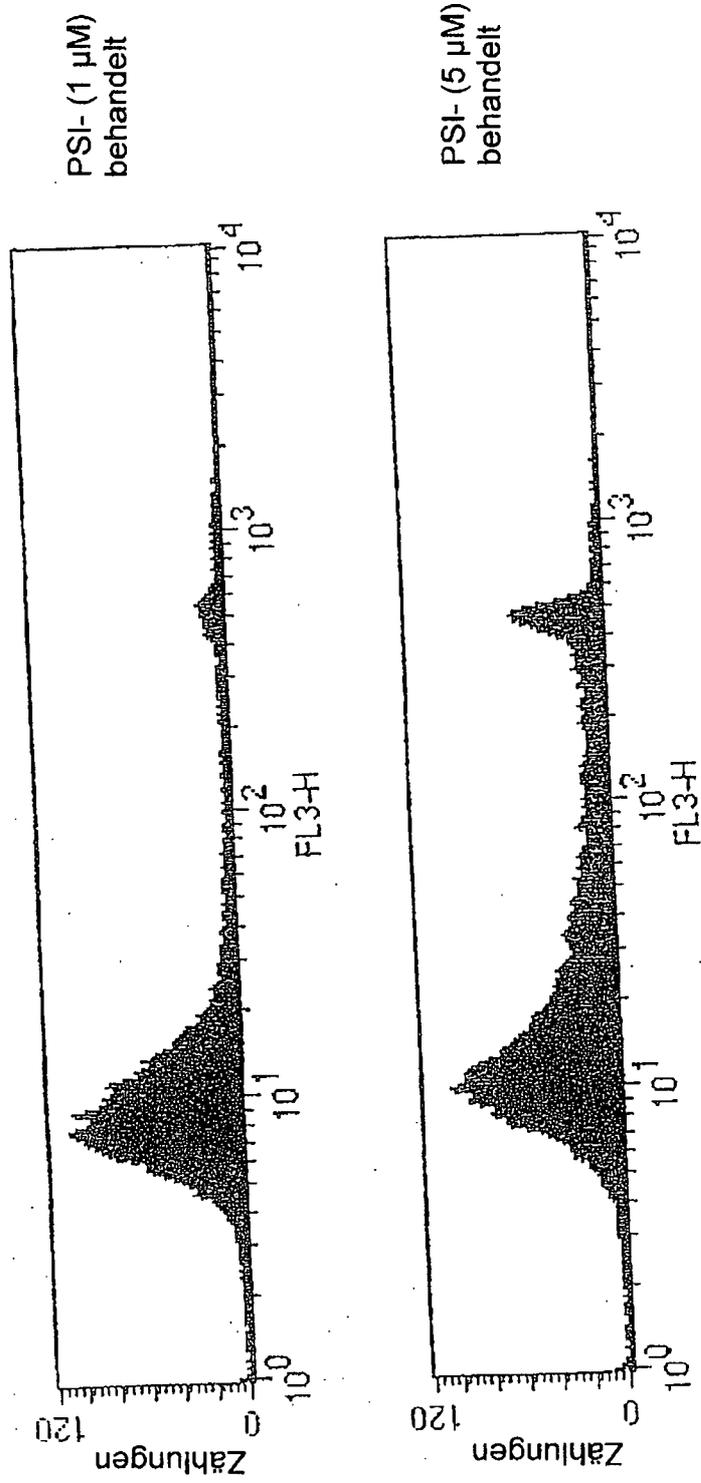
21. Methode nach Anspruch 16 oder Verwendung nach Anspruch 19, wobei die APCs dendritische Zellen sind.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

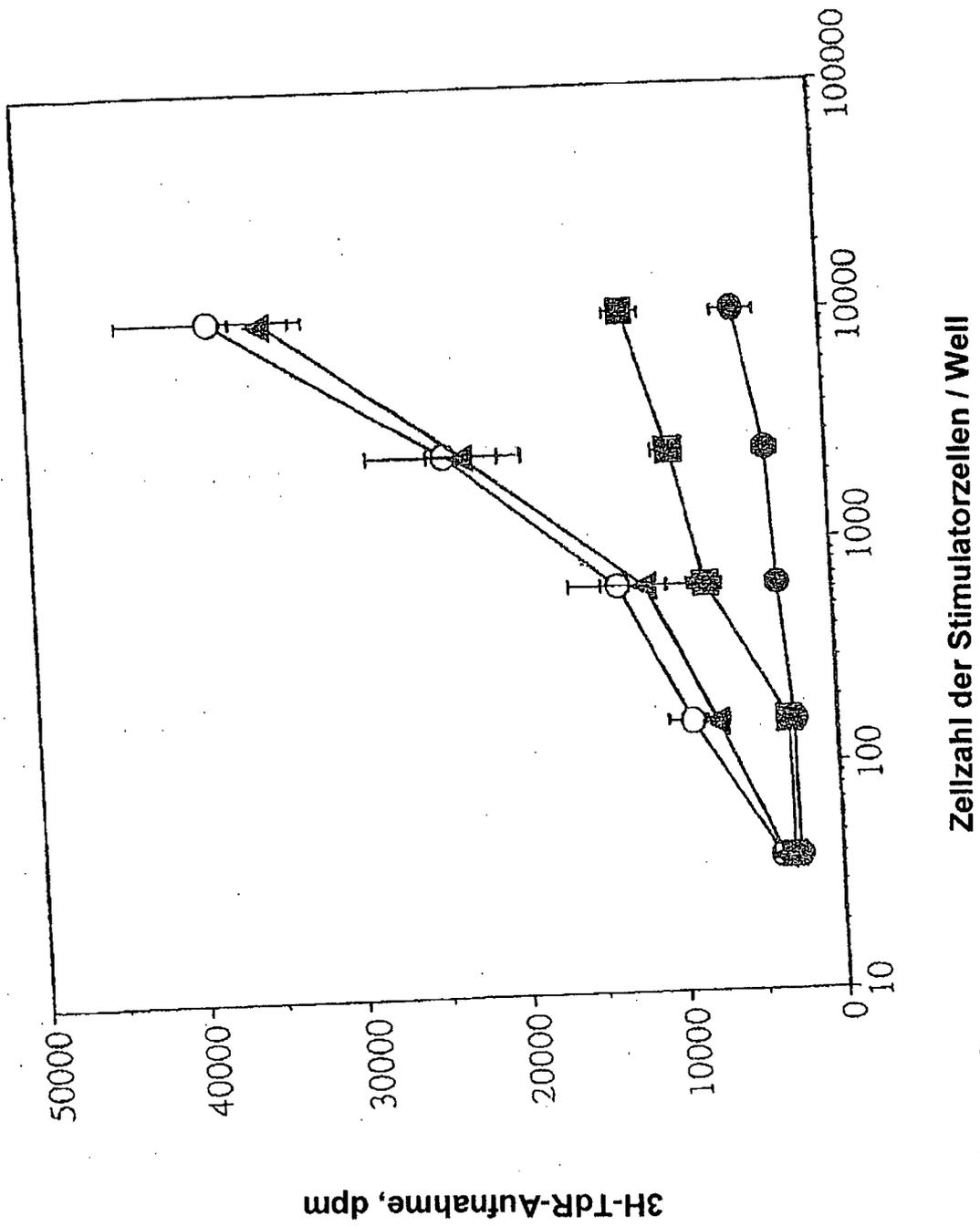
Anhängende Zeichnungen



Figur 1 (Seite 1 von 2)

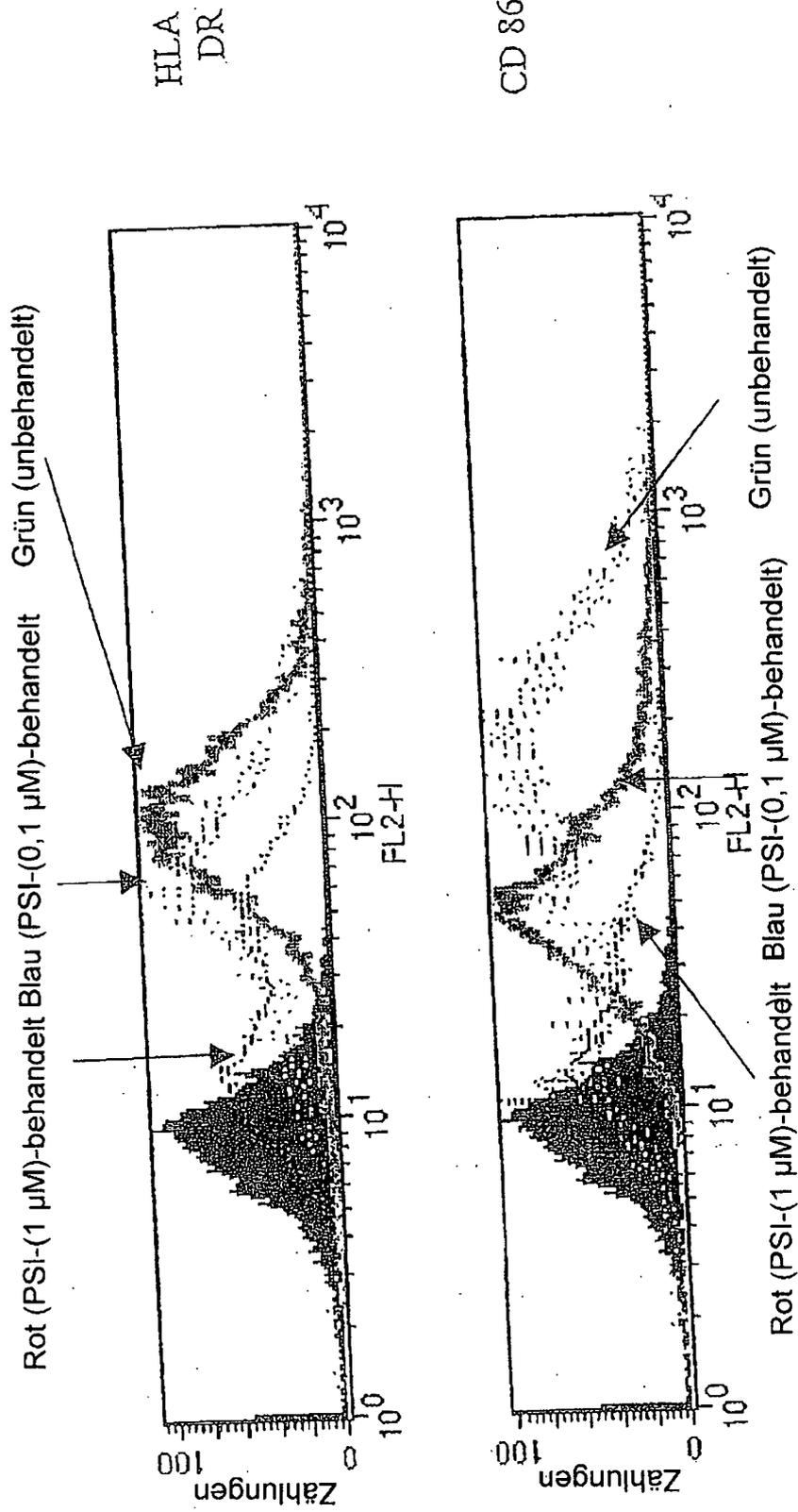


Figur 1 (Seite 2 von 2)



