



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20020249 A2

HR P20020249 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/7088
A 61 K 39/39
A 61 K 48/00
A 61 K 35/12
A 23 L 1/30
A 61 P 37/04

(21) Broj prijave u HR: P20020249A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 25.03.2002.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US00/26383
Datum podnošenja međunarodne prijave: 25.09.2000.
(87) Broj međunarodne objave: WO 01/22972
Datum međunarodne objave: 05.04.2001.

(31) Broj prve prijave: 60/156,113
60/156,135
60/227,436

(32) Datum podnošenja prve prijave: 25.09.1999.
27.09.1999.
23.08.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US
US

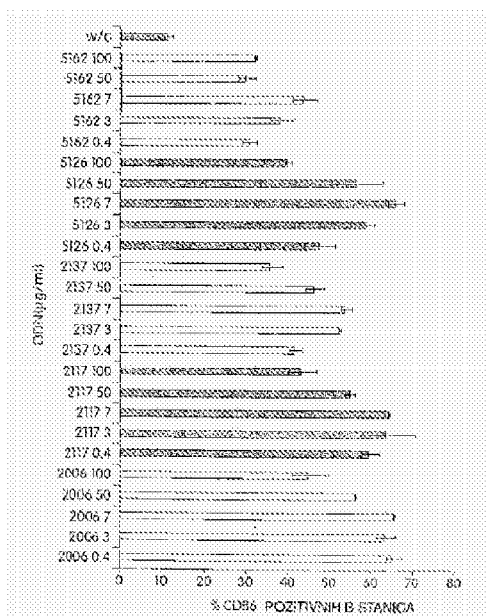
(71) Podnositelj prijave: University of Iowa Research Foundation, 214 Tehnology Innovation Center, Oakdale Research Campus, Iowa City, 52242 IA, US
Coley Pharmaceutical GmbH, Elisabeth-Selbert-Strasse 9, 40764 Langenfeld, DE

(72) Izumitelji: Arthur, M. Krieg, University of Iowa, Dept.of Internal Medicine, 540 EM RB, Iowa City, 52242 IA, US
Christian Schetter, Max-Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, DE
Jörg Vollmer, Max-Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, DE

(74) Punomoćnik: Dragomir Modrušan, ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: **IMUNOSTIMULIRAJUĆE NUKLEINSKE KISELINE**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i pripravke i metode primjene pripravaka. T-obogaćene nukleinske kiseline sadrže poli-T sekvencije i/ili imaju više od 25% T nukleotidnih ostataka. TG nukleinske kiseline imaju TG dinukleotide. C-obogaćene nukleinske kiseline imaju barem jednu poli-C regiju i/ili više od 50% C nukleotida. Te imunostimulirajuće nukleinske kiseline djeluju na sličan način kao nukleinske kiseline koje imaju CpG motive. Izum također obuhvaća preferirane CpG nukleinske kiseline.



HR P20020249 A2

OPIS IZUMA

Dosadašnje spoznaje

5 Bakterijska DNA, ali ne DNA kralježnjaka, ima izravni imunostimulirajući učinak na periferne mononuklearne krvne stanice (PBMC) *in vitro* (Krieg *et al.*, 1995). Bakterijska DNA ima imunostimulirajući učinak na aktivne B stanice i na stanice prirodne ubojice, a DNA kralježnjaka nema učinak (Tokunaga T. *et al.*, 1988, *Jpn. J. Cancer Res* 79:682-686; Tokunaga T. *et al.*, 1984, *JNCI* 72:955-962; Messina J. P. *et al.* 1991, *J. Immunol.* 147:1759-1764; i pregled u Krieg, 1998 u :Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein u A. M. Krieg, (Izd.) John Wiley Sons, Inc, New York, NY, str 431-448). Sada se podrazumijeva da su ti imunostimulirajući efekti bakterijske DNA rezultat prisutnosti određenog udjela baza nemetiliranih CpG dinukleotida (CpG motivi) koji su uobičajeni u bakterijskoj DNA, ali su metilirani i u smanjenoj količini (CpG supresija, 1/50 do 1/60) u DNA verterbata (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Krieg, 1999 *Biochim. Biophys. Acta* 93321:1-10). Imunostimulirajući efekt bakterijske DNA se može imitirati sitetskim oligonukleotidima (ODN) koji sadrže te CpG motive. Vjerojatno je da brza imuna aktivacija odgovora na CpG DNA može biti izazvana kao jedna komponenta urođenog mehanizma imune obrane koja prepoznaje obrazac specifičan za molekule mikroba.

CpG ODN ima velike stimulirajuće efekte na humane leukocite i one od laboratorijskih glodavaca, uključujući proliferaciju skoro svih (>95%) B stanica i povećanje izlučivanja imunoglobulina (Ig); izlučivanje citokina, litičku aktivnost prirodnih ubojica (NK) i izlučivanje IFN- γ ; te aktivaciju dendričnih stanica (DC) i ostalih stanica koje ispoljavaju antigen za ekspresiju kostimulatornih molekula i izlučivanje citokina, posebice citokina poput Th1 koji su važni u pokretanju odgovora T stanica sličnih Th1. Aktivacija B stanice s CpG DNA je neovisna o T stanici i nije specifična na antigen. Međutim, aktivacija B stanice s niskim koncentracijama CpG DNA pokazuje, a za proliferaciju B stanice i izlučivanje Ig (Krieg *et al.* 1995). Ta jaka sinergija između puta signalizacije B stanica, potaknutu preko receptora antigena B stanice i CpG DNA, pokreće imuni odgovor specifičan na antigen. Uz izravni efekt na B stanice, CpG DNA također izravno aktivira monocite, makrofage i dendrične stanice za izlučivanje različitih citokina uključujući visoke razine IL-12 (Klinman *et al.* 1996; Halpern *et al.*, 1996; Cowdery *et al.*, 1996). Ti citokini stimuliraju stanice prirodne ubojice (NK) da izlučuju g-interferon (IFN- γ) i imaju povećanu litičku aktivnost (Klima, *et al.* 1996, *supra*; Cowdery *et al.* 1996 *supra*; Yamamoto *et al.*, 1992; Ballas *et al.* 1996). Ukupno, CpG DNA inducira produkciju citokina poput Th1 dominiranu s IL-12 i IFN- γ i s malim izlučivanjem Th2 citokina (Klinman *et al.* 1996). Jaki izravni efekti (neovisno o T stanici) CpG DNA B stanice, kao i indukcija citokina koja može imati indirektne efekte na B-stanice putem pomoći T-stanica, ukazuje na upotrebu CpG DNA u obliku ODN kao adjuvansa vakcini. (Vidi PCT Patentnu aplikaciju br.: WO98/40100.)

35 Ti stimulatori imunog efekta prirodnog fosfodieterskog skeleta CpG ODN su visoko specifični na CpG, tako da efekti u osnovi nestaju kada je CpG motiv metiliran, promjenjen u GpC ili na drugi način eliminiran ili promjenjen (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Hartmann *et al.*, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9305-10). Fosfodiester CpG ODN se može formulirati u lipidima, alumu ili ostalim tipovima vehikula sa svojstvima za snabdjevanje ili poboljšanim prihvatom stanica, a da se poveća imunostimulirajući efekti (Yamamoto *et al.*, 1994 *Microbiol. immunol.* 38:831-836; Gramzinski *et al.*, 1998 *Mol. Med.* 4:109-118).

U ranim istraživanjima je mišljeno da imunostimulirajući CpG motiv slijedi nakon formule purin-purin-CpG-pirimidin-pirimidin (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Pisetsky, 1996 *J. Immunol.* 156:421-423; Hacker *et al.*, 1998 *EMBO J.* 17:6230-6240; Lipford *et al.*, 1998 *Trend in Microbiol.* 6:496-500). Međutim, sada je jasno da mišjih hemociti odgovaraju dobro na fosfodieterske CpG motive koji ne slijede tu "formulu" (Yi *et al.*, 1998 *J. Immunol.* 160:5898-5906), a isto vrijedi i za humane B stanice i dendrične stanice (Hartmann *et al.*, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:9305-10; Liand, 1996 *J. Clin. Invest.* 98:1119-1129).

Nekoliko prošlih istraživača su istraživali da li sadržaj nukleotida ODN može imati neovisan efekt na sekvenciju ODN. Interesantno, nađeno je da je antisens ODN općenito bogat sadržajem GC, CCC, CC, CAC i CG sekvencija, dok je smanjena učestalost TT ili TCC nukleotidnih sekvencija u usporedbi s očekivanom kad bi baze bile korištene slučajno (Smetsers *et al.*, 1996 *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 6:63-67). Time se povećava mogućnost da prekomjerno eksprimirane sekvencije mogu sadržavati preferirane ciljne elemente antisens oligonukleotida ili obrnuto. Jedan razlog da se izbjegne upotreba timinom bogatog ODN za antisens eksperimente je što se degradacijom ODN pomoću nukleoaze prisutne u stanicama oslobađa slobodni timidin koji kompetira s ^3H -timidinom koji se često koristi za eksperimente da se utvrdi proliferacija stanice (Matson *et al.*, 1992 *Antisense Research and Development* 2:325-330).

Sažetak izuma

Ovaj izum odnosi se dijelom na pirimidinom bogate (Py-obogaćen) i u nekim cjelinama timidinom (T) bogate imunostimulirajuće nukleinske kiseline koji ne zahtijevaju prisutnost CpG motiva. Ovaj izum se također djelomično odnosi na otkriće da su nukleinske kiseline koje sadrže TG dinukleotidni motiv također imunostimulatori. Izum se zasniva dijelom na neočekivanom otkriću da su sekvencije nukleinskih kiselina koje je sadrže CpG motive imunostimulatori. To je otkriveno nakon analize imunostimulacijskih svojstava mnogih sekvencija nukleinskih kiselina, a te sekvencije mogu biti obogaćene Py, npr. obogaćene T ili mogu sadržavati TG motive. Također je otkriveno da te sekvencije prvenstveno aktiviraju imune stanice koje nisu od glodavaca. S Py obogaćene i TG sekvencije su samo malo imunostimulirajuće svojstvo prema imunim stanicama glodavaca, a u usporedbi sa imunim stanicama neglodavaca. Stoga je moguće prema metodama iz izuma inducirati imuni odgovor u subjektu koji nije glodavac, a davanjem s Py obogaćene ili TG imunostimulacijskih nukleinskih kiselina. Py obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline iz izuma mogu uključivati CpG motive. Ta otkrića imaju važnu primjenu za klinički razvoj imunostimulirajuće CpG koji sadrže nukleinske kiseline koje ne sadrže CpG.

U jednom aspektu izuma obuhvaćen je farmaceutski pripravak koji sadrži učinkovitu količinu za stimuliranje imunog odgovora izoliranih s Py-obogaćenih ili TG imunostimulirajućih nukleinskih kiselina i na farmaceutski prihvatljive nosače. U drugim aspektima izum je pripravak tvari koji sadrži izoliranu Py-obogaćenu ili TG imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu. U drugim cjelinama imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti T-obogaćena. U daljnjim cjelinama imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti T-obogaćena i također ima najmanje TG motiv.

Preferirano Py-obogaćena nukleinska kiselina je T-obogaćena nukleinska kiselina. U nekim cjelinama T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina je poli T nukleinska kiselina koja sadrži 5'TTTT3'. U sljedećim cjelinama nukleinska kiselina je poli T nukleinska kiselina koja sadrži 5'X₁X₂TTTTX₃X₄3', pri čemu su X₁, X₂, X₃ i X₄ nukleotidi. U nekim cjelinama X₁X₂ je TT i/ili X₃X₄ je TT. U drugim cjelinama X₁X₂ je odabran iz skupine koju čine TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC, te X₃X₄ je odabrano iz skupine koju čine: TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC.

T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina može imati jedan poli T motiv ili može imati više poli T motiva. U nekim cjelinama T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži najmanje 2, najmanje 3, najmanje 4, najmanje 5, najmanje 6, najmanje 7, ili najmanje 8 CpG motiva. U preferiranim cjelinama pomiješano je više CpG motiva i poli T motiva.

U sljedećim cjelinama barem jedna od više pojedinih poli T motiva sadrži najmanje 3, najmanje 4, najmanje 5, najmanje 6, najmanje 7, najmanje 8 ili najmanje 9 uzastopnih T nukleotidnih ostataka. U drugim cjelinama broj poli T motiva je najmanje 3 motiva pri čemu najmanje 3 motiva sadrži najmanje 3 uzastopna T nukleotidna ostatka ili više poli T motiva je barem 4 motiva, pri čemu barem 4 motiva sadrži najmanje 3 uzastopna T nukleotidna ostatka.

U nekim slučajevima T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti bez poli T motiva, ali zato u sastavu može imati više od 25% T nukleotida. U drugim cjelinama T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima poli T motive, ali također u sastavu ima više od 25% T. U preferiranim cjelinama T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži više od 35% T, više od 40% T, više od 50% T, više od 60% T, više od 80% T ili više od 90% T.

T-obogaćene i TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju bilo koju duljinu veću od 7 nukleotida. U preferiranim cjelinama T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži barem 20 nukleotida, najmanje 24 nukleotida, najmanje 27 nukleotida ili najmanje 30 nukleotida. U preferiranim cjelinama TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina duga je između 15 i 25 nukleotida. T-obogaćena i TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti jednolančana ili dvolančana. T-obogaćenu regiju smještenu u sredini (t.j. okružuje ih približno jednak broj nukleotida prema 5' i 3' krajevima).

T-bogata nukleinska kiselina odabrana je i skupine koju čine: SEQ ID NO: 59- 63, 73-75, 142, 215, 226, 241, 267-269, 282, 301, 304, 330, 342, 358, 370-372, 393, 433, 471, 479, 486, 491, 497, 503, 556-558, 567, 694, 793794, 797, 833, 852, 861, 867, 868, 882, 886, 905, 907, 908, te 910-913. U drugim cjelinama T-obogaćene nukleinske kiseline imaju sekvenciju odabranu iz skupine koju čine SEQ ID NO: 64, 98, 112, 146, 185, 204, 208, 214, 224, 233, 244, 246, 247, 258, 262, 263, 265, 270-273, 300, 305, 316, 317, 343, 344, 350, 352, 354, 374, 376, 392, 407, 411413, 429-432, 434, 435, 443, 474, 475, 498-501, 518, 687, 692, 693, 804, 862, 883, 884, 888, 890, te 891.

U drugim cjelinama Py-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina je C-obogaćena nukleinska kiselina. Imunostimulirajuća C-obogaćena nukleinska kiselina je nukleinska kiselina koja ima barem jednu a preferirano najmanje dvije poli C-regije ili koja ima više od 50% C nukleotida.

Py-obogaćena TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina može imati jedan ili više CpG motiva. Motivi mogu biti metilirani ili nemetilirani. U drugim cjelinama Py-obogaćene i TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline nemaju jedan ili više CpG dinukleotida.

U drugim cjelinama Py-obogaćene i TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline također imaju poli-A, poli G i/ili poli C motive. U sljedećim cjelinama Py-obogaćene TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema dvije poli C sekvencije s najmanje 3 susjedna C nukleotidna ostatka ili nema dvije poli A sekvencije s najmanje 3 susjedna A nukleotidna ostatka. U drugim cjelinama Py obogaćena ili TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima sadržaj C veći od 25% ili sadržaj A veći od 25%. U sljedećim cjelinama Py obogaćena ili TG imunostimulatorna nukleinska kiselina nema poli-C sekvencije, poli-G sekvencije ili poli-A sekvencije.

Poli-G nukleinska kiselina u nekim cjelinama odabrana je iz skupine koju čine SEQ ID NO: 5, 6, 73, 215, 267-269, 276, 282, 288, 297-299, 355, 359, 386, 387, 444, 476, 531, 557-559, 733, 768, 795, 796, 914-925, 928-931, 933-936, te 938. U drugim cjelinama poli G nukleinska kiselina ima sekvenciju odabranu iz skupine koju čine SEQ ID NO: 67, 80-82, 141, 147, 148, 173, 178, 183, 185, 214, 224, 264, 265, 315, 329, 434, 435, 475, 519, 521-524, 526, 527, 535, 554, 565, 609, 628, 660, 661, 662, 725, 767, 825, 856, 857, 876, 892, 909, 926, 927, 932, te 937.

Prema sljedećem aspektu izuma imunostimulirajuće nukleinske kiseline mogu biti definirane kao one koje imaju TG motiv, koje su ovdje navedene kao TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline. TG nukleinske kiseline u jednoj cjelini sadrže najmanje TG dinukleotid koji ima sekvenciju koja uključuje najmanje sljedeće formule: $5'N_1X_1TGX_2N_23'$. U odgovarajućim cjelinama, N_1 je sekvencija nukleinske kiseline koja se sastoji od broja nukleotida koji se kreće od $(11-N_2)$ do $(21-N_2)$, a N_2 je sekvencija nukleinske kiseline koja se sastoji od broja nukleotida u rasponu od $(11-N_1)$ do $(21-N_1)$. U preferiranoj cjelini X_2 je timidin.

U drugim cjelinama, TG nukleinska kiselina ima najmanje sljedeću formulu: $5'N_1X_1X_2TGX_2X_33'$. U sljedećoj cjelini TG nukleinska kiselina sadrži sljedeću sekvenciju: $5'N_1X_1X_2TGX_2X_3N_23'$. U odgovarajućim cjelinama, N_1 je sekvencija nukleinske kiseline koja se sastoji od broja nukleotida koji je u rasponu od $(9-N_2)$ do $(19-N_2)$, a N_2 je sekvencija nukleinske kiseline koja se sastoji od broja nukleotida u rasponu od $(9-N_1)$ do $(19-N_1)$. U jednoj preferiranoj cjelini X_2 je timidin. X_1X_2 su nukleotidi koji mogu biti odabrani od skupine koju čine: GT, GG, GA, AA, AT, AG, CT, CA, CG, TA i TT, a X_3X_4 su nukleotidi koji mogu biti odabrani od skupine koju čine: TT, CT, AT, AG, CG, TC, AC, CC, TA, AA i CA. U nekim preferiranim cjelinama X_3 je timidin. U nekim preferiranim cjelinama X_3X_4 su nukleotidi koji su odabrani od skupine koju čine: TT, TC, TA, TG. U sljedećim cjelinama X_1 i X_2 su oba purini, a X_3 i X_4 su oba pirimidini ili X_1X_2 su GpA, a X_3 i X_4 su oba pirimidini. U jednoj cjelini X_2 je T a X_3 je pirimidin.

U jednoj cjelini $5'X_1X_2TGX_2X_33'$ sekvencija TG nukleinske kiseline cijele duljine ili nekog fragmenta TG nukleinske kiseline je ne-palindromska sekvencija, a u drugoj cjelini je palindromska sekvencija.

U nekim preferiranom cjelinama TG nukleinska kiselina je također T-obogaćena.

Py-obogaćene i TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline u nekim cjelinama imaju nukleotidni skelet koji uključuje najmanje jednu modifikaciju skeleta kao što je fosfotioatna modifikacija. Nukleotidni skelet može biti kimerni ili je preferirano nukleotidni kostur kompletno modificiran. U jednoj preferiranoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima poli-T motiv i fosfotioatni skelet.

U sljedećem aspektu izuma je pripravak imunostimulirajuće nukleinske kiseline u obliku obogaćenom Py ili TG nukleinske kiseline, te antigen, pri čemu je nukleinska kiselina bez nemetiliranih CpG motiva.

Sljedeći pripravak iz izuma je obogaćenom Py ili TG nukleinska kiselina i antinikrobno sredstvo, pri čemu Py-obogaćena i TG nukleinska kiselina nema nemetiliranih CpG motiva. Preferirano antimikrobno sredstvo je odabrano od skupine koju čine: antivirusno sredstvo, antiparazitsko sredstvo, antibakterijsko sredstvo i sredstvo protiv gljivica. Prema sljedećem aspektu izuma prikazan je pripravak s napravom za odgođeno oslobađanje koji uključuje Py obogaćenu ili TG imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu, pri čemu su Py obogaćene i/ili TG nukleinske kiseline bez nemetiliranih CpG motiva.

Izum također uključuje nutritivne suplemente Py obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline u napravi za isporuku koja je odabrana od skupine koju čine: kapsule, pilule ili sublingvalne tablete, pri čemu su Py obogaćenu ili TG nukleinske kiseline bez nemetiliranih CpG motiva.

Valje razumjeti da kada je korisno davanje Py obogaćene, npr. poli-T, T-obogaćene, C-obogaćene ili TG oligonukleotida i CpG oligonukleotida, može biti također istovremeno davati Py-obogaćeni ili TG oligonukleotidi

zajedno s fizički odijeljenim CpG, Py obogaćenim ili TG oligonukleotidom. Alternativno, CpG, Py-obogaćena ili TG motiv može biti prisutan na istoj nukleinskoj kiselini kao Py-obogaćen ili TG oligonukleotid. U sljedećoj cjelini, sve ili neke kombinacije Py-obogaćene, TG i CpG nukleinskih kiselina se mogu istovremeno davati na odvojenoj nukleinskoj kiselini ili istoj molekuli nukleinske kiseline. Istovremenim davanjem je namjera da nukleinske kiseline daju u gotovo isto vrijeme da se postigne kombinirana korisnost obaju oligonukleotida, preferirano više nego koja bi se korist postigla davanjem svakog oligonukleotida samog u istoj dozi.

CpG oligonukleotidi imaju općenito formulu $5'X_1X_2TGX_3X_43'$, pri čemu su X_1 , X_2 , X_3 , te X_4 nukleotidi i pri čemu je najmanje C od CpG nemetiliran. Preferirano su CpG oligonukleotidi dugi od 8-100 nukleotida i imaju modificirani skelet. Određene strukture su prikazane detaljno u PCT aplikacijama U.S. aplikacijama i tamo navedenim referencijama, a ti prikazi su ugrađeni ovdje referencijom ugrađeni u cijelosti. U jednoj cjelini CpG oligonukleotidi nemaju poli-T i TRG motive i nije T-obogaćen.

U drugim cjelinama CpG oligonukleotidi imaju sekvencije odabrane od skupine kaju čine: SEQ ID NO: 1, 3, 4, 14-16, 18-24, 28, 29, 3346, 49, 50, 52-56, 58, 64-67, 69, 71, 72, 76-87, 90, 91, 93, 94, 96, 98, 102-124, 126-128, 131-133, 136-141, 146-150, 152-153, 155-171, 173-178, 180-186, 188-198, 201, 203-214, 216-220, 223, 224, 227-240, 242-256, 258, 260-265, 270-273, 275, 277-281, 286-287, 292, 295-296, 300, 302, 305-307, 309-312, 314-317, 320-327, 329, 335, 337-341, 343-352, 354, 357, 361-365, 367-369, 373-376, 378-385, 388-392, 394, 395, 399, 401-404, 406-426, 429433, 434-437, 439, 441-443, 445, 447, 448, 450, 453-456, 460-464, 466-469, 472- 475, 477, 478, 480, 483-485, 488, 489, 492, 493, 495-502, 504-505, 507-509, 511, 513- 529, 532-541, 543-555, 564-566, 568-576, 578, 580, 599, 601-605, 607-611, 613-615, 617, 619-622, 625-646, 648-650, 653-664, 666-697, 699-706, 708, 709, 711-716, 718- 732, 736, 737, 739-744, 746, 747, 749-761, 763, 766-767, 769, 772-779, 781-783, 785- 786, 7900792, 798-799, 804-808, 810, 815, 817, 818, 820-832, 835-846, 849-850, 855- 859, 862, 865, 872, 874-877, 879-881, 883-885, 888-904, te 909-913.

U sljedećoj cjelini Py obogaćeni ili TG oligonukleotid je bez CpG motiva. Ta cjelina izuma također obuhvaća farmaceutske pripravke i kitove koji sadrže CpG oligonukleotide (koji mogu biti bez poli-T i TG motiva i ne biti T-obogaćeni) i Py-obogaćeni i/ili TG oligonukleotidi fizički su odvojeni od CpG oligonukleotida. Farmaceutski pripravci su u učinkovitim količinama i tipično uključuju farmaceutsko prihvatljive nosače, sve kao što je ovdje prikazano detaljno za Py-obogaćene i TG oligonukleotide. Kitovi uključuju najmanje jedan spremnik koji sadrži oligonukleotid koji je Py-obogaćen ili TG oligonukleotid (ili neku njihovu kombinaciju). Isti spremnik ili u drugoj cjelini drugi spremnik, može sadržavati oligonukleotid s CpG motivom koji može biti bez Py-obogaćenih i/ili TG motiva. Kit također sadrži upute za davanje oligonukleotida subjektu. Kit također može sadržavati spremnik koji sadrži otapalo ili razrjeđivač.

Ukupno, kako je ovdje ponovo navedeno, ovdje su opisani CpG oligonukleotidi koji su fizički odijeljeni od Py-obogaćenih i TG oligonukleotida u metodama, pripravcima i produktima.

Izum se odnosi na druge aspekte imunostimulirajućih oligonukleotida koji imaju kimerni skelet i koji ne zahtijevaju prisutnost CpG motiva. Izum je zasnovan djelomično na otkriću da su sekvencije nukleinskih kiselina koje ne sadrže CpG motive imunostimulatori, a one koje imaju kimerni skelet su neočekivano povećavale imunostimulirajuća svojstva. Stoga se izum u jednom aspektu odnosi na pripravke oligonukleotida koji imaju formulu: $5'Y_1N_1ZN_2Y_23'$, pri čemu su Y_1 i Y_2 neovisno jedan od drugoga molekule nukleinskih kiselina koje imaju između 1 i 10 nukleotida, pri čemu Y_1 uključuje najmanje jednu modificiranu oligonukleotidnu vezu a Y_2 uključuje najmanje jednu modificiranu internukleotidnu vezu, a pri čemu su N_1 i N_2 molekule nukleinskih kiselina koje neovisno jedna od druge imaju između 0 i 5 nukleotida, ali pri čemu N_1ZN_2 ima ukupno najmanje 6 nukleotida i pri čemu nukleotidi N_1ZN_2 imaju fosfodiestereski skelet, te pri čemu je Z motiv imunostimulirajuće nukleinske kiseline ali ne uključuje CG. U jednoj cjelini Z je sekvencija nukleinske kiseline odabrane iz skupine koju čine TTTT, TG i sekvencija u kojoj je najmanje 50% baza sekvencije T.

U nekim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 imaju između 3 i 8 nukleotida. U drugim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 sadrže najmanje tri G, najmanje četiri G, najmanje sedam G ili sve G. U drugim cjelinama, Y_1 i/ili Y_2 su odabrani iz skupine koju čine TCGTCG, TCGTCGT i TCGTCGTT (SEQ ID NO: 1145). U sljedećim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 uključuju najmanje jedan, dva, tri, četiri ili pet poli-A, poli-T ili poli-C sekvencija.

Centralni nukleotidi (N_1ZN_2) formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$ imaju fosfodiestereske interlukleotidne veze i Y_1 i Y_2 imaju najmanje jednu modificiranu internukleotidnu vezu. U nekim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 imaju najmanje dvije modificirane internukleotidne veze. U ostalim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 imaju između dviju i pet modificiranih internukleotidnih veza. U sljedećim cjelinama Y_1 ima dvije modificirane internukleotidne veze, a Y_2 ima pet modificiranih internukleotidnih veza ili Y_1 ima pet modificiranih internukleotidnih veza a Y_2 ima dvije modificirane internukleotidne veze. Modificirana internukleotidna veza u nekim cjelinama je fosforotioatna modificirana veza, fosfoditionatna modificirana veza ili p-etoksi modificirana veza.

Dijelovi formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$ mogu biti palindromi. Stoga su u nekim cjelinama nukleotidi N_1ZN_2 iz palindroma. U nekim cjelinama palindrom nije izravno ponavljanje. U sljedećim cjelinama nukleotidi N_1ZN_2 ne tvore palindrom.

- 5 Prema ostalim cjelinama N_1ZN_2 imaju sekvencije nukleotida odabranih iz skupine koja se sastoji od: GATTTTATCGTC (SEQ ID NO: 1098), TCGATTTTTCGA (SEQ ID NO: 1099); TCATTTTATGA (SEQ ID NO: 1100); GTTTTTTACGAC (SEQ ID NO: 1101); TCAATTTTGTGA (SEQ ID NO: 1102); ACGTTTTTACGT (SEQ ID NO: 1103); TCGTTTTTACGA (SEQ ID NO: 1104); TCGATTTT-FACGTCGA (SEQ ID NO: 1105); AATTTTTTAACGTT (SEQ ID NO: 1106); TCGTTTTTTAACGA (SEQ ID NO: 1107); ACGTTTTTTAACGT (SEQ ID NO: 1108); GATTTTATCGTC (SEQ ID NO: 1109); GACG ATTTTTCGTC (SEQ ID NO: 1110); GATTTTAGCTCGTC (SEQ ID NO: 1111); GATTTTACGTC (SEQ ID NO: 1112); ATTTTATCGT (SEQ ID NO: 1113); AACGATTTTTCGTT (SEQ ID NO: 1114); TCACTTTTGTGA (SEQ ID NO: 1115); TCGTATTTTA (SEQ ID NO: 1116); ACTTTTGTACCGGT (SEQ ID NO: 1117); TCGATTTTTCGACGTCGA (SEQ ID NO: 1118); ACGATTTTTCGT (SEQ ID NO: 1119); GATGATCGTC (SEQ ID NO: 1120); TCGATGTCGA (SEQ ID NO: 1121); TCATGTATGA (SEQ ID NO: 1122); GTGTTACGAC (SEQ ID NO: 1123); TCAATGTTGA (SEQ ID NO: 1124); ACGTGTACGT (SEQ ID NO: 1125); TCGTGTACGA (SEQ ID NO: 1126); TCGATGTACGTCGA (SEQ ID NO: 1127); AATGTTAACGTT (SEQ ID NO: 1128); TCGTGTTAACGA (SEQ ID NO: 1129); ACGTGTTAACGT (SEQ ID NO: 1130); GATGTATCGTC (SEQ ID NO: 1131); GACGATGTCTGTC (SEQ ID NO: 1132); GATGAGCTCGTC (SEQ ID NO: 1133); GATGTACGTC (SEQ ID NO: 1134); ATGATCGT (SEQ ID NO: 1135); AACGATGTCTGTT (SEQ ID NO: 1136); TCACTGGTGA (SEQ ID NO: 1137); TCGTATGA (SEQ ID NO: 1138); ACTGGTACCGGT (SEQ ID NO: 1139); TCGATGTCTGTCGA (SEQ ID NO: 1140); te ACGATGTCTGTC (SEQ ID NO: 1141).

- 25 Pripravak može uključivati farmaceutski nosač i/ili biti formuliran u napravi za isporuku. U nekim cjelinama naprava za isporuku je odabrana iz skupine koju čine: kationski lipidi, stanični propusni proteini i naprave za odgođeno oslobađanje. U jednoj preferiranoj cjelini naprava za odgođeno oslobađanje je biorazgradni polimer. U sljedećoj cjelini naprava za odgođeno oslobađanje je mikročestica.

U sljedećem aspektu izum je pripravak imunostimulirajućih oligonukleotida formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$ i antigen.

- 30 Sljedeći pripravak iz izuma je imunostimulirajući oligonukleotid koji ima formulu $Y_1N_1ZN_2Y_2$ i antimikronno terapijsko sredstvo. Preferirano je antimikronno terapijsko sredstvo odabrano iz skupine koju čine: antivirusno sredstvo, antiparazitsko sredstvo, antibakterijsko sredstvo i sredstvo protiv gljivica.

- 35 Pripravak naprave za odgođeno oslobađanje, uključujući imunostimulirajući oligonukleotid formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$, prikazan je prema drugom aspektu izuma.

Izum također uključuje nutritivne suplemente imunostimulirajućeg nukleotida formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$ u napravi za isporuku koja je odabrana kapsule, sublingvalne tablete i pilule.

- 40 U sljedećem aspektu gore opisani pripremi također uključuju imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu koja ima nemetilirani CG dinukleotid, TG dinukleotid ili Py obogaćenu sekvenciju u kojoj imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima nemetilirani CG dinukleotid, TG dinukleotid ili Py obogaćenu sekvenciju koja ima različitu sekvenciju od oligonukleotida koji sadrži $5'Y_1N_1ZN_2Y_23'$.

- 45 U nekim cjelinama imunostimulirajuća nukleinska kiselina koja ima nemetilirani CG dinukleotid, TG dinukleotid ili Py-obogaćenu sekvenciju ima kompletno fosfodiesteri skeleta, druge cjeline imunostimulirajuće nukleinske kiseline koja ima nemetilirani CG dinukleotid, TG dinukleotid ili Py-obogaćenu sekvenciju imaju modificirani skelet koji može imati internukleotidne veze odabrane od skupine koju čine fosforotioat, fosfoditionat i p-etoksi.

- 50 U jednoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina koja ima nemetilirani CG dinukleotid ima formulu $5'X_1X_2CGX_3X_43'$, a X_1 , X_2 , X_3 i X_4 nukleotidi. U drugim cjelinama sekvencija imunostimulirajuće nukleinske kiseline uključuje najmanje sljedeću formulu: $5'TCNTX_1X_2CGX_3X_43'$, pri čemu je N sekvencija nukleinske kiseline sastavljena od oko 0-25 nukleotida i pri čemu je barem jedan nukleotid modificiran internukleotidnom vezom, te pri čemu nukleinska kiselina ima manje ili jednako 100 nukleotida. Prema istim cjelinama X_1X_2 su nukleotidi odabrani od skupine koju čine: GT, GG, GA i AA, a X_3X_4 su nukleotidi odabrani od skupine koju čine: TT, CT ili GT. U preferiranoj cjelini X_1X_2 su GA a X_3X_4 su TT.

- 60 U sljedećoj cjelini sekvencija imunostimulirajuće nukleinske kiseline ima nemetilirani CG dinukleotid koji uključuje barem jednu od sljedećih sekvencija: ATCGACTCTCGAGCGTTCTC (SEQ ID No. 15); TCCATGTCTGGTCCTGCTGAT (SEQ ID No. 32); TCCATGTCTGGTZCTGATGCT (SEQ ID No. 31); ATCGACTCTCGAGCGTTZTC (SEQ ID No. 18); TCCATGTCTGGTCCTGATGCT (SEQ ID No. 28); GGGGGG

(SEQ ID No. 12); TCCATGACGGTCCTGATGCT (SEQ ID No. 35); TCCATGGCGGTCCTGATGCT (SEQ ID No. 34); TCCATGACGTTTCCTGATGCT (SEQ ID No. 7); TCCATGTCGTTTCCTGATGCT (SEQ ID No. 38); GGGGTCAGTCTTGACGGG (SEQ ID No. 41); TCCATGTCGTCCTGATGCT (SEQ ID No. 37); TCCATGTCGATCCTGATGCT (SEQ ID No. 36); TCCATGCCGGTCCTGATGCT (SEQ ID No. 33);
 5 TCCATAACGTTTCCTGATGCT (SEQ ID No. 3); TCCATGACGTTTCCTGATGCT (SEQ ID No. 7); TCCATGACGTCCCTGATGCT (SEQ ID No. 39); TCCATCACGTGCCTGATGCT (SEQ ID No. 48); TCCATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID No. 10); ATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID No. 70); TCTCCAGCGCGCGCCAT (SEQ ID No. -72); TCCATGTCGTTTCCTGTCGTT (SEQ ID No. 73); TCCATAGCGTTTCCTAGCGTT (SEQ ID No. 74); TCCTGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID No. 76);
 10 TCCTGTCGTTTCCTGTCGTT7 (SEQ ID No. 77); TCCTGTCGTTTCCTGTCGTT (SEQ ID No. 52); TCCTTGTCGTTTCCTGTCGTT (SEQ ID No. 121); TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT (SEQ ID No. 208); TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT (SEQ ID No. 120); TCCATGCGTTGCGTTGCGTT (SEQ ID No. 8 1); TCCACGACGTTTTTCGACGTT (SEQ ID No. 82); TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 47); TCGTCGTTTTTTGTCGTTTGTGTCGTT (SEQ ID No. 46); TCGTCGTTGTCGTTTGTGTCGTT (SEQ ID No. 49);
 15 GCGTGCCTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 56); TGTCGTTTGTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 48); TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 84); TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 50); TCGTCGTCGTCGTT (SEQ ID No. 5 1); te TGTCGTTGTCGTT (SEQ ID No. 85). U sljedećoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima Py-obogaćenu ili TG sekvenciju u nukleinskoj kiselini kao što je gore opisano.

20 U sljedećem aspektu izum se odnosi na farmaceutске pripravke i kitove koji sadrže oligonukleotid formule $Y_1N_1ZN_2Y_2$ i CpG oligonukleotid (koji može biti bez poli-T i TG motiva i ne biti Py-obogaćen), Py-obogaćen i/ili TG oligonukleotid fizički odvojen od oligonukleotida koji ima formulu $Y_1N_1ZN_2Y_2$. Farmaceutski pripravci u učinkovitim količinama i tipično uključuju farmaceutski prihvatljive nosače, sve koji su ovdje prikazani detaljno. Kitovi uključuju
 25 barem jedan spremnik koji sadrži oligonukleotide koji imaju formulu $Y_1N_1ZN_2Y_2$. Isti spremnik ili u drugim cjelinama drugi spremnik, može sadržavati oligonukleotide s CpG motivom koji može biti bez Py-obogaćenog i/ili TG motiva i/ili Py-obogaćenog ili TG oligonukleotida (ili neke njihove kombinacije). Kit također sadrži spremnik koji sadrži otapalo ili razrjeđivač.

30 Ukupno, kako je ovdje ponovo navedeno, u metodama su ovdje opisani pripravci i produkti oligonukleotida koji imaju formulu $Y_1N_1ZN_2Y_2$ koji su fizički odijeljeni od CpG, Py-obogaćenim, TG oligonukleotidima u metodama, pripravcima i produktima.

35 U sljedećem aspektu izum se odnosi na farmaceutski pripravak koji uključuje najmanje dva oligonukleotida iz izuma, pri čemu najmanje dva oligonukleotida imaju dvije sekvencije koje se razlikuju jedna od druge, te farmaceutski prihvatljiv nosač.

Formulacija vakcine je prikazana prema sljedećem aspektu izuma. Vakcina uključuje bilo koje pripravke iz izuma u kombinaciji s antigenom.

40 Prema sljedećem aspektu izuma prikazana je metoda stimulacije imunog odgovora. Metoda obuhvaća davanje Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuću nukleinske kiseline subjektu koji nije glodavac, a u učinkovitoj količini da se inducira imuni odgovor u subjektu koji nije glodavac. Preferirano je da se Py-obogaćena ili TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina daje oralno, lokalno, u napravi za odgođeno oslobađanje, mukosalno na površini sluznice, sustavno,
 45 parenteralno ili intramuskularno. Kada se Py-obogaćena ili TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina daje na površini sluznice može se isporučiti u učinkovitoj količini za indukciju imunog odgovora sluznice ili sistemskog imunog odgovora. U preferiranim cjelinama površina sluznice odabrana je od skupine koju čine oralna, nazalna, rektalna, vaginalna i okularna površina.

50 U nekim cjelinama metoda uključuje izlaganje subjekta antigenu pri čemu je imuni odgovor specifičan na antigen. Antigen može biti kodiran vektorom nukleinske kiseline koji može biti isporučen subjektu. U nekim cjelinama antigen je odabran iz skupine koja se sastoji od tumorskog antigena, virusnog antigena, bakterijskog antigena, parazitskog antigena i peptidnog antigena.

55 Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline su sposobne izazvati širok spektar imunog odgovora. Primjerice te imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu koristiti za usmjeravanje Th2 u Th1 imunog odgovora. Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu koristiti za aktiviranje imunih stanica kao što su leukociti, dendrične stanice i NK stanice. Aktivacija se može izvesti *in vivo*, *in vitro* ili *ex vivo*, t.j. izoliranjem imune stanice iz subjekta, dovođenje u kontakt imune stanice s učinkovitom količinom Py-obogaćenih ili TG imunostimulirajućih nukleinskih kiselina da se aktivira imuna stanica, te ponovnim davanjem aktivirane imune stanice
 60 subjektu. U nekim cjelinama dendrične stanice eksprimiraju antigen karcinoma. Dendrične stanice mogu biti izložene

antigena karcinoma *ex vivo*.

Imuni odgovor Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline može rezultirati indukcijom produkcije citokina, npr produkcijom IL-6, IL-12, IL-18 TNF, IFN- α i IFN- γ .

U sljedećoj cjelini Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline korisne su za tretman karcinoma. Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline su također korisne prema ostalim aspektima izuma u prevenciji karcinoma (npr. smanjivanjem rizika od razvitka karcinoma) u subjektu koji je rizičan na razvitak karcinoma. Karcinom se može odabrati iz skupine koju čine karcinom žučnog kanala, karcinom dojke, karcinom cerviksa, koriokarcinom, karcinom debelog crijeva, endometrijalni karcinom, karcinom želuca, intraepitelne neoplazme, limfomi, karcinom jetre, karcinom pluća (malih i ne-malih stanica), melanom, neuroblastomi, karcinom jajnika, karcinom pankreasa, karcinom prostate, karcinom rektuma, sarkom, karcinom tiroidne žljezde, karcinom bubrega kao i drugi karcinomi i sarkomi. U nekim važnim cjelinama, karcinom je odabran iz skupine koja se sastoji od karcinoma kosti, karcinoma mozga i CNS, karcinoma vezivnog tkiva, karcinoma jednjaka, karcinoma oka, Hodgkinova limfoma, karcinoma grla, karcinoma oralne šupljine, karcinoma kože i karcinoma testisa.

Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline se također mogu koristiti za povećanje odgovora stanica karcinoma na kancerogenu terapiju (npr. antikancerogena terapija), a Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu davati skupa s antikancerogenom terapijom. Antikancerogena terapija može biti kemoterapija, vakcina (npr. *in vitro* pripremljene klice vakcine dendričnih stanica ili vakcine antigena karcinoma) ili na antitijelima zasnovana terapija. Ta zadnja terapija može također obuhvaćati davanje antitijela specifičnih za antigene stanične površine, primjerice, stanica karcinoma, pri čemu imuni odgovor rezultira o antigenu ovisnoj staničnoj citotoksičnosti (ADCC). U jednoj cjelini antitijelo se može izabrati iz skupine koju čine Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2138, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-2 10, MDX-11, NMX-22, OV 103, 3 622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CNIA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egfr3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART I D 10 Ab, SMART ABL 364 Ab i ImmuRAIT-CEA.

Stoga, prema nekim aspektima izuma, osobi koja ima karcinom ili je rizična na karcinom se daje imunostimulirajuća nukleinska kiselina i antikancerogena terapija. U nekim cjelinama, antikancerogena terapija je odabrana iz skupine koja se sastoji od kemoterapijskih sredstava, imunoterapijskih sredstava i vakcine karcinoma. Kemoterapijsko sredstvo može biti odabrano iz skupine koju čine: metotreksat, vinkristin, adriamicin, cisplatin, kloretilnitrouree koje ne sadrže šećer, 5-fluoruracil, mitomicin C, bleomicin, doksorubicin, dakarbazin, taksol, fragilin, Meglamine GLA, valrubicin, karmustain i poliferposan, MM1270, BAY 12-9566, inhibitor RAS farnetil transferaze, inhibitor farnetil transferaze, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI- 994, TNP-470, Hycamtin/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrone/Mitroksan-tron, Metaret/Suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9AC, AG3340, AG3433, InceINX-710, VX-853, ZDOIOI, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32Nalubicin, derivati Metastron/stroncija, Temodal/Temozolomide, Evacet/liposomalni doksorubicin, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeloda/Capcecitabine, Furtulon/Doxifluridinc, Cyclopax/oral paclitaxel, Oral Taxoid, SPU-077/Cisplatin, HNM 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/RAS oncogeni inhibitor, BMS-182751/oralna platina, UFT(Tegafur/Uracil), Ergamisol/Levamisole, Eniluracil/776C85/5FU enhancer, Campto/Levamisole, Camptosar/Irinotecan, Tumodex/Ralitrexed, Leustatin/Cladribine, Paxex/Paclitaxel, Doxil/liposomal doxorubicin, Caelyx/liposomalni doksorubicin, Fludara/Fludarabine, Pharmarubicin/Epirubicin, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naphtalimide, LU 103793/Dolastdin, Caetax/liposomal doxorubicin, Gemzar/Gemcitabine, ZD 0473/Anormed, YM 116, klice joda, inhibitori CDK4 i CDK2, inhibitori PARP, D4809/Dexifosamide, Ifes/Mesnex/Ifosainide, Vumon/Teniposide, Paraplatin/Carboplatin, Plantinol/cisplatin, Vepeside/Etoposide, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, prolijeke gvanin arabinoze, analog Taxana, nitrozouree, sredstva za alkiliranje kao što je melfelan i ciklofosfamide, Aminoglutethimide, Asparaginase, Busulfan, Carboplatin, Chlorombucil, Cytarabine HCl, Dactinomycin, Daunorubicin HCl, Estramustine natrijev fosfat, Etoposide (VP 16-213), Floxuridine, Fluorouracil (5-FU), Flutamide, Hydroxyurea (hidroksikarbamid), Ifosamide, Interferon Alfa-2a, Alfa-2b, Leuprolide acetate (LIMH-releasing factor analogue), Lomustine (CCN- U), Mechlorethamine HCl (nitrogen mustard), Mercaptopurine, Mesna, Mitotane (o,p'-DDD), Mitoxantrone HCl, Octreotide, Plicamycin, Procarbazine HCl, Streptozocin, Tamoxifen citrat, Thioguanine, Thiotepe, Vinblastine sulfat, Amsacrine (m-AMSA), Azacitidine, Erthropoietin, Hexamethylmelamine (HMM), Interleukin 2, Mitoguazone (methyl-GAG; metil glioksal bis-guanilhidrazone; MGBG), Pentostatin (2'deoksikoformicin), Semustine (metil-CCN-LJ), Teniposide (VM-26) te Vindesine sulfat, ali nije na njih ograničeno.

Imunoterapijska sredstva se mogu odabrati iz skupine koju čine: Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M 195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-2 10, MDX- 11,

MDX-22, OV 103, 3 622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX- 220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab- H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.6, ior 0, BABS, anti- FLK-2, NMX-260, ANA Ab, SMART I D 10 Ab, SMART ABL 364 Ab i ImmuRAIT-CEA, ali nije na njih ograničeno.

5

Vakcina karcinoma se može odabrati iz skupine koju čine: EGF antiidiotipska vakcina karcinoma, Gp75 antigen, vakcina GMK melanoma, vakcina MGv gangliozidnog konjugata, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL teratop, BLP25 (MUC-1), liposomalna idioidiotipska vakcina, Melacine, vektore peptidnog antigena, vektore toksin/antigena, na MVA zasnovana vakcina, PACIS, vakcina BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus te

10

ImmuCyst/TheraCys, ali nije na njih ograničeno.

U sljedećoj cjelini metode su upućene na prevenciju ili tretman karcinoma subjektu, a kojem se nadalje može davati interferon- α .

15

Izum se u drugim aspektima odnosi na metode prevencije bolesti kod subjekta. Metoda obuhvaća davanje osobi Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline redovito, a da se pokrene odgovor imunog sustava kojim se sprječava bolest kod subjekta. Primjeri bolesti ili uvjeta koje treba spriječiti upotrebom profilaktičkih metoda iz izuma uključuju infekcije mikroorganizmima (npr. seksualno prenosive bolesti) i anafilaktički šok od alergije izazvane hranom.

20

U drugim aspektima, izum je metoda indukcije urođenog imunog odgovora davanjem subjektu Py-obogaćene ili TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline u učinkovitoj količini za aktiviranje urođenog imunog odgovora.

Prema sljedećem aspektu iz izuma, prikazana je metoda za tretman ili prevenciju virusne ili retrovirusne infekcije. Metoda obuhvaća davanje subjektu koji ima ili je rizičan na virusnu ili retrovirusnu infekciju učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju virusne ili retrovirusne infekcije. U nekim cjelinama virus je uzrokovan virusom hepatitisa, HIV, hepatitisa B, hepatitisa C, herpesa ili papilomavirusa.

25

Metoda za tretman ili prevenciju bakterijske infekcije prikazana je prema drugom aspektu izuma. Metoda obuhvaća davanje subjektu koji ima ili je rizičan na bakterijsku infekciju učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju bakterijske infekcije. U nekim cjelinama bakterijska infekcija potječe od intracelularne bakterije. U sljedeći aspekt izuma je metoda za tretman ili prevenciju infekcije parazitom davanjem subjektu koji ima ili je rizičan na infekciju parazitom učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju infekcije parazitom. U sljedećoj cjelini infekcija parazitom potječe od parazita koji nije crijevna glista.

30

U nekim cjelinama subjekt je čovjek, a u drugim cjelinama subjekt je kralježnjak koji nije čovjek a odabran je iz skupine koju čine: pas, mačka, konj, krava, svinja, koza, riba, majmun, pile i ovca.

35

U sljedećem aspektu izum je metoda za tretman ili prevenciju astme davanjem subjektu koji ima ili je rizičan na astmu učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju astme. U jednoj cjelini astma je alergijska astma.

40

U sljedećem aspektu izum je metoda za tretman ili prevenciju alergije. Metoda obuhvaća davanje subjektu koji ima ili je rizičan na alergiju učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju astme.

45

Metoda za tretman ili prevenciju imune deficijencije prikazana je u sljedećem aspektu izuma. Metoda obuhvaća davanje subjektu koji ima ili je rizičan na imunu deficijenciju učinkovite količine bilo kojeg pripravka iz izuma, a za tretman ili prevenciju astme.

U sljedećem aspektu izum se odnosi na metodu indukcije TH1 imunog odgovora davanjem subjektu bilo kojeg pripravka iz izuma u učinkovitoj količini koja izaziva TH1 imuni odgovor.

50

U jednoj cjelini metoda izum obuhvaća davanje oligonukleotida formule 5'Y₁N₁ZN₂Y₂3' i imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu koja ima nemetilirani CG dinukleotid i TG dinukleotid ili T-obogaćenu sekvenciju. U cjelini oligonukleotid koji sadrži 5'Y₁N₁ZN₂Y₂3' je dan odvojeno od imunostimulirajuće nukleinske kiseline. U nekim cjelinama oligonukleotid koji sadrži 5'Y₁N₁ZN₂Y₂3' i imunostimulirajuća nukleinska kiselina alternirani su tjedno, a u drugoj cjelini oligonukleotid koji sadrži 5'Y₁N₁ZN₂Y₂3' i imunostimulirajuća nukleinska kiselina dani su alternativno dvotjedno.

55

Izum u drugom aspektu prikazuje pripravak koji sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i antikancerogenu terapiju, formulirano u farmaceutski prihvatljivom nosaču te u učinkovitoj količini za tretman karcinoma ili za smanjivanje rizika od razvitka karcinoma. U važnim cjelinama, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je odabrana iz

60

skupnie koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina, TG nukleinska kiselina i C-obogaćena nukleinska kiselina.

Izum nadalje prikazuje kit koji sadrži prvi spremnik u kojem je imunostimulirajuća nukleinska kiselina i najmanje jedan spremnik (npr. drugi spremnik) u kojem je antikancerogena terapija, te upute za primjenu. U jednoj cjelini, kit nadalje sadrži interferon- α koji može biti smješten odvojeno i još jedan spremnik (npr. treći spremnik). U važnoj cjelini, kit sadrži vehikul za odgođeno oslobađanje imunostimulirajuće nukleinske kiseline i najmanje jedan spremnik u kojem je antekancetogena terapija i upute za određivanje vremena davanja antikancerogene terapije. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti odabrana iz skupine koju čine Py-obogaćena nukleinska kiselina, TG nukleinska kiselina i CpG nukleinska kiselina, pri čemu CpG nukleinska kiselina ima nukleotidnu sekvenciju koja sadrži SEQ ID NO: 246.

Izum nadalje prikazuje metodu za prevenciju ili tretman astme ili alergije, a koja sadrži davanjem imunostimulirajuće nukleinske kiseline i lijek protiv astme/alergije u učinkovitoj količini za tretman ili prevenciju astme ili alergije. U važnim cjelinama, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je odabrana iz skupine koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina, TG nukleinska kiselina i C-obogaćena nukleinska kiselina.

U jednoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina je T-obogaćena nukleinska kiselina. U srodnoj cjelini T-obogaćena nukleinska kiselina ima nukleotidnu sekvenciju odabranu od skupine koju čine: SEQ ID NO: 59-63, 73-75, 142, 215, 226, 241, 267-269, 282, 301, 304, 330, 342, 358, 370-372, 393, 433, 471, 479, 486, 491, 497, 503, 556-558, 567, 694, 793-794, 797, 833, 852, 861, 867, 868, 882, 886, 905, 907, 908, te 910-913. U drugim cjelinama T-obogaćena nukleinska kiselina ima sekvenciju odabranu od skupine koju čine SEQ ID NO: 64, 98, 112, 146, 185, 204, 208, 214, 224, 233, 244, 246, 247, 258, 262, 263, 265, 270-273, 300, 305, 316, 317, 343, 344, 350, 352, 354, 374, 376, 392, 407, 411-413, 429-432, 434, 435, 443, 474, 475, 498-501, 518, 687, 692, 693, 804, 862, 883, 884, 888, 890, te 891.

U sljedećoj srodnoj cjelini T-obogaćena nukleinska kiselina nije TG nukleinska kiselina. U još jednoj cjelini T-obogaćena nukleinska kiselina nije CpG nukleinska kiselina.

U jednoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina je CpG nukleinska kiselina, pri čemu nukleotidna sekvencija sadrži SEQ ID NO: 246.

U sljedećoj cjelini lijek protiv astme/alergije je odabran iz skupine koju čine PDE-4 inhibitor, bronhodilatator/beta-1 agonist, otvarač K⁺ kanala, VLA-4 antagonist, antagonist Neurokina, TXA2 inhibitor sinteze, Xanthanin, antagonist arkidonske kiseline, inhibitor 5 lipoksigenaze, antagonist Thromboxin A2 receptora, antagonist Thromboxane A2, inhibitor 5-lipox aktivacijskog proteina, te inhibitor proteaze, ali nije na njih ograničen. U nekim važnim cjelinama, lijek protiv astme/alergije je agonist bronhodilatator/beta-2 odabran iz skupine koja se sastoji od: salmeterol, salbutamol, terbutalin, D2522/formoterol, fenoterol i orciprenalina.

U sljedećoj cjelini lijek protiv astme/alergije je lijek odabran iz skupine koju čine antihistamini i oni koji induciraju prostaglandin. U jednoj cjelini antihistamin je odabran iz skupine koju čine: loratidin, cetirizin, biclizin, analozi ceterizina, feksofenadin, terfenadin, desloratadin, norastemizol, epinastin, ebastin, astemizol, levokabastin, azelatin, transilast, terfenadin, mizolastin, betatastin, CS560, te HSR 609. U sljedećoj cjelini sredstvo za indukciju prostaglandina je S-5751.

U sljedećoj cjelini lijek protiv astme/alergije je odabran iz skupine koju čine steroidi i imunomodulatori. Imunomodulatori mogu biti odabrani iz skupine koju čine: antiinflamatorna sredstva, antagonisti leukotriena, IL4 muteini, topljivi Fc fuzijski proteini IL-4 receptora, anti-IL-4 antitijela, antagonisti IL-4, anti-IL-4 antitijela, topljivi Fc fuzijski proteini IL-13 receptora, anti-IL-9 antitijela, antagonisti CCR3, antagonisti CCR5, inhibitori VLA-4, sredstva za smanjivanje IgE, ali nisu na njih ograničeni. U jednoj cjelini sredstvo za smanjivanje IgE je anti-IgE.

U jednoj cjelini su steroidi odabrani iz skupine koju čine: beklometazon, flutikazon, tramcinolon, te budesonid. U daljnjoj cjelini, immuno-respresivno sredstvo je peptidna vakcina.

U jednoj cjelini, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je dana istovremeno s lijekom protiv astme/alergije. U sljedećoj cjelini, subjekt je imunokompromizirajući subjekt.

Imunostimulirajuća nukleinska kiselina je dana subjektu prema ovdje prikazanim metodama koje se odnose na prevenciju i tretman astme/alergije, a kao što je opisane za ostale aspekte metoda iz izuma.

I sljedećem aspektu, izum prikazuje kit koji sadrži prvi spremnik u kojem je imunostimulirajuća nukleinska kiselina i najmanje jedan spremnik (npr. drugi spremnik) u kojem je lijek protiv astme/alergije, te upute za primjenu. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina korisna u kitu je ona ovdje opisana. U važnoj cjelini imunostimulirajuća nukleinska kiselina je odabran iz skupine koju čine: T-obogaćena nukleinska kiselina, TG nukleinska kiselina i C-

obogaćena nukleinska kiselina. U sljedećoj cjelini kit sadrži vehikul za odgođeno oslobađanje imunostimulirajuće nukleinske kiseline i najmanje jedan spremnik u kojem je lijek protiv astme/alergije, upute za određivanje vremena davanja lijeka protiv astme/alergije. Lijek protiv astme/alergije se može odabrati iz skupine opisanih lijekova protiv astme/alergije opisanih u prethodnim metodama upućenim za prevenciju ili tretman astme/alergije.

U daljnjem aspektu, izum prikazuje pripravak koji sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i lijek protiv astme/alergije, formulirano u farmaceutski prihvatljivom nosaču te u učinkovitoj količini za prevenciju tretman imunog odgovora povezanog s izlaganjem medijatoru astme ili alergije. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti odabrana iz skupine imunostimulirajućih nukleinskih kiselina opisanih u prethodnim metodama i pripravcima. U važnim cjelinama, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je odabrana iz skupine koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina, TG nukleinska kiselina i C-obogaćena nukleinska kiselina. Lijek protiv astme/alergije može biti odabran iz skupine koja se sastoji od lijekova protiv astme i alergije kao što je opisano u prethodnim metodama i pripravcima.

U sljedećem aspektu izum prikazuje pripravak koji sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu odabranu iz skupine koju čine: SEQ ID NO: 95-136, SEQ ID NO: 138-152, SEQ ID NO: 154-222, SEQ ID NO: 224-245, SEQ ID NO: 247-261, SEQ ID NO: 263-299, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 303-409, SEQ ID NO: 414-420, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 426-947, SEQ ID NO: 959-1022, SEQ ID NO: 1024-1093, te farmaceutski prihvatljiv nosač. Preferirano, imunostimulirajuća nukleinska kiselina prisutna je u pripravku u učinkovitoj količini. U jednoj cjelini, imunostimulirajuća nukleinska kiselina prisutna je u učinkovitoj količini da izazove imuni odgovor. U sljedećoj cjelini, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je prisutna u učinkovitoj količini za prevenciju i tretman karcinoma. U sljedećoj cjelini, imunostimulirajuća nukleinska kiselina je prisutna u učinkovitoj količini za prevenciju ili tretman astme/alergije. Izum također prikazuje kitove koji sadrže pripravak od bilo koje prethodne imunostimulirajuće nukleinske kiseline i upute za upotrebu.

U sljedećem aspektu izum uključuje pripravak imunostimulirajuće nukleinske kiseline koja se u osnovi sastoji od 5' M₁TCGTCGTTM₂3', pri čemu najmanje jedan od Cs nije metilirani, pri čemu je M₁ nukleinska kiselina koja ima najmanje jedan nukleotid, te pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima manje od 100 nukleotida.

U drugim aspektima izum se odnosi na farmaceutski pripravak imunostimulirajuće nukleinske kiseline koja sadrži: 5' TCGTCGTT 3', pri čemu najmanje jedan od Cs nije metilirani, te pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima manje od 100 nukleotida i fosfodiesterički skelet i napravu za odgođeno oslobađanje. U nekim cjelinama naprava za odgođeno oslobađanje je mikročestica. U ostalim cjelinama pripravak uključuje antigen.

Svako od ograničenja izuma može sadržavati različite cjeline izuma. Stoga se očekuje da svako ograničenje izuma koje obuhvaća bilo koji element ili kombinaciju elemenata može biti uključeno u svaki aspekt izuma.

Kratki opis slika

Slika 1A je histogram ekspresije CD86 (Y-os) CD19⁺ stanicama nakon izlaganja tih stanica oligonukleotidima prikazanih na X-osi pri koncentraciji od 0.15 µL/mL.

Slika 1B je tablica podataka iz Slike 1A.

Slika 1C je histogram ekspresije CD86 (Y-os) CD19⁺ stanicama nakon izlaganja tih stanica oligonukleotidima prikazanih na X-osi pri koncentraciji od 0.30 µL/mL.

Slika 1D je tablica podataka iz Slike 1C.

Slika 2 je graf koji uspoređuje sposobnosti ODN 2137, ODN 2177, ODN 2200 i ODN 2202 da stimuliraju proliferaciju B stanica pri koncentracijama u rasponu od 0.2 µg/mL do 20 µg/mL.

Slika 3 je graf koji uspoređuje sposobnosti ODN 2188, ODN 2189, ODN 2190 i ODN 2182 da stimuliraju proliferaciju B stanica pri koncentracijama u rasponu od 0.2 µg/mL do 20 µg/mL.

Slika 4 je graf koji opisuje o dozi ovisnu aktivaciju B stanica induciranu ne-CpG ODN. PBMC davatelja krvi je inkubiran s naznačenom koncentracijom ODN 2006 (SEQ ID NO: 246), 2117 (SEQ ID NO: 358), 2137 (SEQ ID NO: 886), 5126 (SEQ ID NO: 1058), te 5162 (SEQ ID NO: 1094) i bojano je s mAb za CD19 (marker B stanice) i CD86 (aktivacijski marker B stanice, B7-2). Ekspresija je mjerena protočnom citometrijom.

Slika 5 je graf koji opisuje stimulaciju B stanica različitim ne-CpG ODN. PBMC jedno predstavnika davatelja je stimulirana s 0.4 µg/mL, 1.0 µg/mL ili 10 µg/mL sljedećih ODN 2006 (SEQ ID NO: 246), 2196 (SEQ ID NO: 913), 2194 (SEQ ID NO: 911), 5162 (SEQ ID NO: 1094), 5163 (SEQ ID NO: 1095), 5168 (SEQ ID NO: 1096), te 5169 (SEQ ID NO: 1097), a ekspresija aktivacijskog markera CD86 (B7-2) na CD-19 pozitivnim B stanicama je mjerena protočnom citometrijom.

Slika 6 je graf koji opisuje aktivaciju B stanica s ne-CpG ODN 1982 i 2041. PBMC je inkubiran s naznačenom koncentracijom ODN 2006 (SEQ ID NO: 246), 1982 (SEQ ID NO: 225), te 2041 (SEQ ID NO: 282) a aktivacija B stanica (ekspresija aktivacijskog markera CD86) je mjerena protočnom citometrijom.

Slika 7 je graf koji opisuje NK stanice aktivirane s ne-CpG ODN. PBMC je inkubiran s 6 µg/mL sljedećih ODN: 2006 (SEQ ID NO: 246), 2117 (SEQ ID NO: 358), 2137 (SEQ ID NO: 886), 2183 (SEQ ID NO: 433), 2194 (SEQ ID NO: 911), te 5126 (SEQ ID NO: 1058) i bojano je s mAb za CD3 (marker T stanice), CD56 (marker NK stanice) i CD69 (rani aktivacijski marker). Ekspresija je CD69 na CD56-pozitivnim NK stanicama mjerena je protočnom citometrijom.

Slika 8 je graf povećanje s NK posredovane citotoksičnosti s ne-CpG ODN. PBMC s 6 µg/mL ODN: 2006 (SEQ ID NO: 246), 2194 (SEQ ID NO: 911), te 5126 (SEQ ID NO: 1058).

Slika 9 je graf koji opisuje NKT stanice koje se mogu aktivirati s ne-CpG ODN. PBMC jednog donora je inkubiran s 6 µg/mL ODN: 2006 (SEQ ID NO: 246), 2117 (SEQ ID NO: 358), 2137 (SEQ ID NO: 886), 2183 (SEQ ID NO: 433), 2194 (SEQ ID NO: 911), te 5126 (SEQ ID NO: 1058) kroz 24 sata i aktivacija NKT stanica je mjerena protočnom citometrijom nakon bojanja stanica s mAb za CD3 (marker T stanice), CD56 (marker NK stanice).

Slika 10 je graf koji opisuje stimulaciju monocita s ne-CpG ODN. PBMC je inkubiran s 6 µg/mL sljedećih ODN: 2006 (SEQ ID NO: 246), 2117 (SEQ ID NO: 358), 2137 (SEQ ID NO: 886), 2178 (SEQ ID NO: 428), 2183 (SEQ ID NO: 433), 2194 (SEQ ID NO: 911), 5126 (SEQ ID NO: 1058), te 5163 (SEQ ID NO: 1095) i bojano je za CD14 (marker monocita) CD80 (B7-1, aktivacijski marker). Ekspresija je mjerena protočnom citometrijom.

Slika 11 je graf koji opisuje oslobađanje TNFα nakon kultiviranja humanih stanica s ne-CpG ODN. PBMC je kultiviran kroz 24 h s ili bez 6 µg/mL navedenog ODN ili 1 µg/mL LPS kao pozitivne kontrole a TNFα je mjerena s ELISA.

Slika 12 je graf koji opisuje oslobađanje IL-6 nakon kultiviranja humanih stanica s ne-CpG ODN i ima isti oblik kao za TNFα. PBMC je kultiviran s navedenom ODN (1.0 µg/mL) a IL-6 je mjerena s ELISA.

Detaljni opis

Izum se u jednom aspektu odnosi na otkriće da su pirimidinom (Py) bogate, te preferirano timidinom (T) bogate nukleinske kiseline kao i nukleinske kiseline koje sadrže TG dinukleotidni motiv učinkovite u posredovanju imuno-stimulirajućeg efekta. Bilo je prethodno poznato da nukleinske kiseline koje sadrže CpG su terapijski i profilaktički pripravci koji stimuliraju imuni sustav u tretmanu karcinoma, infekcijskih bolesti, alergije, astme i ostalih poremećaja, te da pomažu u zaštiti protiv oportunističkih infekcija koje slijede kemoterapije karcinoma. Jaki ali balansirani stanični i humoralni imuni odgovori koji potječu od stimulacije CpG ukazuju na vlastitu obranu tijela od patogena i stanica karcinoma. Sekvencija CpG, koje su relativno rijetke u humanoj DNA se učestlo nalaze u DNA infekcijskih organizama kao što su bakterije. Humani imuni sustav je očito izazvan da prepozna CpG sekvencije kao rani znak upozorenja na infekciju, te iniciraju trenutni i jaki imuni odgovor na napadajuće patogene bez uzrokovanja nepogodnih reakcija koje su često viđene s ostalim stimulirajućim sredstvima. Stoga se nukleinske kiseline koje sadrže CpG, a oslanjaju se na taj urođeni mehanizam obrane, mogu koristiti jedinstven i prirodni put za imunoterapiju. Efekt CpG nukleinskih kiselina na modulaciju imunog odgovora je otkrivena od izumitelja ove patenatne aplikacije i detaljno je opisana u istovremenoj patentnim aplikacijama kao što je U.S. Patentna aplikacija serijski br: 08/386,063 prijavljena 07/02/95 (i odgovarajući PCT US95/01570); 08/738,652 prijavljen 30/10/96; 08/960,774 prijavljeno 10/30/97 (i srodan PCT/IJS97/19791, WO 98/18810); 09/191,170 prijavljen 13/11/98; 09/030,701 prijavljeno 25/02/98 (i odgovarajući PCT/US98/03678; 09/082,649 prijavljen 20/05/98 (i odgovarajući PCT/US98/10408); 09/325,193 prijavljen 03/06/99 (te odgovarajući PCT/US98/04703); 09/286,098 prijavljen 02/04/99 (te odgovarajući PCT/US99/07335); 09/306,281 prijavljen 06/05/99 (te odgovarajući PCT/US99/09863). Cijeli sadržaj od tih patenata i patentnih aplikacija je ovdje ograđen citatom.

Pronalasci iz ovog izuma su primjenjivi za sve gore opisane upotrebe nukleinskih kiselina koje sadrže CpG kao i za bilo koji drugi upotrebu poznatu za korištenje CpG nukleinske kiseline. Izum obuhvaća u jednom aspektu otkriće da Py-obogaćena i preferirano T-obogaćena i TG nukleinske kiseline imaju slična imunostimulirajuća svojstva na CpG oligonukleotide bez obzira da li je CpG motiv prisutan. Stoga je izum koristan za bilo koju metodu za stimuliranje imunog sustava korištenjem Py-obogaćene ili TG nukleinske kiseline. Pronađeno je, iznenađujuće, da prema izumu kimerni oligonukleotidi koji nemaju CpG motiv su imunostimulatori i imaju mnoge iste profilaktičke i terapijske aktivnosti kao CpG oligonukleotidi.

Py-obogaćena je T-obogaćena ili C-obogaćena imunomodulirajuća nukleinska kiselina. U nekim cjelinama T-obogaćene nukleinske kiseline su preferirane. T-obogaćena nukleinska kiselina je nukleinska kiselina koja uključuje najmanje jednu poli-T sekvenciju i/ili koja ima sastav nukleotida koji ima više od 25% T nukleotidnih ostataka. Nukleinska kiselina koja ima koja ima poli-T sekvenciju uključuje najmanje četiri T u nizu, kao što je 5'TTTT3'. Preferirano T-obogaćena nukleinska kiselina uključuje više od jedne poli-T sekvencije. U preferiranim cjelinama T-obogaćena nukleinska kiselina može imati 2,3,4 itd. poli-T sekvencije, kao što su oligonukleotidi br. 2006 (SEQ ID NO: 246). Jedna od vrlo snažnih imunostimulirajućih T-obogaćenih oligonukleotida otkrivenih prema izumu je nukleinska kiselina koja je cijela sastavljena od T nukleotidnih ostataka, npr. oligonukleotidi br. 2183 (SEQ ID NO: 443). Ostale T-

obogaćene nukleinske kiseline prema izumu imaju nukleotidni sastav koji ima više od 25% T nukleotidnih ostataka, ali nije neophodno da uključuje poli T sekvenciju. U tim T-obogaćenim nukleinskim kiselinama T nukleotidni ostaci mogu biti odijeljeni jedan od drugog ostalim tipovima nukleotidnih ostataka npr. G, C, te A. U nekim cjelinama T-obogaćene nukleinske kiseline imaju sastav u kojem je više od 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% i 99% T nukleotidnih ostataka i svaki cijeli broj % između navedenih. Preferirano T-obogaćene nukleinske kiseline imaju najmanje jednu poli-T sekvenciju, te u sastavu nukleotida više od 25% T nukleotidnih ostataka.

Otkriveno je prema ovom izumu da sadržaj T od ODN ima dramatični efekt na imunostimulirajući efekt ODN koji je T-obogaćen ODN, a koji može aktivirati višestruke tipove humanih imunih stanica u odsutnosti bilo kojeg CpG motiva. Oligonukleotid koji ima 3' poli T regiju i 2 5' CG, npr. ODN 2181 (SEQ ID NO: 431) je snažni imunostimulator. Oligonukleotid slične duljine, ODN 2116 (SEQ ID NO: 357) koji sadrži dva dinukleotida na 5' kraju i poli-C regiju na 3' kraju je također imunostimulator ali slabiji od T-obogaćenog oligonukleotida, a prema standardnim eksperimentalnim uvjetima. Stoga, mada C i R imaju skoro identične strukture, njihov efekt na imuna svojstva ODN varira. Oba su sposobna inducirati imuni odgovor ali do različite razine. Stoga su T-obogaćeni i C-obogaćeni oligonukleotidi korisni prema izumu, ali su T-obogaćeni oligonukleotidi preferirani. Nadalje, ako je sadržaj T ODN smanjen ugradnjom drugih baza kao što je G, A ili C, tada su imunostimulirajući efekti smanjeni (ODN br. 2188 (SEQ ID NO: 905), 2190 (SEQ ID NO: 907), 2191 (SEQ ID NO: 908), te 2193 (SEQ ID NO: 910)).

C-obogaćena nukleinska kiselina je nukleinska kiselina koja ima najmanje jednu ili preferirano najmanje dvije poli-C regije ili koja je sastavljena od najmanje 50% C nukleotida. Poli C regija je najmanje četiri C ostatka u nizu. Stoga je poli-C regija prikazana formulom 5'CCCC3'. ostale C-obogaćene nukleinske kiseline prema izumu imaju u sastavu nukleotida više od 50% C nukleotidnog ostatka, ali u sastavu ne uključuju neophodno poli-C sekvenciju. U tim C-obogaćenim nukleinskim kiselinama C nukleotidni ostaci mogu biti odijeljeni jedan od drugog ostalim tipovima nukleotidnih ostataka, npr. G, T, te A. U nekim cjelinama C-obogaćene nukleinske kiseline imaju sastav u kojem je više od 60%, 70%, 80%, 90% i 99% C nukleotidnih ostataka i svaki cijeli broj % između navedenih. Preferirano C-obogaćene nukleinske kiseline imaju najmanje jednu poli-C sekvenciju i u sastavu nukleotida više od 50% C nukleotidnih ostataka, te su u nekim cjelinama također T-obogaćeni.

Kao što je prikazano u Primjerima, nekoliko ODN, za koje se vjerovalo da su ne-imunostimulatori, uključujući dvije ODN SEQ ID NO: 225 i SEQ ID NO: 282 prethodno opisane da su ne-stimulatorne i uglavnom korištene kao kontrole ODN (Takahashi, T *et al.* 2000, *J. Immunol.* 164:4458) je nađeno da su imunostimulatori. Naši eksperimenti pokazuju da ti ODN mogu stimulirati B stanice, mada pri višim koncentracijama u usporedbi s CpG ODN (Slika 6). Duga poli-T ODN (30 mer), barem u nekim eksperimentima je inducirala usporedivo jaku aktivaciju B stanica, a prema jednoj od najjačih CpG ODN aktivatora B stanica. Ti eksperimenti također pokazuju iznenađujuća otkrića da čak poli-C ODN može voditi stimulaciji B stanica.

Imunostimulirajuća aktivnost tih ODN, međutim, nije bila ograničena na humane B stanice. Različiti eksperimentalni testovi su jasno pokazali da uz monocite, NK stanice čak i NKT stanice mogu biti aktivirane takvim ne-CpG ODN (Slike 7-10). Nasuprot poli-T i poli-C sekvencijama, imunostimulirajuće poli-A sekvencije (najmanje za monocite, B i NK stanice) nisu dostignute. Interesantno da je nađeno a uvođenje CpG motiva u SEQ ID No: 225 povećava imunostimulirajuću aktivnost dok produljenje s poli T ne povećava imunostimulaciju. To ukazuje da CpG i T-obogaćeni ODN mogu djelovati preko različitih mehanizama ili puteva. Također je moguće da insercija poli-T motiva u različite položaje SEQ ID NO: 225 može promijeniti imuno-stimulirajuća svojstva.

"TG nukleinska kiselina" ili "TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina" kako se ovdje koristi je nukleinska kiselina koja sadrži barem jedan TpG dinukleotid (timidin-gvanidin dinukleotidnu sekvenciju, t.j. "TG DNA" ili DNA koja sadrži 5' timidin nakon koje slijedi 3' gvanozin i vezani su fosfatnom vezom) i aktivira komponentu imunog sustava. U jednoj cjelini izum prikazuje TG nukleinsku kiselinu predstavljenu najmanje formulom:



pri čemu X_1 i X_2 jesu nukleotidi a N je bilo koji nukleotid, te N_1 i N_2 jesu sekvencije nukleinskih kiselina bilo kojeg broja N, s tim da je suma ukupnog N_1 i N_2 u rasponu od 11 do 21. Kao primjer, kada N_1 jeste 5, tada N_2 može biti 6 (vodeći ukupnoj duljini oligonukleotida od 15 nukleotida). TG može biti smješten bilo gdje unutar oligonukleotidnog lanca, uključujući 5' kraj, centar i 3' kraj. Stoga N_1 može biti od nula do uključujući 21 s tim da je N_2 pogodno odabran i daje sumu od N_2 i N_1 jednaku od 11 do uključujući 21. Slično, N_2 može biti od nula do uključujući 21. U nekim cjelinama, X_1 je adenin, gvanin ili timidin, a X_2 je citozin, adenin ili timidin. U jednoj preferiranoj cjelini, X_2 je timidin. U drugim cjelinama X_1 je citozin i/ili X_2 jeste gvanin. U drugim cjelinama, kao što je ovdje diskutirano, nukleinska kiselina može obuhvaćati druge motive s tim da je dovoljno dug za to.

U drugim cjelinama TG nukleinska kiselina predstavljena je najmanje formulom:



pri čemu X_1 , X_2 , X_3 i X_4 jesu nukleotidi. U nekim cjelinama X_1X_2 jesu nukleotidi odabrani iz skupine koju čine: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, TpA i TpT; X_3X_4 jesu nukleotidi odabrani iz skupine koju čine TpT, CpT, ApT, ApG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA i CpA; N je bilo koji nukleotid, te N_1 i N_2 jesu sekvencije nukleinskih kiselina bilo kojeg broja N s tim da je suma ukupnog N_1 i N_2 u rasponu od 9 do 19. U nekim cjelinama, X_1X_2 jesu GpA ili GpT, X_3X_4 su TpT. U sljedećim cjelinama X_1 i X_2 su purini, a X_3 ili X_4 pirimidini ili X_1X_2 jesu GpA, a X_3 ili X_4 oba jesu pirimidini. I jednoj preferiranoj cjelini X_3X_4 su nukleotidi odabrani iz skupine koju čine: TpT, TpC i TpA.

Imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti bilo koje veličine (t.j. duljine) s tim da je od najmanje 4 nukleotida. U važnim cjelinama imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju duljinu koja je u rasponu između 6 i 100. U još drugim cjelinama duljina je u rasponu između 8 i 35 nukleotida. Preferirano TG nukleotidi su u rasponu od 15 do 25 nukleotida.

Veličina (tj. broj nukleotidnih ostataka u nukleinskoj kiselini) imunostimulirajuće nukleinske kiseline može također doprinijeti stimulatornoj aktivnosti nukleinske kiseline. Iznenadujuće je otkriće da čak kod jake imunostimulirajuće nukleinske kiseline duljina nukleinske kiseline utječe na jakost imunostimulacije koja se može postići. Pokazano je da povećanje duljine T-obogaćene nukleinske kiseline do 24 nukleotida uzrokuje povećanje imune stimulacije. Eksperimenti prikazani u primjerima pokazuju da kada je duljina T-obogaćene nukleinske kiseline povećana s 18 do 27 nukleotida, sposobnost nukleinske kiseline da stimulira imuni odgovor je značajno povećana (usporedi ODN br. 2194, 2183 i 2196 kojima se smanjuje veličina s 27 -18 nukleotida). Povećanjem duljine nukleinske kiseline do 30 nukleotida ima dramatični učinak na biološka svojstva nukleinske kiseline, ali povećavanje duljine preko 30 nukleotida ne utječe dalje na imunostimulirajući efekt (npr. usporedi ODN 2179 do 2006).

Pokazano je da TG nukleinske kiseline raspona duljine od 15 do 25 nukleotida mogu pokazivati povećanu imunostimulaciju. Stoga u jednom aspektu izum prikazuje oligonukleotide duljine 15-27 nukleotida (t.j. oligonukleotid koji je 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ili 27 nukleotida) koja može biti T-obogaćena nukleinska kiselina ili može biti TG nukleinska kiselina. U jednoj cjelini, oligonukleotid nije T-obogaćeni oligonukleotid niti je TG nukleinska kiselina. U drugim cjelinama oligonukleotidi nemaju CG motiv. Izum slično prikazuje oligonukleotide koji imaju duljinu od 15-27 nukleotida, oligonukleotide koji imaju duljinu od 18-25 nukleotida, oligonukleotide koji imaju duljinu od 20-23 nukleotida, te oligonukleotide koji imaju duljinu od 23-25 nukleotida. Bilo koja prethodna cjelina odnosi se na oligonukleotide u tom rasponu duljina. Izum nadalje obuhvaća upotrebu tih prethodnih oligonukleotida u ovdje navedenim metodama.

Mada je maksimalna razina imune stimulacije dostignuta s nekim T-obogaćenim nukleinskim kiselinama kada nukleinska kiselina ima duljinu od 24-30 nukleotidnih ostataka, kao i neke TG nukleinske kiseline čija je duljina u rasponu od 15 do 25 nukleotida, kraće ili dulje imunostimulirajuće nukleinske kiseline se također mogu koristiti prema metodama iz izuma. Za olakšavanje prihvata u stanice imunostimulirajuće nukleinske kiseline preferirano imaju minimalnu duljinu od 6 nukleotidnih ostataka. Nukleinske kiseline bilo koje duljine veće od 6 nukleotida (čak mnogo kb duge) su sposobne inducirati imuni odgovor prema izumu, a ako su prisutni imunostimulirajući motivi, jer se veće nukleinske kiseline degradiraju unutar stanice. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline preferirano jesu u rasponu između 8 i 100, a u nekim cjelinama T-obogaćene imunostimulirajuće nukleinske kiseline su između 24 i 40 nukleotida duljine, a TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline su duljine između 15 i 25 nukleotida.

U jednoj cjelini T-obogaćena nukleinska kiselina predstavljena je najmanje formulom:



pri čemu X_1 , X_2 , X_3 i X_4 jesu nukleotidi. U jednoj cjelini X_1X_2 je TT i/ili X_3X_4 jesu TT. U sljedećoj cjelini X_1X_2 jesu bilo koji od sljedećih nukleotida: TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GT, GG, GA i GC, te X_3X_4 jesu bilo koji od sljedećih nukleotida: TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GT, GG, GA i GC.

U nekim cjelinama je preferirano da imunostimulirajuće nukleinske kiseline ne sadrže poli-C (CCCC) ili poli-A (AAAA). U drugim cjelinama je preferirano da imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju poli-C, poli-A, poli-G (GGGG) ili višestruke GG. Upravo poli-G ili višestruki GG motivi imaju dramatični učinak na neke imunostimulirajuće nukleinske kiseline. Efekt tih ne-T sekvencija ovisi dijelom o statusu skeleta nukleinske kiseline. Primjerice, ako nukleinska kiselina ima fosfodiesterški kimerni skelet, uključivanje tih sekvencija u nukleisku kiselinu će imati samo minimalni učinak na biološku aktivnost nukleinske kiseline. Ako je skelet kompletno fosforotioatni (ili druge fosfatne modifikacije) ili u značajnoj mjeri fosfotioatni, tada uključivanje tih sekvencija može imati veći utjecaj na biološku aktivnost ili kinetiku biološke aktivnosti, uzrokujući smanjivanje mogućnosti T-obogaćenih i TG imunostimulirajućih

nukleinskih kiselina.

Mada je za C-obogaćene nukleinske kiseline pokazano da imaju imunostimularajuća svojstva, insercija poli-C sekvencije u T-obogaćenu nukleinsku kiselinu može imati negativni učinak na nukleinsku kiselinu. Mada prijavitelji nizu vezani predloženim mehanizmom, vjeruje se da imuni sustav razvija mehanizam za razlikovanje nukleinskih kiselina koje imaju različita nukleotidna svojstva, moguće zbog različitih skupina vezanih proteina koji prepoznaju različite sekvencije ili specifičnih vezanih proteina koji prepoznaju sve imunostimularajuće sekvencije ali s različitim afinitetima. Općenito, nukleinske kiseline koje uključuju nemetilirane CpG motive su najbolji imunostimulatori, nakon kojih slijede T-obogaćene nukleinske kiseline, TG nukleinske kiseline i C-obogaćene nukleinske kiseline. Ova generalizacija, međutim ima mnogo izuzetaka. Primjerice znatno T-obogaćena nukleinska kiselina kao što je SEQ ID NO: 886 je jači imunostimulator prema nekim testovima nego neke nukleinske kiseline koje sadrže CpG (npr. fosforotioatna CpG nukleinska kiselina koja sadrži jedan CpG motiv).

Također je otkriveno da dodatak poli-A repa na imunostimularajuću nukleinsku kiselinu može povećati aktivnost nukleinske kiseline. Otkriveno je da modifikacija dodatkom poli-A repa (AAAAAA) ili poli-T repa (TTTTTT) na jako imunostimularajuću CpG nukleinsku kiselinu (SEQ ID NO: 246) povećava imunostimularajuću aktivnost. Sposobnost poli-A repa ili poli-T repa da poveća imunostimularajuća svojstva oligonukleotida je vrlo slična. SEQ ID NO: 246 je T-obogaćen oligonukleotid. Vjerojatno je da bi dodatak poli-A i poli-T repova na nukleinsku kiselinu, a koja nije T-obogaćena, imao veći učinak na imunostimularajuću sposobnost nukleinske kiseline. Kako je poli-T dodan u nukleinsku kiselinu koja je već znatno T-obogaćena, imunostimularajuće svojstvo dodatkom poli-T je nešto smanjeno, mada ne potpuno. Ti pronalasci imaju važnu posljedicu za upotrebu poli-A regija.

Neke imunostimularajuće nukleinske kiseline iz izuma uključuju jedan ili više motiva. Prisutnost CG motiva u imunostimularajućim nukleinskim kiselinama također ima utjecaj na biološku aktivnost nukleinskih kiselina. Kako je ukupna duljina imunostimularajuće nukleinske kiseline 20 nukleotidnih ostataka ili manja, tada su CpG motivi važni u određivanju imunog efekta nukleinske kiseline i metiliranje tih motiva smanjuje mogućnost imunostimularajućeg efekta nukleinske kiseline. Ako je duljina imunostimularajuće nukleinske kiseline povećana na 24, tada imunostimularajući efekti nukleinske kiseline postaju ovisni o CpG motivima i nisu više nestali zbog metiliranja CpG motiva ili njihovim inverznim GC dinukleotidima, s tim da su prisutna ovdje opisana ostala imunostimularajuća svojstva.

Primjerice, ODN 2006 (SEQ ID NO: 246) je jaki stimulator T-obogaćene nukleinske kiseline duljine od 24 nukleotidna ostatka s četiri CpG dinukleotida. Međutim, ODN 2117 (SEQ ID NO: 358), u kojem su CpG motivi metilirani je također jak imunostimulator. ODN 2137 (SEQ ID NO: 886), u kojem su CpG motivi ODN 2006 pretvoreni u GpC, a koji kao rezultat posjeduje šest TG dinukleotida je također imunostimulator. Imunostimularajući efekti nukleinskih kiselina kao što je ODN 2117 i 2137 su regulirani njihovim T i TG sadržajem. Svaka od tih triju nukleinskih kiselina je T-obogaćena, a ODN 2137 je dodatno TG-obogaćen. Ako je njihov sadržaj T smanjen inseriranjem drugih baza kao što je A (ODN 2117 (SEQ ID NO: 358)) ili je njihov sadržaj TG smanjen supstitucijom TG s AG, tada su imunostimularajući efekti nešto smanjeni. U sljedećem primjeru, nukleinska kiselina duljine 24 nukleotida u kojoj su svi položaji slučajni ima samo mali imunostimularajući efekt (ODN 2182 (SEQ ID NO:432)). Slično, nukleinska kiselina duljine 24 nukleotida s drugim nukleotidnim sastavom ima promjenjive imunostimularajuće efekte, ovisno o sadržaju T (ODN 2188 (SEQ ID NO:905), 2189 (SEQ ID NO: 906), 2190 (SEQ ID NO:907), 2191 (SEQ ID NO:908), 2193 (SEQ ID NO: 910), 2183 (SEQ ID NO:433), te 2178 (SEQ ID NO:428)). ODN 2190 koji sadrži TGT motive je jači imunostimulator od ODN 2202 koji sadrži TGG motive. Stoga su u nekim cjelinama preferirani TGT motivi. U drugim cjelinama broj TG motiva je važan zato što povećava broj TG motiva što vodi povećanju imunostimulacije. Neke preferirane TG nukleinske kiseline sadrže najmanje tri TC motiva.