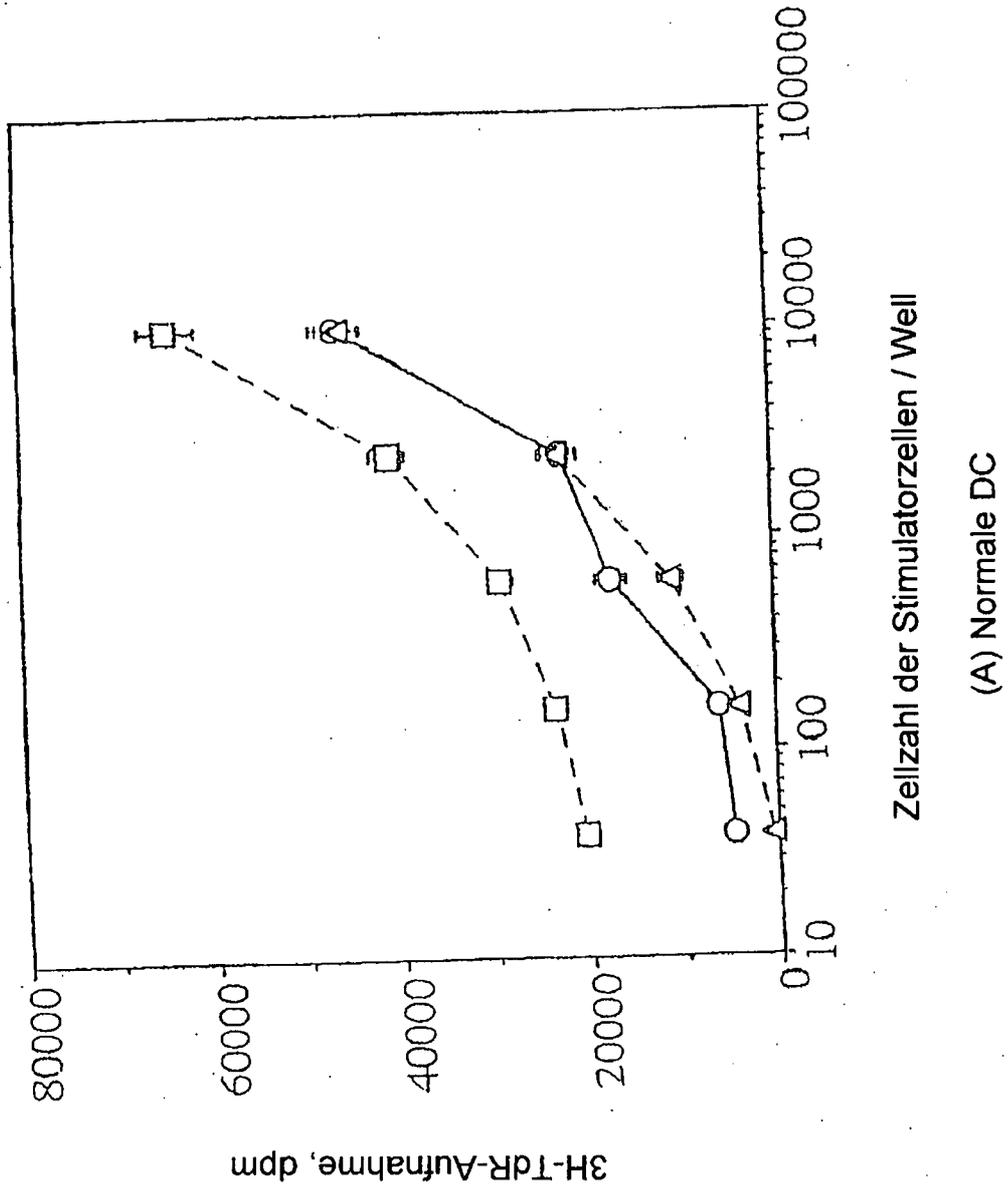
Figur 2

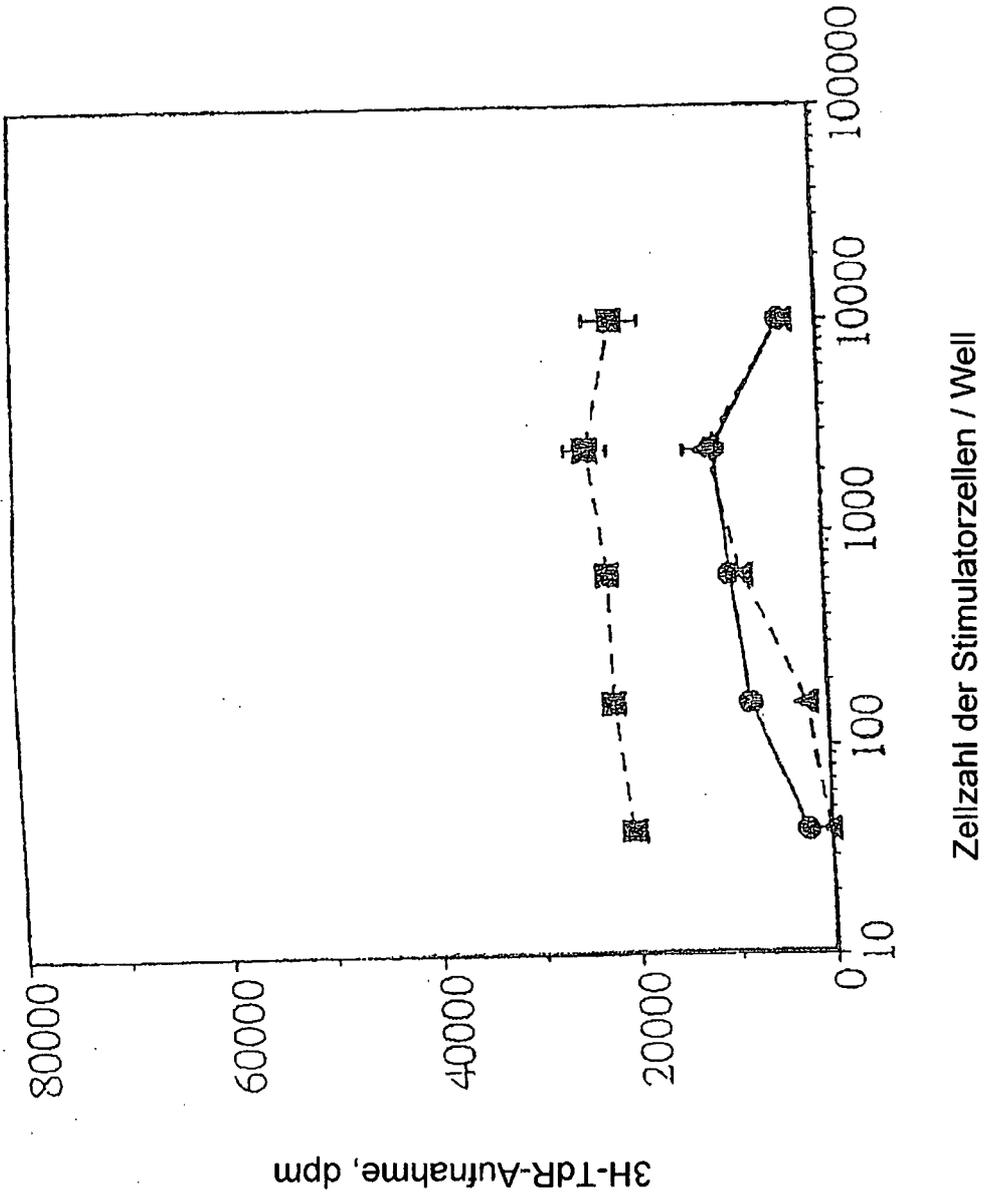
**Wirkung von PSI auf die Expression der Oberflächenantigene**



Figur 3

Figur 4 (Seite 1 von 2)

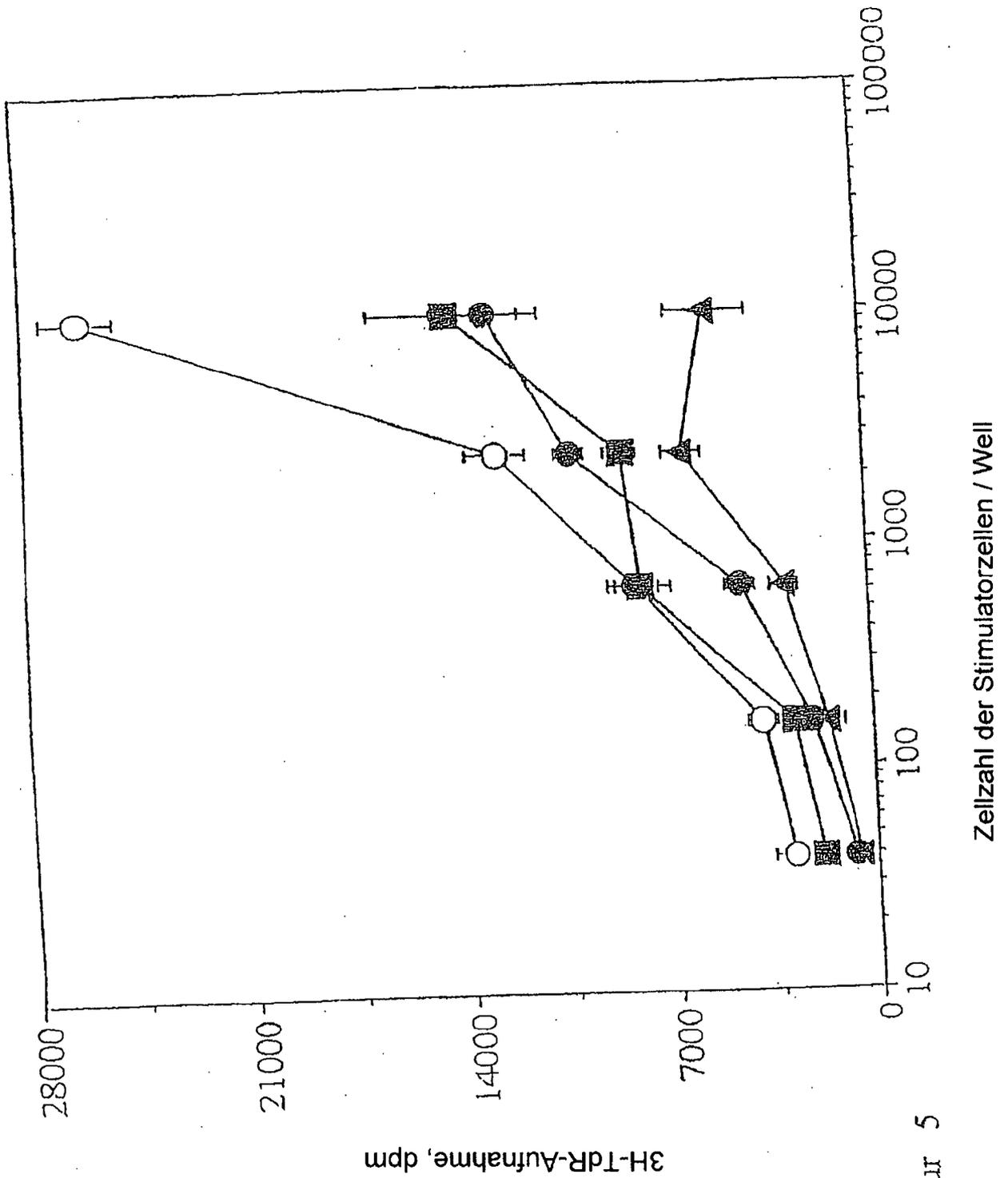




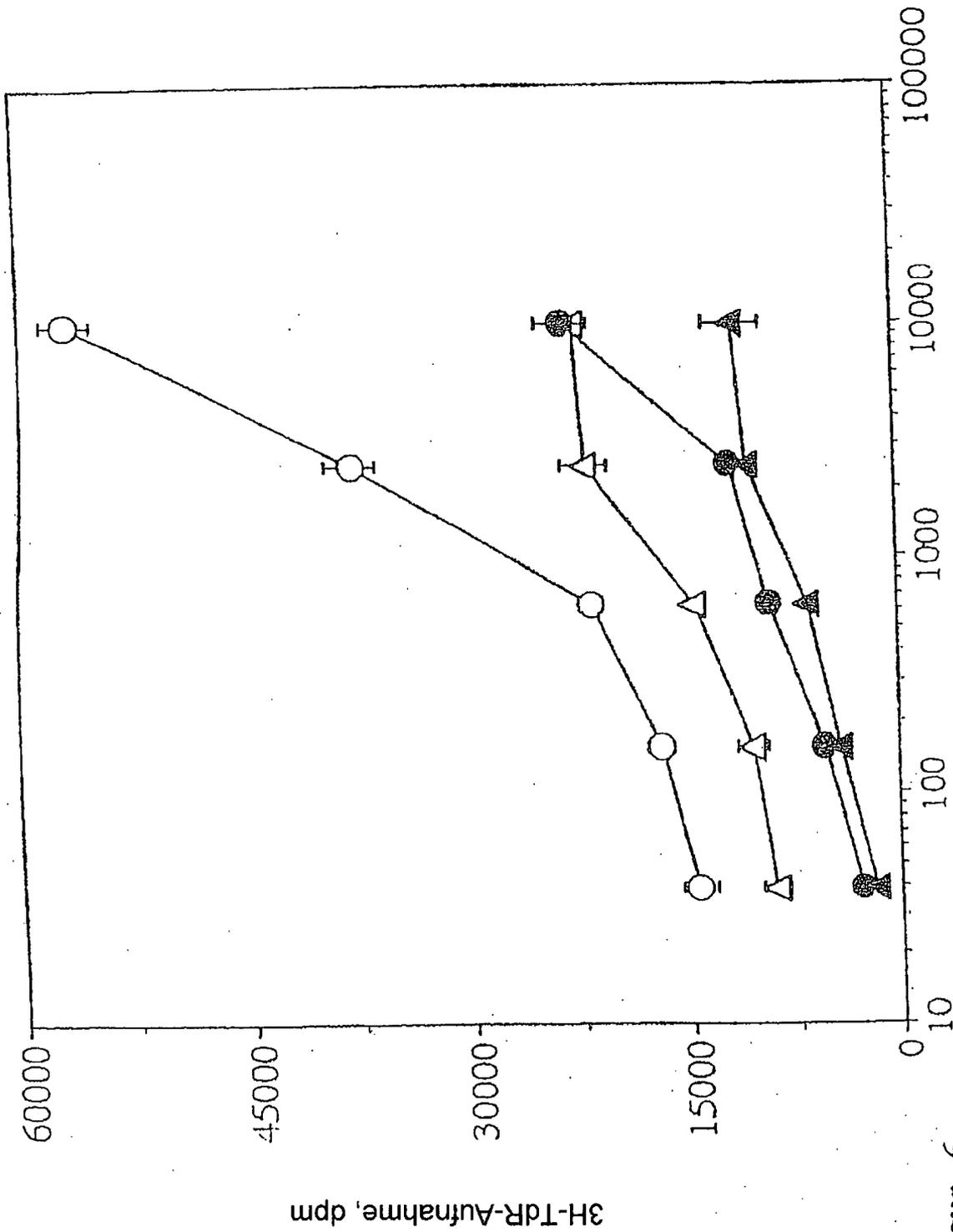
Figur 4

(Seite 2 von 2)