Primjeri CpG nukleinskih kiselina uključuju, ali nisu na njih ograničeni prikazane u Tablici A, kao što su: SEQ ID NO: 1, 3, 4, 14-16, 18-24, 28, 29, 33-46, 49, 50, 52-56, 58, 64-67, 69, 71, 72, 76-87, 90, 91, 93, 94, 96, 98, 102-124, 126-128, 131-133, 136-141, 146-150, 152-153, 155-171, 173-178, 190-186, 188-198, 201, 203-214, 216-220, 223, 224, 227-240, 242-256, 258, 260-265, 270-273, 275, 277-281, 286-287, 292, 295-296, 300, 302, 305-307, 309-312, 314-317, 320-327, 329, 335, 337-341, 343-352, 354, 357, 361- 365, 367-369, 373-376, 378-385, 388-392, 394, 395, 399, 401-404, 406-426, 429-433, 434-437, 439, 441-443, 445, 447, 448, 450, 453-456, 460-464, 466-469, 472-475, 477, 478, 480, 483-485, 488, 489, 492, 493, 495-502, 504-505, 507-509, 511, 513-529, 532- 541, 543-555, 564-566, 568-576, 578, 580, 599, 601-605, 607-611, 613-615, 617, 619- 622, 625-646, 648-650, 653-664, 666-697, 699-706, 708, 709, 711-716, 718-732, 736, 737, 739-744, 746, 747, 749-761, 763, 766-767, 769, 772-779, 781-783, 785-786, 790-792, 798-799, 804-808, 810, 815, 817, 818, 820-832, 835-846, 849-850, 855-859, 862, 865, 872, 874-877, 879-881, 883-885, 888-904, te 909-913.

U nekim cjelinama izuma, imunostimularajuća nukleinska kiselina uključuje CpG dinukleotid a u drugim cjelinama imunostimularajuća nukleinska kiselina nema CpG dinukleotid. CpG dinukleotid može biti metiliran ili nemetiliran. Nukleinska kiselina koja sadrži barem jedan nemetilirani CpG dinukleotid je molekula nukleinske kiseline koja sadrži

nemetiliranu dinukleotidnu sekvenciju citozin-gvanin (j. "CpG DNA" ili DNA koja sadrži nemetilirani 5' citozin nakon kojeg slijedi 3' gvanozina i vezani su fosfatnom vezom) i aktivira imuni sustav. Nukleinska kiselina koja sadrži barem jedan metilirani CpG dinukleotid je nukleinska kiselina koja sadrži metiliranu dinukleotidnu sekvenciju citozin-gvanin (tj. metilirani 5' citozin nakon kojeg slijedi 3' gvanozina i vezani su fosfatnom vezom).

Primjeri T-obogaćenih nukleinskih kiselina koji nemaju CpG nukleinske kiseline uključuju, ali nisu na njih ograničeni oni prikazani na Tablici A, kao što je: SEQ ID NO: 59-63, 73-75, 142, 215, 226, 241, 267-269, 282, 301, 304, 330, 342, 358, 370-372, 393, 433, 471, 479, 486, 491, 497, 503, 556-558, 567, 694, 793-794, 797, 833, 852, 861, 867, 868, 882, 886, 905, 907, 908.1 te 910-913. Primjeri T-obogaćenih nukleinskih kiselina koje uključuju CpG nukleinske kiseline jesu ali bez ograničenja oni prikazane na Tablici A, kao što je SEQ ID NO: 64, 98, 112, 146, 185, 204, 208, 214, 224, 233, 244, 246, 247, 258, 262, 263, 265, 270-273, 300, 305, 316, 317, 343, 344, 350, 352, 354, 374, 376, 392, 407, 411-413, 429-432, 434, 435, 443, 474, 475, 498-501, 518, 687, 692, 693, 804, 862, 883, 884, 888, 890, te 891.

Imunostimulirajuća nukleinska kiselina može biti dvolančana ili jednolančana. Općenito, dvolančane molekule su stabilnije *in vivo*, dok jednolančane molekule imaju povećanu imunsku aktivnost. Stoga u jednom aspektu izuma preferirano je da nukleinska kiselina bude jednolančana, a u drugom aspektu preferirano je da nukleinska kiselina bude dvolančana.

Termin T-obogaćena nukleinska kiselina i TG nukleinska kiselina, kako je ovdje korišteno odnosi se na imunostimularajuću T-obogaćenu nukleinsku kiselinu, odnosno na imunostimularajuću TG nukleinsku kiselinu, osim kad nije drugačije naznačeno. Sekvencije T-obogaćene nukleinske kiseline iz izuma su one opširno opisane gore kao i nukleinske kiseline prikazane na Tablici A koje imaju barem jedan poli-T motiv i/ili imaju u sastavu više od 25% T ili preferirano više od 35% nukleotidnih ostataka. C-obogaćene nukleinske kiseline su one koje imaju najmanje jednu a preferirano barem dvije poli-C regije. TG nukleinske kiseline iz izuma su one detaljno opisane gore, kao i specifične nukleinske kiseline prikazane na Tablici A koje imaju TG motiv.

Nukleinske kiseline iz izuma mogu, ali nije neophodno također imati poli-G nukleinske kiseline kao imunostimulatore. Razne referencije, uključujući Pisetsky i Reich, 1993 *Mol. Biol. Reports*, 18:217-221; Krieger i Herz, 1994, *Ann. Rev. Biochem.*, 63:601-637; Macaya *et al.*, 1993, *PNAS*, 90:3745-3749; Wyatt *et al.*, 1994, *PNAS*, 91:1356-1360; Rando i Hogan, 1998, In *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, ed. Krieg te Stein, str. 335-352; te Kimura *et al.*, 1994, *J Biochem.* 116, 991-994 također opisuju imuno-stimulirajuća svojstva poli-G nukleinskih kiselina.

Poli-G nukleinska kiselina je preferirano nukleinska kiselina predstavljena sljedećim formulama:



pri čemu X_1 , X_2 , X_3 i X_4 jesu nukleotidi. U preferiranoj cjelini barem jedan X_3 jeste G. U sljedećim cjelinama X_3 i X_4 jesu G. U sljedećim cjelinama preferirana formula je 5'GGGNNGGG3' ili 5'GGGNFFNFFF3' pri čemu N predstavlja između 0 i 20 nukleotida. U sljedećim cjelinama poli G nukleinske kiseline nema nemetilirane CG dinukleotide, kao što su primjerice dolje prikazane nukleinske kiseline kao: SEQ ID NO: 5, 6, 73, 215, 267-269, 276, 282, 288, 297-299, 355, 359, 386, 387, 444, 476, 531, 557-559, 733, 768, 795, 796, 914-925, 928-931, 933-936, te 938. U drugim cjelinama poli-G nukleinska kiselina ima barem jedan nemetilirani CG dinukleotid, kao što su primjerice gore prikazane nukleinske kiseline kao: SEQ ID NO: 67, 80-82, 141, 147, 148, 173, 178, 183, 185, 214, 224, 264, 265, 315, 329, 434, 435, 475, 519, 521-524, 526, 527, 535, 554, 565, 609, 628, 660, 661, 662, 725, 767, 825, 856, 857, 876, 892, 909, 926, 927, 932, te 937.

Termini "nukleinska kiselina" i "oligonukleotid" se upotrebljavaju naizmjenično i označavaju višestruke nukleotide (tj. molekule koje sadrže šećer (npr. ribozu ili deoksiribozu) povezane fosfatnom skupinom i različite organske baze koje su supstituirani pirimidini (npr. citozin (C), timidin (T) ili uracil (U)) ili supstituirane purine (npr. adenin (A) ili gvanin (G)). Kako je ovdje korišteno, termin se odnosi na oligoribonukleotide kao i na oligodeoksiribo-nukleotide. Termini će također uključivati polinukleotide (t.j. polinukleotid minus fosfat) i bilo koju drugu organsku bazu koja sadrži polimer. Molekule nukleinske kiseline se mogu dobiti iz postojećih izvora nukleinskih kiselina (npr. genomne ili cDNA) ili su preferirano sintetske (npr. pripravljene sintezom nukleinske kiseline). Termin nukleinska kiselina i oligonukleotid također obuhvaća nukleinske kiseline ili oligonukleotide sa supstitucijama ili modifikacijama, kao što su baze i/ili šećeri. Primjerice, oni uključuju nukleinske kiseline koje imaju šećere u skeletu koji su kovalentno povezani na organsku skupinu male molekulske mase koja nije hidroksilna skupina na 3', te skupinu koja nije fosfatna na 5' položaju. Modificirane nukleinske kiseline mogu uključivati 2'-O-alkiranu riboznu skupinu. Uz to, modificirane nukleinske kiseline mogu uključivati šećere kao što je arabinoza umjesto riboze. Stoga nukleinske kiseline mogu biti heterogenog sastava skeleta i stoga imati bilo koju moguću kombinaciju polimernih jedinica povezanih zajedno kao što su peptid-nukleinske kiseline (koji imaju aminokiselinski skelet s nukleinskim bazama). U nekim cjelinama nukleinske kiseline su homogenog sastava skeleta. Nukleinske kiseline također uključuju supstituirane purine i pirimidine kao što

su C-5 propinom modificirane baze (Wagner *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:840-844, 1996). Purini i pirimidini uključuju, ali bez ograničenja, adenin, citozin, gvanin, timidin, 5-metilcitozin, 2-aminopurin, 2-amino-6-klorpurin, 2,6-diaminopurin, hipoksantin i ostali sintetski nukleoblati, supstituirani ili nesupstituirani aromatski dijelovi. Druge takve modifikacije su dobro poznate stručnjacima.

Za upotrebu ovog izuma, nukleinske kiseline iz izuma mogu biti sintetizirane de novo korištenjem bilo kojeg broj postupaka dobro poznatih u struci. Primjerice, b-cianoetil fosforoamiditna metoda (Beaucage, S. L., i Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); nukleozide H-fosfonatna metoda (Garegg *et al.*, *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 14:5399-5407, 1986; ; Garegg *et al.* *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986; Gaffney *et al.*, *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Te kemijske promjene se mogu izvesti u različitim automatiziranim napravama za sintezu koje postoje na tržištu. Te nukleinske kiseline su navedene kao sintetske. Alternativno, T-obogaćeni i/ili TG T-dinukleotidi se mogu pripremiti u velikim količinama u plazmidima (vidi Sambrook, T., *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989) i odijeliti na manje dijelove ili davati cijele. Nukleinske kiseline se mogu pripremiti iz postojećih sekvencija nukleinskih kiselina (npr., genomne ili cDNA) upotrebom poznatih tehnika kao što su one koje koriste restriksijske enzime, egzonukleaze ili enonukleaze. Nukleinske kiseline pripravljene na ovaj način su navedene kao izolirane nukleinske kiseline. Izolirana nukleinska kiselina se općenito odnosi na nukleinsku kiselinu koja je odijeljena od komponenata s kojima je normalno povezana u prirodi. Kao primjer izolirane nukleinske kiseline može biti ona izdvojena iz stanice, iz jezgre, iz mitohondrija ili iz kromatina. Termini Py-obogaćene nukleinske kiseline i TG nukleinske kiseline.

Za *in vivo* upotrebu, Py-obogaćene i TG nukleinske kiseline mogu biti relativno rezistentne na degradaciju (npr su stabilizirane). "stabilizirana molekula nukleinske kiseline" će značiti molekulu nukleinske kiseline koja je relativno rezistentna na *in vivo* degradaciju (npr. preko egzo- ili endo-nukleaze). Stabilizacija može biti ovisna o duljini ili sekundarnoj strukturi. Nukleinske kiseline koje su deset do stotinu kb duge su relativno rezistentne na *in vivo* degradaciju. Za kraće nukleinske kiseline sekundarna struktura se može stabilizirati i povećati efekt. Primjerice, kada 3' kraj nukleinska kiselina ima komplementarnu sekvenciju uzvodno tako da se može saviti i tvoriti neku vrstu petljaste strukture, tada nukleinska kiselina postaje stabilizirana i stoga pokazuje veću aktivnost.

Alternativno, stabilizacija nukleinske kiseline se može kompletirati preko modifikacije fosfatnog skeleta. Pokazano je da modifikacija skeleta nukleinske kiseline dovodi do povećane aktivnosti Py-obogaćene i RG nukleinskih kiselina kada su dane *in vivo*. Te stabilizirane strukture su preferirane jer Py-obogaćene ili TG molekule iz izuma imaju barem djelomično modificirani skelet. Py-obogaćeni u TG konstrukt koji imaju fosforotianatne veze imaju maksimalnu aktivnost i štite nukleinsku kiselinu od degradacije intracelularnim egzo- i endo-nukleazama. Ostale modificirane nukleinske kiseline uključuju fosfodiesterom modificirane nukleinske kiseline, kombinacije fosfodiesteri i fosforodirioata, p-metoksi i njihove kombinacije. Svaka od tih kombinacija i njihovi određeni efekti na imune stanice su diskutirani detaljnije, a prema CpG nukleinskim kiselinama i PCT publiciranim patentnim aplikacijama PCT/US95/01570 (WO 96/02555) i PCT/US97/19791 (WO 98/18810) traženih prioriteta U.S. serijskih br. 08/386,063 te 08/960,774, prijavljeni 7. veljače, 1995 odnosno 30. listopada 1997, a cijeli sadržaj je ovdje ugrađen citatom. Vjeruje se da te modificirane nukleinske kiseline mogu pokazivati stimulatorsku aktivnost zbog povećane rezistencije nukleaze, povećanog staničnog prihvata i povećanog vezivanja proteina i/ili promjenjene stanične lokalizacije.

Pripravci iz izuma mogu biti kimerni oligonukleotidi. Kimerni oligonukleotidi su oligonukleotidi koji imaju formulu 5'Y₁Y₂Y₃3'. Y₁ i Y₂ jesu molekule nukleinske kiseline koje imaju između 1 i 10 nukleotida. Svaka Y₁ i Y₂ uključuje najmanje jednu modificiranu intranukleotidnu vezu. Kako najmanje 2 nukleotida kimernih oligonukleotida imaju skelet dobiven modifikacijom, te nukleinske kiseline su primjeri jednog tipa "stabiliziranih imunostimulirajućih nukleinskih kiselina".

Što se tiče kimernih oligonukleotida, Y₁ i Y₂ se smatraju neovisnim jedan od drugoga. To znači da svaki Y₁ i Y₂ može ali ne mora imati različite sekvencije i različit skeletne veze u istoj molekuli. Sekvencija varira, ali u nekim slučajevima Y₁ i Y₂ imaju poli-G sekvenciju. Poli-G sekvencija se odnosi na najmanje 3G u nizu. U drugim cjelinama poli-G sekvencija se odnosi na najmanje 4, 5, 6, 7, ili 8 G u nizu. U drugim cjelinama, Y₁ i Y₂ mogu biti TCGTCG, TCGTCGT, ili TCGTCGTT (SEQ ID NO: 1145). Y₁ i Y₂ mogu također imati poli-C, poli-T ili poli-A sekvenciju. U nekim cjelinama Y₁ i/ili Y₂ imaju između 3 i 8 nukleotida.

N₁ i N₂ su molekule nukleinskih kiselina koje imaju između 0 i 5 nukleotida dok N₁ZN₂ ima najmanje ukupno 6 nukleotida. Nukleotidi N₁ZN₂ imaju fosfodiesterski skelet i ne uključuju nukleinske kiseline s modificiranim skeletom. Z je motiv imunostimulirajuće nukleinske kiseline ali ne uključuje CG. Primjerice, Z može biti nukleinska kiselina T-obogaćene sekvencije, npr. uključujući TTTT motiv ili sekvenciju u kojoj je barem 50% baza sekvencije jesu T ili Z može biti TG sekvencija.

Srednji nukleotidi (N₁ZN₂) formule Y₁N₁ZN₂Y₂ imaju fosfodiesterske internukleotidne veze, a Y₁ i Y₂ imaju barem

jedan ali mogu imati više od jednog ili čak mogu imati sve modificirane internukleotidne veze. U preferiranim cjelinama Y_1 i/ili Y_2 imaju barem dvije ili između dvije i pet modificiranih internukleotidnih veza ili Y_1 ima dvije modificirane internukleotidne veze, a Y_2 ima pet modificiranih internukleotidnih veza ili Y_1 ima pet modificiranih internukleotidnih veza a Y_2 ima dvije modificirane internukleotidne veze. Modificirana internukleotidna veza u nekim cjelinama je fosforotioatna modificirana veza, fosforoditioatna modificirana veza ili p-etoksi modificirana veza.

Modificirani skeleti kao što su fosforotioati mogu biti sintetizirani korištenjem automatiziranih tehnika korištenjem fosforoamidata ili H-fosfonatne kemije. Arilni i alkilni fosfonati se mogu pripremiti, npr. kao što je opisano u U. S. Patentu br. 4,469,863; alkilfosfotioesteri (u kojima je nabijeni kisik alkiliran kao što je opisano u U. S. Patentu br. 5,023,243 i Europskom Patentu Br 092,574) se može pripremiti automatiziranom sintezom na čvrstoj fazi upotrebom komercijalno pristupačnih reagensa. Metode za pripremu drugih modifikacija skeleta DNA i supstitucija su opisane ranije (Uhlam, E. i Peyman, A. *Chem. Rev.* 90:544,1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1:165,1990).

Ostale stabilizirane nukleinske kiseline uključuju neionske analoge DNA kao što su alkilni i arilni fosfati (u kojima je nabijeni fosfonatni kisik zamijenjen alkilnom ili arilnom skupinom), fosfodiester i alkilfosfotrietsti u kojima je nabijeni kisik alkiliran. Za nukleinske kiseline koje sadrže diol, kao što je tetraetilenglikol ili heksaetilenglikol, na jednom ili oba kraja je pokazano da su značajno rezistentni na degradaciju nukleoazom.

U slučaju kada je Py-obogaćena ili Tg nukleinska kiselina dana skupa s antigenom koji je kodiran u vektoru nukleinske kiseline, preferirano je da skelet Py-obogaćene ili TG nukleinske kiseline bude kimerna kombinacije fosfodiester i fosforotioata (ili druge fosfatne modifikacije). Stanica može imati poteškoća pri prihvatu vektora plazmida u prisutnosti kompletno fosfotioatno povezanom nukleinskom kiselinom. Stoga kada su vektor i nukleinska kiselina isporučeni u subjektu, preferirano je da nukleinska kiselina ima kimerni skelet ili ima fosforotioatni skelet, ali da je plazmid povezan s vehikulom koji isporučuje izravno u stanicu, pa tako izbjegavajući potrebu za prihvatom u stanicu. Takvi vehikuli poznati u struci uključuju, primjerice, liposome i genske pištolj.

Ovdje opisane nukleinske kiseline kao i različite kontrolne nukleinske kiseline prikazane su dolje u Tablici A

Tablica A

Dok su CpG efekti u miševima dobro karakterizirani, informacije koje se tiču humanog sustava su ograničene. CpG fosforotioatni oligonukleotidi s jakom stimulatornom aktivnosti u mišjem sustavu pokazuju nižu aktivnost kod humanih i drugih imunih stanica koje nisu od glodavaca. U primjerima je opisan razvitak potetnog humanog CpG motiva i karakterizacija njihovih efekata i mehanizama djelovanja na humane primarne B-stanice. DNA koja sadrži CpG motiv jako stimulira proliferaciju primarnih humanih B-stanica, produciraju IL-6 i ekspresiju povećane razine CD96, CD40, CD54 i MHCII. To je povećalo aktivnost vezivanja DNA transkripcijskih faktora NF- κ B i AP-1, kao i fosforilaciju i stresom aktivirane protein kinaze JNK i p38, te transkripcijski faktor ATF-2. Signalizacijski put B-stanice aktiviran CpG DNA je različit od onih aktiviranih receptorom B-stanice, a koji aktiviraju ERK i drugim izoform JNK, ali ne aktivira p38 i ATF-2. Općenito su podaci o CpG s DNA inicirane signalne transdukcije u skladu s onim dobivenim od miševa (Hacker H. *et al.* 1998, *Embo J.* 17:6230, Yi A. K. i Krieg A. M. 1998 *J. immunol* 161:4493).

Preferirani motiv koji nije od glodavca je 5'TCGTCGTT3'. Bazna izmjena u najpotetnijim 8-merom CpG motivu (5'TCGTCGTT3') smanjuje aktivnost oligonukleotida. Timidini na položajima 5' i 3' tog motiva su važniji nego timidini na srednjem položaju. Adenin ili gvanozin na srednjem položaju dovodi do smanjivanja aktivnosti.

Valja napomenuti da naša istraživanja pokazuju da je humani CpG motiv unutar fosfodiesteraskog oligonukleotida (2080) dovoljan za produkciju maksimalnog efekta i da daljnji CpG motivi (2059) ne povećavaju aktivnost dalje. Oligonukleotid s 8-mernim motivom 5'TCGTCGTT3' (2080) koji sadrži dva CpG dinukleotida pokazuje najveću aktivnost u istraživanjima. Zamjenom baza koje okružuju dva CpG dinukleotida (5' položaj, srednji položaj, 3' položaj) smanjuje se aktivnost te sekvencije. Oba CpG dinukleotida unutar 8-mernog CpG motiva zahtijevaju optimalnu aktivnost (2108, 2106). Metiliranjem citidina CpG dinukleotida (2095) gubi se aktivnost 2080, dok se metiliranjem neovisnog citidina (2094) ne gubi. Adicija dvaju CpG motiva u sekvenciju 2080 dajući 2059, ne povećava dalju aktivnost fosfodiesteraskog oligonukleotida. Sekvencija 2080 s fosforotioatnim skeletom (2116) pokazuje manju aktivnost, ukazujući da su dodatni CpG motivi preferirani za jaki fosfotioatni oligonukleotid.

Nadeno je prema izumu da imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju dramatični imunostimulirajući efekt na

humane stanice kao što su NK stanice, B-stanice i DC *in vitro*. Pokazano je da *in vitro* testovi ovdje korišteni predviđaju *in vivo* učinkovitost kao adjuvansa vakcini u verterbratama koji nisu glodavci (Primjer 12), ukazujući da su imunostimulirajuće nukleinske kiseline učinkovita terapijska sredstva za humanu vakcinaciju, imunoterapiju karcinoma, imunoterapiju astme, opće povećanje imune funkcije, povećanje hematopoietičnosti nakon radijacije ili kemoterapije i ostale imunomodulirajuće primjene.

Stoga su imunostimulirajuće nukleinske kiseline korisne u nekim aspektima izuma kao profilaktičke vakcine za tretman subjekta koji ima rizik od razvijanja infekcije s infektivnim organizmom ili karcinom u kojem je na karcinom specifični antigen identificiran, ili alergije ili astme pri čemu je poznata predispozicija na alergen ili na astmu. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline mogu također biti dane bez antigena ili alergena za kratkotrajnu zaštitu od infekcije, alergije ili karcinoma. U tom slučaju ponovljene doze će dozvoliti zaštitu na dulji period. Subjekt koji je rizičan, a kako je ovdje korišteno je subjekt koji ima rizik od izlaganja infekciji uzrokovanj patogenima ili karcinom ili alergen ili ima rizik od razvijanja karcinoma. Primjerice, subjekt koji ima rizik može biti subjekt koji planira putovati u dijelove gdje postoje određeni tipovi infekcijskih sredstava ili može biti subjekt koji je tijekom života ili medicinskog postupka izložen tjelesnim tekućinama koji sadrže infekcijske organizme ili su direktno izloženi organizmima ili čak bilo koji subjekt koji živi u dijelu u kojem su identificirani infekcijski organizmi ili alergeni. Subjekt koji je rizičan za razvitak infekcije također obuhvaća opću populaciju kojoj medicinske ustanove savjetuju vakcinaciju s antigenom određenog infekcijskog organizma. Ako je antigen alergen i subjekt razvija alergijske odgovore na taj odgovarajući antigen i subjekt razvija alergijski odgovor na taj određeni antigen, te subojek može biti izložen antigenu, t.j. tijekom sezone polena, tada je taj subjekt rizičan na izlaganje antigenu. Subjekt koji je rizičan da razvije alergiju na astmu uključuje one subjekte koji su identificirani kao oni koji imaju alergiju ili astmu, ali nemaju aktivnu bolest tijekom tretmana imunostimulirajućom nukleinskom kiselinom kao i subjekti koji se smatraju rizični na razvitak tih bolesti zbog genetičkog i okolišnog faktora.

Subjekt koji je rizičan za razvijanje karcinoma je onaj koji ima veliku vjerojatnost z razvitak karcinoma. Ti subjekti uključuju primjerica subjekte koji imaju genetsku abnormalnost, za što je pokazano da korelira s većom vjerojatnosti razvitka karcinoma i subjekti koji su izloženi sredstvima koji uzrokuju karcinom kao što je duhan, azbest ili drugi toksini ili subjek koji je prethodno bio tretiran protiv karcinoma pa je došlo do reminisije. Kada je subjekt rizičan na razvita karcinoma, tretiran je antigenom specifičnim na tip karcinoma na koji je subjekt rizičan i imunostimulirajućom nukleinskom kiselinom, subjekt može biti sposoban ubiti stanice karcinoma kako se razvijaju. Ako se tumor počinje stvarati u subjeku, on će razviti specifični imuni odgovor na antigen tumora.

Uz to što se imunostimulirajuće nukleinske kiseline koriste za profilaktički tretman, izum također obuhvaća upotrebu imunostimulirajućih nukleinskih kiselina za tretman subjekta koji ima infekciju, alergiju, astmu ili karcinom.

Subjekt koji ima infekciju je subjekt koji je izložen infekcijskim patogenima i ima akutnu ili kroničnu razinu patogena u organizmu koja se može detektirati. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu koristiti s antigenom da podignu na antigen specifičan sustav ili mukozni imuni odgovor koji je sposoban smanjiti razinu ili iskorijeliti infekcijski patogen. Infekcijska bolest, kako je ovdje korišteno, je bolest koja potječe od prisutnosti stranog mikroorganizma u tijelu. Vrlo je važno da se razvije učinkovita vakuinska strategija i tretmani da bi se zaštitile površine sluznice tijela, a koji su priparma mjesta ulaska patogena.

Subjekt koji ima alergiju je subjekt koji ima ili je rizičan da se razvije alergijska reakcija kao odgovor na alergen. Alergija se odnosi na stečenu hipersenzitivnost na tvar (alergen). Alergični uvjeti uključuju ali nisu na njih ograničeni, ekcem, alergijski rinitis, peludnu groznicu, konjunktivitis, bronhialnu astmu, utrikariju ili alergije na hranu i ostale atopične uvjete.

Sada se alergijske bolesti općenito tretiraju injekcijom malih doza antigena nakon postupnog porasta doze antgena. Vjeruje se da taj postupak inducira toleranciju na alergen da bi se spriječile daljnje alergijske reakcije. Tim metodama, međutim, može proći nekoliko godina prije nego što počnu djelovati, te su metode povezane s rizičnim nusjeftima kao što je anafilatički šok. Metodama iz izuma su izbjegnuti ti problemi.

Alergije su općenito uzrokovane generiranjem IgE antitijela protiv neštetnih alergena. Citokini koji su inducirani sistemskim ili mukoznim davanjem imunostimulirajućih nukleinskih kiselina su uglavnom iz klase koja se zove Th1 (primjer su IL-12 i IFN- γ) i ti induciraju humoralni i stanični imuni odgovore. Tipovi antitijela povezanih s Th1 odgovorom su općenito više zaštitni jer imaju veliku neutralizacijsku i opsonizaciju sposobnost. Drugi glavni tip imunog odgovora koji je povezan s produkcijom IL-4, IL-5 i IL-10 citokinima je zaustavljen Th2 imuni odgovor. Th2 odgovori obuhvaćaju uglavnom antitijela i ona ijamju manji zaštitni efekt protiv infekcije i nekih Th2 izotipova (npr. IgE) povezani su s alergijom. Općenito, izgleda da su alergijske bolesti posredovane Th2 tipom imunog odgovora, dok su Th1 odgovori povezani s autoimunom bolesti. Na osnovu sposobnosti imunostimulirajućih nukleinskih kiselina da pomaknu imuni odgovor u osobi s Th2 (koji je povezan s produkcijom IgE antitijela i alergije) na Th1 ogovor (koji je

zaštita protiv alergijskih reakcija), može se davati učinkovita doza za indukciju imunog odgovora imunostimulirajućih nukleinskih kiselina subjetu, a za tretman ili prevenciju alergije.

Stoga imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju značajnu terapijsku primjenu u tretmanu alergijskih ili nealergijskih uvjeta kao što je astma. Razina Th2 citokina, posebice IL-4 i IL-5 je podignuta u dišnim putevima subjelata s astmom. Ti citokini pokažu važne aspekte asmatičnih upalnih odgovora, uključujući IgE izotopnu izmjenu, eozinofilnu kemotaksiju i aktivaciju rasta mast stanica. Th1 citokini, posebno IFN- γ i IL-12 mogu spriječiti nastajanje Th2 klonova i produkciju Th2 citokina. Astma se odnosi na poremećaj respiratornog sustava karakteriziran upalom, sužavanjem dišnih puteva i povećanom reaktivnosti dišnog puta s inhaliranim sredstvima. Astma je učestalo, mada ne ekskluzivno, povezana s atopičnim ili alergijskim simptomima.

Subjekt koji ima karcinom je subjekt koji ima stanice karcinoma koje se mogu detektirati. Karcinom može biti maligni ili nemaligni. Karcinomi ili tumori uključuju, ali nisu na njih ograničeni, karcinom žučnog kanala, karcinom mozga, karcinom dojke, karcinom cerviksa, koriokarcinom, karcinom debelog crijeva, endometrialni karcinom, karcinom jednjaka, karcinom želuca, intraepitelne neoplazme, limfome, karcinom jetre, karcinom pluća (malin i ne-malih stanica), melanom, neuroblastome, karcinom usta, karcinom jajnika, karcinom pankreasa, karcinom prostate, karcinom rektuma, sarkome, karcinom kože, karcinom testisa, karcinom tiroidne žlijezde, karcinom bubrega kao i drugi karcinomi i sarkomi. U jednoj cjelini, karcinom je leukemija vlaknastih stanica, kronična mieloidna leukemija, leukemija kralježničnih T-stanica, multipla mieloma, folikularni limfom, maligni melanom, karcinom skvamoznih stanica, karcinom bubrežnih stanica, karcinom prostate, karcinom stanica mjehura ili karcinom debelog crijeva.

Stoga izum može također biti korišten za tretman karcinoma i tumora kod subjelata koji nisu ljudi. Karcinom je jedna od vodećih uzroka smrti u domaćim životinjama (t.j. mačke i psi). Karcinom obično pogađa starije životinje koji u slučaju kućnih ljubimaca su integrirani u obitelj. Vjerojatno je da će 45% pasa starijih od 10 godina dobiti bolest. Najuočljiviji tretman uključuje operaciju, kemoterapiju i radijacijsku terapiju. Ostali tretmani koji se koriste s nekim uspjehom su laserska terapija, krioterapija, hipertermija i imunoterapija. Izbor tretmana ovisi o tipu karcinoma i stupnju zahvaćenosti. Dok je maligni rast zadržan na male dijelove tijela, teško je ukloniti samo maligne stanice bez djelovanja na normalne stanice.

Maligni poremećaji dijagnosticirani kod pasa i mačaka uključuju, ali bez ograničenja, limfosarkom, osteosarkom, tumore miješane žlijezde, mastocitom, tumor mozga, melanom, adenoskvamozni, karcinoidni tumor pluća, tumor bronhijalne žlijezde, bronhiolarni adenokarcinom, fibrom, miksohondrom, plućni sarkom, neurosarkom, osteom, papilom, retinoblastom, Ewingov sarkom, Wilms tumor, Burkittov limfom, microgliom, neuroblastom, osteoklastom, oralna neoplazija, fibrosarkom, osteosarkom, te rabdomosarkom. Ostale neoplazije kod pasa uključuju karcinom genitalnih skvamoznih stanica, prijenosi veneralnog tumora, tumor testisa, seminom, tumor Sertolijevih stanica, hemangiopericitom, histiocitoma, klorom (granulocitni sarkom), komealni papilom, karcinom komealnih skvamoznih stanica, hemangiosarkom, tumor pleuralnih mezotelijalnih bazalnih stanica, timom, tumor želuca, karcinom adrenalne žlijezde, oralna papilomatoza, hemangioendoteliozom te cistadenom. Dodatne maligne bolesti dijagnosticirane u mačkama uključuju: folikularni limfom, probavni limfosarkom, fibrosarkom i karcinom plućnih skvamoznih stanica. Kod kućnog tvora koji je još opasniji kućni ljubimac razvija se inzulinom, limfom, sarkom, neurom, tumor stanica pankreasa, želučani MALT limfom i želučani adenokarcinom.

Neoplazija koja pogađa životinje u poljoprivredi uključuje leukemiju, hemangiopericitom i goveđu okularnu neoplaziju (kod stoke); preputalni fibrosarkom, karcinom skvamoznih stanica ulcera, preputalni karcinom, neoplaziju vezivnog tkiva i mastocitom (kod konja); hepatocelularni karcinom (kod svinja); limfom i plućni adenom (kod ovaca; plućni sarkom, limfom, Rousov sarkom, retikulendoteliom, fibrosarkom, nefroblastom, limfom B-stanica i limfoidnu leukozu (kod ptica); retinoblastom, hepatični neoplaziju, limfosarkom (limfoblastični limfom, plazmacitoidnu leukemiju i mjehura za plivanje (kod riba), **caseous** limfadenitis (CLA); kronične, infektivne, zarazne bolesti ovaca i koža uzrokovane bakterijom *Corynebacterium pseudotuberculosis*, i zarazni tumor pluća kod ovaca uzrokovan **jaagsiekte**.

Subjekt je izložen antigenu. Kako je ovdje korišteno, termin izložen odnosi se na aktivni korak kontakta subjekta s antigenom ili pasivno izlaganje subjekta antigenu *in vivo*. Metode aktivnog izlaganja subjekta antigenu dobro su poznate u struci. Općenito, antigen je dan direktno subjektu na bilo koji način, kao što je intravenozno, intramuskularno, oralno, transdermalno, mukozalno, intranazalno, intratrahealno ili subkutanalno. Antigen može biti dan sistemski ili lokalno. Metode davanja antigena i imunostimulirajuće nukleinske kiseline su niže detaljno opisane. Subjekt je pasivno izložen antigenu kad antigen postaje raspoloživ za izlaganje imunim stanicama u tijelu. Subjekt može biti pasivno izložen antigenu, primjerice ulaskom stanog patogena u tijelo ili razvojem tumorske stanice, a ekspresiranjem stranog antigena na njegovoj površini.

Metode u kojima je subjekt pasivno izložen antigenu mogu biti vrlo ovisne o vremenu davanja imunostimulirajućih nukleinskih kiselina. Primjerice, kod subjekta koji je rizičan na razvijanje karcinoma ili infektivne bolesti ili alergije ili

astmatskog odgovora, može mu se dati imunostimulirajuća nukleinska kiselina regularno kada je rizik najveći, t.j. tijekom sezone alergije ili nakon izlaganja sredstvu koje uzrokuje karcinom. Uz to, imunostimulirajuća nukleinska kiselina se može davati putnicima prije puta u strane zemlje kada postoji rizik od izlaganja infekcijskim sredstvima. Slično, imunostimulirajuća nukleinska kiselina se može dati vojnicima ili civilima koji su rizični na izlaganje biološkom oružju, a da se izazove sistemski ili muklozni imuni odgovor na antigen, a ako je subjekt izložen.

Antigen, kako je ovdje korišten, je molekula koja je sposobna izazvati imuni odgovor. Antigeni uključuju, ali nisu na njih ograničeni, stanice, ekstrakte stanica, proteine, polipeptide, peptide, polisaharide, polisaharidne konjugate, peptidne i nepetidne imitacije polisaharida ili drugih molekula, male molekule, lipide, glikolipide, ugljikohidrate, viruse i virusne ekstrakte i višestanične organizme kao što su paraziti i alergeni. Termin antigen široko uključuje bilo koji tip molekule koja je prepoznata kao strana od imunog sustava domaćina. Antigeni uključuju, ali nisu ograničeni, antigene karcinoma, mikrobioloških sredstava i alergena.

Antigen karcinoma, kako je ovdje korišten, kao što je peptid ili protein, povezan je sa staničnim površinama tumora ili karcinoma i sposoban je izazvati imuni odgovor kada je ekspimiran na površini stanice koja ispoljava sadržaj MHC molekule. Antigeni karcinoma se mogu pripremiti iz stanica karcinoma pripravom sirovog ekstrakta stanica karcinoma, primjerice kao što je opisano u Cohen *et al.*, 1994 *Cancer Research*, 54:1055 djelomičnim pročišćavanjem antigena, rekombinantnom tehnologijom ili *de novo* sintezom poznatih antigena. Antigeni karcinoma uključuju, ali nisu na njih ograničeni, antigene koji su rekombinantno ekspimirani, njihov imunogeni dio ili od cijele stanice karcinoma. Takvi antigeni mogu biti izolirani ili pripremljeni rekombinantno ili ostalim načinima poznatim u struci.

Mikrobiološki antigen kako je ovdje korišten, je antigen mikroorganizma i uključuje, ali nije na njih ograničen, virus, bakterije, parazite i gljivice. Takvi antigeni uključuju cijeli mikroorganizam kao i njihove prirodno izolirane fragmente ili derivate, a također i sintetske spojeve koji su identični ili slični prirodnim antigenima mikroorganizma i induciraju imuni odgovor specifičan za taj mikroorganizam. Takvi antigeni se koriste rutinski u struci i dobro su poznati stručnjacima u području.

Primjeri virusa koji su nađeni u ljudima uključuju ali nisu na njih ograničeni: *Retroviridae* (npr. humane imunodeficientne viruse kao HIV- I (također naveden kao HTLV-III, LAV ili HTLV-III/LAV, ili MV-III; te ostale izolirane, kao što je HIV-LP; *Picornaviridae* (npr. polio virusi, virus hepatitisa A; enterovirusi, humani Cocksackie virusi, rinovirusi, ehovirusi); *Calciviridae* (npr. vrste koje uzrokuju gastroenteritis); *Togaviridae* (npr. virusi encefalitisa, virusi ružice); *Flaviridae* (npr. virusi encefalitisa, virusi žute groznice); *Coronaviridae* (npr. koronavirusi); *Rhabdoviridae* (npr. virusi vezikularnog stomatitisa); *Coronaviridae* (npr. koronavirusi); *Rhabdoviridae* (npr. virusi vezikularnog stomatitisa, virusi bjesnoće); *Filoviridae* (npr. virusi ebola); *Paramyxoviridae* (npr. virusi parainfluence, virus mumsa, virus ospica, respiratorni sincitialni virus); *Orthomyxoviridae* (npr. influenza virusi); *Bunyaviridae* (npr. Hantaan virusi, bunga virusi, phlebovirusi te Nairo virusi); *Arenaviridae* (hemoragični virusi groznice); *Reoviridae* (npr. reovirusi, orbivirusi i rotavirusi); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus hepatitisa B); *Parvoviridae* (parvovirusi); *Papovaviridae* (papiloma virusi, polio virusi); *Adenoviridae* (većina adenovirusa); *Herpesviridae* (herpes simplex virus (HSV) I i 2, varicela zoster virus, citomegalovirus (CMV), virus herpesa); *Poxviridae* (virusi variole, virusi vakcine, pox virusi); te *Iridoviridae* (npr. virus groznice afričke svinje); te neklasificirani virusi (npr. etiološka sredstva Spongiform encephalopathies, the sredstvo delta hepatitisa (mišljeno da bude defektivni satelit virusa hepatitisa B), sredstva ne-A, ne-B hepatitisa (klasa I = interno prenosivi; klasa 2 = parenteralno prenosivi (t.j. Hepatitis); Norwalk i odgovarajući virusi, te astrovirusi).

Gram negativne i gram pozitivne bakterije služe kao antigeni u vertebrata. Takve gram pozitivne bakterije uključuju, ali nisu na njih ograničene, vrste *Pasteurella*, vrste *Staphylococci*, te vrste *Streptococcus*. Gram negativne bakterije uključuju, ali nisu na njih ograničene, *Escherichia coli*, vrste *Pseudomonas*, te vrste *Salmonella*. Specifični primjeri infekcijskih bakterija uključuju, ali nisu na njih ograničene *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionellapneumophila*, *Mycobacteria* sps (npr. *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (grupa A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (grupa B Streptococcus), *Streptococcus* (viridans grupa), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobne sps.), *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, te *Aspergillus niger*.

Primjeri gljivica uključuju *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Ostali infekcijski organizmi (t.j. protitis) uključuju *Plasmodium spp.* kao što su *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, te *Plasmodium vivax* i *Toxoplasma gondii*. Paraziti rođeni u krvi i tkivu uključuju *Plasmodium spp.*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania spp.*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* te *Trypanosoma rhodesiense* (afrička bolest spavanja), *Trypanosoma cruzi* (Chagasova bolest), te *Toxoplasma gondii*.

Ostali medicinski relevantni mikroorganizmi su opisani naširoko u literaturi, npr. vidi C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Velika Britanija 1983, i cijeli sadržaj koji je ovdje ugrađen citatom.

Mada se mnogi gore opisani mikrobiološki antigeni odnose na humane poremećaje, izum je također koristan za tretman drugih vertebrate koji nisu ljudi. Vertebrate koje nisu ljudi su također sposobni razviti infekcije koje mogu biti spriječene ili tretirane ovdje prikazanom imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama. Primjerice, uz tretman infekcijskih humanih bolest, metode iz izuma su korisne za tretman infekcija kod životinja.

Kako je ovdje korišteno, termin tretirati, tretiran ili tretirajući kada se koristi za infektivnu bolest odnosi se na profilaktički tretman koji povećava rezistenciju subjekta (subjek je rizičan na infekciju) na infekciju s patogenom, ili drugim riječima smanjuje se vjerojatnost da subjekt postane inficiran patogenom kao i tretman nakon što je subjekt (inficirani subjekt) postao inficiran, a da se bori protiv infekcije, npr. za smanjivanje ili eliminaciju da infekcija postane lošija.