(B) PSI-vorbehandelte DC

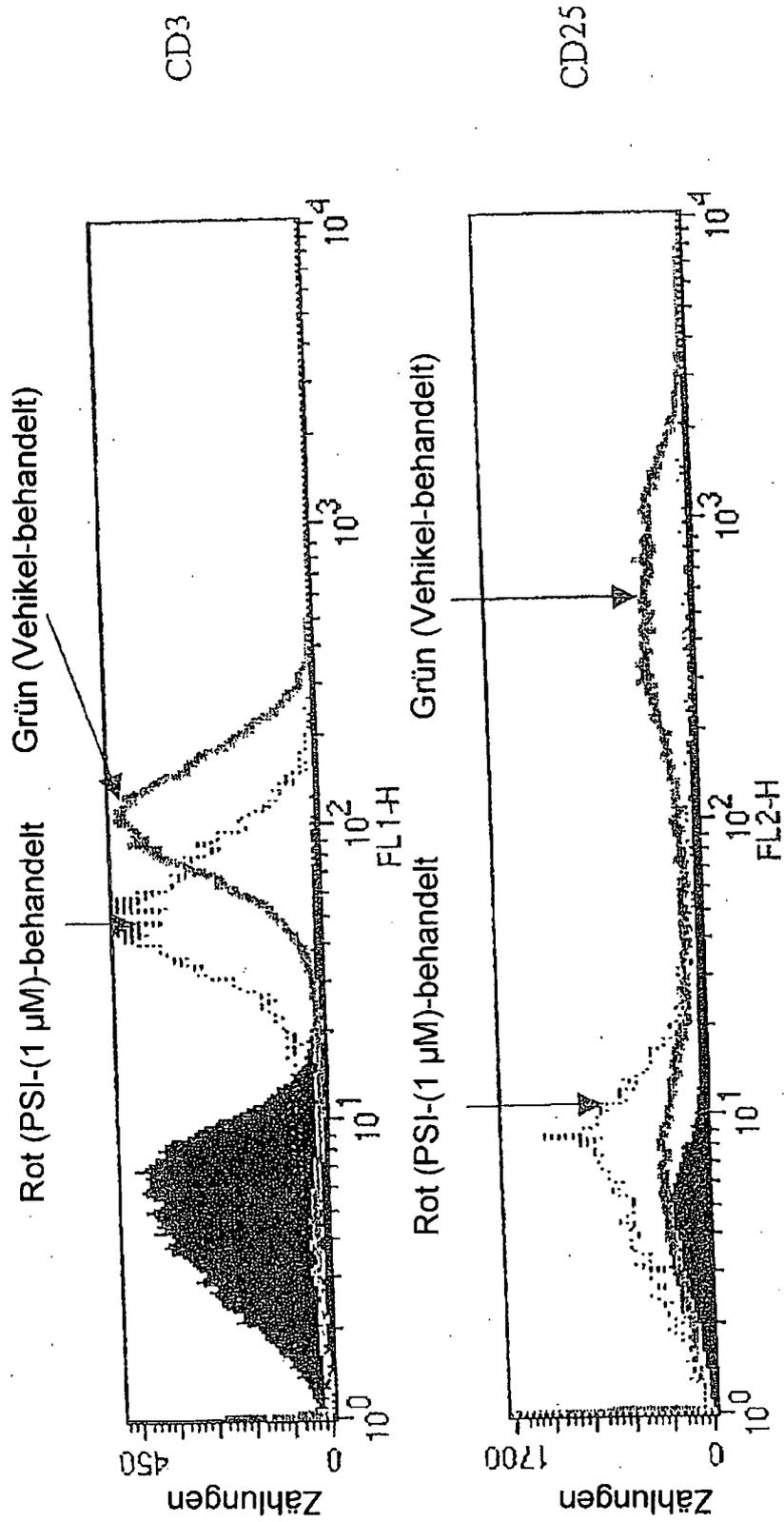


Figur 5



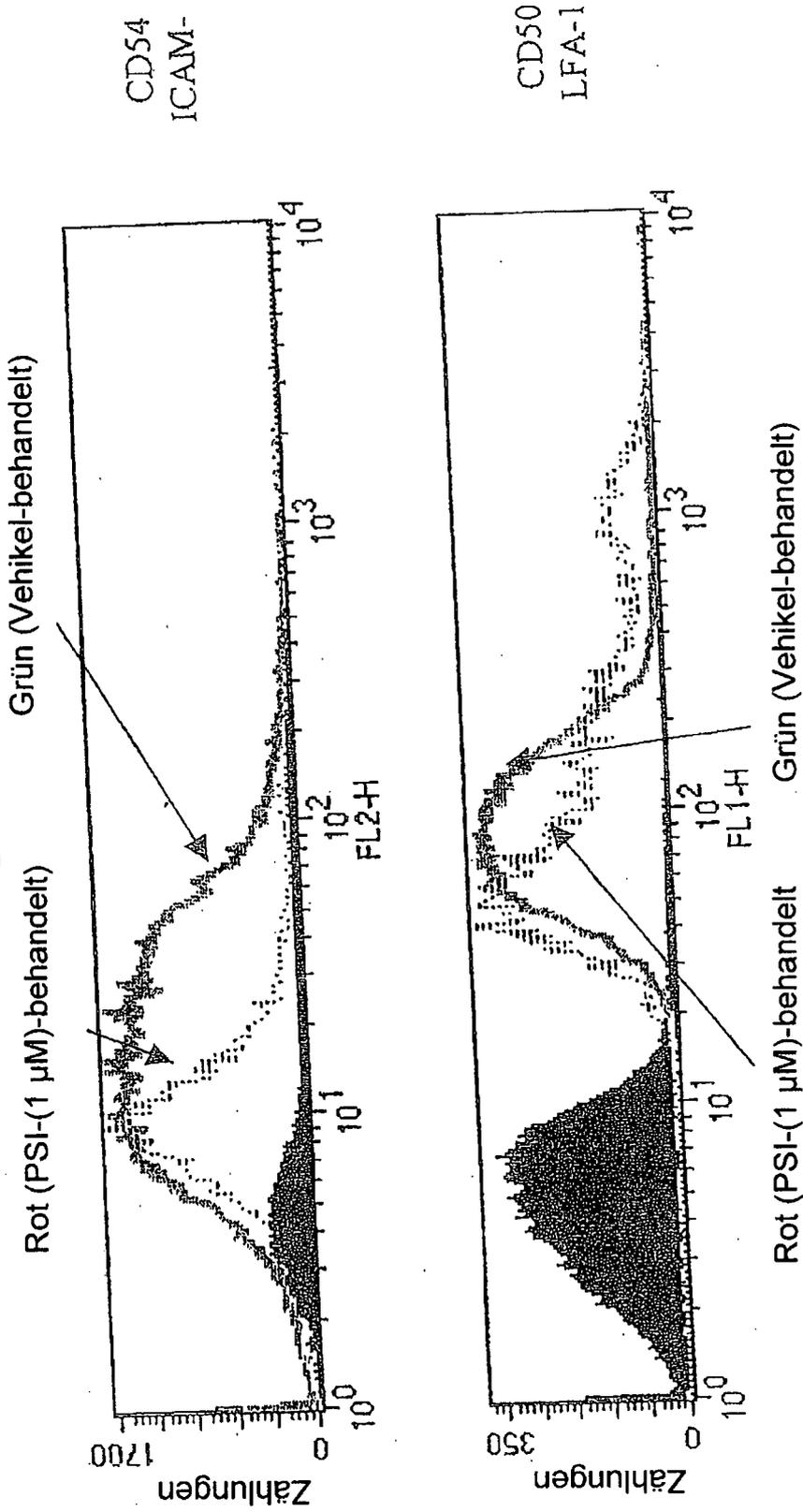
Figur 6

Zellzahl der Stimulatorzellen / Well



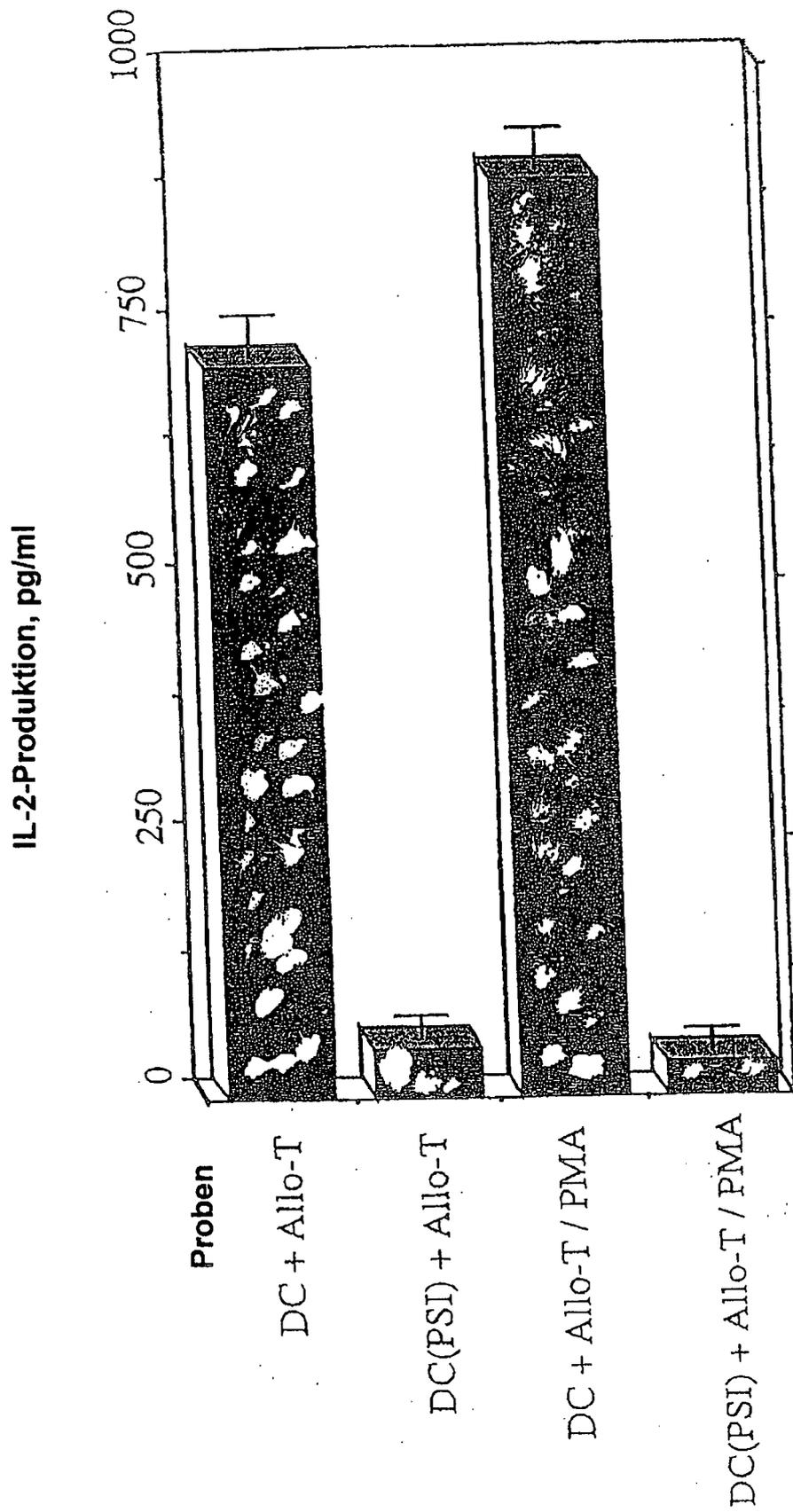
Figur 7 (Seite 1 von 2)

Figur 7

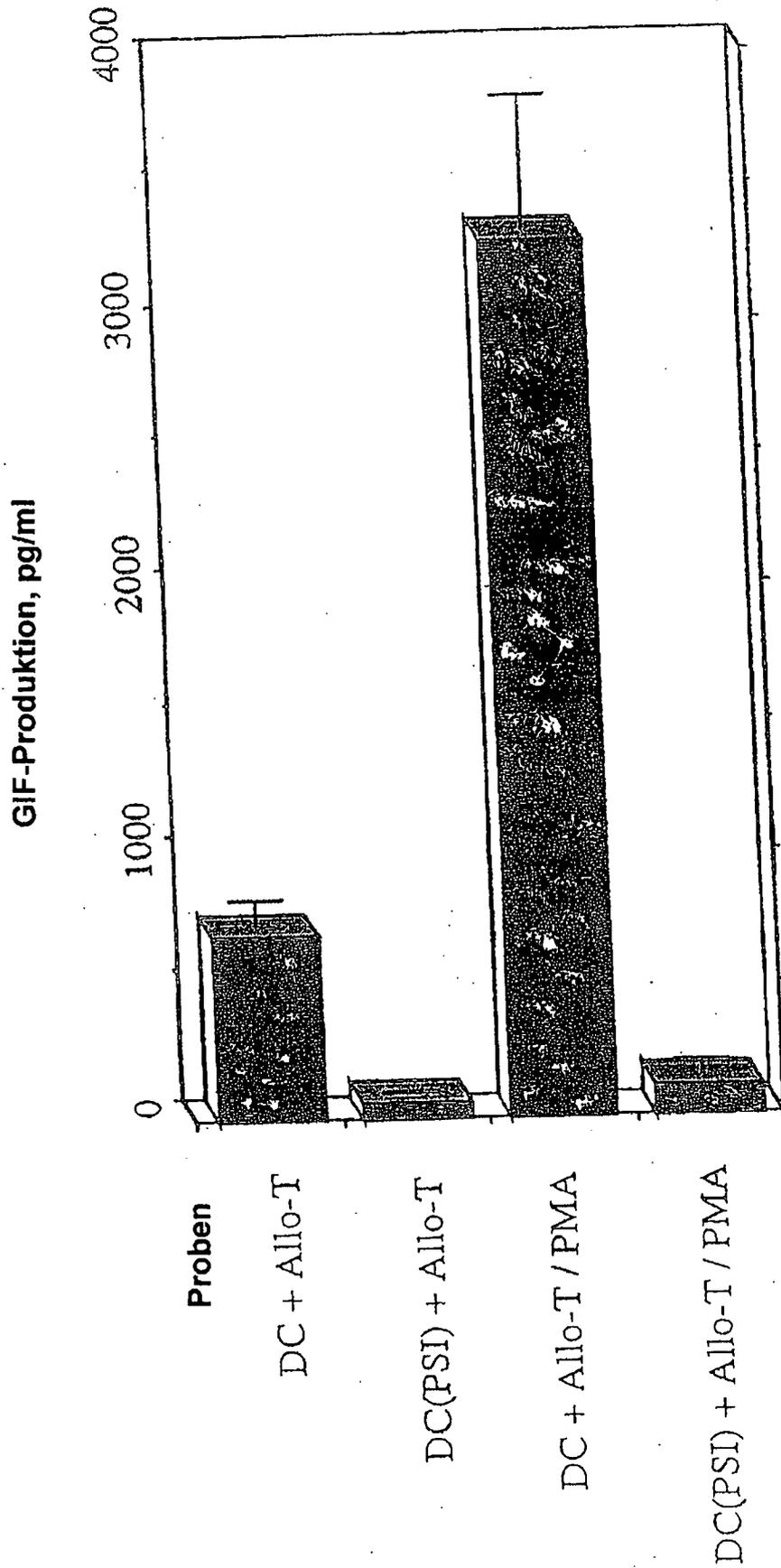


Reduzierte Expression von Oberflächenantigenen auf Allo-Lymphozyten durch PSI-behandelte DC

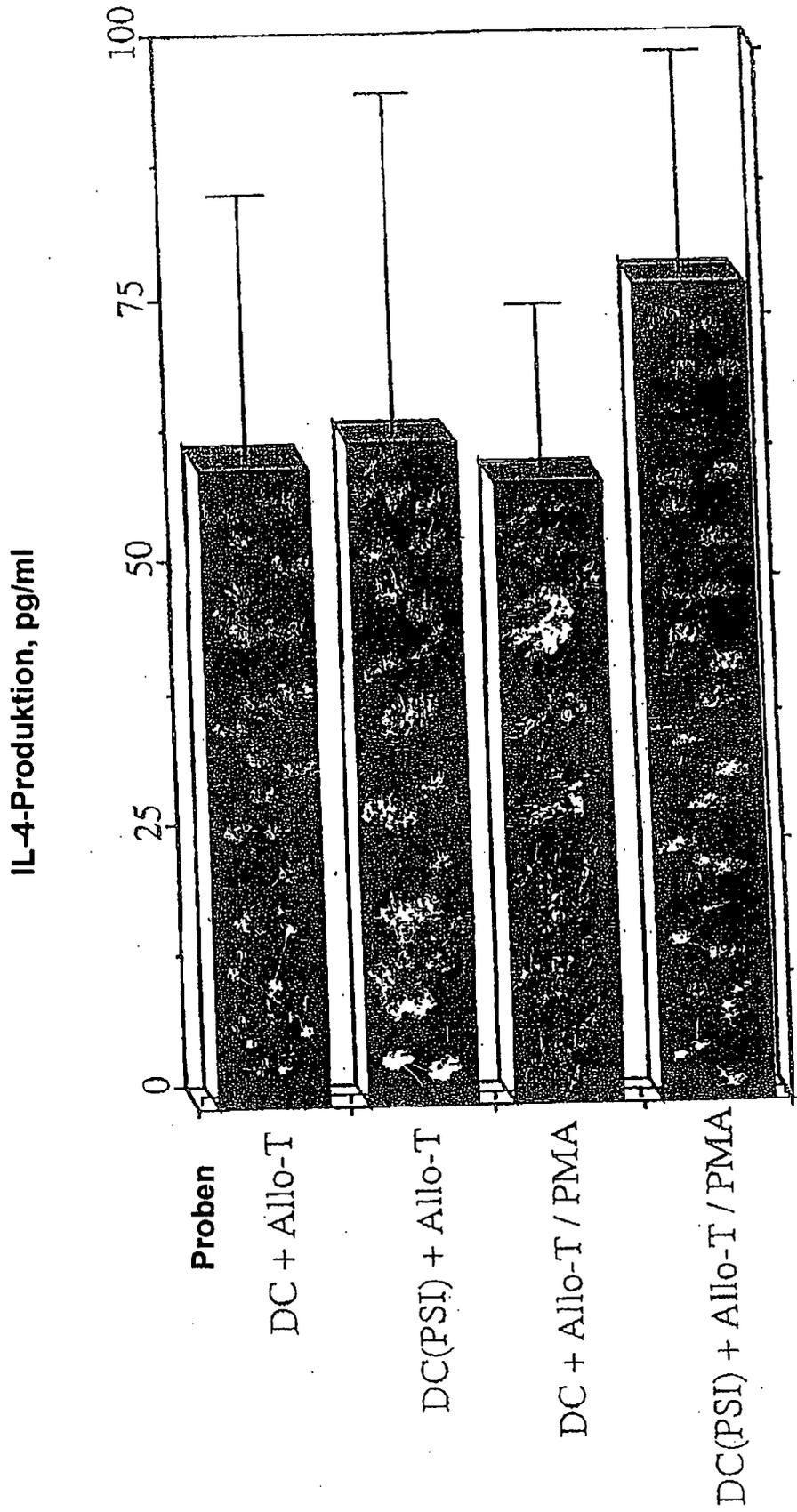
Figur 7 (Seite 2 von 2)



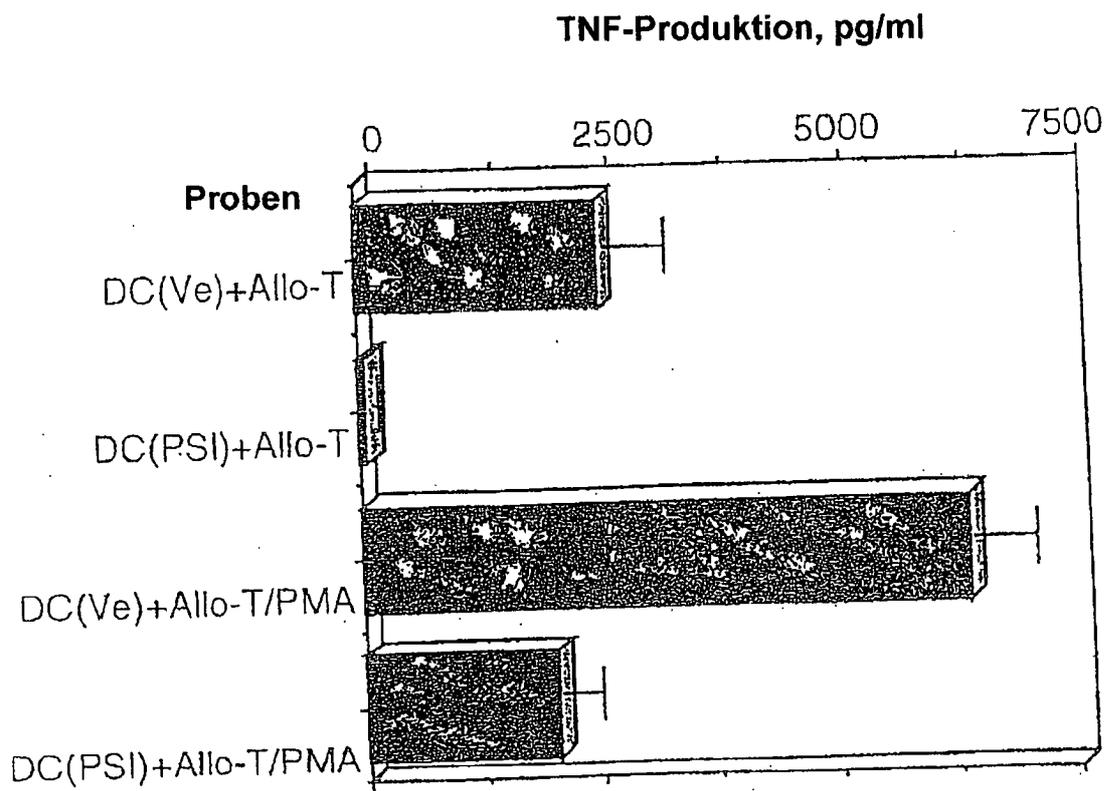
Figur 8 (Seite 1 von 3)



Figur 8 (Seite 2 von 3)