Mnoge vaccine za tretman vertebrata koji nisu ljudi prikazani su u Bennett, K. *Compendium of Veterinary Products*, 3. izd. North American Compendiums, Inc., 1995. Kako što je gore diskutirano, antigeni uključuju infekcije mikroorganizme kao što su virusi, paraziti, bakterije i gljivice, te njihove fragmente izvedeni iz prirodnih izvora ili sintetski. Infekcijski virusi za humane i ne-humane vertebrate uključuju retroviruse, RNA viruse i DNA viruse. Ta skupina retrovirusa uključuje jednostavne retroviruse ili kompleksne retroviruse. Jednostavni retrovirusi uključuju podgrupe retrovirusa tipa B, retroviruse tipa C, retroviruse tipa D. Primjer retrovirusa tipa B je mišji tumor mliječne žljeze (MMTV). Retrovirusi C tipa uključuju podgrupe grupa A C tipa (uključujući Rous sarkoma virus (RSV), ptičji virus leukemije (ALV), te ptičji virus mieloblastoze (AMV)) te C tip grupe B (uključujući virus mačje leukemije (FeLV), virus leukemije gibona (GALV), virus nekroze slezene (SNV), virus retikuloendotelioze (RV) te virus majmuskog sarkoma (SSV)). Retrovirusi D-tipa uključuju Mason-Pfizer virus majmuna (MPMV) i majmunski retrovirus tipa I (SRV- 1). The kompleksni retrovirusi uključuju podgrupu lentivirusa, viruse karcinoma T-stanica i pjenaste viruse. Lentivirusi uključuju HIV-1, ali također uključuju HIV-2, SIV, Visna virus, mačji virus imunodeficiencije (FIV), te konjsku infekciju anemia virusom (EIAV). Virus leukemije T-stanica uključuje HTLV- 1, HTLV-II, virus leukemije T-stanica majmuna (STLV), te virus leukemije goveda (BLV). Konjski pjenasti virusi uključuju humani pjenasti virus (HFV), majmunski pjenasti virus (SFV) i goveđi pjenasti virus (BFV).

Primjeri ostalih RNA virusa koji su antigeni u vertebratama uključuju, ali nisu na njih ograničeni, članove obitelji Reoviridae, uključujući rod Orthoreovirus (višestruki serotip retrovirusa sisavaca i ptica), rod Orbivirus (Bluetongue virus, Eugenangee virus, Kemerovo virus, virus afričke bolesti konja, te virus jake Colorado groznice), the rod Rotavirus (humani rotavirus, virus diareje teleta iz Nebraske, majmunski rotavirus, goveđi rotavirus, ptičji rotavirus); obitelji Picomaviridae, uključujući rod Enterovirus (poliovirus, Cocksackie virus A i B, enterični citoplastični human (ECHO) virusi, virus hepatitisa A, majmunski enterovirusi, virusi encephalomyelitis (ME) glodavaca, Poliovirus muris, goveđi enterovirusi, svinjski enterovirusi, rod Cardiovirus (virus encefalomyokarditisa (EMC), mengovirus), rod Rhinovirusa (Humani rinovirusi uključujući majmanje 113 podtipova; ostali rinovirusi), rod Aphovirus (slinavka i šap (FMDV); obitelj Calciviridae, uključujući Vesicular exanthema svinjskog virusa, virus San Miguel morskog lava, mačji pikomavirus i Norwalk virus; the obitelj Togaviridae, uključujući the rod Alphavirus (Uskršnji virus encefalitisa, virus Semliki šume, Sindbis virus, Chikungunya virus, O'Nyong- Nyong virus, virus Ross rijeke, Venecuelanski virus konjskih encefalitisa, zapadni virus konjskih encefalitisa), the rod Flavivirus (virus žute groznice rođen u komarcu, denga virus, japanski virus encefalitisa, St. Louis virus encefalitisa, Murray Valley virus encefalitisa, virus West Nile, Kunjin virus, srednjoeuropski virus zadebljanja kosti, virus zadebljanja kosti iz dalekog istoka, Kyasanur šumski virus, Louping III virus, Powassan virus, virus hemoragične groznice iz Omska), rod Rubivirus (Rubella virus), rod Pestivirus (virusne bolesti sluznice, Hog virus kolere, virus Borderove bolesti); obitelj Bunyaviridae, uključujući rod Bunyavirus (Bunyamwera i povezani virusi, grupa virusa kalifornijskog encefalitisa), rod Phlebovirus (virus siciliske pješčane groznice, virus groznice iz Rift Valley), rod Nairovirus (Crimean-Congo virus hemoragične groznice, virus bolesti Nairobi ovaca) te rod Uukuvirus (Uukuniemi i slični virusi); obitelj Orthomyxoviridae, uključujući rod virusa Influenza (virus influenza tipe A, mnogi humani podtipovi; svinjski virus influenza, te ptički i konjski virusi influenza; influenza tipa B (mnogi humani podtipovi), te influenza tipa C (moguće drugi rod); obitelj paramyxoviridae, uključujući rod Paramyxovirus (virus parainfluenza tipa 1, Sendai virus, Hemadsorption virus, Parainfluenza virusi tipova 2 do 5, virus Newcastle bolesti, virus mumps), rod Morbillivirus (virus ospica, virus subacutne sklerotičnog panencefalitisa, virus zlovolje, Rinderpest virus), rod Pneumovirus (virus respiratorne sincicijski (RSV), virus goveđi respiratorni sincicijski i virus upale pluća); obitelj Rhabdoviridae, uključujući rod Vesiculovirus (VSV), Chandipura vims, Flanders-Hart Park

virus), rod *Lyssavirus* (*Rabies virus*), riblji *Rhabdovirusi*, te dva vjerojatna *Rhabdovirusa* (*virus Marburga* i *virus Ebola*); obitelj *Arenaviridae*, uključujući *virus limfocitnog koriomenegitisa* (LCM), *virus Tacaribe kompleksa*, te *Lassa virus*; the obitelj *Coronoviridae*, uključujući infekcije *Bronchitis Virusom* (IBV), *virusom Hepatitisa*, *humani entero* i *corona virus*, te mačji *infektivni peritonitis* (mačji *coronavirus*).

Ilustrativni su DNA virusi koji su antigeni u kralježnjacima uključujući, bez ograničenja, obitelj *Poxviridae*, uključujući rod *Orthopoxvirus* (*Variola major*, *Variola minor*, *majmunski pox* *Vaccinia*, *Cowpox*, *Buffalopox*, *Rabbitpox*, *Ectromelia*), rod *Leporipoxvirus* (*Myxoma*, *Fibroma*), rod *Avipoxvirus* (*Fowlpox*, *ptičji pox virus*), rod *Capripoxvirus* (*ovčiji pox*, *kozji pox*), rod *Suipoxvirus* (*svinjski pox*), rod *Parapoxvirus* (*zarazni virus postularnog dermatitisa*, *pseudogovedi pox*, *virus govedeg papularnog stomatitisa*); obitelj *Iridoviridae* (*virus groznice afričke svinje*, *žablj virusi 2 i 3*, *virus ribljeg limfocitisa*); obitelj *Herpesviridae*, uključujući α -*Herpesviruse* (*Herpes Simplex* tipovi 1 i 2, *Varicella-Zoster*, *konjski virus abortusa*, *konjski virus herpesa 2 i 3*, *pseudorabies virus*, *virus infektivnog ketokonjunktivisa*, *virus infekcije govedeg rinotracheitisa*, *virus infekcije mačjeg rinotracheitisa*, *virus infektivnog laryngotracheitisa*) the β -*herpesvirusi* (*humani cytomegalovirus* i *svinjski i majmunski cytomegalovirusi*); γ -*herpesvirusi* (*Epstein-Barr virus* (EBV), *virus Marekove bolesti*, *Herpes saimiri*, *Herpesvirus ateles*, *Herpesvirus silvilagus*, *herpes virus zamorca*, *virus Lucke tumora*); obitelj *Adenoviridae*, uključujući rod *Mastadenovirusa* (*humane podgrupe A,B,C,D,E* i *negrupirani*; *majmunski adenovirusi* (najmanje 23 serotipova), *infektivni pseći hepatitis*, te *adenovirusi* of *koza*, *svinja*, *ovaca*, *žčaba* i *mnogih drugih vrsta*, rod *Aviadenovirus* (*Avian adenovirusi*); te *adenovirusi* koji se ne mogu kultivirati; obitelj *Papoviridae* uključujući rod *Papillomavirusa* (*humani papilloma virusi*, *goveži papilloma virusi*, *Shope zečji papilloma virus*, te različiti patogeni *papilloma virusi* drugih vrsta), rod *Polyomavirus* (*polyomavirus*, *majmunski vacuolirajuće sredstvo* (SV-40), *zečje vacuolirajuće sredstvo* (RKV), *K virus*, *BK virus*, *JC virus*, i *polioma virusi* ostalih primata kao što je *Lymphotropic papilloma virus*); obitelj *Parvoviridae* uključujući rod *Adeno-povezanih virusa*, rod *Parvovirus* (*mačji panleukopenia virus*, *bovine parvovirus*, *pseći parvovirus*, *virus bolesti Aleutian kezna*, itd). Konačno, DNA virusi mogu uključivati viruse koji ne spadaju u gornje obitelji kao što je *virusi Kuru* i *Creutzfeldt-Jacobova bolest* i *kronične infekcije neuropatičnih sredstava* (*CHINA virus*).

Svaka od prethodnih listi je ilustrativna i nije namjera da bude ograničavajuća.

Uz upotrebu imunostimulirajućih nukleinskih kiselina za indukciju na antigen specifičnog imunog odgovora kod ljudi, metode iz preferiranih cjelina su posebno dobro postavljene za tretman ptica kao što su pilići, purice, patke, guske, prepelica i fazana. Ptice su primarni ciljevi za mnoge tipove infekcija.

Izlegnute ptice su izložene patogenim mikroorganizmima odmah nakon rođenja. Mada su te ptice početno zaštićene protiv patogena antigenima naslijeđenim od majke, zaštita je samo privremena i vlastiti imuni odgovor ptice mora započeti da zaštiti ptice protiv patogena. Često je poželjno sriječiti infekciju mladih ptica koje su najprijemčivije. Također je poželjno da se spriječi infekcija u starijim pticama, posebice kada su ptice čuvane u zatvorenim kvartovima, što vodi brzom širenju bolesti. Stoga je poželjno da se daje imunostimulirajuća nukleinska kiselina iz izuma i adjuvnas koji nije nukleinska kiselina da se poveća na antigen specifični odgovor, a kada je antigen prisutan.

Primjeri uobičajenih infekcija kod pilića je infektivna pileća infekcija *virusom anemija* (CIAV). CIAV je prvo izoliran u Japanu 1979 tijekom izražavanja *Marekove bolesti* (Yuasa *et al.*, 1979, *Avian Dis.* 23:366-385). Kako je u to vrijeme CIAV nađen kod komercijalne živine u svim zemljama koji su veliki proizvođači živine, (van Bulow *et al.*, 1991, pp.690-699) u *Diseases of Poultry*, 9, izd. Iowa State University Press).

CIAV infekcija rezultira kliničkom bolesti koja je karakterizirana anemijom, hemoragijom i imunosupresijom mladih pilića. Atrofija timusa i koštane srži i konzistentne lezije su također karakteristike infekcije s CIAV. Iscrpljenjem limfocita iz timusa i povremeno u burza *Fabricsius*, rezultira imunosupresijom i povećanom mogućnosti sekundarne, bakterijske ili virusne infekcije koja tada otežava tijekom bolesti. Imunosupresija može uzrokovati pogoršanje bolesti nakon infekcije s jednim ili više virusa *marekove bolesti* (MDV), infektivne virusne bolesti burze, virusne retikuloendotelioze, adenovirusa ili reovirusa. Pokazano je da je patogenezna MDV povećana CIAV (DeBoer *et al.*, 1989, str. 28 i *Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference*, Tempe, Ariz.). Nadalje, pokazano je da CIAV pogoršava znakove infekcije burze, bolesti burze i znakova infekcije bolesti burze (Rosenberger *et al.*, 1989, *Avian Dis.* 33:707- 713). Pilići razvijaju vremenom rezistenciju na eksperimentalno izazvane bolesti zbog CAA. To se u suštini završeno do 2 tjedna, ali starije životinje su još uvijek prijemčive za infekciju (Yuasa, N. *et al.*, 1979 *supra*; Yuasa, N. *et al.*, *Arian Diseases* 24, 202-209, 1980). Međutim, ako su pilići dvostruko zaraženi s CAA i ako imunosupresivnim sredstvima (IBDV, MDV etc.), rezistencija prema bolesti će biti odgođena (Yuasa, N. *et al.*, 1979 i 1980 *supra*; Bulow von V. *et al.*, *J. Veterinary Medicine* 33, 93-116, 1986). Karakteristike CIAV koje mogu povećati transmisiju bolesti uključuju visoku rezistenciju na okolišne inaktivacije u nekom uobičajenim dezinfektima. Ekoomski učinak infekcije CIAV ina industiju uzgoja živine je jasna iz činjenice da 10% do 30% ptiva uginu koje dobiju infekciju.

Vakcinacija ptica kao i ostalih kralježnjaka se može izvesti pri bilo kojoj starosti. Normalno se vakcijacija izvodi do 12 tjedana starosti sa živim mikroorganizmima i između 14 i 18 tjedana s inaktiviranim mikroorganizmima ili druge tipove vakcina. *In vivo* vakcinacija se može izvesti u zadnjem kvartalu razvoja embrija. Vakcina se može dati subkutano, sprejem, oralno, intraokularno, intrakatehalno, nazalno ili drugim metodama ovdje opisanih isporuka u sluznicu. Stoga se imunostimulirajuće nukleinske kiseline iz izuma mogu davati pticama i drugim kralježnjacima koji nisu ljudi upotrebom rutinskih rasporeda vakcinacije, a antigen se može davati nakon odgovarajućeg perioda, kao što je ovdje opisano.

Stoka također može dobiti infekciju. Bolesti koje pogađaju te životinje uzrokuju veliki ekonomski gubitak. Metode iz izuma se mogu koristiti da zaštite stoku kao što su goveda, konji, svinje, ovce i koze.

Goveda mogu biti inficirana govedim virusima. Virus govede diareje (BVDV) je mali virus s omotačem koji sadrži RNA pozitivnog smjera i klasificiran je skupa s virusom svinjske kolere (HOCV) i ovčijom pograničnom bolesti (BDV) i rodu pestivirusa. Mada su pestivirusi prethodno klasificirani u obitelj Togaviridae, neka istraživanja ukazuju da ih treba smjestiti unutar obitelji Flaviviridae skupa s flavivirusom i virusom hepatitisa C (HCV) (Francki *et al.*, 1991).

BVDV koji je važan patogen kod stoke se može razlikovati na osnovi analize stanične kulture u citopatogenim (CP) i necitopatogenim (NPC) biotipovima. NPC biotip je rašireniji, mada se oba biotipa mogu naći kod stoke. Ako trudna krava postane inficirana s NCP vrstom, krava može okotiti trajno inficirano i specijalno imunotolerantno tele koje će širiti virus tijekom života. Stalno inficirana stoka može dobiti bolest sluznice i oba biotipa se tada mogu izolirati iz životinje. Klinička manifestacija može uključivati abortus, tetragenczu, respiratorne probleme, bolest sluznice i blagi proljev. Uz to, ozbiljna trombocitopenija povezana s epidemijom stada koja rezultira uginućem životinja koje su opisane, a vrste koje su povezane s bolešću su smrtnije nego klasični BVDV.

Konjski virusi herpesa (EHV) sadrže skupinu antigenski različitih bioloških sredstava koji uzrokuju različite infekcije u konjima u rasponu od sublingvalne do fatalne bolesti. To uključuje konjski herpesvirus-1 (EHV-1), patogen u konjima. EHV-1 je povezan s epidemijom abortusa, bolesti respiratornog trakta i poremećajima cerebralnog nervnog sustava. Primarna infekcija u gornjem respiratornom traktu mladih konja je rezultat groznice koja traje od 8 do 10 dana. Imunološka slabost može izazvati ponovnu infekciju preko respiratornog trakta bez da bolest postane očita, tako da do abortusa dolazi bez najave. Neurološki sindrom je povezan s respiratorom bolesti ili abortusom i može djelovati na životinje bilo kojeg spola u bilo kojoj dobi, vodeći nedostatku koordinacije, slabosti i naknadno paralizi (Telford, E. A. R. *et al.* Virology 189, 304-316, 1992). Ostali EHV uključuju EHV-1 ili konjski citomegalovirus, EHV-3, virus konjske koitalne eksanteme, te EHV-4 prethodno klasificiran kao podtip 2 EHV-1.

Ovce i koze mogu biti zaražene raznim opasnim mikroorganizmima uključujući visna-maedi.

Primati kao što su majmuni se mogu inficirati virusom majmunske imunodeficijencije. Prikazani su inaktivirani stanični virus i majmunske imunodeficijente vakcine bez stanica kojima se dobiva zaštita majmuna (Stott *et al.* (1990) Lancet 36:1538-1541; Desrosiers *et al.* PNAS USA (1989) 86:6353-6357; Murphey-Corb *et al.* (1989) Science 246:1293-1297; te Carlson *et al.* (1990) AIDS Res. Human Retroviruses 6:1239-1246). Pokazano je da rekombinantna HIV gp120 vakcina dovodi do zaštite čimpanzi (Berman *et al.* (1990) Nature 345:622-625).

Mačke, domaće i divlje lako se inficiraju različitim mikroorganizmima. Primjerice mačji infektivni peritonitis je bolest koja se događa u domaćim i divljim mačkama, kao što su lavovi, leopardi, gepardi i jaguari. Kada je poželjno da se spriječi infekcija s tim i drugim patogenim organizmima u mačaka, za vakcinaciju mačke i zaštu od infekcije se mogu koristiti metode iz izuma.

Domaće mačke se mogu inficirati s nekoliko retrovirusa uključujući, ali bez ograničenja, virus mačje leukemije (FeLV), mačji sarkoma virus (FeSV), konkomavirus endogenog tipa (RD-1 14), mačji sincicijsku virus (FeSFV). Od tih je FeLV najznačajniji patogen koji uzrokuje različite simptome uključujući limforetikularne i mieloidne neoplazme, anemije, imuno-posredovane poremećaje, i sindrom imunodeficijencije koji je sličan humanom sindromu imunodeficijencije (AIDS). Nedavno određeni replikacijski defektni mutant FeLV označen kao FeLV-AIDS je vrlo jako povezan s imunosupresivnim svojstvima.

Otkriće mačjeg T-limfotropičnog lentivirusa (koji se također navodi kao mačja imunodeficijencija) je prvi put prikazano od Pedersen *et al.* (1987) Science 235:790-793. Karakteristike FIVsu prikazane u Yamamoto *et al.* (1988) Leukemia, December Supplement 2:204S-215S; Yamamoto *et al.* (1988) Am. J. Vet. Res. 49:1246-1258; te Ackley *et al.* (1990) J. Virol. 64:5652-5655. Kloniranje i sekvencijska analiza FIV je prikazana u Olmsted *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2448-2452 te 86:4355-4360.

Mačji infektivni peritonitis (FIP) je sporadična bolest koja se zbiva nepredvidivo u domaćim i divljim mačkama. Dok

je FIP primarno bolest domaćih mačaka, dijagnosticirana je i u lavovima, leopardima, gepardima i jaguarima. Manje divlje mačke koje su zaražene FIP uključuju risa. Kod domaćih mačaka bolest se uglavnom pojavljuje kod mladih životinja, mada je mogu dobiti mačke svake dobi. Najviše se pojavljuje u dobi od 6 do 12 mjeseci. Smanjivanje pojavljivanja bolesti je zabilježeno od 5 do 13 godina starosti, nakon čega slijedi povećano pojavljivanje kod mačaka starih 14 do 15 godina.

Virusne, bakterijske i parazitske bolesti riba i školjaka i ostalih vodenih životinja tvore ozbiljan problem za industriju akvakulture. Zbog velike gustoće životinja u bazenima ili zatvorenim morskim prostorima za uzgoj, infekcijske bolesti se mogu razviti veliki dio uzgoja, primjerice riba, školjaka ili drugih vodenih životinja. Prevencija od bolesti je poželjniji način od tretmana životinja već kad se bolest pojavila. Vakcinacija riba je jedina preventivna metoda koja može pobuditi dugotrajnu zaštitu preko imuniteta. Vakcinacije zasnovane na nukleinskim kiselinama opisane su u U.S. Patentu br. 5,780,488 izdano Davisu.

Imuno sustav ribe ima mnoge karakteristike imunog sustava sisavaca, kao što je prisutnost B-stanica, T-stanica, limfokina, komplementa i imunoglobulina. Riba imaju podklase limfocita s ulogom koja izgleda slična onim od B- i T-stanica sisavaca. Vакcine mogu biti dane uranjanjem ili oralno.

Vrste akvakulture uključuju, ali nisu ograničene na ribe, školjke i druge vodene životinje. Riba uključuju sve ribe kralježnjake koje mogu imati kosti ili hrskavicu, kao što su primjerice salmonidi, šaran, som, te arbut. Salmonidi su obitelj riba koji uključuju pastrvu i losos. Primjeri školjaka i rakova uključuju ali nisu na njih ograničeni lisanku, jastoga, kozicu, rakovicu i kamenice. Ostale vodene životinje uključuju, ali nisu na njih ograničeni jegulju, sipu i hobotnice.

Polypeptides virusnih vodenih patogena uključuju, ali nisu na njih ograničeni, glikoprotein (G) ili nukleoprotein virusne hemoragije virusa septicemija (VHSV); G ili N proteini virusa infektivne hematopoietičke nekroze (IHNV); VP 1, VP2, VP3 ili N strukturni proteini virusa infektivne nekroze pankreasa (IPNV); G protein proljetne viroze šarana (SVC); te protein povezan s membranom, teguminski ili kapsidni protein ili glikoprotein virusa soma (CCV).

Tipični paraziti koji inficiraju konje su: *Gasterophilus* spp.; *Eimeria leuckarti*, *Giardia* spp.; *Tritrichomonas equi*; *Babesia* spp. (RBC's), *Theileria equi*; *Trypanosoma* spp.; *Klossiella equi*; *Sarcocystis* spp.

Tipični paraziti koji inficiraju svinje uključuju: *Eimeria bebbiae*, *Eimeria scabra*, *Isospora suis*, *Giardia* spp.; *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*; *Toxoplasma gondii* i *Sarcocystis* spp., te *Trichinella spiralis*.

Glavni paraziti u mliječnim proizvodima, te kod goveda jesu: *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp.; *Toxoplasma gondii*; *Babesia bovis* (RBC), *Babesia bigemina* (RBC), *Trypanosoma* spp. (plasma), *Theileria* spp. (RBC); *Theileria parva* (limfociti); *Tritrichomonas foetus*; te *Sarcocystis* spp.

Glavni paraziti u grabežljivcima uključuju: *Trichomonas gallinae*; *Coccidia* (*Eimeria* spp.); *Plasmodium relictum*, *Leucocytozoon danilewskyi* (sove), *Haemoproteus* spp., *Trypanosoma* spp.; *Histomonas*; *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Giardia*, *Eimeria*; *Toxoplasma*.

Tipični paraziti koji inficiraju ovce i koze jesu: *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp.; *Toxoplasma gondii*; *Babesia* spp. (RBC), *Trypanosoma* spp. (plasma), *Theileria* spp. (RBC); te *Sarcocystis* spp.

Tipične infekcije parazitima kod živine uključuju kokodiozu uzrokovanu: *Eimeria acervulina*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *Isospora* spp. te *Eimeria truncata*; histomonijazu, uzrokovanu *Histomonas meleagridis* i *Histomonas gallinarum*; trihomonijazu uzrokovanu *Trichomonas gallinae*; te heksamitiju uzrokovanu *Hexamita meleagridis*. Živina može također biti zaražena *Eimeria maxima*, *Eimeria meleagridis*, *Eimeria adenoeides*, *Eimeria meleagritidis*, *Cryptosporidium*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria adenoeides*, *Leucocytozoon* spp., *Plasmodium* spp., *Hemoproteus meleagridis*, *Toxoplasma gondii* i *Sarcocystis*.

Metode iz izuma se također mogu primjeniti na tretman i/ili prevenciju infekcija parazitima kod pasa, mačaka, ptica i riba. Tipični paraziti kod riba su: *Trichomonas gallinae*; *Eimeria* spp., *Isospora* spp., *Giardia*; *Cryptosporidium*; *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Haemoproteus/Parahaemoproteus*, *Plasmodium* spp., *Leucocytozoon/Akiba*, *Atoxoplasma*, *Trypanosoma* spp. Tipični paraziti koji inficiraju pse jesu: *Trichinella spiralis*; *Isospora* spp., *Sarcocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Hammondia* spp., *Giardia duodenalis* (canis); *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*; *Hepatozoon canis*; *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis*; *Leishmania amastigotes*; *Neospora caninum*.

Tipični paraziti koji inficiraju mačke vrste jesu *Isospora* spp., *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Hammondia*

hammondi, *Besnoitia* spp., *Giardia* spp.; *Entamoeba histolytica*; *Hepatozoon canis*, *Cytauxzoon* sp., *Cytauxzoon* sp., *Cytauxzoon* sp. (crvene stanice, RE stanice).

Tipični paraziti koji inficiraju ribe jesu *Hexamita* spp., *Eimeria* spp.; *Cryptobia* spp., *Nosema* spp., *Myxosoma* spp., *Chilodonella* spp., *Trichodina* spp.; *Plistophora* spp., *Myxosoma Henneguya*; *Costia* spp., *Ichthyophthirius* spp., te *Oodinium* spp.

Tipični paraziti u divljim životinjama jesu *Giardia* spp. (camivores, herbivores), *Isospora* spp. (camivores), *Eimeria* spp. (camivores, herbivores); *Theileria* spp. (herbivores), *Babesia* spp. (carnivores, herbivores), *Trypanosoma* spp. (carnivores, herbivores); *Schistosoma* spp. (herbivores); *Fasciola hepatica* (herbivores), *Fascioloides magna* (herbivores), *Fasciola gigantica* (herbivores), *Trichinella spiralis* (camivores, herbivores).

Parazitne infekcija u zooškim vrtovima također mogu stvarati ozbiljni problem. Tipični paraziti u obitelji bovidae je *Eimeria* spp. Tipični parazit u obitelji pinnipedae (foka, morski lav) je *Eimeriaphocae*. Tipični parazit u obitelji camelidae (deve, lame) je *Eimeria* spp. Tipični parazit u obitelji giraffidae (žirafe) je *Eimeria* spp. Tipični parazit u obitelji elephantidae (afrički i azijski) je *Fasciola* spp. Tipični paraziti u nižih primata (čimpanze, orangutani, babuni, majmuni) jesu *Giardia* sp.; *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*; *Plasmodium* spp. (RBC), *Babesia* spp. (RBC), *Trypanosoma* spp. (plazma), *Leishmania* spp. (makrofagi).

Polipeptidni bakterijski patogeni uljučuju ali nisu na njih ograničeni željzom regulirane proteine s vanjske membrane (IROMP) i proteine s unutrašnje membrane (OMP) i A-protein *Acromoniasalmonicida* koja uzrokuje furunkulozu, p57 protein od *Renibacterium salmoninarum* koji uzrokuje bakterijsku bolest bubrega (BKD), antigen povezan s gljivom površinom (msa), površinski eksprimiran citotoksin (mpr), površinski eksprimiran hemolizin (ish), te flagelarni antigen of *Yersinia*; vanstanični protein (ECP), željzom regulirane proteine s vanjske membrane (IROMP), te strukturni protein od *Pasteurellosis*; OMP i flagelarni protein od *Vibriosanguillarum* i *V. ordalii*; flagelarni protein, OMP protein, *aroA* i *purA* of *Edwardsiella ictaluri* te E.

Polipeptidi parazitskog patogena pokazuju ali nisu na njih ograničeni površinske antigene *Ichthyophthirius*.

Alergen se odnosi na tvar (antigen) koja može inducirati alergijski ili asmatski odgovor u osobi. Lista alergena je ogromna i može uključivati polene, otrov insekata, životinjsku prašinu, spore gljivica i lijekove (npr. penicilin). Primjeri prirodnih životinjskih i biljnih alergena jesu, ali nisu na njih ograničeni specifični proteini na sljedeće rodove: *Canine* (*Canisfamiliaris*); *Dermatophagoides* (e.g. *Dermatophagoidesfarinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (e.g. *Lolium perenne* or *Lolium multiflorum*) *Cryptomeria* (*Cryptomeriajaponica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (e.g. *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (e.g. *Parietaria officinalis* or *Parietariajudaica*); *Blattella* (e.g. *Blattella germanica*); *Apis* (e.g. *Apis multiflorum*); *Cupressus* (e.g. *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* i *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (e.g. *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* i *Juniperus ashei*); *Thuya* (e.g. *Thuya orientalis*); *Chamaecyparis* (e.g. *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (e.g. *Periplaneta americana*); *Agropyron* (e.g. *Agropyron repens*); *Secale* (e.g. *Secale cereale*); *Triticum* (e.g. *Triticum aestivum*); *Dactylis* (e.g. *Dactylis glomerata*); *Festuca* (e.g. *Festuca elatior*); *Poa* (e.g. *Poa pratensis* or *Poa compressa*); *Avena* (e.g. *Avena sativa*); *Holcus* (e.g. *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (e.g. *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (e.g. *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (e.g. *Agrostis alba*); *Phleum* (e.g. *Phleum pratense*); *Phalaris* (e.g. *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (e.g. *Paspalum notatum*); *Sorghum* (e.g. *Sorghum halepensis*); te *Bromus* (e.g. *Bromus inermis*).

Antigen može biti antigen koje je kodiran od vektora nukleinske kiseline. U prethodnom slučaju vektor nukleinske kiseline je dan subjektu i antigen je eksprimiran *in vivo*. U drugom slučaju antigen može biti dan izravno subjektu. Antigen ne kodira vektor nukleinske kiseline i kako je ovdje korišteno odnosi se na bilo koji tip antigena koji nije nukleinska kiselina. Primjerice, u nekom aspektima izuma, antigen koji nije kodiran u vektoru nukleinske kiseline je polipeptid. Male modifikacije primarne aminokiselinske sekvencije polipeptidnog antigena mogu rezultirati polipeptidom koji ima uglavnom istu antigensku aktivnost, a u usporedbi s nemodificiranim polipeptidnim partnerom. Takve modifikacije mogu biti namjerne, kao što je na mjestu dirigiranom mutagenozom, ili mogu biti spontane. Svi polipeptidi producirani tim modifikacijama su ovdje uključeni, a ako antigenost i dalje postoji.

Termin značajno pročišćen kako je ovdje korišten odnosi se na polipeptid koji je gotovo potpuno bez drugih proteina, lipida, ugljikohidrata ili drugih materijala kojim su prirodno povezani. Stručnjak može pročišćiti virusne ili bakterijske polipeptide koristeći standardne tehnike za pročišćavanje proteina. Dovoljno čist polipeptid će često davati jednu glavnu vrpcu na nereducirajućem poliakrilnom gelu. U slučaju djelomično glikoliziranih polipeptida ili tih koji imaju nekoliko početnih kodona može postojati nekoliko vrpca na nereducirajućem poliakrilnom gelu, ali će oni tvoriti prepoznatljive oblike za taj polipeptid. Čistoća virusnog ili bakterijskog polipeptida može također biti određena amino-terminlanom

sekvencijskom analizom. Ostali tipovi antigena nekodiranih od vektora nukleinske kiseline, kao što su polisaharidi, male molekule, imitacije itd su gore opisane i uključene u izum.

Izum također koristi polinukleotide koji kodiraju antigenske polipeptide. Objašnjeno je da se antigen može isporučiti subjektu u molekuli nukleinske kiseline koja kodira antigen, tako da antigen mora biti eksprimiran *in vivo*. Takvi antigeni isporučeni u subjekt u vektoru nukleinske kiseline su navedeni kao antigeni kodirani vektorom nukleinske kiseline. Nukleinska kiselina koja kodira antigen je operativno vezana na sekvenciju ekspresijskog gena koji usmjerava ekspresiju antigena nukleinske kiseline unutar eukariotske stanice. Sekvencija ekspresijskog gena je bilo koja regulacijska nukleotina sekvencija, kao što je promotorska sekvencija ili kombinacija promotora-pojačivača, što olakšava učinkovitu transkripciju i translaciju antigenske nukleinske kiseline na koju je operativno vezan. Sekvencija ekspresijskog gena može, primjerice, biti promotor sisavaca ili virusa, kao što je konstitutivni ili inducibilni promotor. Konstitutivni promotori sisavaca uključuju, ali nisu na njih ograničeni, sljedeće promotore gena: hipoksantil fosforibozil transfetaza (HPTR), adenzin deaminaza, piruvat kinaza, promotor b-aktin i ostali konstitutivni promotori. Primjer virusnih promotora koji djeluje konstitutivno u eukariotskim stanicama uključuje, primjerice promotore iz citomegalovirusa (CMV), majnuskog virusa (npr. SV40), papiloma virusa, adenovirusa, virusa humane imunodeficiencije (HIV), Rus sarkoma virusa, citomegalovirusa, dugo terminalno ponavljanje (LTR) virusa Moloneyove leukemije i ostalih retrovirusa, te promotor timidin kinaze virusa herpes simpleksa. Ostali konstitutivni promotori su poznati stručnjacima. Promotori korisni kao ekspresijske sekvencije gena iz izuma također uključuju inducibilne promotore. Inducibilni promotori su eksprimirani u prisutnosti sredstva za indukciju. Primjerice, metalotioneinski promotor je induciran da promovira transkripciju i translaciju u prisutnosti nekih metalnih iona. Ostali inducibilni promotori poznati su stručnjaku u struci.

Općenito, ekspresijska sekvencija gena će inducirati, ako je neophodno 5' ne-transkribirajuće i 5' ne-translatirajuće sekvencije obuhvaćene inicijacijom transkripcije i translacije, kao što je TATA kutija, pokrivajuća sekvencija, CAAT sekvencija i slično. Posebice, kao 5' ne-transkribirajuće sekvencije će uključivati promotorsku regiju koja uključuje promotorsku sekvenciju za transkripcijsku kontrolu operabilno vezane antigenske nukleinske kiseline. Sekvencija ekspresijskog gena može uključivati pojačivačku sekvenciju ili uzvodni aktivator sekvencija, a ako je poželjno.

Antigenska nukleinska kiselina je operativno vezana na ekspresijsku sekvenciju gena. Kako je ovdje korišteno, za sekvenciju antigenske nukleinske kiseline i ekspresijske sekvencije gene je rečeno da su operativno vezani kada su kovalentno vezani na taj način da smjeste ekspresijsku ili transkripcijsku i/ili translacijsku sekvenciju koju kodira antigen pod utjecajem ili kontrolom ekspresijske sekvencije gena. Za dvije DNA sekvencije je rečeno da su operativno vezane kada indukcija promotora u 5' ekspresijskoj sekvenciji gena rezultira transkripcijom antigenske sekvencije, te ako priroda veze između dvije DNA ne (1) rezultira uvođenjem mutacija pomaka čitajućeg okvira, (2) interferira sa sposobnosti promotorske regije da usmjeri transkripciju antigenske kiseline, ili (3) interferira sa sposobnosti odgovarajućeg RNA transkripta da bude transliran u protein. Stoga, bi ekspresijska sekvencija gena bila operabilno vezana na sekvenciju antigenske nukleinske kiseline ako je ekspresijska sekvencija gena sposobna utjecati na transkripciju sekvencije antigenske nukleinske kiseline, tako da je nastali transkript transliran u željeni protein ili polipeptid.

Antigenska nukleinska kiselina iz izuma može biti isporučena u imuni sustav sam ili skupa s vektorom. U najširem smislu, vektor je bilo koji vehikul koji je sposoban olakšati prijenos antigenske nukleinske kiseline u stanice imunostg sustava tako da antigen može biti eksprimiran i prezentiran na površini imune stanice. Vektor općenito transportira nukleinsku kiselinu u imune stanice sa smanjenom degradacijom relativno prema stupnju degradacije do koje bi došlo u odsutnosti vektora. Vektor može uključivati gore opisane ekspresijske sekvencije gena da se poveća ekspresija antigenske nukleinske kiseline u imunom stanicama. Općenito, vektori korisni u izumu uključuju, ali nisu na njih ograničeni, plazmide, fagemide, viruse, ostale vehikule izvedene iz virusnih ili bakterijskih izvora koji su manipulirani insercijom ili ugradnjom antigenske sekvencije nukleinske kiseline. Virusni vektori u preferirani tip vektora i uključuju, ali bez ograničenja na njih, sekvencije nukleinske kiseline iz sljedećih virusa: retrovirusi kao što je virus Moloneyeve leukemije glodavca, virus Hervejevog sarkoma glodavca, virus tumora mliječne žljezde glodavca, virus Rous sarkoma, adenovirus, virus povezan adenovirusom, SV40 tip virusa, virusi polioima, Epstein-Barrovi virusi, papiloma virusi, virusi vakcinije, te RNA virus kao što je retrovirus. Mogu se koristiti i ostali neimenovani vektori poznati u struci.

Preferirani virusni vektori su zasnovani na necitopatskim eukariotskim virusima čiji su neesencijalni geni zamjenjeni genom od interesa. Necitopatski virusi uključuju retroviruse, čiji životni ciklus obuhvaća reverznu transkripciju genomne virusne RNA u DNA nakon čega slijedi provirusna integracija u staničnu DNA domaćina. Retrovirusi su odobreni u humanoj genskoj terapiji. Korisniji su oni retrovirusi koji su replikacijski deficitarni (t.j. sposobni usmjeravati sintezu željenih proteina ali nisu sposobni proizvesti infektivne čestice. Takvi genetički promijenjeni retrovirusni ekspresijski vektori imaju opću upotrebu za transdukciju gena visoke učinkovitosti *in vivo*. Standardni protokoli za produkciju replikacijski deficitarnog retrovirusa (uključujući korake ugradnje egzogenog genetičkog materijala u plazmid, transfekciju pakirane stanice povezane s plazmidom, produkciju rekombinantnog retrovirusa

pakiranjem stanične linije, sakupljanje virusnih čestica iz medija za kulturu tkiva i infekciju ciljanih stanica s virusnim česticama) prikazani su u Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual W. H. Freeman C. O. New York (1990) i Murry, E. J. methods in Molecular Biology, vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991).

Preferirani virus za neku aplikaciju je virus povezan s adenovirusom, je dvolančani DNA virus. Virus povezan s adenovirusom može biti modificiran inženjersvom da bude replikatorno deficijantan i sposoban inficirati široki raspon tipova stanica i čestica. On dalje ima prednosti kao što su stabilnosti na toplinu i otapalo, velika frekvencija transdukcije u stanicama različitih bioloških linija uključujući hemopoietičke stanice, nedostatak inhibicije superinfekcije što dozvoljava višestruku seriju transdukcije. Virus povezan s adnovirusom može biti integriran u humanu staničnu DNA na specifičnom mjestu i čime je na najmanju mjeru smanjena mogućnost insercijske mutagenaze i varijabilosti ekspresijskih karakteristika insertiranog gena retrovirusne infekcije. Uz to, divlji tip virusne infekcije povezne s adenovirusom je praćen u staničnoj kulturi za veći broj od 100 prolaza u odsutnosti selektivog tlaka, pokazujući da je genomski integracija relativno slaba u virusima sličnim adenovirusima.

Ostali vektori uključuju vektore plazmida. Vektori plazmida su iscrpno opisani u struci i dobro su poznati stručnjacima. Vidi npr. Sambrook *et al.* Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. U zadnjih nekoliko godina vektori plazmida su nađeni posebno pogodnim za isporuku gena u stanice *in vivo* zbog njihove nesposobnosti da se repliciraju i integriraju u genom domaćina. Ti plazmidi, međutim, imaju promotor kompatibilan sa stanicom domaćina, pa mogu eksprimirati peptide iz gena operativno kodiranog unutar plazmida. Neki uobičajeno korišteni plazmidi su pBR322, pUC18, pUC19, PRC/CMV, SV400 i pBlucScript. Ostali plazmidi su dobro poznati stručnjacima u području. Nadalje, plazmidi mogu biti dizajnirani korištenjem restrikcijskih enzima i reakcijom ligacije da se uklone i dodaju specifični fragmeniti DNA.

Nedavno je otkriveno da gen koji nosi plazmide može biti isporučen u imuni sustav korištenjem bakterije. Modificirani oblici bakterija kao što je *Salmonella* mogu biti transficirani plazmidom i korišteni kao vehikuli za isporuku. Bakterijski vehikuli za isporuku mogu biti dani domaćinu oralno ili na bilo koji drugi način. Bakterija isporučuje plazmid u imunostanicu, npr. B-stanice, dendrične stanice koje vjerojatno prolaze preko stomatne barijere. Tom metodologijom je utvrđena visoka razina imune zaštite. Takve metode isporuke su korisne za aspekte izuma, a koriste sistemsku isporuku antigena, imunostimulirajuće nukleinske kiseline i/ili drugog terapijskog sredstva.

Stoga su imunostimulirajuće nukleinske kiseline korisne kao adjuvansi vakcini. Prethodno je ustanovljeno da su CpG oligonukleotidi izvrsni adjuvansi vakcini. Također je pokazano, međutim, da su CpG oligonukleotidi izvrsni adjuvansi vakcini. Međutim, također je pokazano da CpG ODN koji je izvrsni adjuvans kod miševa nije preferiran kod životinja koje nisu glodavci. Da bi se identificirala najbolja imunostimulirajuća nukleinske kiseline za upotrebu kad adjuvasa u humanu vakcinu i ostalih životinja koji nisu glodavci, provedeno je *in vivo* probiranje različitih nukleinskih kiselina za tu svrhu. Nekoliko *in vivo* testova je procijenjeno u miševima prema njihovoj predvidljivoj vrijednosti aktivnosti adjuvansa u miševima. Tijekom tog istraživanja, utvrđen je *in vitro* test koji je predviđa *in vivo* efikasnost. Nađeno je da, iznenađujuće, aktivacija B-stanica i NK stanica korelira posebno dobro sa sposobnošću imunostimulirajuće nukleinske kiseline da se poveća *in vivo* imuni odgovor na antigen.

Ispravno predvidljiva vrijednost aktivacije B-stanica za *in vivo* aktivnost adjuvansa je najvjerojatnije povezana s centralnom ulogom B-stanica u utvrđivanju specifičnog imunog odgovora. Poliklonalna proliferacija B-stanice (inducirana imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama) povećava vjerojatnost na slaganja s na antigen specifičnih B-stanica/T-pomoćnih stanica. Nadalje, povećana ekspresija kostimulirajuće molekule CD86 na poliklonalne proširene B-stanice aktivira antigen specifične T-pomoćne stanice. B-stanice također povećavaju ekspresiju CD40 kao odgovor na imunostimulirajuće nukleinske kiseline, poboljšavajući sposobnost CD40L eksprimiranih aktiviranih T-pomoćnih stanica da stimuliraju B-stanice. Povećana ICAM-1 sinteza na B-stanicama olakšava kontakt stanice na stanicu. Stoga aktivacijski status poliklonalnih B-stanica ima kritičnu ulogu tijekom započinjanja specifičnih odgovora antitijela.

Doprinos aktivnost NK stanica da bi se utvrdila specifična antitijela je, međutim, iznenađujući. NK stanice su djelomice urođeni dio imunog sustava i kao takve obuhvaćene su u prvoj liniji obrane protiv patogena. Najvjerojatnije je obrazac citokina produciranih NK stanicama nakon aktivacije blisko povezan s inicijacijom specifičnog imunog odgovora. Stoga u jednom aspektu izum se odnosi na metode identifikacije adjuvansa, a detekcijom aktivacije NK stanica. Test aktivacije NK stanica se može izvesti kao što je opisano u donjim Primjerima ili korištenjem drugih poznatih testova aktivnosti NK stanica. Preferirano je, međutim, da je korištena miješana populacija stanica, kao što je PBMC, jer je vjerojatno da je aktivacija NK stanica indirektni efekt. Test je preferirano koristan za identifikaciju imunostimulirajućih nukleinskih kiselina koje su korisni adjuvansi za ljude i ostale životinje koji nisu glodavci.