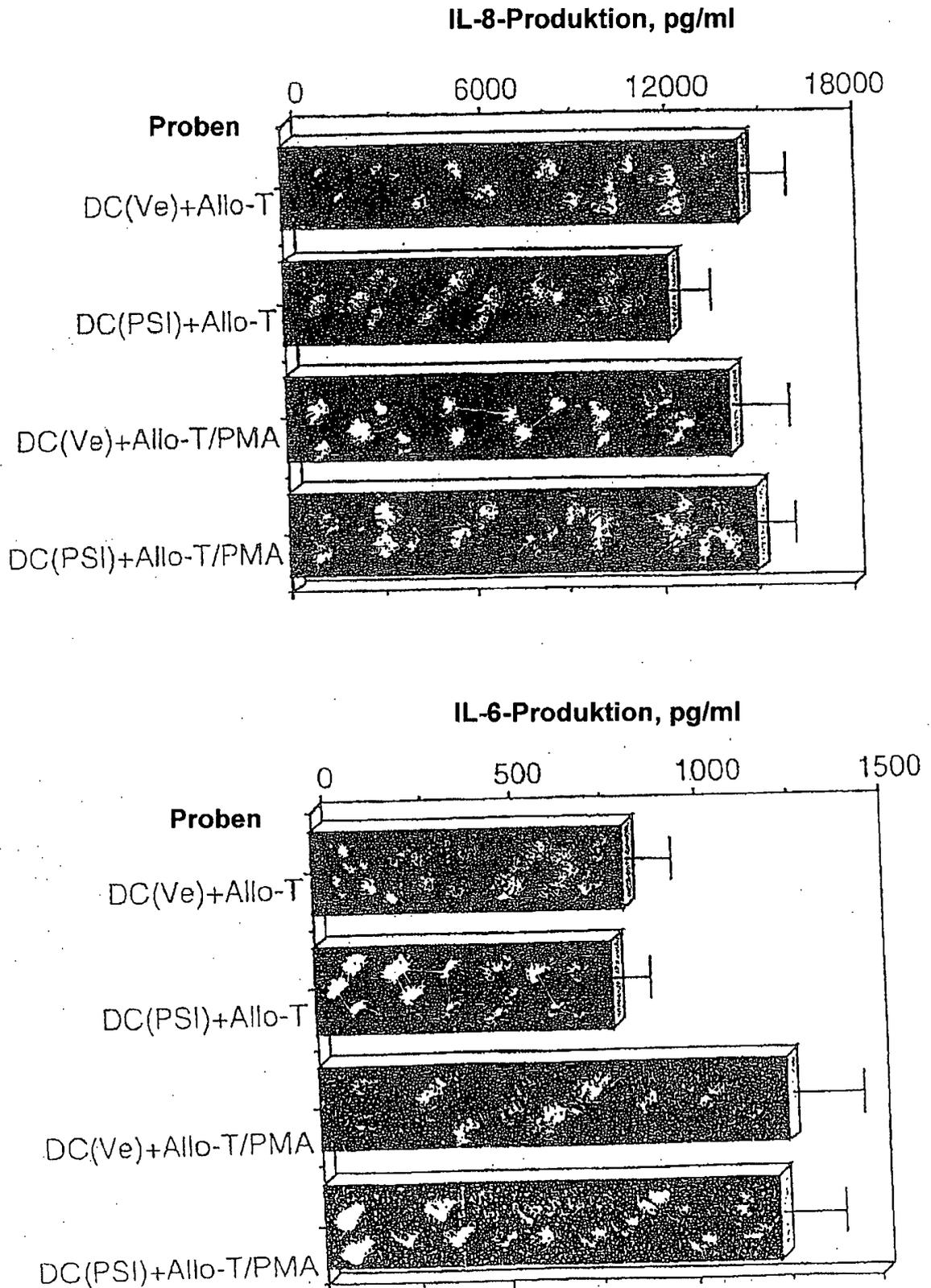


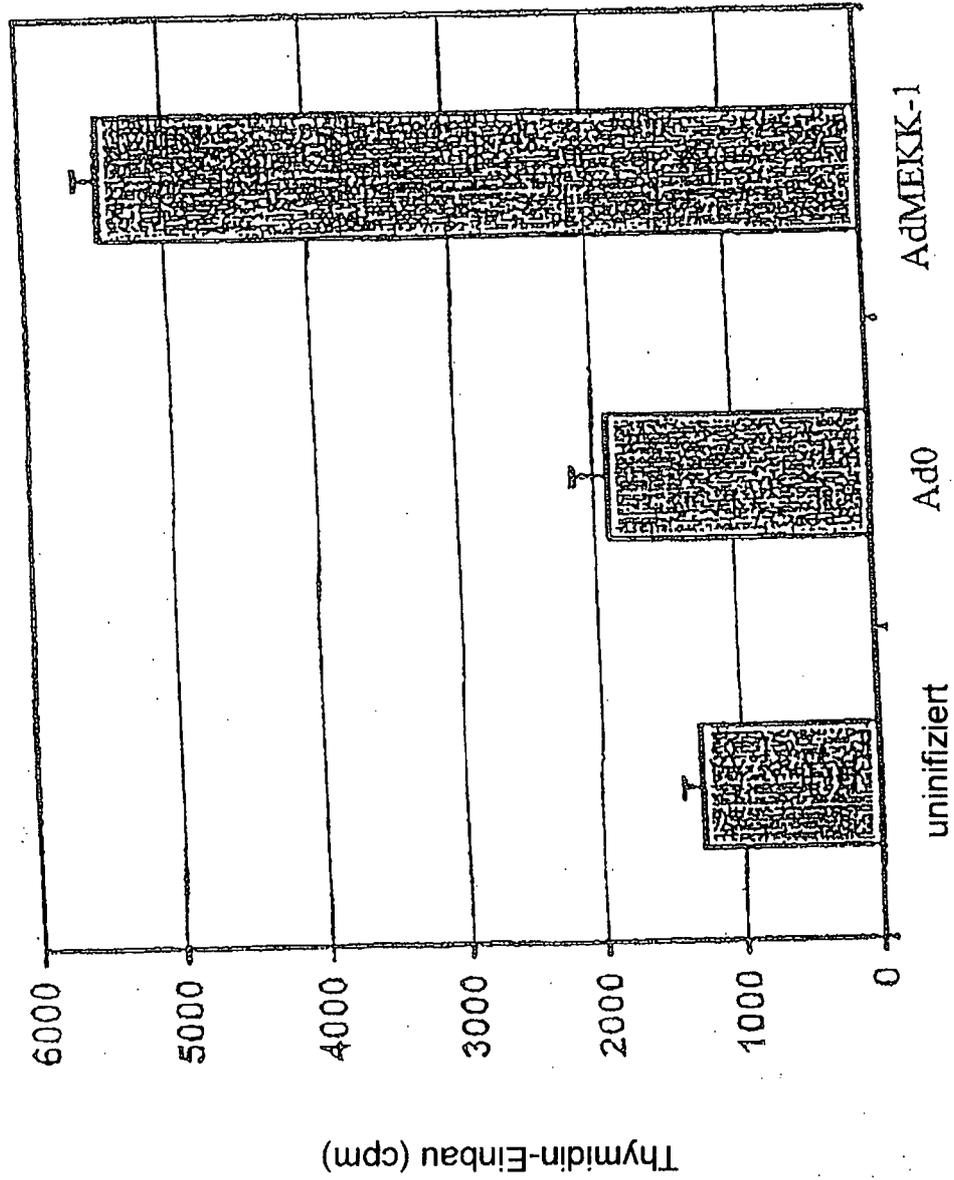
Figur 8 (Seite 3 von 3)



**Figur 9 (Seite 1 von 2)**

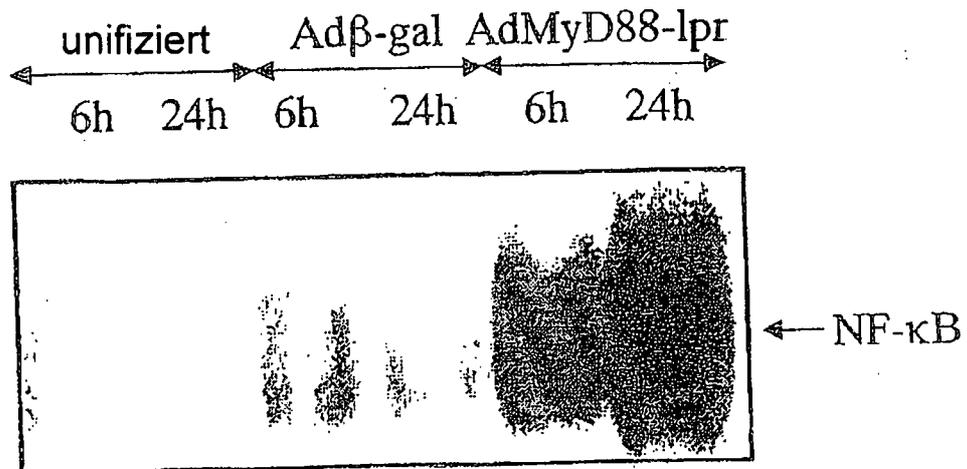
Figur 9 (Seite 2 von 2)





Figur 10

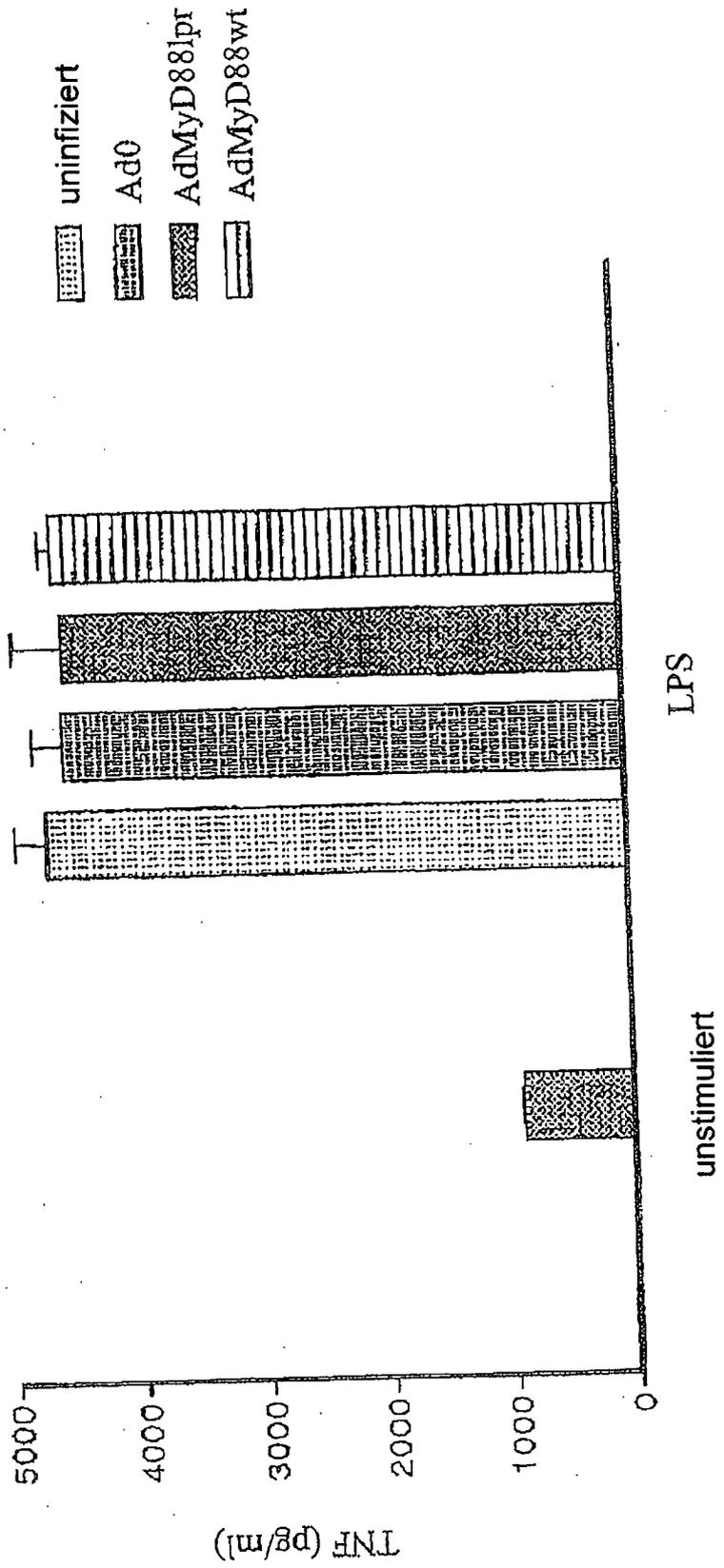
**Überexpression von MyD88-lpr in  
unreifen dendritischen Zellen induziert  
NF- $\kappa$ B-Aktivierung**



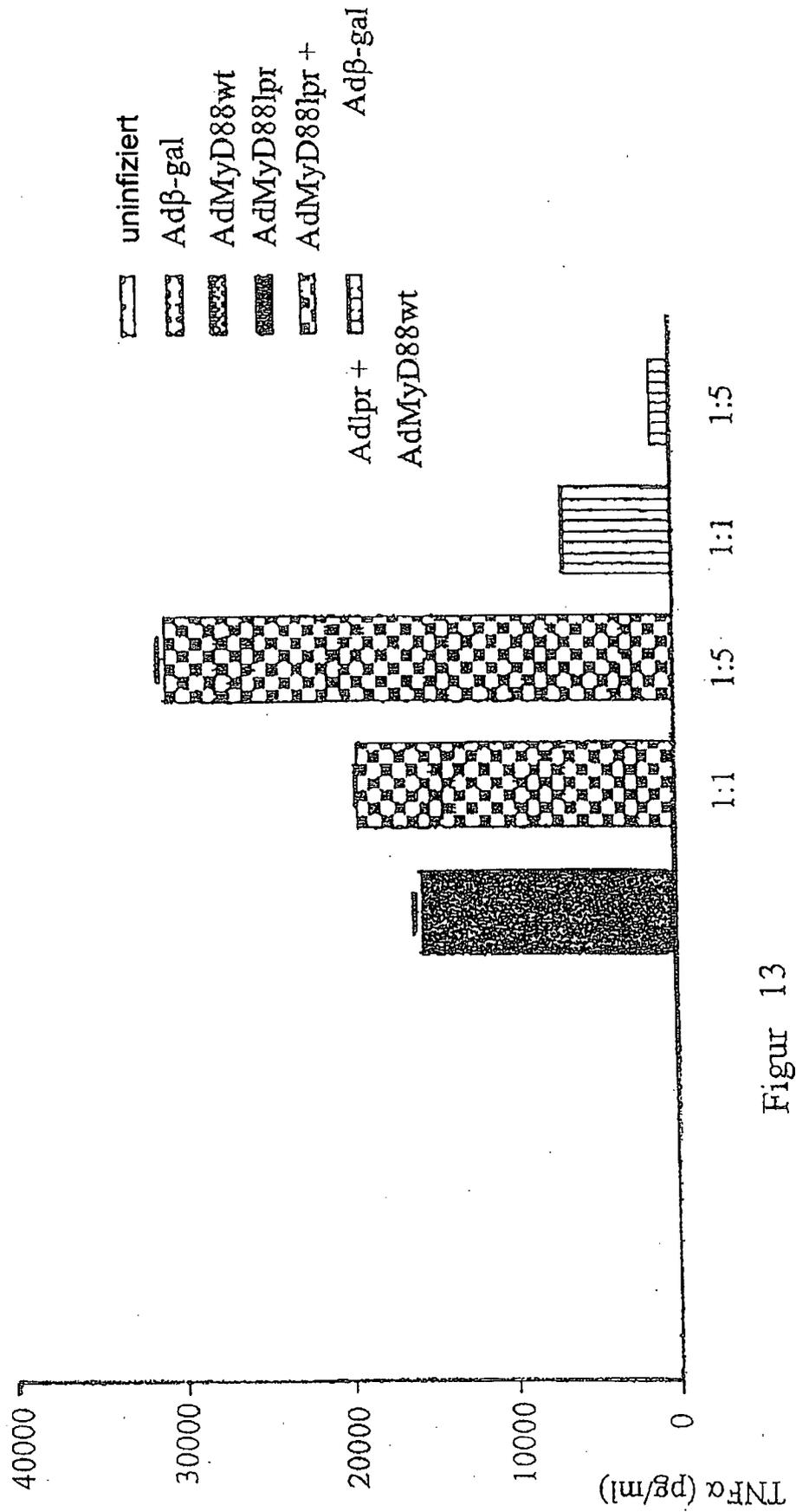
Figur 11

Figur 12

Effekt der Überexpression für 24 h von MyD88 WT und DN-Formen auf unreife dendritische Zellen