Pokazano je da je indukcija citokina također važna najava *in vivo* aktivnosti adjuvansa. Kako je to 2 log viša osjetljivost humanog endotoksina nego mišjih primarnih monocita, neki oprez je, međutim, potreban da bi se izbjegla

kontaminacija endotoksinom imunostimulirajućih nukleinskih kiselina ovdje korištenih za testiranja humanog sustava (Hartmann G., i Krieg A. M. 1999 *Gene Therapy* 6:893). Kako su TNF- α , IUL-6 i IL-12 producirani od humanih monocita kao odgovor na čak male količine endotoksina, njihova vrijednost za visoki prolaz *in vitro* probiranja je ograničena. S druge strane humane B-stanice i NK stanice pokazuju samo malu aktivaciju endotoksinom i stoga su znatno korisnije u testiranju imunostimulirajuće aktivnosti.

Stimulacija stanične funkcije u NK ili B-stanicama (t.j. litička aktivnost, proliferacija) zahtjeva jaču imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu nego što je indukcija aktivacijskih markera na njihovoj površini (CD69, CD86). Za oba tipa stanica upotreba aktivacijskih markera sa stanične površine pokazuje višu nespecifičnu bazu koja se može pripisati fosforotioatnom skeletu uspoređenom sa funkcionalnim testom. Velika osjetljivost površinskih markera zahtjeva upotrebu imunostimulirajuće nukleinske kiseline male koncentracije za optimalno razlikovanje između imunostimulirajućih nukleinskih kiselina sličnih aktivnosti. Stoga upotreba površinskih markera dozvoljava usporedbu imunostimulirajućih nukleinskih kiselina slabe aktivnosti, dok je funkcionalni test preferiran za usporedbu imunostimulirajućih nukleinskih kiselina velike aktivnosti. Treba naznačiti da su optimalne koncentracije imunostimulirajuće nukleinske kiselina za stimuliranje B-stanica i NK stanica različite. Dok 0.6 μ L/mL ODN već maksimalno stimulira C stanice, optimalna aktivacija NK stanica može zahtijevati 6 μ L/mL ODN. Aktivacija B-stanice i funkcionalna aktivnost NK stanice je mjerena unutar svježe izoliranog PBMC. Prethodno je nađeno da su visoko pročišćene primarne humane B-stanice aktivirane s CpG DNA. Postojanje direktnog efekta CpG DNA na NK stanice je manje jasna, te sekundarni mehanizam posredovan drugim tipom stanica unutar PBMC može doprinijeti funkcionalnoj aktivnosti NK stanica induciranih CpG.

Nukleinske kiseline iz izuma se mogu dati subjektu skupa s antimikrobnim sredstvom. Antimikrobno sredstvo, kako je ovdje korišteno, odnosi se na prirodne i sintetske spojeve koji su sposobni ubiti ili inhibirati infekcijske mikroorganizme. Tip antimikrobnih sredstava korisnih prema izumu će ovisiti o tipu mikroorganizma s kojim je subjekt inficiran ili o riziku da postane inficiran. Antimikrobna sredstva uključuju ali nisu na njih ograničena, antibakterijska sredstva, antivirusna sredstva, antifungalna sredstva, te sredstva protiv parazita. Fraze kao što su "antibakterijsko sredstvo", "antivirusno sredstvo", "antifungalno sredstvo", te "sredstvo protiv parazita" imaju dobro ustanovljena značenja za stručnjake u području i definirani su standardnim medicinskim tekstovima. Ukratko, antibakterijska sredstva ubijaju ili inhibiraju bakterije, i uključuju antibiotike kao i ostale sintetske ili prirodne spojeve koji imaju sličnu funkciju. Antibiotici su molekule male molekulske mase koji su producirani kao sekundarni metaboliti od stanica, kao što su mikroorganizmi. Općenito, antibiotici interferiraju s jednom ili više bakterijskih funkcija ili struktura koje su specifične za mikroorganizme i koji nisu prisutni u stanicama domaćina. Antivirusna sredstva se mogu izolirati iz prirodnih izvora ili sintetizirati i korisni su za ubijanje ili inhibiciju virusa. Antifungalna sredstva se koriste za tretman površinskih gljivičnih infekcija kao i oportunističkih i primarnih sistemskih gljivičnih infekcija. Sredstva protiv parazita ubijaju ili inhibiraju parazite.

Primjeri sredstava protiv parazita, koji su također navedeni kao parazitocidi korisni za humano davanje uključuju, ali nisu na njih ograničeni: albendazol, amfotericin B, benznidazol, bitionol, chloroquine HCl, chloroquine fosfat, clindamycin, dehydroemetine, diethylcarbamazine, diloxanide furoate, eflomithine, furazolidone, glucocorticoids, halofantrine, iodoquinol, ivermectin, mebendazole, mefloquine, meglumine antimoniate, melarsoprol, metrifonate, metronidazole, niclosamide, nifurtimox, oxamniquine, paromomycin, pentamidine isethionate, piperazine, praziquantel, primaquine fosfat, proguanil, pyrantel pamoate, pyrimethamine sulfonamidi, pyrimethamine- sulfadoxine, kinakrine HCl, kinin sulfate, kinidin glukonat, spiramycin, stibogluconate natrij (natrijev kositreni glukonate), suramin, tetraciklin, doxycycline, thiabendazole, tinidazole, trimethoprim-sulfamethoxazole, te trypanosomide od kojih su neki korišteni sami ili u kombinaciji.

Parazitocidi korišteni kod subjekata koji nisu ljudi uključuju: piperazin, dietilkarbamazin, tiabendazol, fenbendazol, albendazol, oksfendazol, oksibendazol, febantel, levamisol, pirantel tartrate, pyrantel pamoate, diklorvos, ivermectin, doramectin, milbemycin-oksime, iprinomektin, moksidektin, N-butil-klorid, toluen, higromicin B tiacetarsekao što je fenbendazol, albendazol, oksendazol, klorsulon, albendazol, amprolium; decokvinat, lasalocid, monensin sulfadimetoksime; sulfafinazolin, sulfakvinoksoline, metronidazol.

Parazitocidi korišteni kod konja uključuju mebendazol, oksifendazol, febantel, pirantel, diklorvos, triklorfon, ivermectin, piperazine; za *S. westeri*: ivermectin, benzimidazoli kao što je tiabendazol, kambendazol, oksibendazol i fenbendazol. Korisni parazitocidi kod pasa uključuju kombinaciju ivermektina i pirantela. Tretman parazitsa kod svinja može uključivati: levamisol, piperazine, pirantel, tiabendazol, diklorvos i fenbendazol. Kod ovaca i koza sredstva uključuju levamisol ili ivermectin. Kaparsolati pokazuju neku učinkovitost u tretmanu *D. immitis* (glista) kod mačaka.

Antibakterijska sredstva ubijaju ili inhibiraju rast ili funkciju bakterija. Velika klasa antibakterijskih sredstava su antibiotici. Antibiotici koji su učinkoviti u ubijanju ili inhibiciji širokog raspona bakterija su navedeni kao antibiotici širokog spektra. Ostali tipovi antibiotika su uglavnom učinkoviti protiv bakterija klase gram pozitivnih ili gram

negativnih. Ti tipovi antibiotika su navedeni kao antibiotici uskog spektra. Ostali antibiotici koji su učinkoviti protiv jednog organizma ili bolesti a ne protiv ostalih tipova bakterija su navedeni kao antibiotici ograničenog spektra. Antibakterijska sredstva su ponekad klasificirana na osnovu njihovog primarnog djelovanja. Općenito, antibakterijska sredstva su inhibitori sinteze staničnih stijenki, inhibitori stanične membrane inhibitori sinteze proteina, inhibitori sinteze i funkcije nukleinske kiseline, te kompetitivni inhibitori.

Antibakterijska sredstva korisna u izumu uključuju ali nisu na njih ograničena prirodne peniciline, polusintetske peniciline, klavulansku kiselinu, cefalosporine, bakitracin, ampicilin, karbenicilin, oksacilin, azlocilin, mezlocilin, piperacilin, methicilin, dicloksacilin, nafcilin, cefalotin, cefapirin, cefaleksin, cefarnandol, cefaklor, cefazolin, cefuroksine, cefoksitin, cefotak-sime, cefsulodin, cefetamet, cefiksime, ceftriaksone, cefoperazone, ceftazi-dine, moksalactam, carbapenems, imipenems, monobactams, euztreonam, vancomicin, polimiksin, amfotericin B, nistatin, imidazoli, clotrimazol, miconazol, ketokonazol, itraconazol, fluconazol, rifampins, etambutol, tetraciklini, koramfenicol, makrolidi, aminoglikozidi, streptomycin, kanamicin, tobramicin, amikacin, gentamicin, tetracikline, minocikline, doksicikline, klortetracikline, eritromicin, roksitromicin, klaritromicin, oleandomicin, azitromicin, chloram-fenikol, kinoloni, kotrimoksazol, norfloksacin, ciprofloksacin, enoksacin, nalidiksinska kiselina, temafloksacin, sulfonamidi, gantrisin, te trimetoprim; Acedapsone; Acetosulfone Sodium; Alamecin; Alexidine; Amdinocillin; Amdinocillin Pivoxil; Amicycline; Amifloxacin; Amifloxacin Mesylate; Amikacin; Amikacin Sulfate; Aminosalicilic acid; Aminosalicylate sodium; Amoxicillin; Amphomycin; Ampicillin; Ampicillin Sodium; Apalcillin Sodium; Aprainycin; Aspartocin; Astromicin Sulfate; Avilamycin; Avoparcin; Azithromycin; Azlocillin; Azlocillin Sodium; Bacampicillin Hydrochloride; Bacitracin; Bacitracin Methylene Disalicylate; Bacitracin Zinc; Bambermycins; Benzoylpas Calcium; Berythromycin; Betamicin Sulfate; Biapenem; Biniramyacin; Biphenamine Hydrochloride; Bispyrithione Magsulfex; Butikacin; Butirosin Sulfate; Capreomycin Sulfate; Carbadox; Carbenicillin Disodium; Carbenicillin Indanyl Sodium; Carbenicillin Phenyl Sodium; Carbenicillin Potassium; Carumonam Sodium; Cefaclor; Cefadroxil; Cefamandole; Cefamandole Nafate; Cefamand-ole Sodium; Cefaparolet; Cefatrizine; Cefazafur Sodium; Cefazolin; Cefazolin Sodium; Cefbuperazone; Cefdinir; Cefepime; Cefepime Hydrochloride; Cefetecol; Cefixime; Cefmenoxime Hydrochloride; Cefmetazole; Cefmetazole Sodium; Cefonicid Monosodium; Cefonicid Sodium; Cefoperazone Sodium; Ceforanide; Cefotaxime Sodium; Cefotetan; Cefotetan Disodium; Cefotiam Hydrochloride; Cefoxitin; Cefoxitin Sodium; Cefpimizole; Cefpimizole Sodium; Cefpiramide; Cefpiramide Sodium; Cefpirome Sulfate; Cefpodoxime Proxetil; Cefprozil; Cefroxadine; Cefsulodin Sodium; Ceftazidime; Ceftibuten; Ceftizoxime Sodium; Ceftriaxone Sodium; Cefuroxime; Cefuroxime Axetil; Cefuroxime Pivoxetil; Cefuroxime Sodium; Cephacetrile Sodium; Cephalixin; Cephalixin Hydrochloride; Cephaloglycin; Cephaloridine; Cephalothin Sodium; Cephapirin Sodium; Cephadrine; Cefotaxime Hydrochloride; Cefphenicol; Chloramphenicol; Chloramphenicol Palmitate; Chloramphenicol Pantothenate Complex Chloramphenicol Sodium Succinate; Chlorhexidine Phosphanilate; Chloroxyleneol; Chlortetracycline Bisulfate ; Chlortetracycline Hydrochloride ; Cinoxacin; Ciprofloxacin; Ciprofloxacin Hydrochloride; Ciprofloxacin; Clarithromycin; Clinafloxacin Hydrochloride; Clindamycin; Clindamycin Hydrochloride; Clindamycin Palmitate Hydro-chloride; Clindamycin Phosphate; Clofazimine ; Cloxacillin Benzathine; Cloxacillin Sodium; Cloxyquin; Colistimethate Sodium; Colistin Sulfate; Coumermycin; Coumermycin Sodium; Cyclacillin; Cycloserine; Dalfopristin; Dapsone; Daptomycin; Demeclocycline; Demeclocycline Hydrochloride; Demecycline; Denofungin ; Diaveridine; Dicloxacillin; Dicloxacillin Sodium; Dihydrostreptomycin Sulfate; Dipyrithione; Dirithromycin; Doxycycline; Doxycycline Calcium; Doxycycline Fosfatex; Doxycycline Hyclate; Droloxacin Sodium; Enoxacin; Epiacillin; Epiacillin Hydrochloride; Erythromycin; Erythromycin Acistrate; Erythromycin Estolate; Erythromycin Ethylsuccinate; Erythromycin Glucoceptate; Erythromycin Lactobionate; Erythromycin Propionate; Erythromycin Stearate; Ethambutol Hydrochloride; Ethionamide; Fleroxacin; Floxacillin; Fludalanine; Flumequine; Fosfomycin; Fosfomycin Tromethamine; Fumoxycillin; Furazolidone Chloride; Furazolidone Tartrate; Fusidate Sodium; Fusidic Acid; Gentamicin Sulfate; Gioximonom; Gramicidin; Haloprogin; Hetacillin; Hetacillin Potassium; Hexedine; Ibafoxacin; Imipenem; Isoconazole; Isepamicin; Isoniazid; Josamycin; Kanamycin Sulfate; Kitasamycin; Levofuraltadone; Levopropylcillin Potassium; Lexithromycin; Lincomycin; Lincomycin Hydrochloride; Lomefloxacin; Lomefloxacin Hydrochloride; Lomefloxacin Mesylate; Loracarbef; Mafenide; Meclocycline; Meclocycline Sulfosalicylate; Megalomicin Potassium Phosphate; Mequidox; Meropenem; Methacycline; Methacycline Hydrochloride; Methenamine; Methenamine Hippurate; Methenamine Mandelate; Methicillin Sodium; Metioproim; Metronidazole Hydrochloride; Metronidazole Phosphate; Mezlocillin; Mezlocillin Sodium; Minocycline; Minocycline Hydrochloride; Mirincamycin Hydrochloride; Monensin ; Monensin Sodium; Nafcillin Sodium; Nalidixate Sodium; Nalidixic Acid; Natamycin; Nebramycin; Neomycin Palmitate; Neomycin Sulfate; Neomycin Undecylenate ; Netilmicin Sulfate; Neutramycin; Nifuradene; Nifuraldezone; Nifuratel ; Nifuratrone; Nifurazil; Nifurimide; Nifurpirinol; Nifurquinazol; Nifurthiazole; Nitrocyline; Nitrofurantoin; Nitromide; Norfloxacin; Novobiocin Sodium; Ofloxacin; Ormetoprim; Oxacillin Sodium; Oximonom; Oximonom Sodium; Oxolinic Acid; Oxytetracycline; Oxytetracycline Calcium; Oxytetracycline; Hydrochloride; Paldimycin; ParacWorophenol; Paulomycin; Pefloxacin; Pefloxacin Mesylate; Penamocillin; Penicillin G Benzathine; Penicillin G Potassium; Penicillin G Procaine; Penicillin G Sodium; Penicillin V; Penicillin V Benzathine; Penicillin V Hydrabamine; Penicillin V Potassium; Pentizidone Sodium; Phenyl Aminosalicylate; Piperacillin Sodium; Pirbenicillin Sodium; Piridicillin Sodium; Pirlimycin Hydrochloride; Pivampicillin Hydrochloride; Pivampicillin Pamoate; Pivampicillin Probenate; Polymyxin B Sulfate; Porfiromycin ;

Propikacin; Pyrazinamide; Pyrithione Zinc; Quindecamine Acetate; Quinupristin; Racephenicol; Ramoplanin; Ranimycin; Relomycin; Repromicin; Rifabutin; Rifametan; Rifamexil; Rifamide; Rifampin; Rifapentine; Rifaximin; Rolitetracycline; Rolitetracycline Nitrate; Rosaramicin; Rosaramicin Butyrate; Rosaramicin Propionate; Rosarainicin Sodium Phosphate; Rosaramicin Stearate; Rosoxacin; Roxarsone; Roxithromycin; Sancycline; Sanfetrinem Sodium; Sarmoxicillin; Sarpicillin; Scopafungin; Sisomicin; Sisomicin Sulfate; Sparfloxacin; Spectinomycin Hydrochloride; Spiramycin; Stallimycin Hydrochloride; Steffimycin; Streptomycin Sulfate; Streptonicozid; Sulfabenz; Sulfabenzamide; Sulfacetamide; Sulfacetamide Sodium; Sulfacytine; Sulfadiazine; Sulfadiazine Sodium; Sulfadoxine; Sulfalene; Sulfamerazine; Sulfameter; Sulfamethazine; Sulfamethizole; Sulfamethoxazole; Sulfamonomethoxine; Sulfamoxole; Sulfanilate Zinc; Sulfanitran Sulfasalazine; Sulfasomizole; Sulfathiazole; Sulfazamet; Sulfisoxazole; Sulfisoxazole Acetyl; Sulfisoxazole Diolamine; Sulfomyxin; Sulopenem; Sultamicillin; Suncillin Sodium; Talampicillin Hydrochloride; Teicoplanin; Temafloxacin Hydrochloride; Temocillin; Tetracycline; Tetracycline Hydrochloride; Tetracycline Phosphate Complex; Tetroxoprim; Thiainphenicol; Thiphencillin Potassium; Ticarcillin Cresyl Sodium; Ticarcillin Disodium; Ticarcillin Monosodium; Ticlatone; Tiodonium Chloride; Tobramycin; Tobramycin Sulfate; Tosufloxacin; Trimethoprim; Trimethoprim Sulfate; Trisulfapyrimidines; Troleandomycin; Trospectomycin Sulfate; Tyrothricin; Vancomycin; Vancomycin Hydrochloride; Virginiamycin; te Zorbamycin.

Anivirusna sredstva su spojevi koji sprječavaju infekciju stanica virusima ili replikaciju virusa unutar stanice. Postoje mnogo manje antivirusnih lijekova nego antibakterijskih lijekova jer je proces virusne replikacije blisko vezan s replikacijom DNA unutar stanice domaćina, tako da bi nepsecifična antivirusna sredstva često bila toksična kod domaćina. Postoje nekoliko stupnjeva procesa virusne infekcije koje se mogu blokirati ili inhibirati antivirusnim sredstvima. Ti stupnjevi uključuju spajanje virusa na stanicu domaćina (imunoglobulinom ili vezujućim peptidima), virusa bez omotača (npr. adamantinom), sintezu ili translaciju virusne mRNA (npr. interferonom), replikaciju virusne RNA ili DNA (npr. analozima nukleotida), sarijevanje novih virusnih proteina (npr. inhibitorima proteaze) i zametanje i oslobađanje virusa.

Analozi nukleotida su sintetski spojevi koji su slični nukleotidima ali koji imaju nekompletnu ili abnormalnu deoksiriboznu ili riboznu skupinu. Kad su jedanput analozi nukleotida u stanici, oni su fosforilirani, produciraju trifosfate koji kompetiraju s normalnim nukleotidima za ugradnju u virusnu DNA ili RNA. Kad je jedanput trifosfatni oblik nukleotidnog analoga ugrađen u rastući lanac nukleinske kiseline, uzrokuje ireverzibilno povezivanje s virusnom polimera-zom i stoga uzrokuje terminaciju lanca. Analozi nukleotida uključuju, ali nisu na njih ograničeni acilovir (koristan za tretman citomegalovirusa), idoksiridin, ribavirin (koristan za tretman respiratornog sincitalnog virusa), dideoksiinozin, dideoksicitidin, te zidovudin (azoditiimidin).

Interferoni su citokini koji se izlučuju iz virusom inficiranih stanica kao i imunih stanica. Interferoni djeluju vezanjem na specifične receptore na stanicu susjednu inficiranoj stanici uzrokujući promjene koje je zaštićuju od infekcije virusom. α - i β -interferon također inducira ekspresiju Klase I i Klase II MHC molekula na površini inficiranih stanica čime je povećano ispoljavanje za prepoznavanje imune stanice domaćina. α - i β -interferoni se mogu dobiti kao rekombinantni oblici i korišteni su za tretman kroničnog hepatitisa B i C infekcije. Pri dozama koje su učinkovite za antivirusnu terapiju, interferon ima ozbiljne nuspojave kao što je temperatura, slabost i gubitak težine.

Terapija imunoglobulinom je ovdje korištena za prevenciju virusne infekcije. Terapija imunoglobulinom za virusne infekcije je različita nego za bakterijske infekcije jer umjesto da je specifična na antigen, imunoglobulinska terapija funkcionira vezivanjem na vanstanični virion i sprječava od napada i ulaska u stanicu koje mogu dobiti virusnu infekciju. Terapija je korisna za prevenciju virusne infekcije u periodu vremena u kojem su antitijela prisutna u domaćinu. Općenito postoje dva tipa imunoglobulinske terapije, normalna imunoglobulinska terapija i hiperimunoglobulinska terapija. Normalna imunoglobulinska terapija koristi produkte antitijela koji su pripravljeni iz sakupljenih seruma normalnih donora krvi. Ti sakupljeni produkti imaju niski titar antitijela prema visokom rasponu humanih virusa, kao što je hepatitis A, parvovirus, enterovirus (posebno naonati), humani imunoglobulin za bjesnoću (koristan nakon izlaganja profilaksi subjekta kojeg je ugrizka bijesna životinja) imunoglobulin hepatitisa B (koristan za prevenciju virusa hepatitisa B posebno kod subjekata izloženih virusu), te RSV imunoglobulin (koristan za tretman respiratornih sincitalnih virusnih infekcija).

Sljedeći tip imunoglobulinske terapije je aktivna imunizacija. To obuhvaća davanje antitijela ili fragmenata antitijela virusnim površinskim proteinima. Dva tipa vakcina koja su na raspolaganju za aktivnu imunizaciju hepatitisom B uključuju iz seruma doobivena antitijela protiv hepatitisa B i rekombinantna antitijela protiv hepatitisa B. Oba su pripravljena iz HBsAg. Antitijela su dana u tri doze subjektima koji su visoko rizični na infekciju s virusom hepatitisa B, kao što su zdravstveni radnici, seksualni partneri kroničnih nosača i pomoci.

Stoga, antivirusna sredstva korisna u izumu jesu, ali bez ograničenja, imunoglobulini, amantadin, interferon, analozi nukleozida i inhibitori proteaze. Specifični primjeri antivirusnih sredstava jesu, ali bez ograničenja: Acemannan; Acyclovir; Acyclovir Sodium; Adefovir; Alovudine; Alvircept Sudotox; Amantadine Hydrochloride; Arantatin;

Arildone; Ateviridine Mesylate; Avridine; Cidofovir; Cipamfylline; Cytarabine Hydrochloride; Delavirdine Mesylate; Desciclovir; Didanosine; Disoxaril; Edoxudine; Enviroxime; Famciclovir; Famotidine Hydrochloride; Fiacitabine; Fialuridine; Fosarilate; Foscamet Sodium; Fosfomet Sodium; Ganciclovir; Ganciclovir Sodium; Idoxuridine; Kethoxal; Lamivudine; Lobucavir; Memotidine Hydrochloride; Methisazone; Nevirapine; Penciclovir; Pirodavin; Ribavirin; Rimantadine Hydrochloride; Saquinavir Mesylate; Somantadine Hydrochloride; Sorivudine; Statolon; Stavudine; Tilorone Hydrochloride; Trifluridine; Valacyclovir; Hydrochloride; Vidarabine; Vidarabine Phosphate; Vidarabine Sodium Phosphate; Viroximin; Zalcibatin; Zidovudine; te Ziniviroxim.

Sredstva protiv gljivica se ponekad klasificiraju po njihovom mehanizmu djelovanja. Neka antifungalna sredstva djeluju kao inhibitori stanične stijenke, a inhibicijom sintetaze glukoze. Ti uključuju, ali nisu na njih ograničeni, basiungin/ECB. Ostala antifungalna sredstva djeluju destabilizira-njem membranske cjelovitosti. Oni uključuju, ali nisu na njih ograničeni, imidazole, kao što je klotrimazol, sertakonzol, flukonazol, itraconazol, ketokonazol, mikonazol, te voriconazol, kao i FK 463, amfotericin B, BAY 38-9502, MK 991, pradićimin, UK 292, butenafin, te terbinafin. Ostala antifungalna sredstva djeluju razbijanjem hitina (npr. hitinaze) ili imunosupresijom (501 cream). Neki primjeri komercijalno pristupaćnih sredstava prikazani su na Tablici B.

Tvrtka	Naziv produkta	Generiĉko ime	Indikacija	Mehanizam djelovanja
PHARMACIA & UPJOHN	PNU 196443	PNU 196443	antifungalno	n/k
Lilly	LY 303366	Basiungin/EC8	gljiviĉna infekcija	antifungalno/ inhibitor staniĉne stijenke
Bayer	Canesten	Clortimazol	gljiviĉna infekcija	destablizator cjelovitosti membrane
Fujisawa	FK 463	FK 463	gljiviĉna infekcija	destablizator cjelovitosti membrane
Mylan	Sertaconazole	Sertaconazole	gljiviĉna infekcija	destablizator cjelovitosti membrane
Genzyme	Chitinase	Chitinase	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Liposome	Abelcet	Amphoterocon B, liposomski	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Sequus	Amphotec	Amphoterocon B, liposomski	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Bayer	BAY 38-9502	BAY 38-9502	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Pfizer	Diflucan	Fluconazole	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Johnson&Johnson	Sporanox	Itraconazole	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Sepracor	Itraconazole (2R,4S)	Itraconazole (2R,4S)	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Johnson&Johnson	Nizoral	Ketoconazole	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Johnson&Johnson	Monistat	Miconazole	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Merck	MK 991	MK 991	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Bristol Myers Sq'b	Paradimicin	Paradimicin	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Pfizer	UK-292, 633	UK-292, 633	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Pfizer	Voriconazole	Voriconazole	gljiviĉna infekcija, sistemska	destablizator cjelovitosti membrane
Mylan	501 Cream	501 Cream	upalni gljiviĉna stanja	imunosupresija
Mylan	Mentax	Bufenafinc	gljivice u noktima	destablizator cjelovitosti membrane
Schering Plough	Anti Fungal	Anti Fungal	oportunistiĉke infekcije	destablizator cjelovitosti membrane
Alza	Mycelex Troche	Clorimazole	oralna infekcija	destablizator

Novartis	Lamisil	Terbinafine	sistemska gljivična infekcija, Onychomycosis	cjelovitosti membrane destabilizator cjelovitosti membrane
----------	---------	-------------	--	--

Stoga antifungalna sredstva korisna u izumu uključuju, ali nisu na njih ograničeni imidazole, FK 463, amfotericin B, BAY 3 8-9502, MK 99 1, pradimicin, UK 292, butenafin, hitinazu, 501 Cream, Acrisorein; Ambruticin; Amorolfine, Amphotericin B; Azacozazole; Azaserine; Basifungin; Bifonazole; Biphenamine Hydrochloride; Bispyrithione Magsulfex; Butoconazole Nitrate; Calcium Undecylenate; Candicidin; Carbol-Fuchsin; Chlordantoin; Ciclopirox; Ciclopirox Olamine; Cilofungin; Ciconazole; Clotrimazole; Cuprimyxin; Denofungin; Dipyrithione; Doconazole; Econazole; Econazole Nitrate; Enilconazole; Ethonam Nitrate; Fenticonazole Nitrate; Filipin; Fluconazole; Flucytosine; Fungimycin; Griseofulvin; Hamycin; Isoconazole Itraconazole; Kalafungin; Ketoconazole; Lomofungin; Lydimycin; Mepartricin Miconazole; Miconazole Nitrate; Monensin; Monensin Sodium; Naftifine Hydrochloride; Neomycin Undecylenate; Nifuratel; Nifurtimone; Nitralamine Hydrochloride; Nystatin; Octanoic Acid; Orconazole Nitrate; Oxiconazole Nitrate; Oxifungin Hydrochloride; Parconazole Hydrochloride; Partricin; Potassium Iodide Proclonol; Pyrrhithione Zinc; Pyrrolnitrin; Rutamycin; Sanguinarium Chloride Saperconazole; Scopafungin; Selenium Sulfide; Sinefungin; Sulconazole Nitrate; Terbinafine; Terconazole; Thiram; Ticlatone; Tioconazole; Tolclate; Tolindate; Tolnaftate; Triacetin; Triafungin; Undecylenic Acid; Viridofulvin; Zinc Undecylenate; te Zinoconazole Hydrochloride.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu kombinirati s ostalim terapijskim sredstvima kao što su adjuvansi koji povećavaju imuni odgovor. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina i drugo terapijski sredstvo se mogu dati istovremeno ili jedna za drugim. Kada se terapijsko sredstvo daje istovremeno mogu biti dani u istoj ili odvojenoj formaciji, ali dani istovremeno. Druga terapijska sredstva se daju jedan za drugim s drugom imunostimulirajućom nukleinskom kiselinom, a kada je davanje drugih terapijskih sredstava i imunostimulirajuće nukleinske kiseline privremeno odvojeno. Vrijeme između davanja tih spojeva mogu biti minute ili dulje. Ostala terapijska sredstva uključuju ali nisu na njih ograničena adjuvanse, citokine, antitijela, antigene itd.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline su korisne kao adjuvansi za indukciju sistemskog imunog odgovora. Stoga se mogu isporučiti osobi izloženoj antigenu da produciraju ili povećaju imuni odgovor antigena.

Uz imunostimulirajuće nukleinske kiseline, pripravci iz izuma mogu također biti dani s adjuvansima koji nisu nukleinske kiseline. Adjuvans koji nije nukleinska kiselina je bilo koja molekula ili spoj osim imunostimulirajućih nukleinskih kiselina ovdje opisanih, a koje mogu stimulirati humoralni i/ili celularni imuni odgovor. Adjuvansi koji nisu nukleinske kiseline uključuju, primjerice adjuvansi koji stvaraju depo efekt, imunostimulirajući adjuvansi, imunostimulirajući adjuvansi koji stvaraju depo efekt.

Adjuvansi koji stvaraju depo efekt kako je ovdje korišteno može uzrokovati da se antigen polako oslobađa i stoga produžiti izlaganje imunih stanica antigenu. Ta klasa adjuvansa uključuje, ali nije na njih ograničena, alum (npr. aluminijev hidroksid, aluminijev fosfat) ili na emulziji zasnovane formulacije uključujući mineralna ulja, ulja koja nisu mineralna, vodu-u-ulju ili ulje-u-vodi emulzije, ulje-u-vodi emulziju kao što je Seppic ISA serija Montanide adjuvanda (npr. Montanide ISA 720, AirLiquide, Pariz, Francuska); MF-59 (a skvalen-u-vodi emulzija stabilizirana sa Span 85 i Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, CA; te PROVAX (ulje-u-vodi emulzija koja sadrži stabilizirajući deterdenti i sredstvo za stvaranje micela; IDEC, Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA).

Imunostimulirajući adjuvansi su adjuvansi koji uzrokuju aktivaciju stanica imunog sustava. Može, primjerice u imunom sustavu uzrokovati izlučivanje citokina. Ta klasa adjuvansa uključuje, ali nije na njih ograničena saponine pročišćene od drva *Q. saponaria*, kao što je QS21 (glikolipid koji je eluiran u 21. signalu HPLC frakcioniranjem; Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, MA); poli[(di(karboksilatofenoksi)fosfazene (PCPP polimer; Virus Research Institute, USA); derivati lipopolisaharida kao što je monofosforilni lipid A (MPL; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT), muramil dipeptid (MOP; Ribi) te treonil-muramil dipeptid (t-MDP; Ribi); OM-174 (glukozamine disaharid sličan lipidu A; OM Pharma SA, Meyrin, Švicarska); te Leishmania factor produljivanja (pročišćen Leishmania protein; Corixa Corporation, Seattle, WA).

Adjuvanski koji tvore depo efekt i stimuliraju imuni sustav su oni spojevi koji imaju obje gore navedene funkcije. Ta klasa spojeva adjuvansa uključuje ali bez ograničenja ISCOMS (imunostimulirajuće komplekse koji sadrže miješane saponine, lipide i iz virusa dobivene čestice s porama koji mogu biti antigeni; CSL, Melbourne, Australia); SB-AS2 (SmithKline Beecham sustav adjuvansa br. 2 koji je ulje-u-vodi emulzija sadrži MPL i QS21; SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Belgija); SB-AS4 (SmithKline Beecham sistem adjuvansa br.4 koji sadrži alum i MPL; SBB, Belgija); neionski blok kopolimeri koji tvore micelle kao što je CRL 1005 (oni sadrže linearni lanac hidrofnih polipropilena okruženih lancima polietilena; Vaxcel, Inc., Norcross, GA); i Syntex Adjuvant Formulation (SAF, ulje-u-vodi emulzija koja sadrži Tween 80 i neionski blok kopolimer, Syntex Chemicals, Inc. Boulder, CO).

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline su također korisne kao mukozni adjuvansi. Prethodno je otkriveno da su sistemska i mukosalna imunost inducirani isporukom CpG nukleinskih kiselina u sluznicu. Sistemska imunost inducirana kao odgovor na CpG nukleinske kiseline uključuje humoralno i stanično posredovane odgovore na specifične antigene koji nisu sposobni inducirati sistemske imunost kada se daju sami mukozno. Nadalje, CpG nukleinskim kiselinama i toksinom kolere (CT, mukozni adjuvans koji inducira odgovor poput Th-2) inuciraju CTL. To je iznenađujuće jer je sistemskom imunizacijom prisutnost antitijela sličnih Th-2 normalno povezana s nedostatkom CTL (Schirmbeck *et al.*, 1995). Zasnvano na ovdje predstavljenim rezultatima, očekuje se da će imunostimulirajuće nukleinske kiseline funkcionirati na sličan način.

Uz to, imunostimulirajuće nukleinske kiseline iduciraju mukozni odgovor u lokalnim (npr. plućima) i udaljenom (niži probavni trakt) mukoznim mjestima. Značajne razine IgA antitijela su inducirana na dalekim mjestima u sluznici imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama. CT se općenito smatra vrlo učinkovitim mukoznim adjuvansom. Kako je prethodno pokazano (Snider 1995), CT inducira uglavnom IgG1 izotip antitijela koji ukazuju na Th-2 tip odgovora. Nasuprot tome, imunostimulirajuće nukleinske kiseline su više Th1 s uglavnom IgG2 antitielima, posebno nakon pomoći ili kad su dva adjuvna kombinirana. Th1 tip antitijela općenito ima bolju neutralizacijsku sposobnost i nadalje, Th2 odgovor u plućima je vrlo nepoželjan jer je povezan s astmom (Kay, 1996, Hogg, 1997). Stoga se upotrebom imunostimulirajućih nukleinskih kiselina kao mukoznih adjuvansa postiže ono što drugi mukozni adjuvnasi ne mogu postići. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline iz izuma su također korisne kao mukozni adjuvansi za uvođenje sistemskog i mukoznog imunog odgovora.

Mukozni adjuvnasi koji se navode kao mukozni adjuvansi koji nisu nukleinske kiseline, mogu se dati s imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama. Mukozni adjuvans koji nije nukleinska kiselina koji se navodi kao mukozni adjuvans koji nije imunostimulirajuća nukleinske kiselina je onaj koji je sposoban inducirati imuni odgovor kod subjekta kada je dan na površinu sluznice skupa s antigenom. Mukozni adjuvnasi uključuju, ali nisu na njih ograničeni: bakterijske toksine npr. toksin kolere (CT), CT derivate uključujući ali bez ograničenja, CT B podjedinice (CTB) (Wu *et al.*, 1998, Tochikubo *et al.*, 1998); CTD53 (Val do Asp) (Fontana *et al.*, 1995); CTK97 (Val do Lys) (Fontana *et al.*, 1995); CTK 104 (Tyr do Lys) (Fontana *et al.*, 1995); CTD53/K63 (Val do Asp, Ser do Lys) (Fontana *et al.*, 1995); CTH54 (Arg do His) (Fontana *et al.*, 1995); CTN 107 (His do Asn) (Fontana *et al.*, 1995); CTE 114 (Ser do Glu) (Fontana *et al.*, 1995); CTE I 12K (Glu do Lys) (Yamamoto *et al.*, 1997a); CTS61F (Ser do Phe) (Yamamoto *et al.*, 1997a, 1997b); CTS106 (Pro do Lys) (Douce *et al.*, 1997, Fontana *et al.*, 1995); te CTK63 (Ser do Lys) (Douce *et al.*, 1997, Fontana *et al.*, 1995), Zonula occludens toksin, zot, Escherichia coli termolabilni enterotoksin, Labile Toxin (LT), LT derivate uključujući ali bez ograničenja LT B podjedinice (LTB) (Verweij *et al.*, 1998); LT7K (Arg do Lys) (Komase *et al.*, 1998, Douce *et al.*, 1995); LT61F (Ser do Phe) (Komase *et al.*, 1998); LT I 12K (Glu do Lys) (Komase *et al.*, 1998); LT1 18E (Gly do Glu) (Komase *et al.*, 1998); LT146E (Arg do Glu) (Komase *et al.*, 1998); LT I 92G (Arg do Gly) (Komase *et al.*, 1998); LTK63 (Ser do Lys) (Marchetti *et al.*, 1998, Douce *et al.*, 1997, 1998, Di Tommaso *et al.*, 1996); te LTR72 (Ala do Arg) (Giuliani *et al.*, 1998), Pertussis toksin, PT. (Lycke *et al.*, 1992, Spangler BD, 1992, Freytag i Clements, 1999, Roberts *et al.*, 1995, Wilson *et al.*, 1995) uključujući PT9K/129G (Roberts *et al.*, 1995, Cropley *et al.*, 1995); derivate toksina (vidi dolje) (Holmgren *et al.*, 1993, Verweij *et al.*, 1998, Rappuoli *et al.*, 1995, Freytag i Clements, 1999); derivati lipida A (npr., monofosforil lipid A, MPL) (Sasaki *et al.*, 1998, Vancott *et al.*, 1998; derivati muranil dipeptida (MDP) (Fukushima *et al.*, 1996, Ogawa *et al.*, 1989, Michalek *et al.*, 1983, Morisaki *et al.*, 1983); bakterijski proteini vanjske membrane (npr. protein A vanjske površine (OspA) lipoprotein od *Borrelia burgdorferi*, vanjski membranski proteini od *Neisseria meningitidis*) (Marinero *et al.*, 1999, Van de Verg *et al.*, 1996); ulje-u-vodi emulzije (e.g., MF59) (Barchfield *et al.*, 1999, Verheoor *et al.*, 1999, O'Hagan, 1998); Aluminurn salts (Isaka *et al.*, 1998, 1999); te Saponins (npr. QS21) Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, MA) (Sasaki *et al.*, 1998, MacNeal *et al.*, 1998), ISCOMS, MF-59 (skvalen-u-vodi emulzija stabilizirana sa Span 85 i Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, CA); the Seppic ISA serije Montanide adjuvansa (e.g., Montanide ISA 720; AirLiquide, Paris, France); PROVAX (ulje-u-vodi emulzija koja sadrži stabilizirajući detergent i tvari koje tvore micle, IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA); Syntex Adjuvant Formulation (SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO); poli [di(karboksilatophenoksi)fosfazene (PCPP polimer; Virus Research Institute, USA) i Leishmania factor produljenja (Corixa Corporation, Seattle, WA).

Imuni odgovori se također mogu iducirati ili povećati istovremenim davanjem kolinearnih ekspresijskih citokina (Bueler & Mulligan, 1996; Chow *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) ili B-7 kostimulirajuće molekule (Iwasaki *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1997) imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama. Citokini se mu davati direktno s imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama ili mogu biti dani u obliku vektora nukleinske kiseline koji kodira citokin, tako da citokin može biti eksprimiran *in vivo*. U jednoj cjelini je citokin dan u obliku plazmida ekspresijskog vektora. Termin citokin je ovdje korišten kao generičko ime za raličite skupine topljivih proteina i peptida koji djeluju kao humoralni regulatori pri nano do pikomolarnih koncentracija pri kojima u normalnim ili patološkim uvjetima moduliraju funkcionalnu aktivnost pojedinih stanica i tkiva. Ti proteini također direktno posreduju u interakciji stanica i reguliraju procese koji se odvijaju u vanstaničnoj okolini. Primjeri citokina uključuju,

ali nisu na njih ograničeni IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL12, IL-15, IL-18, stimulirajući faktor kolonija granulocitnih makrofaga (GM-CSF), stimulirajući faktor kolonija granulocita (G-CSF), interferon- γ (γ -IFN), IFN- α , faktor tumorne nekroze (TNF), TGF- β , FLT-3 ligand, te CD40 ligand.

5 Citokini imaju ulogu u usmjeravanju odgovora T-stanice. Položne (CD4+) T-stanice upravljaju imunim odgovorom kod sisavaca produkcijom topljivih faktora koji djeluju na druge stanice imunog sustava, uključujući T-stanice. Najzrelije CD4+ T pomoćne stanice mogu eksprimirati jedan od dva citokinska profila; Th1 ili Th2. Th1 podgrupa potiče hipersenzitivnost odgođe-nog tipa, stanicama posredovanu imunost, te promjenu klase imunoglobulina u IgG_{2a}. Podgrupa Th2 inducira humoralnu imunost aktiviranjem B-stanica, pokretanjem produkcije antitijela i indukcijom klase
10 koja se mijanja u IgG₁ i IgE. U nekim cjelinama preferirano je da je citokin Th1 citokin.

Nukleinske kiseline su također korisne u usmjeravanju imunog odgovora iz Th2 u Th1 imuni odgovor. Usmjeravanje imunog odgovora iz Th2 u Th1 imuni odgovor se može utvrditi mjerenjem razine citokina produciranog kao odgovor na nukleinsku kiselinu (npr. inducijom monocitnih stanica i ostalih stanica da produciraju Th1 citokine, uključujući IL-12, IFN- γ i GM-CSF). Usmjeravanje ili rebalans imunog odgovora s Th2 u Th1 odgovor je posebno korisan za tretman ili
15 prevenciju astme. Primjerice, učinkovita količina za tretman astme može biti količina korisna za usmjeravanje Th2 tipa imunog odgovora koji je povezan s astmom na Th1 tip odgovora. Th2 citokini, posebno IL-4 i IL-5 su podignuti u dišnim putevima subjekata koji imaju astmu. Ti citokini pokreću važne aspekte astmatičnog upalnog odgovora uključujući primjenu IgE izotipa, eozinofilnu kemotaksiju i aktivaciju rasta mast stanica. Th1 citokini, posebno IFN- γ i IL-12 mogu spriječiti tvorbu Th2 klonova i produkciju Th2 citokina. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline iz izuma
20 uzrokuju povećanje Th1 citokina što pomaže rebalansu imunog sustava, prevenciju smanjivanja nepovoljnih efekata povezanih s uglavnom Th2 imunom odgovorom.