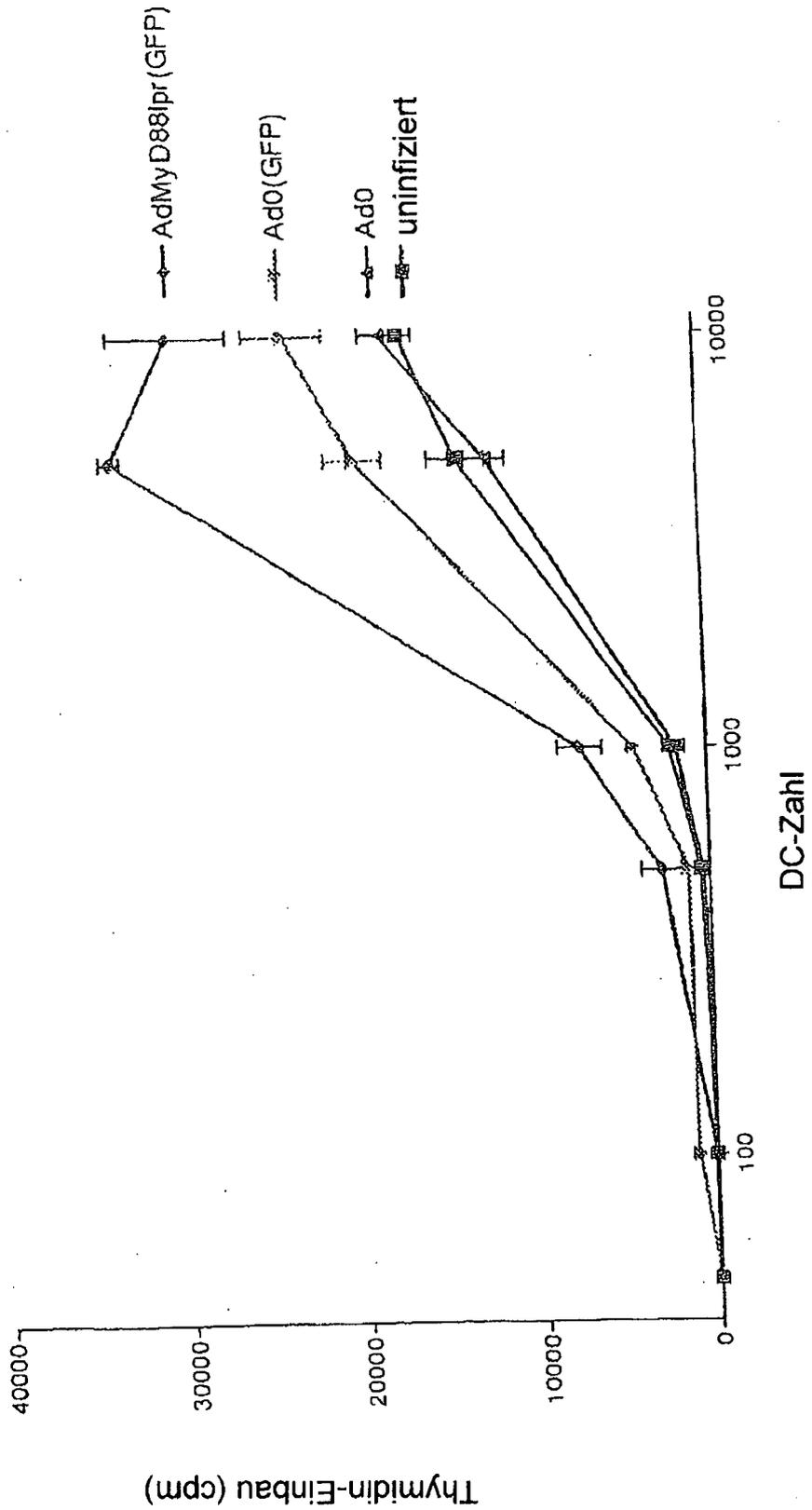
Überexpression von Wildtyp-MyD88 hebt die Adlpr-induzierte TNFalpha-Produktion in dendritischen Zellen auf



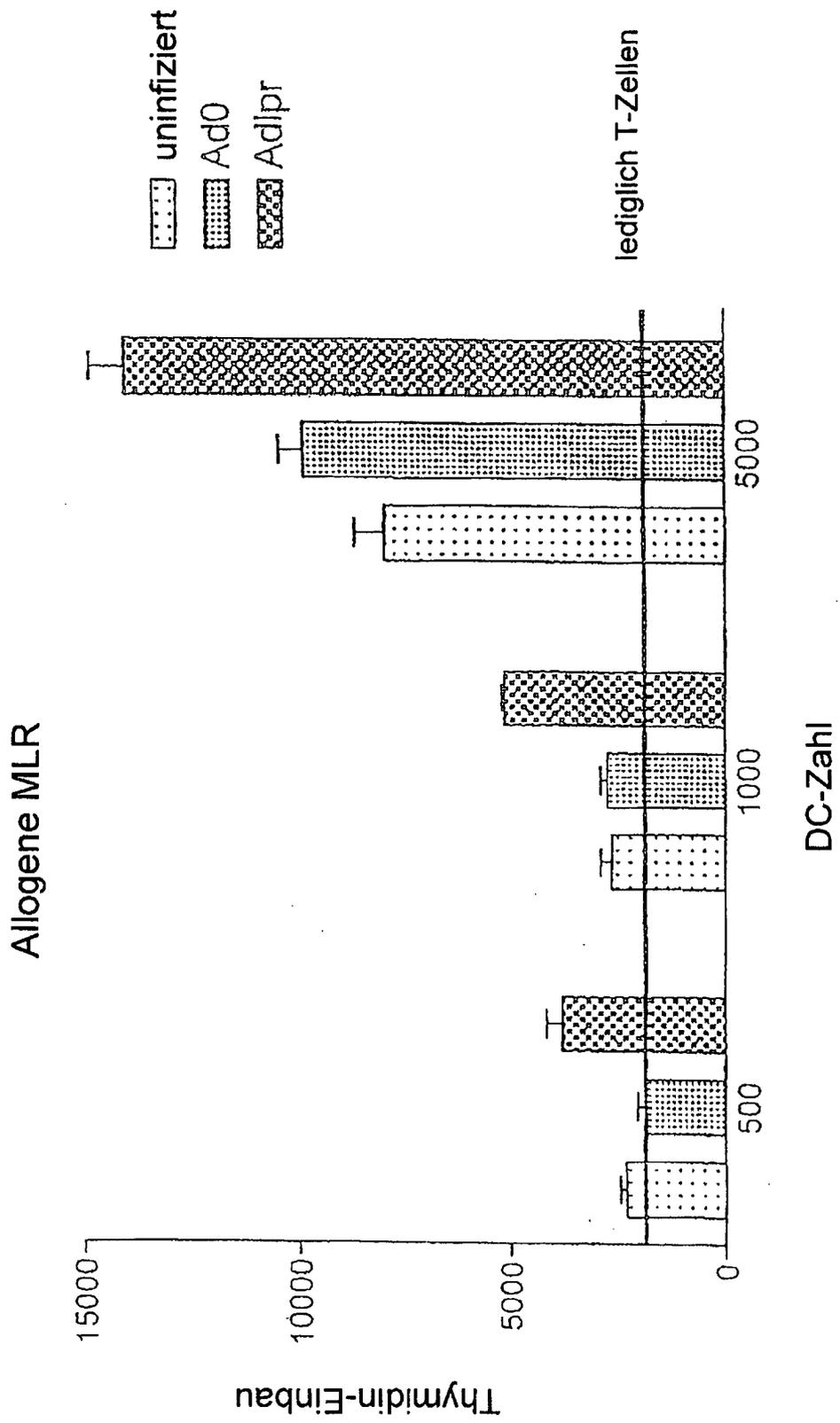
Figur 13

Figur 14

GFP-spezifische T-Zellproliferation ist erhöht,  
wenn MyD88lpr in DC überexprimiert wird