Nukleinske kiseline su također korisne u poboljšanju preživljavanja, diferencijacije, aktivacije i sazrijevanja dendričnih stanica. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline imaju jedinstvenu sposobnost da pokrenu stanično preživljavanje, diferencijaciju, aktivaciju i sazrijevanje dendričnih stanica. Prekursori dendrične stanice izolirani su iz krvi sortiranjem imunomagnetskih stanica razvijaju morfološke i funkcionalne karakteristike dendričnih stanica tijekom dva dana inkubacije s GM-CSF. Bez GM-CSF te stanice podliježu aptezi. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline su bolje od GM-CSF za poboljšanje preživljavanja i diferencijacije dendričnih stanica (MHC II ekspresija, veličina stanice, granularnost). Imunostimulirajuće nukleinske kiseline također induciraju sazrijevanje dendričnih stanica. Kako dendrične stanice povezuju urođeni i stečeni imuni sustav, ispoljavanjem antigena kao i njihovom ekspresijom prepoznavajućih receptora koji detektiraju mikrobne molekule kao što je LPS i njihova lokalna okolina, sposobnost za aktiviranje dendričnih stanica s imunostimulirajućim nukleinskim kiselinama podupire upotrebu tih imunostimulirajućih nukleinskih kiselina za strategije *in vivo* i *ex vivo* imunoterapiju protiv poremećaja kao što je karcinom i alergijske ili
35 infektivne bolesti. Imunostimulirajuće nukleinske kiseline također povećavaju litičku aktivnost prirodnih stanica ubojica i o antitijelima ovisnu staničnu citotoksičnost (ADCC). ADCC se može izvesti upotrebom imunostimulirajuće nukleinske kiseline u kombinaciji s antitijelom koji je specifičan na ciljnu stanicu, kao što je stanica karcinoma. Kada je imunostimulirajuća nukleinska kiselina dana subjektu skupa s antitijelom, subjektov imuni sustav je induciran da ubije staničnu tumoru. Antitijela korisna u postupku ADCC uključuju antitijela koji stupaju u interakciju sa stanicama tijela. Mnoga takva antitijela specifična na ciljane stanične su opisana u struci i mnogi su komercijalno pristupačni. Primjeri tih antitijela su prikazani dolje među popisom imunoterapije karcinoma.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu također dati skupa s antikancerogenom terapijom. Antikancerogene terapije uključuju lijekove protiv karcinoma, zračenje i kirurške postupke. Kako je ovdje korišteno "liječ protiv karcinoma" odnosi se na sredstvo koje je dano subjektu za svrhe tretmana karcinoma. Kako je ovdje korišteno "tretirani karcinom" uključuje prevenciju razvitka karcinoma, smanjivanje simptoma karcinoma i/ili inhibiciju rasta utvrđenog karcinoma. U drugim aspektima, lijek protiv karcinoma je dan subjektu koje je rizičan na razvitak karcinoma, a za svrhe smanjivanja rizika od razvijanja karcinoma. Ovdje su opisani različiti tipovi lijekova za tretman karcinoma. Za svrhe tih specifikacija, lijekovi protiv karcinoma su klasificirani kao kemoterapijska sredstva, imunoterapijska sredstva, vakcine protiv karcinoma, hormonske terapije i modifikatore biološkog odgovora.
50

Kako je ovdje korišteno "liječ protiv karcinoma" odnosi se na sredstvo koje je dano subjektu za svrhe tretmana karcinoma. Kako je ovdje korišteno "tretirani karcinom" uključuje prevenciju razvitka karcinoma, smanjivanje simptoma karcinoma i/ili inhibiciju rasta utvrđenog karcinoma. U drugim aspektima, lijek protiv karcinoma je dan subjektu koje je rizičan na razvitak karcinoma, a za svrhe smanjivanja rizika od razvijanja karcinoma. Ovdje su pisani različiti tipovi lijekova za tretman karcinoma. Za svrhe tih specifikacija, lijekovi protiv karcinoma su klasificirani kao kemoterapijska sredstva, imuno-terapijska sredstva, vakcine protiv karcinoma, hormonske terapije i modifikatore biološkog odgovora. Uz to, namjera je da metode iz izuma obuhvate upotrebu više od jednog lijeka protiv karcinoma skupa s imuno-stimulirajućim nukleinskim kiselinama. Kao primjer, imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu
55 dati s kemoterapijskim sredstvom i imunoterapijskim sredstvom. Alternativno lijek protiv karcinoma obuhvaća imunoterapijsko sredstvo i vakcinu protiv karcinoma, ili kemoterapijsko sredstvo i vakcinu protiv karcinoma, ili

kemoterapijsko sredstvo, imunoterapijsko sredstvo i vakcinu protiv karcinoma, svi dani jednom subjektu za svrhe tretmana subjekta koji ima karcinom ili je rizičan na razvitak karcinoma.

Lijekovi protiv karcinoma djeluju na različite načine. Neki lijekovi protiv karcinoma ciljaju fiziološki mehanizam koji je specifičan tumorskim stanicama. Primjeri uključuju ciljanje specifičnih gena i njihovih genskih produkata (t.j. prvenstveno proteina) koji su mutirani u karcinomu. Takvi geni uključuju ali nisu na njih ograničeni onkogene (npr. Ras, Her2, bcl-2), gene supresore tumora (npr. EGF, p53, Rb) i one koji ciljaju stanični ciklus (npr. CDK4, p21, telomeraza). Lijekovi protiv karcinoma mogu alternativno ciljati put prijenosa signala i molekulski mehanizam koje je primjenjen u stanicama karcinoma. Ciljanje stanica karcinoma preko epitopa eksprimiranih na njihovoj površini i završeno upotrebom monoklonalnih antitijela. Taj kasniji tip lijeka protiv karcinoma je općenito preferiran ovdje za imunoterapiju.

Ostali lijekovi protiv karcinoma ciljaju stanice koje nisu stanice karcinoma. Primjerice, neki lijekovi potaknu imuni sustav da napadne stanice tumora (t.j. vaccine protiv karcinoma). Drugi lijekovi koji se zovu inhibitori angiogeneze, djeluju napadom na snadjevanje s krvi u čvrstim tumorima. Kako je većina malignih karcinoma sposobna da metastazira (t.j. postoji u primarnom mjestu tumora i započinje u daljnjem tkivu i time tvori sekundarne tumore), lijekovi koji spriječe tu metastazu su također korisni u tretmanu karcinoma. Posrednici angiogeneze uključuju FGF, VEGF, angiopoietine, angiostatin, endostatin, TNF- α , TNP-470, trombospodin-1, faktor leukocita 4, CAI, te neki broj proteina iz obitelji integrina. Jedna kategorija tog tipa lijekova je inhibitor metraloproteinaze koji inhibira enzime korištene od stanica karcinoma da postoje kao primarni tumorska mjesta i unose u drugo tkivo.

Neke stanice karcinoma imaju antigenska svojstva pa mogu biti ciljani imunim sustavom. U jednom aspektu, kombinirano davanje imunostimulira-jućih nukleinskih kiselina u lijekova protiv karcinoma, posebno onih koji su klasificirani kao imunoterapijska sredstva protiv karcinoma, je korisno za stimuliranje specifičnog imunog odgovora protiv antigena karcinoma. "Antigen karcinoma" kako je ovdje korišten je spoj kao što je peptid, povezan s tumorom ili površinom stanice karcinoma i koji je sposoban izazvati imuni odgovor kada je eksprimiran na površini antigena koji ispoljava stanicu u kontekstu MHC molekule. Antigen karcinoma, kao što su oni prikazani u vakcinama protiv karcinoma ili oni koji se koriste za pripravu imunoterapije protiv karcinoma, se mogu pripremiti iz sirovih staničnih ekstrakata karcinoma kao što je opisano u Cohen *et al.*, 1994, *Cancer Research*, 54:1055, ili djelomično pročišćenih antigena korištenjem rekombinantne tehnologije ili *de novo* sintezom poznatih antigena. Antigeni karcinoma se mogu koristiti u obliku imunogenih dijelova određenih antigena ili u nekim slučajevima se može kao antigen koristiti cijela stanica ili tumorska masa. Takvi antigeni se mogu izolirati ili pripremiti rekombinantno ili bilo kojim načinom poznati u struci.

Teorija imunog nadziranja koja začinje funkciju imunog sustava je da se detektiraju i eliminiraju neoplastične stanice prije oblika tumora. Osnovni princip te teorije je da su stanice karcinoma antigenske različite od normalnih stanica i stoga izazivaju imunu reakciju koja je slična onima koje uzrokuju odbijanje imunološki inkompatibilnih alografta. Istraživanja su potvrdila da se tumori razlikuju kvalitativno ili kvantitativno prema ekspresiji njihovog antigena. Primjerice, "tumorski specifični antigeni" su antigeni koji su specifično povezani s tumorskim stanicama ali nisu normalne stanice. Primjer tumorski specifičnih antigena su virusni antigeni u tumorima iduciranim virusima DNA ili RNA. "S tumorom povezani" antigeni predstavljaju tumorske stanice i normalne stanice ali su prisutni u različitim količinama ili različitim oblicima u tumorskim stanicama. Primjeri takvih antigena su onkofetalni antigeni (npr. karcionembrionski antigeni), diferencijalni antigeni (npr. T i Tn antigeni), te onkogeni produkti (npr. HER/neu).

Različiti tipovi stanica koje mogu ubiti tumorske ciljeve *in vitro* i *in vivo* su: prirodne stanice ubojice (NK stanice), citotoksični T-mfociti (CTL), limfokinom aktivirane stanice ubojice (LAK), te aktivirani makrofagi. NK stanice mogu ubiti stanice tumora bez da su prethodno senzitivirane na specifični antigen, te aktivnosti ne zahtjeva prisutnost klase I antigena kodiranih s glavnim kompleksom histokompatibilnosti (MHC) ili ciljnih stanica. Mišljeno je da NK stanice sudjeluju u kontroli nascentnih tumora i u kontroli rasta metastaze. Za razliku od NK stanica, CTL mogu ubiti tumorske stanice samo nakon što su senzitivirane na tumorske antigene i kada je ciljni antigen eksprimiran na tumorskim stanicama koje također eksprimiraju MHC klasu I. Mišljeno je da CTL budu stanice efektori u odbacivanju transplantiranih tumora uzrokovanih virusima DNA. LAK stanice su podgrupa nukleokocita koji su različiti od NK i CTL populacije. Aktivirani makrofagi mogu ubiti stanice tumora na način koji nije ovisan o antigenu niti je MHC djeluje restriktivno, a kad su jednaput aktivirani. Mišljeno je da aktivirani makrofagi smanje rast tumora u koje se infiltriraju. *In vitro* testovi su pokazali druge imune mehanizme kao što je o antitijelu ovisne stanicom posredovane citotoksične reakcije i liza pomoću antitijela plus komplementa. Međutim, ti imunofektorski mehanizmi su mišljeni da budu manje važni *in vivo* nego funkcija NK, CTL, LAK i makrofaga *in vivo* (za pregledni rad vidi Piessens W. F. i Danid. J., "Tumor Immunology" u: Scientific American Medicine, vol. 2, Scientific American Books, N. Y. str. 1-13, 1996.

Cilj imunoterapije je da poveća pacijentov imuni odgovor na ustanovljeni tumor. Jedna metoda imunoterapije uključuje

upotrebu adjuvnasa. Adjuvans se izvodi iz mikroorganizama kao što je bacillus Callmette-Guerin, povećava imuni odgovor i povećava otpornost na tumore kod životinja.

- Imunoterapijska sredstva su lijekovi koji se izvode iz antitijela ili fragmenata antitijela koji se specifično vežu ili reorganiziraju antigen karcinoma. Kako je ovdje korišteno, antigen karcinoma je prema široj definiciji antigeni koji ekspresira stanica karcinoma. Preferirao stanica karcinoma ekspresira antigen na površini stanice. Preferirani je da je antigen onaj koji nije ekspresiran od normalnih stanica, ili barem nije ekspresiran na istoj razini kao u stanicama karcinoma. Na antitijelu zasnovana terapija može djelovati vezivanjem na staničnu površinu stanice karcinoma i stoga stimulirati endogeni imuni sustav da napadne stanicu karcinoma. Drugi način na koji djeluje na antitijelu zasnovana terapija je isporuka sustava za specifične ciljane toksične tvari u stanice karcinoma. Antitijela su obično povezana s toksinima kao što je ricin (iz sjemenki ricinusa), kalihemacin i majtansinoidi, do radioaktivnih izotopa kao što je jod-131 i itrij-90, do kemoterapijskih sredstava (kako je ovdje opisano) ili na modifikatore biološkog odgovora. Na taj način, toksične tvari se mogu sakupiti u regijama karcinoma i nespecifična toksičnost na normalne stanice može biti svedena na najmanju mjeru. Uz upotrebu antitijela koja su specifična na antigen karcinoma, antitijela koja se vežu na vaskulature kao što su ona koja se vezuju na endotelne stanice su također korisni u izumu. To je zbog toga što je općenito preživljavanje čvrstih tumora ovisno i novonastalim krvnim sudovima pa je većina tumora sposobna ojačati i stimulirati rast novih krvnih sudova. Kao rezultat, jedna strategija od mnogih lijekova protiv karcinoma je da napadne krvne sudove koji hrane tumor i/ili vezna tkiva (ili stroma) koji podupiru krvne sudove.
- Upotreba imunostimulirajućih sredstava kao što su monoklonalna antitijela su sposobna povećati dugotrajno preživljavanje preko brojnih mehanizama uključujući značajno povećanje ADCC (kako je gore diskutirano), aktivaciju stanica prirodnih ubojica (NK) i povećanje razine ITN₀. Kada se nukleinske kiseline koriste u kombinaciji s monoklonalnim antitijelima, služe za smanjivanje doze antitijela potrebnih da se postigne biološki rezultat.
- Primjeri imunoterapije karcinoma koji su sada korišteni ili koji su razvijeni su navedeni u Tablici C.

Tablica C

<i>Imunoterapije karcinoma koje su u razvitku ili na tržištu</i>		
TRŽISTA	TRGOVAČKI NAZIV (GENERIČKO IME)	INDIKACIJA
IDEC/Genentech, Inc./HoffmannLaRoche (prvo monoklonalno antitijelo licencirano za tretman karcinoma u U.S.)	Rituxan TM (rituximab, Mabthera) (IDECC2B8, kimerni glodavca/humani anti-CD20 MAb)	non-Hodgkinov limfom
Genentech/Hoffmann-La Roche	Herceptin, anti-Her2 hMAb	dojke/jajnici
Cytogen Corp.	Quadramet (CYT-424) radioterapijsko sredstvo	metastaze kosti
Centocor/Glaxo/Ajinomoto	PanorexO (17- 1 A) (monoklonalno antitijelo glodavca)	Terapija adjuvansom za kolorektum(Dukes-C)
Centocor/Ajinomoto	PanorexO (17-1A) (kimerno monoklonalno antitijelo glodavca)	pankreas, pluća dojka, jajnik
IDEC	IDEC-Y2B8 (glodavac, anti-CD20 N1Ab obilježeno s itrij-90)	non-Hodgkinov limfom
ImClone Systems	BEC2 (anti-idiotični N1Ab, imitira GD3 epitope) (s BCG)	mala stanica pluća
ImClone Systems	C225 (kimerno monoklonalno antitijelo do receptora epidermalnog faktora rasta (EGFr))	stanica bubrega
Techniclone International/Alpha Therapeutics	Oncolym (Lym- 1 monoklonalno antitijelo povezano na jod-131)	non-Hodgkinov limfom
Protein Design Labs	SMART M 195 Ab, humanizirano	akutna mielooidna leukemija
Techniclone Corporation/Cambridge Antibody Technology	¹³¹ I LYM-1 (OnColyM TM)	non-Hodgkinov limfom
Aronex Pharmaceuticals, Inc.	ATRAGEN???	akutna promiolooidna leukemija
ImClone Systems	C225 (kimerni anti-EGFr monoklono antitijelo) + cisplatin ili radijacija	glava i vrat, nemale stanice pluća
Altarex, Canada	Ovarex (B43.13, anti-idiotični CA 125, miš	ovarij

	Mab)	
Coulter Phanna (klinički rezultati su bili pozitivni ali je lijek bio vrlo toksičan prema koštanoj srži)	Bexxar (anti-CD20 Mab obilježeno s "I")	non-Hodgkinov limfom
Aronex Phartnaceuticals, Inc.	ATRAGEN????	Kaposhi sarkom
IDEC Pharinaceuticals Corp/Genentech	Pituxan™ (Mab protiv CD20) pan-B Ab u komb s kemoterapijom	limfon B-stanica
LeukoSite/Ilex Oncology	LDP-03, huMab to na leukocitni antigen CAMPATH	kronična limfocitna leukemija (CLL)
Center of Molecular Immunology	ior t6 (anti CD6, glodavca MAb) CTCL	karcinom
Medarex/Novartis	MDX-210 (humanizirano anti-HER-2 bispecifično antitijelo)	dojka, jajnik
Medarex/Novartis	MDX-210 (humanizirano anti-HER-2 bispecifično antitijelo)	prostata, nemale stanice pluća, pankreas, dojka
Medarex	MDX-11 (komplementarni aktivirajući receptor (CAR) monoklonoalno antitijelo)	akutna mielogena eukemija (AML)
Medarex/Novartis	MDX-210 (humanizirano anti-HER-2 bispecifično antitijelo)	bubreg i debelo crijevo
Medarex	MDX-11 (komplementarni aktivirajući receptor (CAR) monoklonoalno antitijelo)	<i>ex vivo</i> čišćenje akutno mielogene leukemije (AML)
Medarex	MDX-22 (humanizirano bispecifilno antitijelo, MAb konjugati) (komplementarni kaskadni aktivator)	akutna mileoidna leukemija
Cytogen	OV 103 (itrij-90 obilježeno antitijelo)	jajnik
Cytogen	OV 103 (itrij-90 obilježeno antitijelo)	prostata
Aronex Pharinaceuticals, Inc.	ATRAGEN????	non-Hodgkinov limfom
Glaxo Wellcome plc	3 622W94 MAb that se veže na EGP40 (17-1 A) antigen pankarcinoma na adenocarcinom	nemale stanice pluća, prostata (adjuvans)
Genentech	anti-VEGF, RhuMAB (inhibira angiogenezu)	pluća, dojka, prostata, kolorektum
Protein Design Labs	Zenapax (SMART Anti-Tac (receptor IL-2) Ab, humaniziran)	leukemija, limfom
Protein Design Labs	SMART M 195 Ab, humanizirano	akutna promilecitička leukemija
ImClone Systems	C225 (kimerno anti-GFr monoklonoalno antitijelo) + taxol	dojka
ImClone Systems (licencirano od RPR)	C225 (kimerno anti-GFr monoklonoalno antitijelo) + doxorubicin	prostata
ImClone Systems	C225 (kimerno anti-GFr monoklonoalno antitijelo) + dpxprubicin	prostata
ImClone Systems	BEC2 (anti-idiotični MAb, imitira GD3 epitope)	melanom
Medarex	NMX-2 10 (humanizirana antiHER-2 bispecifično antitijelo)	karcinom
Medarex	MDX-220 (bispecifičan za tumore koji eksprimiraju TAG-72)	pluća, debelog crijeva, prostata, jajnik, endometrij, pankreasa u želuca
Medarex/Novartis	MDX210 (humaniziran anti-HER-2 bispecifično antitijelo)	prostata
Medarex/Merck KoaA	MDX-447 (humanized anti-EGF receptor bispecifično antitijelo)	karcinomi EGF receptora (Hlave i vrata, prostate, pluća, mjehura, cerviksa, jajnika)
Medarex/Novartis	MDX-210 (humaniziran anti-HER-2	kombinacijska terapija s G-

	bispecifično antitijelo)	CSF za različite karcinome, posebno dojke
IDEC	MELIMMUNE-2 (terapijska vakcina s monoklonalnim antitijelima glodavca)	melanom
IDEC	MELIMMUNE-1 (terapijska vakcina s monoklonalnim antitijelima glodavca)	melanom
Immunomedics, Inc.	CEACIDE™ (1-131)	kolorektalni i ostali
NeoRx	Pretarget™ radioaktivna antitijela	non-Hodgkinov limfom B-stanice
Novopharm Biotech, Inc.	NovoNIAb-G2 (pankarcinomspecifični Ab)	karcinom
Technicione Corporation/ Cambridge Antibody Technology	TNT (kimerni NIAb tnatigeni na histon)	mozak
Techniclone International/ Cambridge Antibody Technology Novopharm	TNT (chimeric MAb antigeni na histon)	mozak
Novopharm	Gliomab-H (monoklonalni - humanizirani Abs)	mozak, melanomi, neuroblasti
Genetics Institute/AHP	GNI-250 Mab	kolorektumski
Merck-KgaA	EMD-72000 (kimerni-EGF antagonist)	karcinom
Immunomedics	LymphoCide (humanizirano LL2 antitijelo)	non-Hodgkinov limfom B-stanice
Immunex/AHP	CMA 676 (konjugat monoklolog antitijela)	akutna mielogna leukemija
Novopharm Biotech, Inc.	Monopharm-C	debelog crijeva, pluća pankreasa
Novopharm Biotech, Inc.	4B5 anti-idiotip Ab	melanom, male stanice pluća
Center of Molecular Immunology	ior egf/r3 (anti EGF-R humaniziran Ab)	radioimunoterapija
Center of Molecular Immunology	ior c5 (kolorektalni NIAb glodavca) za radioimunoterapiju	kolorektalni
Creative BioMolecules/ Chiron	BABS (mjesto vezivanja biosintetskog antitijela) Proteins	karcinom dojke
ImClone Systems/Chugai	FLK-2 (monoklonalo antitijelo na fetalnu kinazu jetre -2 (FLK-2))	angiogeneza povezana s tumorom
ImmunoGen, Inc.	Humanized NIAb/mail-konjugat lijeka	ne-malih stanica pluća
Medarex, Inc.	MDX-260 bispecifični, ciljevi GD-2	melanom, gliom, neuroblastom
Procyon Biopharma, Inc.	ANA Ab	karcinom
Protein Design Labs	SMART IDIO Ab	limfom B-stanice
Protein Design Labs/Novartis	SMART ABL 364 Ab	dojka, pluća, debelo crijevo
Immunomedics, Inc.	ImmuRAIT-CEA	kolorektuma

- Sljedeći tip kemoterapijskih sredstava koji se mogu koristiti prema izumu uključuju Aminoglutethimide, Asparaginase, Busulfan, Carboplatin, Chlorombucil, Cytarabine HCl, Dactinomycin, Daunorubicin HCl, natrijev Estramustine fosfat, Etoposide (VP 16-213), Floxuridine, Fluorouracil (5-FU), Flutamide, Hydroxyurea (hidroksikarbamid), Ifosfamide, Interferon Alfa-2a, Alfa-2b, Leuprolide acetat (analog LHRH faktora oslobađanja), Lomustine (CCNTJ), Mechlorethamine HCl (dušikov mustard), Mercaptopurine, Mesna, Mitotane (o.p'-DDD), Mitoxantrone HCl, Octreotide, Plicarabine, Procarbazine HCl, Streptozocin, Tamoxifen citrate, Thioguanine, Thiotepa, Vinblastine sulfate, Amsacrine (m-AMSA), Azacitidine, Erthropoietin, Hexamethyl-melarnine (HMM), Interleukin 2, Mitoguanone (metil-GAG; metilni glikosak bis-gvanilhidroazon; MGBG), Pentostatin (2'-deoksikofomicin), Semustine (metil-CCNTJ), Teniposide (VM-26) te Vindesine sulfat.

- Namjera je da vakcine protiv karcinoma stimuliraju endogeni imuni odgovor protiv stanica karcinoma. Danas proizvedene vakcine uglavnom aktiviraju humoralni imunostup (t.j. o antitijelu ovisan imuni odgovor). Ostale vakcine koje se danas razvijaju su usmjerene na aktiviranje imunog odgovora posredovanog stanicom, uključujući citotoksične T-limfocite koji su sposobni ubiti tumorske stanice. Vakcine protiv karcinoma općenito pojačavaju ispoljavanje antigena karcinoma u stanicama koje prezentiraju antigen (npr. makrofagi i dendrične stanice) i/ili druge stanice imunog sustava kao što su T-stanice, B-stanice i NK stanice.

Mada vakcine protiv karcinoma mogu imati nekoliko oblika, kao što je diskutirano *infra*, njihova svrha je da isporuče antigene karcinoma i/ili s karcinomom povezane antigene do stanica koje prezentiraju antigen (APC) da bi olakšale endogeno djelovanje takvih antigena pomoću APC i konačno ispoljavanje antigena na površini stanice u kontekstu MHC klase I molekula. Jedan oblik vakcine protiv karcinoma je vakcina cijele stanice koja je pripravljena od stanica karcinoma koje su uklonjene iz subjekta, tretirane *ex vivo* i zatim ponovo unešene kao cijele stanice u subjekt. Lizati tumorskih stanica se također mogu koristiti kao vakcine protiv karcinoma da se izazove imuni odgovor. Drugi oblik vakcine protiv karcinoma je peptidna vakcina koja koristi na karcinom specifične s karcinomom povezane male proteine za aktivaciju T-stanica. Proteini povezani s karcinomom su proteini koji nisu antigeni). Međutim, ekspresija s karcinomom povezanih antigenima je općenito usklađeno povišena s karcinomima određenog tipa. Sljedeći oblik vakcine protiv karcinoma je vakcina dendričnih stanica koje uključuju cijele dendrične stanice koje su *in vitro* izložene antigenu karcinoma ili antigenu povezanom s karcinomom. Lizati ili membranske frakcije dendričnih stanica mogu također biti korištene kao vakcine protiv karcinoma. Vakcine dendričnih stanica su sposobne aktivirati izravno stanice koje ispoljavaju antigen. Ostale vakcine protiv karcinoma uključuju gangliozidne vakcine, vakcine s proteinom nakon toplotnog šoka, virusne i bakterijske vakcine i vakcine nukleinske kiseline.

Upotreba imunostimulirajućih nukleinskih kiselina skupa s vakcinama protiv karcinoma dovodi do poboljšanog na antigen specifičnog humoralno i stanično posredovanog imunog odgovora, a uz aktivaciju NK stanica i endogenih dendričnih stanica i povećanje razine IFN α . To povećanje dozvoljava da se vakcina koristi sa smanjenom dozom antigena, a čime se postiže isti učinak. U nekim slučajevima vakcine protiv karcinoma se mogu koristiti skupa s adjuvansom kao što su oni gore opisane.

Kako je ovdje korišteno termini "antigen karcinoma" i "antigen tumora" se koriste alternativno i odnose se na antigene koji su različito ekprimirani od stanica karcinoma i stoga mogu biti korišteni da bi se ciljale stanice karcinoma. Antigeni karcinoma su antigeni koji mogu stimulirati imune odgovore specifične na tumor. Neki od tih antigena su kodirani, mada ne i obavezno ekprimirani u normalnim stanicama. Ti antigeni se mogu karakterizirati kao oni koji su normalno tihi (t.j. nisu ekprimirani) u normalnim stanicama, oni koji su ekprimirani samo u nekim stupnjevima diferencijacije i oni koji su privremeno ekprimirani kao što su embrionalni ili fetalni antigeni. Ostali antigeni karcinoma su kodirani mutantnim staničnim genima, kao što su onkogeni (npr. aktivirani ras onkogeni), geni supresori (npr. mutant p53), fuzijski proteini nastali iz internih delecija ili kromosomskih translacija. Drugi antigeni karcinoma se mogu kodirati virusnim genima kao oni nošeni na RNA i DNA tumorskim virusima.

Ostale vakcine uzimaju oblik dendričnih stanica koje su izložene antigenima karcinoma *in vitro*, imaju procesuirane antigene i sposobni su ekprimirati antigene na njihovoj staničnoj površini u kontekstu MHC molekula za efektivno ispoljavanje antigena na ostale stanice imunog sustava.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline su u jednom aspektu izuma korištene skupa s vakcinama protiv karcinoma koje su zasnovane na dendričnim stanicama. Dendrična stanica je profesionalna stanica koja ispoljava antigen. Dendrične stanice tvore vezu između urođenog i stečenog imunog sustava, a ispoljavanjem antigena i putem njihove ekspresije receptora koji prepoznaju oblik koji detektira mikrobnju molekulu kao što je LPS i lokalnom okruženju. Dendrične stanice učinkovito unošenjem procesuiraju i ispoljavaju topljive specifične antigene kojima su izloženi. Proces unošenja i ispoljavanja antigena uzrokuje brzo povećanje ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) i kostimuliranje molekule, produkciju citokina i migraciju prema limfatičnim organima u kojima se vjeruje da su obuhvaćeni u aktivaciji T-stanice.

Tablica D nabroja različite vakcine protiv karcinoma koji su sada koriste ili su u razvoju.

Tablica D

<i>Imunoterapije karcinoma koje su u razvitku ili na tržištu</i>		
TRŽISTA	TRGOVAČKI NAZIV (GENERIČKO IME)	INDIKACIJA
Center of Molecular Immunology	EGF	karcinom
Center of Molecular Immunology		vakcina protiv gangliozidnog karcinoma
Center of Molecular Immunology	anti-idiotipik	vakcina protiv karcinoma
mClone Systems/Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	Gp75 antigen	melanom
mClone Systems/Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	anti-idiotipic Abs	vakcina protiv karcinoma
Progenics Pharmaceuticals, Inc.	vakcina GMK melanoma	melanom
Progenics Pharmaceuticals, Inc.	MGV gangliosidni konjugat	limfo, kolorektum, pluća

Corixa	Her2/neu	dojka, jajnik
AltaRex	Ovarex	jajnik
AVAX Technologies Inc.	M-Vax, autologna cijela stanica	melanom
AVAX Technologies Inc.	O-Vax, autologna cijela stanica	jajnik
AVAX Technologies Inc.	L-Vax, autologna cijela stanica	leukemija-AML
Blomira Inc./Chiron	Theratope, STn/KLH	dojka, kolorektum
Biomira Inc.	BLP25, MUC-1 peptidna vakcina kapulirana u liposomalni sustav uisporuke	pluća
Biomira Inc.	BLP25, MUC-1 peptidna vakcina kapulirana u liposomalni sustav uisporuke + liposomski IL2	pluća
Biomira Inc.	liposomska isiotipska vakcina	malignost limfoma B-stanice
Ribi Immunochem	Melacine, stanični lizat	melanom
Corixa	Peptide antigens, mikrosferini sustav isporuke i LeIF adjuvans	dojka
Corixa	Peptide antigens, mikrosferini sustav isporuke i LeIF adjuvans	postata
Corixa	Peptide antigens, mikrosferini sustav isporuke i LeIF adjuvans	jajnik
Corixa	Peptide antigens, mikrosferini sustav isporuke i LeIF adjuvans	limfom
Corixa	Peptide antigens, mikrosferini sustav isporuke i LeIF adjuvans	pluća
Virus Research institute	Toxin/antigenski rekombinantni sustav isporuke	svi karcinomi
Apollon Inc.	Genevax-TCR	limfom T-stanica
Bavarian Nordic Research Institute A/S	na MVA zasnovana (virus vaccinia) vakcina	melanom
BioChem Phanna/BioChem Vaccine	PACIS, BCG vakcina	mjehura
Cantab Pharmaceuticals	TA-HPV	cervikalni
Cantab Pharmaceuticals	TA-CIN	cervikalni
Cantab Pharmaceuticals	DISC-Virus, imunoterapija	karcinom
Pasteur Merieux Connaught	ImmuCyst????/TheraCys????-BCG Immunotherapeutic (Bacillus Calmette-Guerin/Connaught) za intravezikularni tretman karcinoma površine mjehura	mjehur

Kako je ovdje korišteno, kemoterapijska sredstva obuhvaćaju sve ostale oblike lijekova protiv karcinoma koji ne spadaju u kategoriju imunoterapijskih sredstava ili vakcina protiv karcinoma. Kemoterapijska sredstva, kako je ovdje korišteno, obuhvaćaju kemijska i biološka sredstva. Funkcija tih sredstava je da inihbiraju staničnu aktivnost o kojoj ovisi preživljavanje stanice karcinoma. Kategorije kemoterapeutika uključuju alkilirajuća ili alkoksirajuća sredstva, antimetabolite, hormone i analoge hormona, te razne antineoplastične lijekove. Većina, ako ne i sva ta sredstva su direktno toksična za stanice karcinoma i ne trebaju imunu stimulaciju. Davanje kombinacije kemoterapeutika i imunostimulirajućih nukleinskih kiselina povećava maksimalnu toleranciju dozu kemoterapije.

Sredstva za kemoterapiju koja su sada u razvoju ili u upotrebi u kliničkim slučajevima prikazani su na Tablici E.

Tablica E

<i>Lijekovi protiv karcinoma koji su u razvitku ili na tržištu</i>			
Provođač	Naziv	Generičko ime	Indikacija
Abbott	TNP 470/AGM 1470		anti-angiogeneza kod karcinoma
Takeda	TNP 470/AGM 1470		anti-angiogeneza kod karcinoma
Scotia	Meglamine GLA	Meglamine GLA	karcinom mjehura
Medeva	Valstar		karcinom mjehura -

			refraktorni karcinom in situ
Medeva	Valstar		karcinom mjehura - papilarni karcinom
Rhone Poulenc	Gliadel Wafer		tumor mozga
Wamer Lambert	Undisclosed Cancer (b)	Undisclosed Cancer (b)	karcinom
Bristol Myers Squibb	RAS Farnesyl Transferase Inhibitor	inhibitor RAS famezil transferaze	karcinom
Novartis	MMI 270		karcinom
Bayer	BAY 12-9566		karcinom
Merck	Farnesyl Transferase Inhibitor	inhibitor famezil transferaze	karcinom (čvrsti tumori - pankreas, debelo crijevo, pluća, dojka)
Pfizer	PFE	MMP	karcinom, angiogeneza
Pfizer	PFE	tirozin kinaza	karcinom, angiogeneza
Lilly	MTA/LY 231514	MTA/LY 231514	karcinom, čvrsti tumori
Lilly	LY 264618/Lometexot	Lometexot	karcinom, čvrsti tumori
Scotia	Glamotec		karcinom, pankreas, dojka, devalo crijevo
Wamer Lambert	CI-994	CI-994	karcinom, čvrsti tumori/leukemija
Schering AG	Angiogenesis inhibitor	inhibitor angiogeneze	karcinom/ kardio
Takeda	TNP-470	n/k	maligni tumor
Smithkline Beecham	Hycamtin	Topotecan	metastaze karcinoma jajnika
Novartis	PKC 412	PKC 412	karcinom otporan na mnoge lijekove
Novartis	Valspodar	PSC 833	mieloidna leukemija/karcinom jajnika
Immunex	Novantrone	Mitoxantrone	bol povezana s refraktornim karcinomom prostate
Wamer Lambert	Metaret	Suranim	prostata
Genentech	Anti-VEGF	Anti-VEGF	prostata/dojka/debelo crijevo/NSCL karcinom
British Biotech	Batimastat		pterygium
Elsai	E 7070	E 7070	čvrsti tumori
Blochem Pharma	BCH-4556	BCH-4556	čvrsti tumori
Sankyo	CS-682	CS-682	čvrsti tumori
Agouron	AG2037	AG2037	čvrsti tumori
IDEC Pharma	9-AC	9-AC	čvrsti tumori
Agouron	VEGF/b-FGF Inhibitors	Inhibitori VEGF/b-FGF	čvrsti tumori
Agouron	AG3340	AG3340	čvrsti tumori/makularna degen
Vertex	Incel	VX-710	čvrsti tumori-IV
Vertex	VX-853	VX-853	čvrsti tumori - oralni
Zeneca	ZD 0101 (inj)	ZD 0101	čvrsti tumori
Novartis	IS1641	IS1641	čvrsti tumori
Novartis	ODN 698	ODN 698	čvrsti tumori
Tanabe Seiyaku	TA 2516	Marimistat	čvrsti tumori
British Biotech	Marimastat	Marimastat (BB 2516)	čvrsti tumori
Celitech	CDP 845	inhibitor agrekanaze	čvrsti tumori/karcinom dojke
Chiroscience	D2163	D2163	čvrsti tumori/metastaze
Warner Lambert	PD 183805	PD 183805	
Daiichi	DX895 If	DX8951f	protiv karcinoma
Daiichi	Lemonal DP 2202	Lemonal DP 2202	protiv karcinoma
Fujisawa	FK 317	FK 317	antibiotik protiv karcinoma
Chugai	Picibanil	OK-432	protiv malignog tumora

Nycomed Amersham	AD 32/valrubicin	Valrubicin	karcinom mjehura - tvrdi in situ karcinom
Nycomed Amersham	Metastron	derivat stroncija	karcinom kosti (pobočna terapija, bol)
Schering Plough	Temodal	Temozolomide	tumori mozga
Schering Plough	Temodal	Temozolonide	tumori mozga
Liposome	Evacet	Doxorubicin, Liposomal	karcinom dojke
Nycomed Amersham	Yewtaxan	Paclitaxel	uznapredovani karcinom dojke, uznapredovani karcinom jajnika
Bristol Myers Squibb	Taxol	Paclitaxel	uznapredovani karcinom dojke, uznapredovani karcinom jajnika, NSCLC
Roche	Xeloda	Capecitabine	karcinom dojke, karcinom kolorektuma
Roche	Furtulon	Doxifluridine	karcinom dojke, karcinom kolorektuma, karcinom želuca
Pharmacia & Upjohn	Adriamycin	Doxorubicin	karcinom dojke, leukemija
Ivax	Cyclopax	Paclitaxel, oralni	karcinom dojke/jajnika
Rhone Poulenc	Oral Taxoid	Oralni Taxoid	široki karcinom
AHP	Novantrone	Mitoxantrone	karcinom
Sequus	SPI-077	Cisplatin, tajni	karcinom
Hoechst	HMR 1275	Flavopiridol	karcinom
Pfizer	CP-358,774	EGFR	karcinom
Pfizer	CP-609, 754	Inhibitor onkogenog RAS	karcinom
Bristol Myers Squibb	BMS- 182751	Oralni Platinum	karcinom (pluća, jajnik)
Bristol Myers Squibb	UFT (Tegafur/Uracil)	UFT (Tegafur/Uracil)	oralni karcinom
Johnson & Johnson	Ergamisol	Levamisole	terapija karcinoma
Glaxo Wellcome	Eniluracil/776C85	pojvečalo 5FU	karcinom, čvrsti& karcinom kolorektuma
Johnson & Johnson	Ergamisol	Levamisole	karcinom debelog crijeva
Rhone Poulenc	Campto	Irinotecan	karcinom kolorektuma, karcinom cerviksa
Pharmacia & Upjohn	Camptosar	Irinotecan	karcinom kolorektuma, karcinom cerviksa
Zeneca	Tomudex	Ralitrexed	karcinom kolorektuma, pluća
Johnson & Johnson	Leustain	Cladribine	leukemija vlaknastih stanica
Ivax	Paxene	Paclitaxel ,	Kaposi sarkom
Sequus	Doxii	Doxorubicin, Liposomal	KS/karcinom
Sequus	Caelyx	Doxorubicin, Liposomal	KS/karcinom
Schering AG	Fludara	Fludarabine	leukemija
Pharmacia & Upjohn	Pharmorubicin	Epirubicin	karcinom pluća/dojke
Chiron	DepoCyt	DepoCyt	neoplastični meningitis
Zeneca	ZD1839	ZD1839	karcinom ne-malih stanič pluća, karcinom pankreasa
BASF	LU 79553	bis-naftilamid	onkologija
BASF	LU 103793	dolastin	onkologija
Schering Plough	Caetyx	Doxorubicin-Liposome	karcinom jajnika/dojke
Lilly	Gemzar	Gemcitabine	karcinom pankreasa, karcinom ne-malih stanica

			pluća, dojke, mjehura i jajnika
Zeneca	ZD 0473/Anormed	ZD 0473/Anormed	na platinumu zasnovani NSCL, jajnika itd.
Yamanouchi	YM 116	YM 116	karcinom prostate
Nycomed Amersham	Seeds/1-125 Rapid St	Lodine Seeds	karcinom prostate
Agouron	inhibitors	inhibitori Cdk-4/cdk2	čvrsti tumori
Agouron	PARP inhibitors	inhibitori PARP	čvrsti tumori
Chiroscience	D4809	Dexifosamide	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	UFT (Tegafur/Uracil)	UFT (Tegafur[Uracil)	čvrsti tumori
Sankyo	Krestin	Krestin	čvrsti tumori
Asta Medica	Ifex/Mesnex	ifosamid	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Ifex/Mesnex	ifosamid	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Vumon	teniposid	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Paraplatin	karboplatin	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Plantinol	cisplatin, tajni	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Plantinol	cisplatin	čvrsti tumori
Bristol Myers Squibb	Vepeside	etopozid	čvrsti tumori, melanom
Zeneca	ZD 9331	ZD 9331	čvrsti tumori, uznapredovani kolorektuma
Chugai	Taxotere	Docetaxel	čvrsti tumori, karcinom dojke
Rhone Poulenc	Taxotere	Docetaxel	čvrsti tumori, karcinom dojke
Glaxo Wellcome	Prodrug of guanine arabinoside	prolijek arabinizida	leukemija T-stanica/limfom i neoplazma B-stanice
Bristol Myers Squibb	Taxane Analog	analog taxana	kao i Taxol

U jednoj cjelini metode iz izuma koriste imunostimulirajuće nukleinske kiseine kao zamjenu za IFN α terapiji u tretmanu karcinoma. Danas se u nekim protokolima tretmana poziva na upotrebu IFN α . Kako je IFN α produciran nakon davanja nekim imunostimulirajućih nukleinskih kiselina, te nukleinske kiseline se mogu koristiti za generiranje endogenog IFN α .

Izum također uključuje metode indukcije na antigen nespecifične aktivancije urođenog imuniteta i široki spektar otpora prema infekcijama korištenjem imunostimulirajućih nukleinskih kiselina. Termin antigen nespecifična aktivancija urođenog imuniteta kako je ovdje korišten odnosi se na aktivaciju imunih stanica koje nisu B-stanice i primjerice mogu uključivati aktivaciju NK stanica, T-stanica ili ostalih imunih stanica koje daju odgovor neovisan o antigenu ili nekim kombinacijama tih stanica. Široki spektar otpora na infekcije je induciran jer su imune stanice u aktivnom obliku i začete su da odgovore bilo kojem invazivnom spoju ili mikroorganizmu. Stanice ne moraju biti specifično začete protiv određenog antigena. To je posebno korisno u biološkom ratovanju i ostalim gore opisanim uvjetima, kao što je kod putnika.

Stimulacijski indeks određene imunostimulirajuće nukleinske kiseline se može testirati u različitim testovima imunosti stanice. Preferirano stimulacijski indeks imunostimulirajuće nukleinske kiseline prema proliferaciji B-stanici jeste barem oko 5, preferirano barem oko 10, preferiranije barem oko 15 i najpreferiranije barem oko 20, a kako je određeno ugradnjom ^3H uridina u B staničnu kulturu glodavca, kojoj je dodano 20 μM nukleinske kiseline kroz 20h pri 37 $^{\circ}\text{C}$ i pulsirano je s 1 μCi ^3H uridina, sakupljena i brojana 4 h nakon, a kako je opisano detaljno u PCT Published Patent Appliations PCT/US95/01570 (WO 96/02555) i PCT/US97/19791 (WO 98/18810) prioriteta prema U.S. Seriskim br. 08/386,063 i 08/960,744 prijavljeno 7. veljače 1995 i 30. listopada 1997. Za upotrebu *in vivo*, primjerice, važno je da su

imunostimulirajuće nukleinske kiseline sposobne učinkovito inducirati imuni odgovor kao što je, primjerice produkcija antitijela.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline su učinkovite u veterbatama koji nisu glodavci. Različite imunostimulirajuće nukleinske kiseline mogu uzrokovati optimalnu imunostimulaciju ovisno o tipu subjekta i sekvenciji imunostimulirajuće nukleinske kiseline. Glodavci, međutim, odgovaraju različito na nukleinske kiseline. Kako je ovdje pokazano, imunostimulirajuće nukleinske kiseline koje uzrokuju optimalnu simulaciju kod ljudiopćenito ne uzrokuju optimalnu stimulaciju kod miša i obrnuto. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina koja uzrokuje optimalnu stimulaciju kod ljudi često, međutim, uzrokuje optimalnu stimulaciju kod ostalih životinja kao što su krave, konji, ovce itd. Stručnjak može identificirati optimalne sekvencije nukleinskih kiselina korisnih za određenu vrstu od interesa, korištenjem ovdje opisanih rutinskih testova i/ili poznatih testova u struci, a korištenjem ovdje prikazanih uputa.

Imunostimulirajuće nukleinske kiseline se mogu izravno dati subjektu ili mogu biti dane skupa s kompleksom za isporuku nukleinske kiseline. Kompleks za isporuku nukleinske kiseline će značiti molekulu nukleinske kiseline povezane s (npr. ionski ili kovalentno i kapsulirano unutar) sustavom za ciljanje (npr. molekula koja rezultira većim afinitetom vezanja na ciljane stanice npr. površinu B-stanice i/ili povećanim prihvatom od ciljanih stanica). Primjeri kompleksa za isporuku nukleinske kiseline uključuju nukleinske kiseline povezane sa sterolom (npr. kolesterolom), lipidom (npr. kationski lipid, virosom ili liposomom) ili specifično sredstvo za vezivanje na ciljanu stanicu (npr. ligand prepoznat od specifičnog receptora ciljane stanice). Preferirano kompleksi mogu biti dovoljno stabilni *in vivo* da spriječe značajno kidanje veze prije prihvata od ciljane stanice. Međutim, kompleks mora biti takav da se može cijepati pod odgovarajućim uvjetima unutar stanice tako da se nukleinska kiselina oslobađa u funkcionalnom obliku.

Opisani su vehikuli za isporuku ili naprave za isporuku antigena i nukleinskih kiselina na površinu. Imunostimulirajuća nukleinska kiselina i/ili antigen i/ili ostali terapeutici se mogu dati sami (npr. u fiziološkoj otopini ili puferu) upotrebom vehikula poznatih u struci. Primjerice opisani su sljedeći vehikuli za isporuku: Cochleates (Gould-Fogerite *et al.*, 1994, 1996); Emulsomes (Vancott *et al.*, 1998, Lowell *et al.*, 1997); ISCOMs (Mowat *et al.*, 1993, Carlsson *et al.*, 1991, Hu *et al.*, 1998, Morein *et al.*, 1999); Liposomes (Childers *et al.*, 1999, Michalek *et al.*, 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); živi bakterijski vektori (e.g., *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone *et al.*, 1996, Pouwels *et al.*, 1998, Chatfield *et al.*, 1993, Stover *et al.*, 1991, Nugent *et al.*, 1998); živi virusni vektori (e.g., Vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex) (Gallichan *et al.*, 1993, 1995, Moss *et al.*, 1996, Nugent *et al.*, 1998, Flexner *et al.*, 1988, Morrow *et al.*, 1999); Microspheres (Gupta *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 1996, Maloy *et al.*, 1994, Moore *et al.*, 1995, O'Hagan *et al.*, 1994, Eldridge *et al.*, 1989); vakuine nukleinske kiseline (Fynan *et al.*, 1993, Kuklin *et al.*, 1997, Sasaki *et al.*, 1998, Okada *et al.*, 1997, Ishii *et al.*, 1997); Polymers (e.g. karboksimetilceluloza, kitosan) (Hamajima *et al.*, 1998, Jabbal-Gill *et al.*, 1998); polimerni prsteni (Wyatt *et al.*, 1998); proteosomi (Vancott *et al.*, 1998, Lowell *et al.*, 1998, 1996, 1997); natrijev fluorid (Hashi *et al.*, 1998); transgenične biljke (Tacket *et al.*, 1998, Mason *et al.*, 1998, Haq *et al.*, 1995); virosomi (Gluck *et al.*, 1992, Mengiardi *et al.*, 1995, Cryz *et al.*, 1998); čestice poput virusa (Jiang *et al.*, 1999, Leibl *et al.*, 1998). Ostali vehikuli za isporuku su poznati u struci i neki dodatni primjeri prikazani su ispod u diskusiji o vektorima.

Termin učinkovita količina imunostimulirajuće nukleinske kiseline odnosi se na količinu neophodnu ili dovoljnu da se postigne željeni biološki učinak. Primjerice, učinkovita količina imunostimulirajuće nukleinske kiseline za indukciju mukoznog imuniteta je količina neophodna da uzrokuje razvitak IgA kao odgovor na antigen nakon izlaganja antigenu, dok je ta količina potrebna za indukciju sistemske imunosti uporavo količina neophodna da uzrokuje razvitak IgG kao odgovor na antigen nakon izlaganja antigenu. U kombinaciji s ovim ovdje prikazanim, izborom među raznim aktivnim spojevima, te ovisno o faktorima za procjenu kao što je mogućnost, relativna bioraspoloživost, tjelesna težina pacijenta, ozbiljnost nepovoljnih nusjeftakata i preferirani načini davanja, te efektivni profilaktički ili terapijski režim tretman, se može planirati koja doza ne uzrokuje znatnu toksičnost a ipak je efektivna u tretmanu određene bolesti. Učinkovita količina za određenu primjenu se može mijenjati ovisno o faktorima kao što je bolest i uvjeti koji se tretiraju, o datoj imunostimulirajućoj nukleinskoj kiselini, o antigenu, o veličini subjekta ili ozbiljnosti bolesti ili uvjeta. Stručnjak u području može empirijski odrediti učinkovitu količinu određene imunostimulirajuće nukleinske kiseline i/ili antigen i/ili drugog terapijskog sredstva bez nepotrebnog eksperimentiranja.

Doze spojeva subjektima za mukoznu ili lokalnu isporuku su u rasponu od oko 0.1 µg do 10 mg po davanju, a koja ovisi o aplikaciji koja može biti dana dnevno, tjedno ili mjesečno te u drugim rasponima vremena. Tipičnije mukozne ili tipične doze su u rasponu od oko 10 µg do 5 mg po davanju, a najtipičnije od oko 100 µg do 1 mg s 2-4 davanja između kojih prođu dani ili tjedni. Tipičnije, doza imunostimulanta je u rasponu od 1 µg do 10 mg po davanju, a najtipičnije 10 µg do 1 mg uz dnevno ili tjedno davanje. Doze spojeva ovdje opisane za parenteralno davanje za svrhe indukcije na antigen specifičnog imunog odgovora, pri čemu su spojevi izporučeni s antigenom ali ne drugim terapijskim sredstvom su tipično 5 do 10000 puta više od učinkovite mukozne doze za adjuvans vakuine ili imunostimulirajućom aplikacijom, tipičnije 10 do 1000 puta više, a najtipičnije 20 do 100 puta više. Doze ovdje opisanih spojeva za parenteralnu isporuku za svrhe indukcije urođenog imunog odgovora ili za povećanje ADCC ili za indukciju na antigen specifičnog odgovora,

a kada su imunostimulirajuće nukleinske kiseline dane u kombinaciji s drugim terapijskim sredstvima ili u specijaliziranim vehikulima za isporuku, su tipično u rasponu od oko 0.1 µg do 10 mg po davanju, koji ovisi o tome da li se aplikacija daje dnevno, tjedno ili mjesečno ili u nekim drugim vremenskim rasponima između ovih. Tipičnije se parenteralne doze za te svrhe kreću u rasponu od oko 10 µg do 5 mg po davanju, a najtipičnije od oko 100 µg do 1 mg s 2-4 davanja odijeljena danima ili tjednima. U nekim cjelinama, međutim, parenteralne doze se za te svrhe mogu koristiti u rasponu od 5 do 10000 puta veće nego gore opisane tipične doze.

Za bilo koji spoj ovdje opisan, terapijski učinkovita količina može biti početno određena za životinjske modele. Terapijski učinkovita doza može također biti određena prema podatke za CpG oligonukleotide kod ljudi koji su testirani na ljudima (klinička istraživanja na ljudima su započela) i za spojeve koji su poznati da imaju slične farmakološke aktivnosti, kao što su ostali mukozni adjuvansi, npr. LT i ostali antigeni za svrhe vakcinacije, a za mukozno ili lokalno davanje. Za parenteralno davanje su potrebne visoke doze. Primjenjena doza može biti podešena na osnovi bioraspoloživosti i potentnosti danog spoja. Podešavanje doze da se postigne maksimalne učinkovitost je zasnovana na gore opisanim metodama i ostalim metodama dobro poznatim u području, a što je unutar sposobnosti običnog stručnjaka.

Formulacije iz izuma su dane u farmaceutski prihvatljivim otopinama koje rutinski mogu sadržavati farmaceutski prihvatljive koncentracije soli, sredstva za puferiranje, konzervative, kompatibilne nosača, adjuvanse i mogu biti drugi terapijski sastojci.

Za upotrebu u terapiji, učinkovita količina imunostimulirajuće nukleinske kiseline može biti dana subjektu na bilo koji način koji ispručuje nukleinsku kiselinu na željenu površinu, npr. mukozno, sistemski. Davanje farmaceutskog pripravka iz ovog izuma može se izvesti na bilo koji način poznat stručnjacima. Preferirani načini davanja uključuju, ali nisu na njih ograničeni, parenteralno, intramuskularno, intranazalno, intratrahealno, inhalacijom, okularno, vaginalno i rektalno.

Za oralno davanje spojevi (npr. imunostimulirajuće nukleinske kiseline, antigeni i ostala terapijska sredstva) mogu biti lako formulirani spajanjem aktivnog spoja (spojeva) s farmaceutski prihvatljivim nosačima poznatim u struci. Takvi nosači omogućuju spojevima iz izuma da se formuliraju kao tablete, pilule, dražeje, kapsule, tekućine, gelovi, sirupi, smjese, suspenzije i slično, a za oralnu razgradnju u tretiranom subjektu. Farmaceutski pripravci za oralno davanje se mogu dobiti kao čvrsti ekscipijensi, smjesa može biti usitnjena i procesuirana da se dobiju granule, nakon dodatka pogodnih pomoćnih sredstava, te po želji, a da se dobiju tablete i jezgra dražeje. Pogodni ekscipijensi su punila kao što su šećeri, uključujući laktozu, saharozu, manitol ili sorbitol; pripravci s celulozom kao što je primjerice kukuruzni škrob, pšenični škrob, krumpirov škrob, želatina, guma tragaklant, metilna celuloza, hidroksipropilmetilceluloza, natrijeva karboksimetilceluloza i/ili polivinil-pirolidon. (PVP). Ako je poželjno, može se dodati dizintegrirajuće sredstvo, kao što je umreženi polivinil-pirolidin, agar ili algijska kiselina ili njena sol, kao što je natrijev alginat. Oralne formulacije mogu biti također formulirane u fiziološkoj otopini ili puferima za neutralizaciju kiselih uvjeta ili mogu biti dani bez nosača.

Jezgre dražeja presvučene su s pogodnim sredstvom za presvlačenje. Za te svrhe, mogu se koristiti koncentrirane otopine šećera koje mogu sadržavati gumu arabiku, talk, polivinil-pirolidon, karbopol gel, polietilen glikol, i/ili titanov dioksid, otopine laka i pogodna organska otapala ili smjese otapala. U tablete ili dražeje se mogu dodati boje ili pigmenti, a za identifikaciju ili karakterizaciju različitih kombinacija doza aktivnog spoja.

Farmaceutski pripravci koji se koriste oralno uključuju kapsule načinjene od želatine koje se pritiskaju, kao i meke zatvorene kapsule načinjene od želatine i plastifikatora kao što je glicerol ili sorbitol. Kapsule mogu sadržavati aktivne sastojke i smjese s punilom kao što je laktoza, veziva kao što su škrobovi i/ili lubrikante kao što je talk ili magnezijev stearat, te može biti prisutan stabilizator. U mekim kapsulama aktivni spojevi se mogu otopiti ili suspendirati u pogodnim tekućinama kao što su masne kiseline, tekući parafin ili tekući polietilenglikoli. Uz to se mogu dodati stabilizatori. Mogu se također koristiti mikrosfere formulirane za oralno davanje. Takve mikrosfere su dobro definirane u struci. Sve formulacije za oralno davanje trebaju biti u dozama pogodnim za takvo davanje.

Za buklano davanje se pripravci mogu uzeti u obliku tableta ili lonžeta formuliranih na uobičajeni način.

Za davajne inhalacijom spoj koji se koristi se prema ovom izumu se može pogodno isporučiti u obliku aerosolnog spreja iz paketa pod tlakom, a upotrebom pogodnog propelanta, npr. diklordifluormetana, triklorfluormetana, triklortetrafluoretana, ugljičnog dioksida ili drugih pogodnih plinova. U skućaju aerosola pod tlakom, jedinica doze može biti određena ventilom za ispruku mjerene količine. Kapsule i spremnici npr. želatine za upotrebu inhalatora ili insufлятора se mogu formulirati da sadrže smjesu prašaka spoja i pogodni prašak za osnovu kao što je laktoza ili škrob.

Ako je poželjna sistemska isporuka, spojevi se mogu formulirati za parenteralno davanje npr. bolus injekcija ili kontinuirana infuzija. Formulacije za injekciju mogu biti prisutne u obliku jedinice doze, npr. u ampulama ili

spremicima s višestrukom dozom, a s dodanim prezervativom. Pripravci mogu biti u obliku suspenzija, otopina ili emulzija u ulju ili vodenih vehikula, te mogu sadržavati sredstva za formulaciju kao što su ona za suspendiranje, stabiliziranje i/ili disperziju.

- 5 Pripravci se mogu biti u oblicima kao što je otopina aktivnih spojeva u obliku koji je topljiv u vodi. Uz to, suspenzije aktivnih spojeva se mogu pripremiti kao pogodne uljne injekcije suspenzija. Pogodni lipofilna otapala ili vehikuli uključuju masna ulja kao što je sezamovo ulje ili sintetske masne estere, kao što je etilni oleat ili trigliceridi, ili liposomi. Vodene injekcije suspenzija mogu sadržavati tvari koje povećavaju viskoznost suspenzije, kao što je natrijeva karboksimetil-celuloza, sorbitol ili dekstran. Suspenzije također mogu sadržavati stabilizatore ili sredstva koja
- 10 povećavaju topljivost spojeva da se dozvoli priprema otopina velike koncentracije.

Alternativno aktivni spojevi mogu biti u obliku prašaka za pripremu s pogodnim vehikulima, npr. sterilnom vodom bez pirogena, a prije upotrebe.

- 15 Spojevi također mogu biti formulirani kao rektalni i vaginalni pripravci kao što su supozitoriji ili klistiri s odgođenim djelovanjem, koji npr. sadrže uobičajene baze za supozitorije kako što je kako maslac ili ostali gliceridi.

- Uz prethodno opisane formulacije, spojevi također mogu biti formulirani kao depo pripravci. Takve formulacije koje dugo djeluju se mogu formulirati s pogodnim polimernim ili hidrofobnim materijalima (primjerice kao emulzija u prihvatljivom ulju) ili smoli za ionsku izmjenu, ili kao umjereno topljivi derivati, primjerice kao umjereno topljive soli.
- 20 Farmaceutski pripravci također mogu sadržavati pogodne nosače ili ekscipijense u čvrstoj fazi ili u gelu. Primjeri takvih nosača su ekscipijensi koji uključuju, ali bez ograničenja, kalcijev karbonat, kalcijev fosfat, različite šećere, škrobove, derivate celuloze, želatinu i polimere kao što je polietilen glikol.

- 25 Pogodni tekući ili farmaceutski oblici pripravaka su primjerice, vodene ili fiziološke otopine za inhalaciju, mikrokapsulirane, presvučene na mikroskopske zlatne čestice, sadržane u liposomima, raspršene, aerosoli, u obliku za implantaciju pod kožu ili sušene na oštrom predmetu da bi bile unesene grebanjem kožu. Farmaceutski pripravci također uključuju granule, praške, tablete, presvučene tablete, mikro(kapsule), supozitorije, sirupe, emulzije, suspenzije, kreme, kapi ili pripravke s produljenim oslobađanjem aktivnih spojeva u čijoj pripremi su korišteni ekscipijensi i aditivi
- 30 i/ili pomoćna sredstva, kao što su sredstva za dezintegraciju, veziva, sredstva za presvlačenje, sredstva za bubrenje, lubrikanti, sredstva za poboljšanje okusa, zaslađivači ili solubilizatori. Farmaceutski pripravci su pogodni za upotrebu u različitim sustavima za isporuku. Za kratki prikaz metoda isporuke lijekova vidi Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990, a koji je ovdje ugrađen citatom.

- 35 Imunostimulirajuće nukleinske kiseline, a po potrebi i drugi terapeutici i/ili antigeni se mogu davati *per se* (sami) ili u obliku farmaceutski prihvatljive soli. Kada se koriste u medicini, soli trebaju biti farmaceutski prihvatljive ali se mogu koristiti soli koje nisu farmaceutski prihvatljive, a da bi se pripravile odgovarajuće farmaceutski prihvatljive soli. Takve soli uključuju, ali bez ograničenja, one pripravljene iz sljedećih kiselina: klorovodična, bromovo-dična, sumporna, dušična, fosforna, jabučna, octena, salicilna, p-toluensulfonska, vinska, limnusa, metnasulfonska, mravlja, malonska,
- 40 jantarna, naftalen-2-sulfonska, te benzen sulfonska.

Pogodna sredstva za puferiranje uključuju sljedeće: octena kiselina i sol (1-2% w/v), borna kiselina i sol (0.5-2.5% w/v), te fosforna kiselina i sol (0.8-2% w/v). Pogodni prezervativi uključuju benzalkonijev klorid (0.003-0.03% w/v), klorbutanol (0.3-0.9% w/v), parabene (0.01-0.25% w/v), te timerosal (0.004-0.02% w/v).

- 45 Farmaceutski pripravci iz izuma sadrže ulinkovitu količinu imunostimulirajuće nukleinske kiseline i antigene i/ili ostala terapijska sredstva uključena u farmaceutski prihvatljiv nosač. Termin farmaceutski prihvatljiv nosač označuje jedan ili više kompatibilnih čvrstih ili tekućih punila, razrjeđivača ili tvari za kapsuliranje koje su pogodne za davanje ljudima ili ostalim kralježnjacima. Termin nosač odnosi se na organski sastojak, prirodni ili sintetski, s kojim je aktivni sastojak
- 50 spojen da se olakša primjena. Komponente farmaceutskih pripravaka su također mogu miješati sa spojevima iz izuma i jedan s drugim na takav način da ne postoji interakcija koja bi značajno pokvarila željenu farmaceutsku efikasnost.

- Imunostimulirajuće nukleinske kiseline korisne iz izuma mogu biti isporučene u smjesi s dodatnim adjuvansom(ima), drugim terapeutičkim ili antigenom(ima). Smjesa može sadržavati nekoliko adjuvansa uz imunostimulirajuću nukleinsku
- 55 kisleinu ili nekoliko antigena ili ostalih terapeutika.

- Na raspolaganju su različiti načini davanja. Određeni način koji je odabran će ovisiti, naravno o određenom adjuvansu i odabranom antigenu, određenim uvjetima koji su pod tretmanom i potrebnoj dozi za učinkovitu terapiju. Metode iz izuma, općenito govoreći, mogu biti prakticirane upotrebom načina davanja koji je medicinski prihvatljiv, što znači
- 60 svaki način koji producira učinkovite razine imunog odgovora bez uzrokovanja klinički neprihvatljivog nepovoljnog efekata. Preferirani načini davanja su oni gore diskutirani.

Pripravci mogu pogodno biti u jedinici doze ili mogu biti pripremljeni bilo kojom metodom dobro poznatoj u farmaceutskoj struci. Sve meotde uključuju korak spajanja spojeva s nosačem koji je načinjen od jednog ili više sastojaka. Općenito, pripravci su pripremljeni jednoliko raspoređenim i bliskim vezivanjem spojeva s tekućim nosačem, s fino podijeljenim čvrstim nosačem ili oba, a zatim ako je potrebno oblikovanje produkta. Tekuće jedinice doze su u bočicama ili ampulama. Čvrste jedinice doze su tablete, kasule i supozitoriji. Za tretman pacijenata, a ovisno o aktivnosti spoja, način davanja, svrha imunizacije (t.j. profilaktički ili terapijski), priroda i ozbiljnost poremećaja, godine i tjelesna težina pacijenta, mogu biti potrebne različite doze. Davanje dane doze se može izvesti jednim davanjem u obliku jednične doze ili nekoliko manjih jedinica doze. Višestruko davanje doza u specifičnim intervalima tjedana ili mjeseci je obično za izazivanje na antigen specifičnih odgovora.

Ostali sustavi za isporuku mogu uključivati odgođeno oslobađanje i zadržano oslobađanje. Takvi sustavi mogu izbjeći ponovljeno davanje spojeva, i učiniti davanje subjektu i liječniku pogodnijim. Mnogi tipovi sustava za oslobađanje su poznati stručnjacima. Oni uključuju na polimerima zasnovane sustave kao što je poli(laktid-glikolid), kopolioksalat, polikaprolaktoni, polisteramidi, poliortoesteri, polihidroksimaslačna kiselina, te polianhidridi. Mikrokapsule prethodnih polimera koje sadrže lijek su opisane primjerice u U. S. Patent 5,075,109. Sustav za isporuku također uključuje sustav koji nije polimer kao što su: lipidi uključujući sterole kao što je kolesterol, esteri kolesterola i masne kiseline ili neutralne masti kao što je mono-, di- te trigliceridi, hidrogel oslobađajući sustav, silatični sustav, sustav zasnovan na peptidima, presvlačenje voskom, komprimirane tablete korištenjem uobičajenih veziva i ekscipijensa, djelomično fuzionirani implantati i slično. Specifični primjeri uključuju, ali nisu na njih ograničeni: (a) erozijske sustave u kojem sredstvo iz izuma sadržano unutar matrice kao što su one opisane u U. S. Patentima br. 4,452,755, 4,675,189, te 5,736,152, te (b) difuzijski sustavi u kojima aktivna komponenta prodire pri kontroliranoj brzini iz polimera kao što je opisano u U. S. Patentima br. 3,854,480, 5,133,974, te 5,407,686. Uz to, može se koristiti na pumpi zasnovani sustav isporuke, od kojih su neki prilagođeni za implantaciju.

Ovaj izum je dalje ilustriran sljedećim Primjerima, koji ni na koji način nisu ograničavajući. Cijeli sadržaj svih referencija (uključujući literaturne referencije, izdane patente, publicirane patente aplikacije i istovremene patentne aplikacije) navedne kroz cijelu ovu aplikaciju i stoga su odmah ugrađeni citoatom.

Primjeri

Materijali i metode

Oligonukleotidi: Fosfodiesterijski i fosforotioatno modificirani ODN je kupljen od Operon Technologies (Alameda, CA) i Hybridon Specialty Products (Milford, MA). ODN je tesiran na endotoksin korištenjem LAL-testa (LAL-assay BioWittaker, Walkersville, MD; donja granica detekcije 0.1 EU/mL). Za *in vitro* test, ODN je razrijeđen u TE puferu (10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA), te čuvani pri -20 °C. Za *in vivo* upotrebu, ODN je razrijeđen u fosfatnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (0.1 M PBS, pH 7.3) i čuvano je pri 4 °C. Sva razrjeđenja su izvedena korištenjem otapala bez pirogena.

Izolacija humanih PBMC i stanične kulture: Mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) su izolirane krvi zdravih volontera uz centrifugiranje Ficoll-Paque gradijenta gustoće (Histopaque-1077, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kao što je opisano (Hartmann *et al.*, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10). Stanice su suspendirane u RPMI 1640 mediju za kulturu kojem je dodano 10% (v/v) toplinom aktiviranih (56 °C, 1 h) FCS (HyClone, Logan, UT), 1.5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (svi od Gibco BRL, Grand Island, NY) (kompletni medij). Stanice (končana koncentracija 1x10⁶ stanica/mL) su kultivirane u kompletnom mediju u 5% CO₂ vlažnom inkubatoru pri 37 °C. ODN i LPS (iz *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ili anti-IgM su korišteni kao stimulansi. Za mjerenje litičke aktivnosti humanih NK, PBMC je inkubiran na 5 x 10⁶/jažici na ploči s 24 jažica. Kulture su sakupljene nakon 24 sata i stanice su korištene kao efektori u standardnom 4 satnom testu oslobađanja ⁵¹Cr prema K562 ciljanim stanicama, kao što je prethodno opisano (Ballas *et al.*, 1996 J. Immunol. 157:1840-1845). Za proliferaciju B-stanica, 1 µCi of ³H timidina je dodano 18 sati prije sakupljanja i količina ugradnje ³H timidina je određena scintilacijskim brojanjem dana 5. Standardna devijacija trostrukih mjerenja je bila < 5%.

Protočna citometrija na humanim PBMC: Površina antigena na PBMC je bojana kao što je prije opisano (Hartmann *et al.*, 1998 J. Pharmacol. Exp. Ther. 285:920928). Monoklonalna antitijela CD3 (UCHT1), CD14 (WE2), CD19 (1343), CD56 (B 159), CD69 (FN50) te CD86 (2331 [FLN-1]) su kupljena od Pharmingen, San Diego, CA. IgG₁ (MOPC-21) i IgG_{2b} (Hartmann *et al.*, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10) su korišteni za kontrolu nespecifičnog bojanja. NK stanice su identificirane ekspresijom CD56 na CD3, CD14 i CD19 negativnim stanicama, dok su B-stanice identificirane ekspresijom na CD 19. Podaci protočne citometrije od 10000 stanica po uzorku su ispitani na FACScan (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Pogodnost stanica unutar FSC/SSC vrata korištena za analizu je ispitana bojanjem s propidium jodidom (2 µg/mL) i nađeno ih je da je više od 98%. Podaci su analizirani korištenjem kompjutorskog programa FlowJo (verzija 2.5.1, Tree Star, Inc., Stanford, CA).

Rezultati:*Primjer 1: Stimulacija humanih B-stanica ovisna o CpG ovisi o metiliranju i duljini ODN*

Humane PBMC su dobivene od normalnih donora i kultivirane su pet dana pri 2×10^5 stanica/jažici s naznačenom koncentracijom i pokazanim sekvencijama ODN. Kako je pokazano u Tablici F, humane PBMS proliferiraju preko osnovnog signala kada su kultivirani s različitim CpG ODN, ali također pokazuju proliferaciju čak i ODN koji ne sadrži CpG motive. Važnost nemetiliranih CpG motiva u donošenju optimalne imune stimulacije s tim ODN je pokazana činjenicom da ODN 1840 (SEQ ID NO. 83) inducira 56,603 brojanja ugradnje ^3H -timidina dok isti T-obogaćen ODN s metiliranim CpG motivima (ne-CpG) 1979 (SEQ ID NO. 222), inducira niži ali još uvijek povećanu aktivnost preko basne (izbrojano samo 18618) pri istoj koncentraciji od 0.6 $\mu\text{g/mL}$. Smanjena proliferacija pri višim ODN koncentracijama može biti artefakt jer stanice postaju iscrpljene pod tim eksperimentalnim uvjetima ili mogu reflektirati neku toksičnost viših ODN koncentracija. Interesantno je da kraći ODN koji sadrže CpG motive kao što su 13-14 meri 2015 i 2016, su slabiji stimulatori usprkos činjenici da bi njihova molarna koncentracija bila u stvari viša jer je ODN dodan na osnovu mase a ne molariteta. To pokazuje da duljina ODN može također biti važna odrednica za imune efekte ODN. Ne-CpG ODN ali blago T-obogaćen ODN (oko 30% T), 1982 (SEQ ID NO. 225) uzrokuje samo malu količinu stanične proliferacije prema baznoj vrijednosti.

Tablica F

Koncentracija oligo ODN br.	0.15 $\mu\text{g/mL}$	0.6 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
sam	648	837	799
1840 (SEQ ID NO. 83)	5744	56603	31787
2016 (SEQ ID NO. 256)	768	4607	20497
1979 (SEQ ID NO. 222)	971	18618	29246
1892 (SEQ ID NO. 135)	787	10078	22850
2010 (SEQ ID NO. 250)	849	20741	8054
2012 (SEQ ID NO. 252)	2586	62955	52462
2013 (SEQ ID NO. 253)	1043	47960	47231
2014 (SEQ ID NO. 254)	2700	50708	46625
2015 (SEQ ID NO. 255)	1059	23239	36119

Brojevi predstavljaju cpm ugradnje ^3H -timidina za kulturu humanih PBMC pripremljenih kao što je gore prikazano.

Primjer 2. O koncentraciji ovisna aktivacija aktivnosti humanih NK stanica s timidinom obogaćenim ODN.

Humane PBMC su kultivirane 24 sata s raznim CpG ili ne-CpG ODN pri dvijema različitim koncentracijama, te je testirana njihova sposobnost ubijanja NK ciljnih stanica kao što je ranije opisano (Ballas *et al.*, 1996 J. Immunol. 157:1840-1845). Ubijanje je mjereno kao litička jedinica ili L.U. Humani donori korišteni u ovom eksperimentu su imali baznu razinu od 3.69 L.U. koja je povećana na 180.36 L.U. korištenjem pozitivne kontrole, IL-2. A CpG oligo, 2006 (SEQ ID NO. 246), inducirana je visoka razine NK litičke funkcije pri niskoj koncentraciji od 0.6, i nižoj koncentraciji od 6.0. Iznenadujuće, T-obogaćen ODN u kojem su CpG motivi od 2006 metilirani (ODN na 2117 (SEQ ID NO. 358)) ili invertirani u GpCs (ODN 2137 (SEQ ID NO. 886)) su zadržali jaku imunostimulirajuću funkciju pri višim koncentracijama ODN, kao što je prikazano u Tablici G. Ti o koncentraciji ovisni imunostimulirajući efekti nisu opće svojstvo fosforotioatnog skeleta jer niže opisani eksperimenti pokazuju da je poly-A ODN nestimulirajući iznad bazne razine. Neka je stimulacija viđena s ODN duljine od 24 baze u kojem su sve bazne pozicije slučajne, tako da će se A, C, G i T pojavljivati u frekvenciji od po 25% u svakom položaju baze (ODN 2182 (SEQ ID NO. 432)). Međutim, stimulirajući efekt takvog ODN s 24 baze je uveliko povećan ako je čisti poly-T, a u kojem slučaju je stimulacija također viđena kod nižih koncentracija od 0.6 $\mu\text{g/mL}$ (ODN 2183 (SEQ ID NO. 433)). U stvari, stimulatorska aktivnost ODN SEQ ID NO. 433 pri tako niskoj koncentraciji je viša nego bilo kojeg drugog testiranog ODN pri toj niskoj koncentraciji uz optimalnu imunostimulaciju kod ljudi s ODN of SEQ ID NO. 246. U stvari više koncentracije ODN SEQ ID NO. 433 više stimuliraju aktivnost NK nego bilo kojeg drugog fosforotioatnog ODN osim za jaku CpG ODN 2142 (SEQ ID NO. 890), koja je neznatno viša. Ako je sadržaj G ODN SEQ ID NO. 246 povećan relativno prema sadržaju T,

a dodatkom više G, pa stoga rezultira smanjivanje umjera T nukleotida, smanjuje se imunostimulirajući efekt ODN (vidi ODN 2132 (SEQ ID NO. 373)). Stoga, sadržaj T u ODN je važna odrednica njegovog imunostimulirajućeg efekta. Mada je poli-T ODN najviše stimulirajući od ne-CPG ODN, ostale baze su također važne u određivanju imunostimulirajućeg efekta na ne-CpG ODN. ODN 2131 (SEQ ID NO. 372) u kojem je malo više od polovice baza T i u kojem nema G, je imunostimulator pri koncentraciji od 6 $\mu\text{g/mL}$ ali je manje aktivan od ostalih T-obogaćenih ODN. Ako su 6 A u ODN 2131 (SEQ ID NO. 372) zamjenjeni s 6G, imunostimulirajući efekt ODN može biti povećan (vidi ODN 2130 (SEQ ID NO. 371)).

Tablica G

HUMANI PBL KULTIVIRAN PREKO NOĆI S OLIGO

MR	3605						
SR	256						
%SR	7.11						
EFEKTOR	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00	20.00	
KONTROLA [RM]							L.U.
SAMO	2.65	5.45	10.15	17.65	29.92	39.98	3.69
+IL2 (100 U/mL)	35.95	57.66	86.26	100.39	99.71	93.64	180.36
+ 1595 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.75	6.10	12.14	23.70	36.06	43.98	5.48
+ 1595 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	15.42	31.09	47.07	73.34	94.29	97.73	35.85
+ 2006 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	6.71	15.99	26.92	44.75	64.12	68.83	16.96
+ 2006 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	6.19	8.18	16.13	24.35	39.35	56.07	8.04
+ 2117 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.54	4.73	9.56	18.04	28.57	39.85	3.49
+ 2117 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	7.03	10.76	16.90	30.59	52.14	59.46	10.96
+ 2137 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.61	5.35	10.04	15.16	23.79	37.86	2.57
+ 2137 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	7.99	10.37	16.55	32.32	49.78	60.30	11.01
+ 2178 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.88	4.52	11.47	16.05	24.85	34.27	2.37
+ 2178 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.21	5.03	11.16	16.39	28.22	36.45	2.94
+ 2182 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.42	6.57	10.49	19.73	26.55	35.30	2.89
+ 2182 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.11	7.98	14.60	26.56	40.40	51.98	7.59
+ 2183 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.73	8.46.0	15.52	24.48	37.78	56.77	7.80
+ 2183 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	8.86	12.89	23.08	41.49	66.26	75.85	16.57
+ 2140 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.78	5.27	12.30	20.79	35.75	45.62	5.40
+ 2140 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	6.56	13.24	21.26	37.96	60.80	73.05	14.82
+ 2141 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.63	6.34	10.21	17.73	30.93	43.57	4.29
+ 2141 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.98	15.30	25.22	37.88	58.47	69.12	14.83
+ 2142 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.18	3.66	6.99	14.62	19.68	32.52	1.56
+ 2142 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	7.08	15.80	25.65	41.72	68.09	73.14	17.11
+ 2143 (0.6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.12	6.90	10.77	22.96	35.78	42.94	5.19
+ 2143 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.16	8.40	12.38	21.69	34.80	54.21	6.64
+ 2159 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	5.05	11.76	21.67	41.12	51.68	65.47	13.19
+ 2132 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.23	6.06	10.50	18.74	32.68	44.06	4.61
+ 2179 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	6.14	9.49	21.06	42.48	60.12	71.87	14.54
+ 2180 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.37	8.57	15.44	29.66	44.35	61.31	9.47
+ 2133 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	6.53	12.58	23.10	38.03	61.16	68.36	14.62
+ 2134 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	7.51	12.14	21.14	32.46	54.47	67.12	12.98
+ 2184 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	5.22	9.19	17.54	30.76	45.35	63.55	10.42
+ 2185 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	8.11	14.77	26.27	40.31	55.61	70.65	15.60
+ 2116.0 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	5.58	10.54	16.77	37.82	59.80	66.33	13.07
+ 2181 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.43	9.85	17.55	27.05	53.16	69.16	11.43
+ 2130 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.81	8.07	17.11	27.17	42.04	53.73	8.27
+ 2131 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.29	6.73	7.30	18.02	32.73	49.06	5.08
+ 2156 (0.3 $\mu\text{L/mL}$)	2.50	5.26	8.20	15.95	26.64	33.07	2.31
+ 2156 (1.0 $\mu\text{L/mL}$)	5.91	10.99	17.31	26.97	50.64	63.78	10.84
+ 2157 (0.3 $\mu\text{L/mL}$)	2.36	4.00	6.65	12.94	24.13	38.86	2.58
+ 2157 (1.0 $\mu\text{L/mL}$)	3.72	9.55	17.15	34.55	52.27	65.33	11.58
+ 2158 (0.3 $\mu\text{L/mL}$)	1.25	2.36	6.90	16.39	15.63	29.82	1.17
+ 2158 (1.0 $\mu\text{L/mL}$)	4.73	7.26	11.07	15.55	30.80	43.71	4.16
+ 2158 (0.6 $\mu\text{L/mL}$)	1.55	3.38	6.85	13.36	20.15	27.71	1.13
+ 2158 (6.0 $\mu\text{L/mL}$)	2.65	3.88	9.29	12.19	22.47	28.99	1.34

Primjer 3: Indukcija proliferacije B-stanica pomoću T-obogaćenim ne-CpG ODN

Da bi se procijenila sposobnost T-obogaćenog ODN da aktivira proliferaciju B-stanica, humani PBMC su bojani s citoplazmatskom bojom CFSE, inkubirani pet dana s navedenim ODN pri 0.15 ili 0.30 µg/mL, te je analizirano protočnom citometrijom. B-stanice su identificirane na stanice pozitivnim linijama markera CD19. CpG ODN 2006 je 5 jaki induktor proliferacije B i taj efekt je smanjen kad su CpG motivi metilirani ili prevedeni u GpC, a kako je prikazano na Slikama 1A, B, C i D pri koncentraciji ODN od 0.3 µg/mL. Izgleda da je sastav baza ODN važan za određivanje imunostimulirajućeg efekta. Smanjivanje sadržaja T u ODN značajno smanjuje imunostimulirajući efekt, kao u primjeru ODN 2177 (SEQ ID NO. 427) u kojem je 6 prisutnih T u ODN 2137 (SEQ ID NO. 886) promjenjeno u 10 A pri čemu je znatno smanjen imunostimulirajući efekt. Važnost T u imunostimulirajućem efektu ODN je prikazana usporedbom of ODN 2116 (SEQ ID NO. 357) i 2181 (SEQ ID NO. 431), koji se razlikuju u 3' kraju ODN. ODN 2181, u kojem je 3' kraj poli-T je više imunostimulirajući od ODN 2116 u kojem je 3' kraj poli-C, bez obzira na činjenicu da obje ODN imaju TCGTCG na 5' kraju.

Primjer 4: Proliferacija inducirana pomoću TG oligonukleotida

Stimulirajući efekti TG motiva su prikazani na Slici 2. ODN 2137 ima identični sastav baza kao ODN 2006, ali su CG motivi prevedeni u GC čime je dobivena nukleinska kiselina bez CG. ODN, međutim, sadrži 6 TG dinukleotida. U ODN 2177, svi TG dinukleotidi od ODN 2137 su promjenjeni u AG. Mada ODN 2177 sadrži samo 6 adenina, on ne 20 pokazuje stimulaciju pri koncentraciji od 0.2 µg/mL. Za usporedbu, ODN koji ima duljinu od 24 baze a u svakom položaju može slučajno biti bilo koja baza (ODN 2182) inducira >12% proliferacije B-stanica pri koncentraciji od 0.2 µg/mL. Ti rezultati pokazuju da stimulatorni efekt ODN 2137 nije jednostavno taj od fosforotioatnog skeleta, nego se odnosi na prisutnosti TG dinukleotida.

Da bi se odredio efekt promjenljivog broja TG dinukleotidnih motiva, ODN 2200 i ODN 2202 su uspoređeni, kao što 25 pokazuje slika 2. Oba ODN sadrže 18 T i 6 G, ali su kod ODN 2202 svi G jedan za drugim, tako da nema ni jednog TG dinukleotida, dok su u ODN 2202 G razdvojeni kao GG dinukleotidi u cijelom ODN tako da ima tri TG. ODN 2202 je znatni bolji imunostimulator od ODN 2200, što je u skladu s modelom prema kojem su potrebna barem tri TG motiva u ODN za optimalni stimulirajući efekt. Vjerojatno je da čak više razine stimulacije mogu biti postignute ako je TG motiv 30 optimiziran, a kako je prije pokazano.

Primjer 4: Proliferacija inducirana pomoću TG oligonukleotida

Slika 3 prikazuje rezultate eksperimenata izvedenih iz istraživanja sadržaja TG prema realtivnim razinama T prema G, a 35 što se odnosi na stimulirajuće efekte ODN. Slika pokazuje da ODN u kojem su sve baze slučajno T ili G (ODN 2188 (SEQ ID NO. 905)) nisu stimulirajuće pri koncentraciji od 0.2 µg/mL slično ODN u kojem su sve baze slučajno raspoređeni A ili G (ODN 2189 (SEQ ID NO. 906)). Međutim, pri višoj koncentraciji od 2 µg/mL, slučajno smješteni T/G ODN 2188 je znatni više imunostimulatorni. Ta zadnja razina stimulacije je još niža nego koja se događa s potpuno slučajnim ODN (ODN 2182 (SEQ ID NO. 432)). Najviša stimulacija pri niskoj koncentraciji je viđena s ODN u kojem 40 je polovica baza fiksirana na T, a ostala polovica baza su slučajni T ili G (ODN 2190 (SEQ ID NO. 907)). Kako je svaka od tih baza fiksirana da je T, ne može biti TG motiva. Podaci na Slici 3 pokazuju da povećanje sadržaja TG u ODN poboljšava stimulatornu aktivnost.

U drugim eksperimentima, a čiji rezultati nisu prikazani dijagramom, ODN 2190 (SEQ ID NO. 907) pokazuje 45 stimulaciju aktivnosti NK u usporedbi s ODN 2188 (SEQ ID NO. 905) ili ODN 2189 (SEQ ID NO. 906).

Primjeri 6-8:*Uvod:*

Gore smo pokazali da su poli-T sekvencije sposobne povećati stimulaciju B i NK stanica. Ovdje i niže smo ispitivali 50 efekt različith ne-CpG T-obogaćenih ODN kao i poli-C ODN, a prema njihovoj sposobnosti da stimuliraju humane B-stanice, NK stanice i monocite.

Materijali i metode:

Oligonukleotidi: Fosforotioatom modificirani ODN je kupljen od ARK Scientific GmbH (Darmstadt, Gennany). Korištene sekvencije su: 1982: 5'tccaggacftctctcaggtt-3' (SEQ ID NO.: 225), 2006: 5'-tcgtcgttttgtcgtttgtcgtt-3' (SEQ ID NO.: 246), 2041: 5'-ctggtctttctggtttttctgg-3' (SEQ ID NO.: 282), 2117: 5'tzgtzgtttgtgtzgtttgtzgtt-3' (SEQ ID NO.: 358), 2137: 5'-tgctgctttgtgctttgtgctt- 3' (SEQ ID NO.: 886), 2183: 5'-tttttttttttttttttt-3' (SEQ ID NO.: 433), 2194: 5'ttttttttttttttttttt -3' (SEQ ID NO.: 911), 2196: 5'-tttttttttttt -3' (SEQ ID NO.: 913), 5126: 5'-gggtctttgtccttgcctt-3' 60 (SEQ ID NO.: 1058), 5162: 5'ttttttttttttttttttttttttt-3' (SEQ ID NO.: 1094), 5163:

5'aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3' (SEQ ID NO.: 1095), 5168: 5'cccccccccccccccccccccccc-3' (SEQ ID NO.: 1096) te 5169: 5'cgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg-3' (SEQ ID NO.: 1097). Većina ODN je testirana na sadržaj LPS korištenjem LAL testa (BioVWhittaker, Belgium) (donja granica detekcije 0.1 EU/mL), a što je ovdje također opisano. Za sve testove je ODN razrijeđen u TE puferu u čuvan pri -20 °C. Sva razrjeđenja su provedena upotrebom reagenasa bez pirogena.