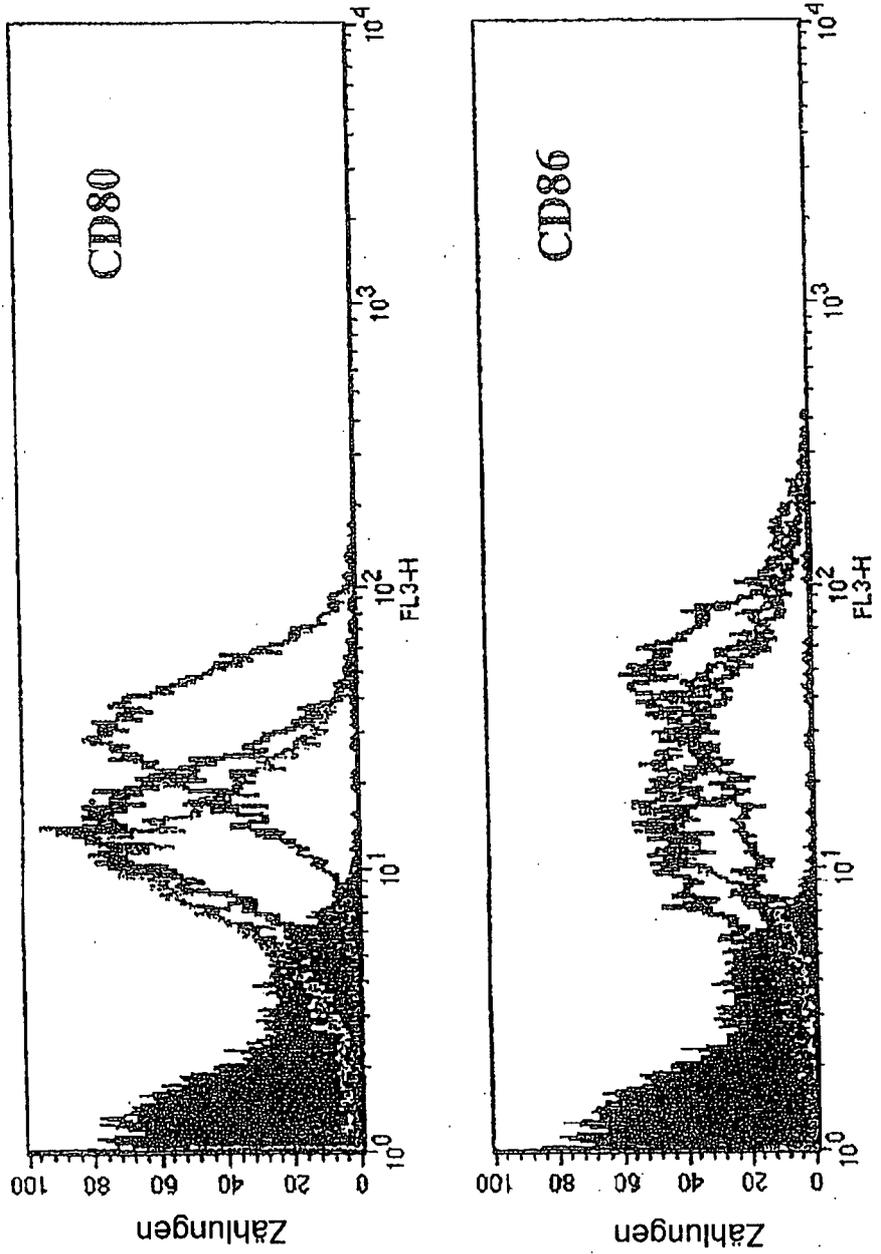


Figur 15

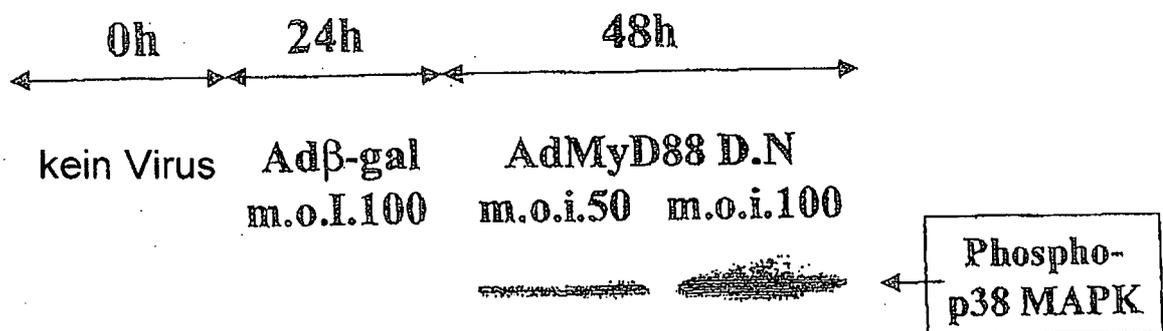


Figur 16

Überexpression von MyD88lpr verstärkt die Expression von CD80 und CD86 in unreifen DC

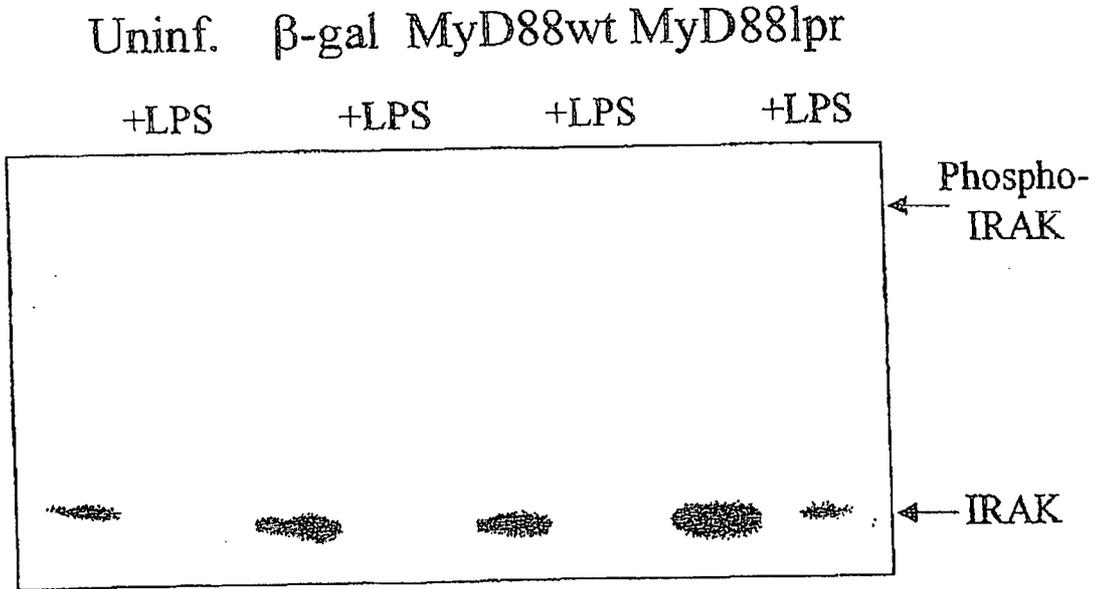


### Aktivierung von p38 MAPK in humanen Makrophagen durch Blockierung von MyD88

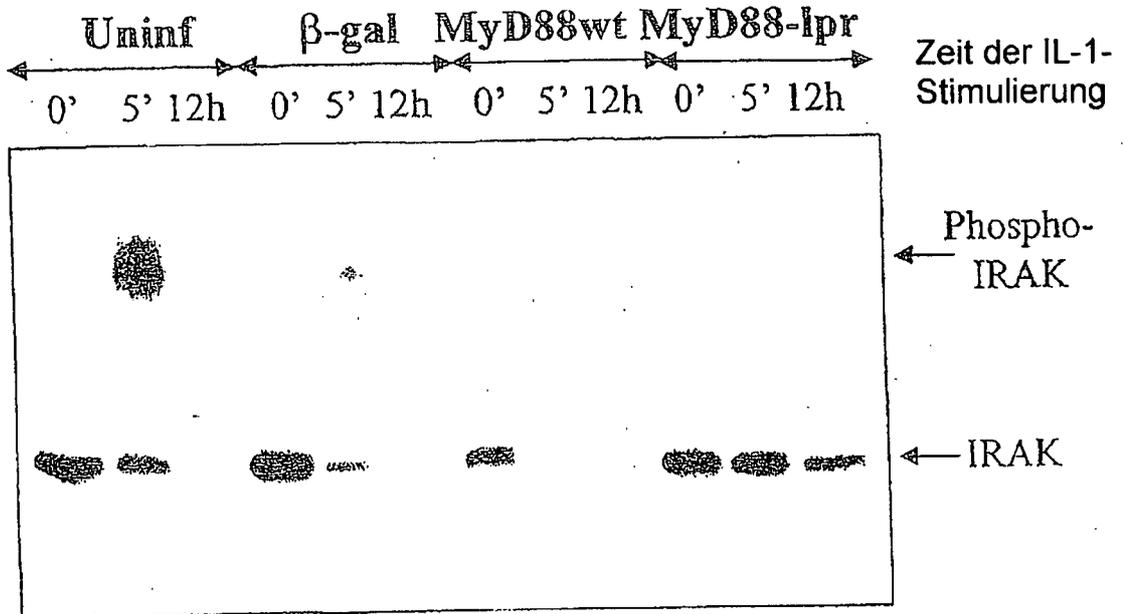


Figur 17

**(a) Makrophagen**

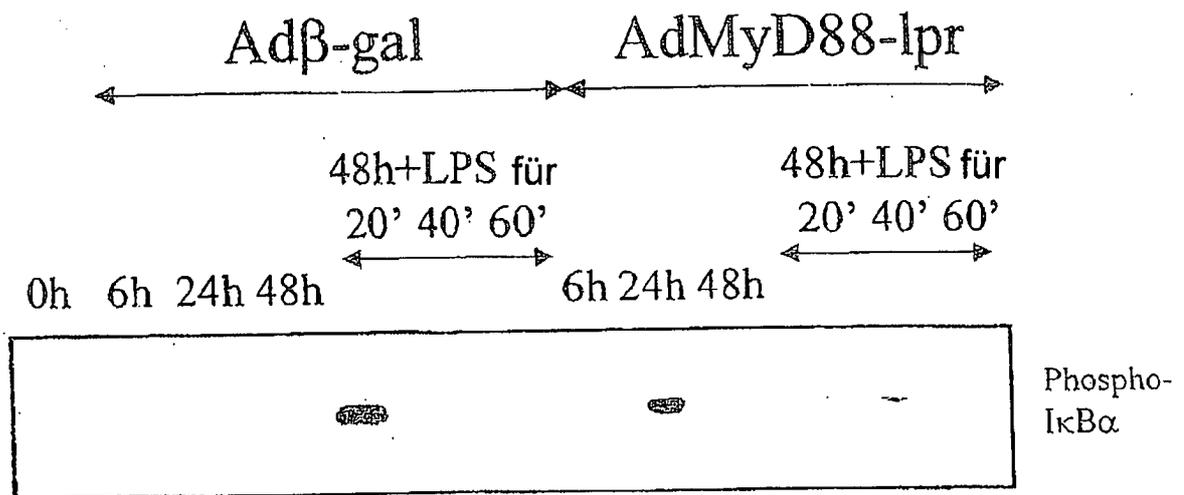


**(b) HELA**



Figur 18

### Überexpression von dominant-negativem MyD88 induziert I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung in humanen Makrophagen



Figur 19

Cytokin-Produktion durch Makrophagen nach  
2 Tagen der Überexpression

uninfiziert	TNF $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
	<20	<50	1000-3000
Ad0	<20	<50	1000-3000
AdMyD88wt	<20	<50	1000-3000
AdMyD88-lpr	40-500 (max 1000)	500-1500	10000-15000

Zeitverlauf der Cytokin-Produktion durch Makrophagen  
nach Infektion mit AdMyD88-lpr

	TNF $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
0h	<20	<70	1700
4h	<20	<70	2200
24h	170	490	14200
48h	70	750	13500

Figur 20