Priprava stanice i stanične kulture: Humani PBMC je izoliran iz periferne krvi zdravih volontera, dobiveno od Njemačkog Crvenog križa (Ratingen, Germany), kako je gore opisano u Primjeru 1, ali su svi materijali kupljeni od Life Technologies, Njemačka i testirani su edotoksinom. Za sve testove B-stanice, NK stanice i aktivaciju monocita, PBMC je kultiviran u kompletnom mediju pri koncentraciji od 2×10^6 stanica/mL u 200 µM na ploči s 96 jažica s okruglim dnom, u vlažnom inkubatoru pri 37 °C. Različiti ODN LPS (Sigma) ili IL-2 (R&D Systems, USA) su korišteni za stimulaciju. U navedeno vrijeme su stanice sakupljene za protočnu citometriju.

Protočna citometrija: MAbs korišteni za bojanje antigena jesu: CD3, CD14, CD19, CD56, CD69, CD80 i CD86 (svi dobiveni od PharMingen/Becton Dickinson, Njemačka). Za monocyte Fc blokirani su receptori upotrebom humanog IgG (Myltenyi, Njemačka) kao što je ranije opisano (Bauer, M *et al* 1999 *Immunology* 97:699). Podaci protočne citometrije za barem 1000 stanica specifične podpopulacije (B-stanice, monociti, NK stanice, NKT-stanice or T-stanice) su doobiveni na FACSCalibur (Becton Dickinson). Podaci su analizirani upotrebom programa CellQuest (Becton Dickinson).

Citotoksičnost posredovana s NK: PBMC su kultivirane preko noći sa ili bez 6 µg/mL ODN ili 100 U/mL IL-2 pri 37 °C, 5% CO₂. Sljedeće jutro su ciljane K-562 stanice obilježene fluorescencijom bojom CFSE, kao što je prethodno opisano za humane B-stanice (Hartmann, G. i A. M. Krieg, 2000 *J. Immunol.* 164:944). PBMC su dodane u različitim omjerima (5 0:1, 25:1 i 12.5: 1) u 2×10^5 ciljanih stanica i inkubirano je 4h pri 37 °C. Stanice su sakupljene i inkubirane s DNA-specifičnom bojom 7-AAD (PharMingen) za detekciju apoptičkih stanica. Rezultati su mjereni protočnom citometrijom.

ELISA: PBMC (3×10^6 stanica/mL) su kultivirane sa specifičnim koncentracijama ODN ili LPS kroz 24h (IL-6, IFNγ i TNFα) ili 8h (IL-1β) na ploči s 48 jažica u vlažnoj atmosferi pri 37 °C. Supernatanti su sakupljeni i citokini su mjereni upotrebom OPTeia ELISA Kits (PharMingen) za IL-6, IFNγ i TNFα ili Elipair ELISA testom (Hoelzel, Njemačka) za IL-1β prema protokolu proizvođača.

Primjer 6: Aktivacija B-stanica inducirana s ODN kojima nedostaju CpG motivi

U gore opisanim eksperimentima u Primjeru 3 smo pokazali da je T-obogaćen ODN sposoban aktivirati B-stanice. Mi smo ovdje proširili istraživanja korištenjem dodatnih ODN i različitih stanica i izvora reagensa. U prvoj skupini eksperimenata smo usporedili aktivacijski potencijal različitih ne-CpG T-obogaćenih ODN sa svakim poznatim potentnim CpG ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246). PBMC (2×10^6 stanica/mL) krvi donora (n=2) su inkubirani s naznačenim koncentracijama ODNs 2006 (SEQ ID NO.: 246), 2117 (SEQ ID NO.: 358), 2137 (SEQ ID NO.: 886), 5126 (SEQ ID NO.: 1058), te 5162 (SEQ ID NO.: 1094). Stanice su inkubirane kroz 48h at 37 °C kao što je gore opisano i bojane s mAb for CD19 (marker B-stanice) i CD86 (aktivator markera B-stanica, B7-2). Ekspresija je mjerena protočnom citometrijom.

Koristeći razne ODNs, mi smo pokazali (Fig. 4) da T-obogaćeni ODN bez CpG motiva mogu inducirati stimulaciju humanih B-stanica. ODN 5126 (SEQ ID NO.: 1058) koji sadrži samo jednu poli-T sekvenciju ali ima više od 50% T, uzrokuje visoku razinu aktivacije humanih B-stanica. Mada postoje sličnosti sa SEQ ID NO.: 246 (npr. više od 80% sadržaja T/G), tom ODN jasno nedostaje bilo koji poznati imunostimulirajući CpG motiv. Iznenadujuće je da je za sve testirane T-obogaćene ODN najviši indeks stimuliranja dobiven pri koncentracijama između 3 i 10 µg/mL. Najviši indeks stimuliranja testiranih ODN je postignut s CpG/T-obogaćenim ODN SEQ ID NO.: 246 pri 0.4 µg/mL. Interesantno, aktivnost opada pri visokim koncentracijama.

Poli-A, poli-C i poli-T sekvencije sintetizirane su i testirane je njihova biološka aktivnost. PBMC (2×10^6 stanica/mL) jednog predstavnika donora (n=3) je stimulirana kao što je gore opisano, a s 0.4 µg/mL, 1.0 µg/mL ili 10.0 µg/mL sljedećih ODN: 2006 (SEQ ID NO.: 246), 2196 (SEQ ID NO.: 913) (poli-T, 18 baza), 2194 (SEQ ID NO.: 911) (poli-T, 27 baza), 5162 (SEQ ID NO.: 1094) (poli-T, 30 baza), 5163 (SEQ ID NO.: 1095) (poli-A, 30 baza), 5168 (SEQ ID NO.: 1096) (poli-C, 30 baza) i 5169 (SEQ ID NO.: 1097) (poli-CG, 30 baza). Ekspresija aktivacijskih markera CD86 (137-2) na CD 19-positivnim B-stanicama je mjerena protočnom citometrijom.

Slika 5 prikazuje da duljina sekvencije, barem za poli-T ODN ima važni utjecaj na aktivnost. Pokazalo se da poli-T sekvencija koja sadrži samo 18 baza (SEQ ID NO.: 913) ja manje stimulirajuća od one s 27 baza (SEQ ID NO.: 911) ili 30 baza (SEQ ID NO.: 1094) s jasno rangiranjem stimulacijom: SEQ ID NO.: 1094 > SEQ ID NO.: 911 > SEQ ID NO.:

913. Poly A (SEQ ID NO.: 1095) ili poli-CG (SEQ ID NO.: 1097) sekvencije, nasuprot tome ne induciraju aktivaciju humanih B-stanica. Iznenadujuće je otkriće da poli-C sekvencije (SEQ ID NO.: 1096) mogu aktivirati humane B-stanice barem pri visokim koncentracijama (10 µg/mL) (Slika 5).

- 5 Dva druga T-obogaćena ODN, poimence 1982 (SEQ ID NO.: 225) i 2041 (SEQ ID NO.: 282) kojima nedostaju CpG motivi su testirani prema njihovom efektu na humane B-stanice. PBMC (n=2) je inkubiran s naznačenom koncentracijom ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), 1982 (SEQ ID NO.: 225) i 2041 (SEQ ID NO.: 282) kao što je gore opisano. Aktivacija B-stanica (ekspresija aktivacijskih markera CD86) je mjerena protočnom citometrijom.
- 10 Slika 6 pokazuje da je T-obogaćen ne-CpG ODN imunostimulator pri koncentracijama većim od 1 µg/mL. Ugradnja CpG motiva u 1982 povećala je imunostimulirajuću aktivnost. Produljenje s poli-T sekvencijom ne povećava imunostimulirajuću aktivnost, tog već T-obogaćenog ODN, nego lagano smanjuje aktivacijski potencijal.

Primjer 7: Imunostimulacija ne-CpG ODN se očituje u povećanoj aktivaciji NK, citotoksičnosti NK i aktivaciji monocita

15 Testirani su odgovori NK stanica i monocita na ne-CpG ODN. PBMC (2x10⁶ stanica/mL) su inkubiran s 6 µg/mL sljedećih ODN (n=4): 2006 (SEQ ID NO.: 246), 2117 (SEQ ID NO.: 358), 2137 (SEQ ID NO.: 886), 2183 (SEQ ID NO.: 433), 2194 (SEQ ID NO.: 911) i 5126 (SEQ ID NO.: 1058). Nakon 24 sata kultiviranja pri 37 °C, stanice su sakupljene i bojane s mAb za CD3 (marker T-stanice), CD56 (marker NK stanice) i CD69 (marker rane aktivacije) kao što je gore opisano. Ekspresija CD69 na CD56-pozitivne NK stanice je mjerena protočnom citometrijom.

25 Slika 7 pokazuje da se za poli-T ODN mogu opaziti slični efekti kao što je opisano na Slici 5. Na stimulaciju NK stanica, kao i B-stanica se može utjecati duljinom ODN. S ODN 2183 (SEQ ID NO.: 433) (21 baza) inducirana aktivacija NK stanica ali do manje mjere nego dulji ODN 2194 (SEQ ID NO.: 911) (27 baza), a kako je mjerena pojačanom ekspresijom ranih aktivacijskih markera CD69. ODN 5126 (SEQ ID NO.: 1058) je također pokazano da aktivira humane NK stanice (Slika 7).

30 Vjeruje se da se antitumorska aktivnost CpG ODNs može procijeniti sposobnošću ODN da povećaju s NK posredovanu *in vitro* citotoksičnost. Za ODN koji sadrže na 5' i 3' krajevima lance poli-G je pokazano da rezultiraju najvišom indukcijom citotoksičnosti (Ballas, Z. K., *et al.* 1996 *J. Immunol.* 157:1840). Da se ispita utjecaj ne-CpG T-obogaćenog ODN na NK citotoksičnost, analiziran je efekt ODN 2194 (SEQ ID NO.: 911) i 5126 (SEQ ID NO.: 1058) na lizu posredovane s NK (Slika 8). S NK posredovana liza K-562 ciljanih stanica je mjerena nakon inkubacije PBMC preko noći s 6 µg/mL ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), SEQ ID NO.: 911 (SEQ ID NO.: 911) (poli-T, 27 baza) i 5126 (SEQ ID NO.: 1058) kao što je gore opisano. SEQ ID NO.: 1058 je pokazala malo povećanje lize u humanim NK stanicama u usporedbi s uzorkom bez ODN. SEQ ID NO.: 911 i SEQ ID NO.: 246 povećali su citotoksičnost humanih NK stanica čak do veće mjere.

40 Prethodni prikazi su pokazali da ne samo NK stanice nego i NKT-stanice posreduju u citotoksičnim odgovorima tumornih stanica (14). Mi smo stoga ispitali potencijalnu aktivaciju humanih NKT-stanica s T-obogaćenim ne-CpG ODN. PBMC jednog predstavnika donora (n=2) je inkubirana s 6 µg/mL ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), 2117 (SEQ ID NO.: 358), 2137 (SEQ ID NO.: 886), 2183 (SEQ ID NO.: 433), 2194 (SEQ ID NO.: 913) i 5126 (SEQ ID NO.: 1058) za 24h kao što je gore opisano. Aktivacija NKT-stanice je mjerena protočnom citometrijom nakon bojanja s mAb for CD3 (marker T-stanice), CD56 (marker NK stanice) i CD69 (marker rane aktivacije). Pokazana je ekspresija CD69 na CD3 i CD56 dvostruko pozitivnim stanicama (NKT-stanice).

50 Na Slici 9, SEQ ID NO.: 911 kao i SEQ ID NO.: 1058 je nađeno da stimuliraju NKT-stanice. Slično NK stanicama SEQ ID NO.: 911 (poli-T) je aktivniji od SEQ ID NO. 1058. Uz to, kako je gore opisano za B-stanice i NK stanice, duljina ODN ima utjecaja na imunostimulirajući potencijal, s tim da dulji ODN imaju jači efekt na NKT-stanice. Slični rezultati su opaženi za humane T-stanice.

55 Sljedeći tip stanica obuhvaćenig u imnuom sustavu za borbu protiv infekcija su monociti. Te se stanice oslobađaju nakon aktivacije različitih citokina i mogu sadržavati u dendritične stanice (DC), profesionalne stanice koje ispoljavaju antigen (Roitt, I., J. Brostoff i D. Male. 1998. *Immunology*. Mosby, London). Slika 10 pokazuje aktivaciju humanih monocita nakon kultiviranja PBMC s različitim ODNs. PBMC (2x10⁶ stanica/mL) su inkubirane s 6 µg/mL 2006 (SEQ ID NO.: 246), 2117 (SEQ ID NO.: 358), 2137 (SEQ ID NO.: 886), 2178 (SEQ ID NO.: 1096), 2183 (SEQ ID NO.: 433), 2194 (SEQ ID NO.: 911), 5126 (SEQ ID NO.: 1058) i 5163 (SEQ ID NO.: 1095) preko noći pri 37 °C kao što je gore opisano (n=3). Stanice su sakupljene i bojane za CD14 (marker monocita) i CD80 (B7-1, marker aktivacije). Ekspresija je mjerena protočnom citometrijom.

60 Kao što je gore pokazano za NK i B-stanice, T-obogaćene sekvencije (npr. SEQ ID NO.: 433, SEQ ID NO.: 911)

različite duljine induciraju stimulaciju monocita ali imaju različite razine aktivnosti, npr. SEQ ID NO.: 433> SEQ ID NO.: 911. Poli-A (SEQ ID NO.: 1095) kao i poli-C (SEQ ID NO.: 1096 (2178) sekvencije, nasuprot tome ne vode aktivaciji monocita (mjereno povećanje CD80 pri koncentraciji od 6 µg/mL ODN).

5 **Primjer 8: Indukcija citokina otpuštenih od ne-CpG ODN**

Sljedeće je ispitana sposobnost različitih T-obogaćenih ODN da utječu na citokine. PBMC (3x10⁶ stanica/mL) su kultivirane 24 sa ili bez 6 µg/mL navedenog ODN 1 µg/mL LPS kao pozitivna kontrola (n=2). Nakon inkubacije supernatanti su sakupljeni i TNFα je mjereno s ELISA kao što je gore opisano i rezultati su prikazani na Slici 11. PBMC je kultiviran s naznačenim ODN (1.0 µg/mL) kao što je prikazano na Slici 11, a IL-6 je mjereno u supernatantima s ELISA i rezultati su prikazani na Slici 12.

Slike 11 i 12 pokazuju da T-obogaćeni ne-CpG i T-obogaćeni CpG mogu inducirati izlučivanje proupalnih citokina TNFα i IL-6. Za oba citokina, ODN 5126 (SEQ ID NO.: 1058) je u većini testova nađeno da su potentni kao ODN 2194 (SEQ ID NO.: 911). Poznato je da CpG ODN utječu na balans Th1/Th2 tako da induciraju Th1 citokine (Krieg, A. M. 1999 *Biochemica et Biophysica Acta* 93321:1). Da se testira da li T-obogaćen ODN uzrokuje sličan pomak prema Th1 citokinima, mjerena je produkcija IFNγ u PBMC. U prvoj skupini eksperimenata je pokazano, a kao što je opisano za IL-6 i TNFα, ODN SEQ ID NO.: 1058 i SEQ ID NO.: 911 inducira oslobađanje usporedive količine tog Th1 citokina IFNγ. Uz to, pokazano je da je drugi proupalni citokin, IL-1β, oslobođen nakon kultiviranja PBMC s tim dvama ODN. Mada je količina tih citokina inducirana s T-obogaćenim ODN kojem nedostaju CpG motivi bila manja nego kad je korišten CpG ODN SEQ ID NO.: 246 količina inducirano T-obogaćenog ODN je značajno viša od kontrole.

Primjeri 9-11

25 **Uvod:**

Ovdje je opisan optimalni CpG motiv za aktivaciju imunih sustava kod kralježnjaka koji nisu glodavci. Nađeno je da fosfodiesteri oligonukleotid koji sadrži taj motiv jako stimulira ekspresiju CD86, CD40, CD54 i MHC II, sintezu IL-6 i proliferaciju primarnih humanih B-stanica. Ti efekti zahtijevaju uvođenje oligonukleotida i edosomsko sazrijevanje. Taj CpG motiv je povezan sa suzdržanim oslobađanjem NF-κB p50/p65 heterodimera i od kompleksa transkripcijskog faktora koji aktivira protien-1 (AP-1). Aktivacija transkripcijskog faktora s CpG DNA je prethodila povećanoj fosforilaciji stresnih kinaza c-jun NH₂ terminalne kinaze (JNK) i p38, te od aktiviranja transkripcijskog faktora-2 (ATF-2). Nasuprot CpG, signalizacija preko receptora B-stanice vodi aktivaciji vanstaničnog receptora kinaze (ERK) i fosforilaciji različitih izoforma JNK.

35 **Materijali i metode:**

Oligodeoksidinukleotidi: Nemodificirani (fosfodiester, PE) i modificirani na nukleazu rezistentni (fosforotioat, PS) ODN su kupljeni od Operon Technologies (Alameda, CA) i Hybridon Specialty Products (Milford, MA). Sekvencije koje su korištene su prokazane u Tablici H. *E. coli* DNA i DNA iz telećeg timusaja kupljena od Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Uzorci genomske DNA su pročišćeni ekstrakcijom s fenil-klorogom-izoamilnim alkoholom (25/24/1) i taloženi etanolom. DNA je pročišćena iz endotoksima ponovljenom ekstrakcijom s triton x-114 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i testirani su za endotoksin korištenjem LAL-testa (LAL-assay BioWhittaker, Walkersville, NM; donja granica detekcije 0.1 EU/mL) i testom visoke osjetljivosti na endotoksin opisan ranije (donja granica detekcije 0.0014 EU/mL) (Hartmann G. i Krieg A. M. 1999. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Therapy* 6:893). Sadržaj endotoksina uzorkak DNA je bio ispod 0.0014 U/mL. DNA *E. coli* i DNA telećeg timusa su imaju jedan lanac prije upotrebe, a zagrijavaju uz vrenje 10 minuta, nakon čega slijedi hlađenje na ledu 5 minuta. DNA uzorci su razrijeđeni u TE puferu upotrebom reagensa bez pirogena.

Tablica H: Prikaz korištenih oligonukleotida¹

	Naziv (SEQ ID NO)	Sekvencija 5' prema 3'
Početna skvencija	PE 2079 (320)	T <u>CG</u> <u>ACG</u> TTC CCC CCC CCC CC
Srednja baza	PE 2100 (341)	TCG <u>GCG</u> TTC CCC CCC CCC CC
	PE 2082 (323)	TCG CCG TTC CCC CCC CCC CC
Humani CpG motiv	PE 2080 (321)	TCG TCG TTC CCC CCC CCC CC
baza koja okružuje 5'	PE 2105 (346)	GCG TCG TTC CCC CCC CCC CC
	PE 2107 (348)	ACG TCG TTC CCC CCC CCC CC
	PE 2104 (345)	CCG TCG TTC CCC CCC CCC CC
baza koja okružuje 3'	PE 2098 (339)	TCG TCG CTC CCC CCC CCC CC
	PE 2099 (340)	TCG TCG GTC CCC CCC CCC CC
	PE 2083 (324)	TCG TCG ATC CCC CCC CCC CC
Prvi CpG deletiran	PE 2108 (349)	CTG <u>T<u>CG</u></u> FTC CCC CCC CCC CC

Drugi CpG deletiran	PE 2106 (347)	TCG TCA TTC CCC CCC CCC CC
Metiliranje	PE 2095 (336)	TZG TZG TTC CCC CCC CCC CC
	PE 2094 (335)	TCG TCG TTC CCC CCC ZCC CC
Ne-CpG kontrola 2080	PE 2078 (319)	TGC TGC TTC CCC CCC CCC CC
	PE 2101 (342)	GGC CTT TTC CCC CCC CCC CC
PS od 2080	PS2116 (357)	TCG TCG TTC CCC CCC CCC CC
Dodatni CpG motivi	PE 2059 (300)	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT
Najbolji PS	PS 2006 (246)	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT
Metilirani 2006	PS2117 (358)	TZG TZG TTT TGT ZGT TTT GTZ GTT

[†] PE, fosfodiester; PS, fosforotioat; masna slova, izmjena baze; masno Z, metilirani citidin; povučeno, CpG dinukleotidi.

Priprava stanica i stanične kulture: Humane mononuklearne stanice perifrne krvi (PBMC) su izolirane iz periferne krvi zdravih volontera pomoću Ficoll-Paque centrifuge gradijenta gustoće (Histopaque-1077, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kao što je opisano (Hartmann G., *et al* 1996 *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:29 1)). Stanice su suspendirane u RPMI 1640 mediju za kulturu uz dodatak 10 % (v/v) topline inaktiviranog (56 °C, 1 h) FCS (HyClone, Logan, UT), 1.5 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomcina (sve od Gibco BRL, Grand Island, NY) (kompletni medij). Svi kupljeni spojevi su testirani na endotoksin. Pogodnost je određena prije inkubacije i nakon inkubacije s ODN izlučivanjem "trypan blue" (uobičajena mikroskopija) ili uzlučivanjem propidij jodida (analiza protočnom citometrijom). U svim eksperimentima je bilo 96 % do 99 % pogodnih PBMC. Stanice (konačna koncentracija 1×10^6 stanica/mL) su kultivirane u potpunom mediju u 5 % CO₂ vlažnom inkubatoru pri 37 °C. Različiti oligonukleotidi (vidi tablicu I, koncentracije su navedene u legendama slike), LPS (od salmonella typhimurium, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ili anti-IgM su korišteni kao stimulatori. Chloroquine (5 µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) je korištena za blokiranje endosomalnog sazrijevanja/ zakiseljavanja. Kod naznačenih točaka su stanice skaupljene za protočnu citometriju kao što je dolje opisano.

Za istraživanja signalne transdukcije humane priparne B-stanice su izolirane imunomagnetskim sortiranjem stanice upotrebom tehnike VARIOMACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) kao što je opisano od proizvođača. Ukratko, PBMC dobivene od zdravih davatelja (Elmer L. DeGowin Blood Center, University of Iowa) su inkubirani s antitijelima vezanim na mikrozrna CD19 i prošli su preko pozitivne kolone. Čistoća B-stanica je bila veća od 95%. Nakon stimulacije su za istraživanje transdukcije pripravljeni cijeli ekstrakti stanica (Western blot) i ekstrakti jezgre (EMSA).

Za istraživanje proteina koji se vezuju na CpG, Ramos stanice (humane Burkitt B stanična linija limfoma, ATCC CRL-1923 ili CRL-1596; *Intervirology* 5: 319-334, 1975) su rastle u potpunom mediju. Netretirane stanice su sakupljene i ekstrakti citosolnog proteina su pripravljeni i analizirani na prisustvo vezanih proteina na CpG oligonukleotide s EMSA i UV-ukrštenjem, kao što je niže opisano.

Protočna citometrija: Bojanje površine antigena je izvedeno kao što je prethodno opisano (Hartmann G. *et al.* 1998 *J Pharmacol Exp Ther* 285:920). Monoklonalna antitijela na HLA-DR su kupljena od Immunotech, Marseille, Francuska. Sva ostala antitijela su kupljena od Phanningen, San Diego, CA: mABs do CD 19 (B43), CD40 (50), CD54 (HA58), CD86 (2331 (FUN-1)). IgG₁ (MOPC-21) i IgG_{2b} su korišteni kao kontrola za specifično bojanje. Bojanje intracelularnog citokina za IL-6 je izvedeno kao što je opisano (Hartmann G. i Krieg A. M. 1999. CpG DNA i LPS induciraju različitu aktivaciju humanih monocita, *Gene Therapy* 6:893). Ukratko, PBMC (konačna koncentracija 1×10^6 stanica/mL) su inkubirane u prisutnosti brefeldin A (konačna koncentracija 1 µg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Nakon inkubacije su stanice sakupljene i bojane upotrebom FITC-obilježenog mAB do CD19 (1343), PE-obilježenim štakorskim anti-humanim IL-6 mAb (MQ2-6A3, Pharmingen) i Fix i Perm Kit (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Podaci protočne citometrije od 5000 stanica po uzorku su dobiveni na FACScan (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Nepogodne stanice su isključene iz analize s bojanjem propidijevim jodidom (2 µg/mL). Podaci su analizirani upotrebom kompjutorskog programa FlowJo (verzija 2.5. 1, Tree Star, Inc., Stanford, CA).

Test proliferacije: CFSE (5-(i-6-) karboksifluorescein diacetat sukcinimidilni ester, Molecular Probes, USA) je iz fluoresceina izvedena intracelularni fluorescentna oznaka koja se jednako razdjeli između stanica kćeri nakon diobe. Bojanje stanica s CFSE dozvoljava kvantifikaciju i imunofenotipizaciju (phycoerythrinom obilježena antitijela) proliferacije stanica u suspenziji miješanih stanica. Ukratko, PBMC je pran dva puta u PBS, ponovo suspendiran u PBS koji sadrži CFSE pri konačnoj koncentraciji od 5 µM, te je inkubiran pri 37 °C kroz 10 minuta. Stanice su prane tri puta s PBS i inkubirane pet dana, kao što je pokazano u legendi slike. Proliferacija CD19-pozitivnih B-stanica je identificirana smanjivanjem sadržaja CFSE, a upotrebom protočne citometrije.

Priprava cijelih stanica, ekstrakata protiena jezgre i citoplazme: Za Western blot analizu su pripravljeni ekstrakti

cijele stanice. Prvo je na B-stanice djelovano medijem, fosfodieterskim oligonukleotidom 2080 (SEQ ID NO.: 32 1) ili 2078 (SEQ ID NO.: 319) pri 30 µg/mL, ili anti-IgM (10 µg/mL). Stanice su sakupljene, prane dva puta s ledenom PBS koja sadrži 1 mM Na₃VO₄, ponovo su suspendirane u puferu za lizu (150 mM NaCl, 10 mM TRIS pH 7.4, 1 % NP40, 1 mM NN₃VO₄, 50 mM NaF, 30 mg/mL leupeptin, 50 mg/mL a proteinin, 5 mg/mL antipain, 5 mg/mL pepstatin, 50 µg/mL fenilmetilsulfonifluorid (PMSF)), inkubirane kroz 15 minuta na ledu i rotirane pri 14000 rpm kroz 10 min. Supernatant je zaleđen kod -80 °C. Za pripremu ekstrakata su primarne B-stanice ponovo suspendirane u hipotoničnom puferu (10 mM HEPES/KOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.05 % NP40, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM ditiotritol (DTT), 0.5 mM PMSF, 30 mg/mL leupeptin, 50 mg/mL a proteinin, 5 mg/mL antipain, 5 mg/mL pepstatin). Nakon 15 minuta inkubacije na ledu, suspenzija je centrifugirana pri 1000 x g kroz 5 minuta. Jezgre su ponovo suspendirane u ekstrakcijskom puferu (20 mM HEPES (pH 7.9), 450 mM NaCl, 50 mM NaF, 20% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 30 mg/mL leupeptin, 50 mg/mL a proteinin, 5 mg/mL antipain, 5 mg/mL pepstatin) i inkubirane su na ledu jedan sat. Suspenzija jezgre je centrifugirana kroz 10 minuta pri 16000 g pri 4 °C. Supernatanti su sakupljeni i čuvani pri -80 °C. Ekstakti citoplazme za istraživanja CpG vezujućih proteina su pripremljeni iz nestimuliranih Rainos stanica, koje su podvrgnute lizi s hipotoničnim puferom opisanom za pripremu ekstrakta jezgre. Nakon centrifugiranja supernatant je uklonjen kao citoplazmatska frakcija i čuvano je pri -80 °C. Koncentracija proteina je mjerena korištenjem proteinskog testa po Bradfordu (Bio-Rad, Hercules, CA), a prema proizvođaču.

Western blot analiza: Jednake koncentracije proteinskog ekstrakta cijelih stanica (25 µg/liniji) su zagrijavane uz vrenje sa SDS uzorkom pufera (50 mM Tris-Cl, pH 6.8; 1% β-merkaptotanol; 2% SDS; 0.1% bromfenil-plavo; 10% glicerol) kroz 4 min prije podvrgavanja elektroforezi na 10 % poliakrilamidnom gelu koji sadrži 0.1 % SDS (SDSPAGE). Nakon elektroforeze su proteini prenešeni na Immobilon-P prijenosnu membranu (Millipore Corp. Bedford, MA). Blotovi su blokirani s 5 % nemasnim suhim mlijekom. Korištena su specifična antitijela protiv fosforiliranog oblika ekstracelularnog receptora kinaze (ERK), c-jun NH₂-terminalne kinaze (JNK), p38, te aktivirajućeg transkripcijskog faktora-2 (ATF-2) (New England BioLabs, Beverly, MA). Blotovi su razvijeni i pojačani kemiluminiscencijskom reagensom (ECL; Amersham International, Aylesbury, U.K.) a prema postupku preporučenom od proizvođača.

Test pomaka pokretljivosti pri elektroforezi (EMSA): Da bi se detektirala aktivnost vezivanja DNA aktivatora transkripcijskog faktora proteina-1 (AP-1) i NF-κB, ekstrakti jezgre (1 µg/liniji) su analizirani s EMSA korištenjem dsODNs 5' GAT CTA GTG ATG AGT CAG CCG GAT C 3' (SEQ ID NO.: 83 8) koji sadrži AP-1vezujući sekvenciju, te NF-κB URE od from the c-myc promotorske regije 5' TGC AGG AAG TCC GGG TTT TCC CCA ACC CCC C 3' (SEQ ID NO.: 1142) kao probe. ODNs su obilježeni s T4-polinukleotidnom kinazom (New England Biolabs) i (γ-³²P) ATP (Amersham, Arlington Heights, IL). Reakcije vezivanja su izvedene s 1 µg ekstrakta proteina iz jezgre u DNA-vezujućem puferu (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, 1 mM ditiotritol, 8% glicerol i 100-400 ng poli (dI-dC) s 20.000-40.000 cpm obilježenim ODN u 10 µL ukupnog volumena. Specifičnost NFκB vrpce je potvrđena kompeticijskim istraživanjima s hladnim oligonukleotidima iz mjesta vezivanja nesrodnog transkripcijskog faktora (10-100 ng). Za test superpoaka, 2 µg specifičnih antitijela za c-Rel, p50 i p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) su dodani u reakcijsku smjesu kroz 30 minuta prije dodatka radiobilježavanja. Nakon inkubiranja kroz 30 minuta pri sobnoj temperaturi dodan je pufer za nanošenje i izvedena je elektroforeza na 6% poliakrilamidnom gelu u Tris-borat-EDTA puferu (90 mM Tris, 90 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8.0). Gelovi su sušeni te su autoradiografirani.

UV-unakrsno povezivanje i denaturirajuća elektroforeza proteina: Ekstrakti jezgre su inkubirani s obilježenim fosfodieterskim oligonukleotidom kao što je opisano za EMSA. Kompleksi DNA-proteina su unakrsno povezani UV-svjetlom u Stratalinker (Stratagene) kroz 10 minuta. Probe su miješane s puferom SDS-uzorka, zagrijavane 10 minuta uz vrenje i nanešene na 7.5% SDS-PAGE. Gel je sušen na Whatman papiru i aurografiran. Krivulja ovisnosti razmaka prema molekularnoj masi proteinskog markera je dala standardnu krivulju koja je korištena za izračunavanje odgovarajuće molekulske mase unakrsno povezanog kompleksa proteina-ODN. The Molekulska masa oligonukleotida je odbijena od te vrijednosti da se dobije veličina.

Primjer 9: Identifikacija optimalnog CpG motiva za upotrebu samog ili u kombinaciji s T-obogaćenim ODN

Fosforioatni oligonukleotidi koji imaju CpG motiv glodavca GACGTT (SEQ ID NO.: 1143) (primjerice 1826 (SEQ ID NO.: 69)) te su korišteni pri koncentracijama su aktivni u B-stanicama glodavaca (Yi A. K., Chang M., Peckham D. W., Krieg A. M. i Ashman R. F. 1998. CpG oligodeoxyribo-nucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 160:5898), su pokazali malu ili nikakvu imunostimulirajuću aktivnost na humanim imunim stanicama. Pri višim koncentracijama je nađeno da taj ODN ima neki imunostimulirajući efekt na B-stanice.

U ranim istraživanjima aktivacije B-stanica kod miševa je nađeno da je CpG dinukleotid koji je okružen s dva 5' purina i dva 3' pirimidina i preferirano je 6-merni motiv 5' GACGTT 3' (SEQ ID NO: 1143) optimalni da fosfodieterski oligonukleotid bude aktivan (Krieg A. M., *et al.* 1995 *Nature* 374:546, Yi A. K., Chang M., *et al.* 1998 *J Immunol* 160:5898).

Da bi se identificirao optimalni motiv za stimulaciju imunog odgovora u humanim kralježnjacima koji nisu glodavci, testirana je aktivnost serija ODN. Prvo smo pripremili 20-merni fosfodiesteri oligonukleotid s TC dinukleotidom na 5' kraju prije optimalnog CpG motiva glodavca 5' GACGTT 3' (SEQ ID NO.: 1143) a nakon toga slijdi poli-T rep (2079: 5' TCG ACG TTC CCC CCC CCC CC 3' (SEQ ID NO.: 320)). Taj oligonukleotid je dodan u humane primarne B-stanice pod istim uvjetima, te je nađeno je da je optimalno za DNA *E. coli* (ponovljena dodavanje pri 0 sati, 4 sata i 18 sati; 30 µg/mL za svaku točku) stimulirao visoku razinu ekspresije CD86 humanih primarnih B-stanica nakon dva dana. Da se odredi odnos strukture i funkcije CpG motiva mi smo zamjenili susjedne baze u CpG dinukleotidima, a održavali smo dva CpG dinukleotida unutar sekvencije. Izmjena adenina smještenog između obaju CpG dinukleotida timidinom (2080 (SEQ ID NO.: 321)) je imala kao rezultat blago veću aktivnost. Zamjena gvanozina (2100 (SEQ ID NO.: 341)) ili citidina (2082 (SEQ ID NO.: 323)) na tom položaju nije pokazala glavne promjene u usporebi s 2079 (SEQ ID NO.: 320). Nasuprot tome, zamjena timidina 3' za drugi CpG dinukleotid s purinskim gvanozinom (2099 (SEQ ID NO.: 340)) ili adeninom (2083 (SEQ ID NO.: 324)) kao rezultat ima značajan pad aktivnosti oligonukleotida, dok je pirimidinski citidin uzrokovao samo malo smanjenje. Timidin odmah na 5' prema prvom CpG dinukleotidu je također bio važan. Zamjena timidina bilo kojom drugom bazom (2105 (SEQ ID NO.: 346), gvanozinom; 2107 (SEQ ID NO.: 348), adeninom; 2104 (SEQ ID NO.: 345), citidinom) vodi smanjivanju aktivnosti markera oligonukleotida. Eliminacijom prvog (2108 (SEQ ID NO.: 349)) ili drugog (2106 (SEQ ID NO.: 347)) CpG dinukleotida također se djelomično smanjuje aktivnost.

Dodatak više 5' GTCGTT 3' (SEQ ID NO.: 1144) CpG motiva fodiesterskom oligonukleotidu koji sadrži 8-merni dupleks CpG motiva (5' TCGTCGTT 3' (SEQ ID NO.: 1145), 2080 (SEQ ID NO.: 321)) ne povećava dalje CD86 ekspresiju na B-stanicama (2059 (SEQ ID NO.: 300)). Oligonukleotid s istom sekvencijom kao 2080 (SEQ ID NO.: 321) ali s fosforotioatnim skeletom ne pokazuje aktivnost iznad osnovne (2116 (SEQ ID NO.: 357)). To je bilo iznenađujuće jer je pokazano da fosforotioatni skelet dobro stabilizira oligonukleotide i povećava s CpG induciranu stimulaciju (Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A. i Klinman D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546). Mi smo stoga izveli daljnju analizu strukture i funkcije fosforotioatnih oligonukleotida koji sadrže 5' GTCGTT 3' (SEQ ID NO.: 1144) i 5' TCGTCGTT 3' (SEQ ID NO.: 1145) motive, što pokazuje da dodatni CpG motivi (2006 (SEQ ID NO.: 246)) imaju tendenciju povećanja aktivnosti fosforotioatnih oligonukleotida.

Pročišćene B-stanice izolirane iz periferne krvi imunomagnetskim sortiranjem su aktivirane s CpG DNA do iste meje kao nepročišćene B-stanice s PBMC. Stoga je aktivacija B-stanica primarni odgovor a ne sekundarni efekt uzrokovan izlučivajem citokina od drugih stanica.

Uz kostimulaciju molekule CD86, funkcijski stupanj B-stanica je karakteriziran drugim površinskim markerima. Primjerice, aktivirane T pomoćne stanice stimuliraju B-stanice ligacijom CD40, intracelularna adhezijska molekula-1 (ICAM-1, CD54) posreduje vezivajem na ostale imune stanice i glavni histokompatibilni kompleks II (MHC II) je odgovoran za prezentaciju antigena. Našli smo da je ekspresija B-stanice CD40, CD54 i MHC II povećana CpG oligonukleotidom 2080 (SEQ ID NO.: 321). Ne-CpG kontrolni oligonukleotid 2078 (SEQ ID NO.: 319) nije pokazao aktivnost u usporebi sa samim medijem.

Kada su PBMC inkubirane 5 dana u prisutnosti 2080 (SEQ ID NO.: 321) (dodano 0 sata, 4 sata, 18 sata i svako sljedeće jutro), bilo je intrigantno da je u podpopulaciji limfocita povećana veličina stanica (FSC) i porasle su granulacije (SSC). Da bi se ispitala podpopulacija predstavljena proliferacijom B-stanica, mi smo bojali svježe izolirani PBMC s CFSE (5-(i-6-) karboksifluorescein diacetat sukcinimidilni ester) dana 0 i inkubirali ih kroz 5 dana s 2080 (SEQ ID NO.: 321) 145, a kao gore. CFSE je fluorescentna molekula koja se ireverzibilno vezuje na proteine stanice. Dioba svake stanice smanjuje CFSE za 50 %. Za stanice koje se slabo boje s CFSE (proliferirane stanice) je nađeno da su uglavnom CD19-pozitivne B-stanice. Oligonukleotid 2080 (SEQ ID NO.: 321) inducira proliferaciju 60 do 70 % D19 pozitivnih B-stanica, a unutar 5 dana. Kontrolni oligonukleotid 2078 (SEQ ID NO.: 319) inducira proliferaciju manje od 5 % B-stanica. Proliferirajuće B-stanice (CFSE niski) su veće (FSC) i više granularne.

Proliferirane B-stanice eksprimiraju veće razine CD86 nego neproliferirajuće stanice (nije pokazano). U skladu s tim pronalaskom da su gore testirani oligonukleotidi za indukciju ekspresije CD86 imali kao rezultat gotovo isti oblik proliferacije B-stanica. Zamjena 3' timidina smanjuje aktivnost više nego što zamjena timidina u srednjem položaju.

Primjer 10: Aktivacija B-stanica zahtjeva ensosomalno sazrijevanje/zakiseljavanje

Prije je pokazano da klorokin, inhibitor endosomalnog zakiseljavanja blokira s CpG posredovanu stimulaciju stanica koje prezentiraju antigen glodavca i B-stanice, dok ne djeluju na efekte posredovane s LPS (Hacker H., et al 1998 *Embo J* 17:6230, Yi A. K et al 1998 *J Immunol* 160:4755, Macfarlane D. E. i Manzel L. 1998 *J Immunol* 160:1122). Mi smo našli da dodatak 5 µg/mL klorkina kompletno blokira indukciju ekspresije CD86 posredovane s CpG DNA, a na

primarnim B-stanicama (MFI CD86: 2006 (SEQ ID NO.: 246), 4.7 vs 1.4; *E. coli* DNA, 3.4 vs. 1.4; sam medij, 0.9; n=4). Nadalje, klorkin je kompletno inhibirao indukciju proliferacije B-stanica s fosforotioatnim oligonukleotidom 2006 (SEQ ID NO.: 246) mjereno testom proliferacije CFSE kao standardom. Ti rezultati pokazuju da je sa stanicama glodavaca aktivacija humanih B stanica s CpG DNA zahtjeva prihvatanje DNA u endosome, te endosomalno zakiseljavanje.

Primjer 11: Analiza substaničnih događaja do kojih dolazi nakon stimulacije B-stanica s optimalnim humanim ODN

Kako je zahtjev za CpG motivom za maksimalnu aktivaciju B-stanica većinom različita između miša (GACGTT) (SEQ ID NO: 1143) i ljudi (TCGTCGTT) (SEQ ID NO: 1145), bilo smo zainteresirani izražiti jesu li osnovni događaji intracelularne signalizacije usporedivi. Brza indukcija aktivnosti vezivanja NFKB je ranije nađena kod B-stanica glodavaca i makrofaga (Stacey K. J., *et al* 1996 *J Immunol* 157:2116, Yi A. K *et al* 1998 *J Immunol* 160:4755). Da se istraži odgovor NF κ B na CpG DNA kod ljudi, humane priprane B-stanice su izolirane iz periferne krvi imunomagnetskim sortiranjem stanica i inkubirane su s CpG oligonukleotidom 2080 (SEQ ID NO.: 321), ne-CpG kontrolnim oligonukleotidom 2078 (SEQ ID NO.: 319), ili medijem. Kod naznačenog vremena su stanice sakupljene i pripremljen je ekstrakt jezgre. U prisutnosti CpG oligonukleotida povećana je aktivnost vezivanja NF κ B, a unutar jednog sata i održavana je do 18 sati (vrijeme zadnje ispitivane točke). Ne-CpG kontrolni oligonukleotid 2078 (SEQ ID NO.: 319) nije pokazivao povećanu aktivnost NF κ B u usporedbi sa stanicama inkubiranim samo u mediju. Vrpea NF κ B koja je identificirana hladnom kompeticijom, kao što je pokazano testom superpomaka, sastoji se od p50 i p65 podjedinica.

Transkripcijski faktor aktivirajućeg proteina (AP-1) je obuhvaćen u regulaciji ranih gena i ekspresiji citokina (Karin M. 1995. The regulation of API activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483). U B-stanicama glodavaca AP-1 vezujuća aktivnost je inducirana u odgovoru na CpG DNA (Yi A. K., i Krieg A. M. 1998. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 161:4493). Da se odredi bi li taj transkripcijski faktor također bio induciran od CpG DNA u ljudima, mi smo ispitivali AP-1 DNA vezujuću aktivnost u humanim primarnim B-stanicama. Stanice su inkubirane s CpG oligonukleotidom 2080 (SEQ ID NO.: 321) ili kontrolnim oligonukleotidom 2078 (SEQ ID NO.: 319). Ekstrakti jezgre su pripremljeni i AP-1 vezujuća aktivnost je analizirana s EMSA. AP-1 vezujuća aktivnost je povećana unutar jednog sata i povećavala se 18 sati (vrijeme zadnje ispitivane točke), pokazujući zadržani odgovor.

Kako je AP-1 aktivnost inducirana mnogim stimulanima (Angel P. i Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129), mi smo bili zainteresirani za put signalne transdukcije uzvodno od AP-1. Kompleks transkripcijskog faktora AP-1 povezuje različite mitogene puteve aktivirane protein kinaze (MAPK) (Karin M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483). Western blotovi su porevedni korištenjem ekstrakta cijelih stanica iz primarnih B-stanica inkubiranih s CpG oligonukleotidom 2080 (SEQ ID NO.: 321), kontrolom 2078 (SEQ ID NO.: 319), ili samim medijem. Korištena su specifična antitijela na fosforilirani oblik JNK, p38, ATF-2 i ERK. Jaka indukcija fosforilacije JNK je nađena 30 min i 60 min nakon izlaganja CpG-DNA, dok ne-CpG oligonukleotid nije pokazivao aktivnost iznad osnovne. Protein kinaza p38, druga stresom aktivirana protein kinaza (SAPK), je također fosforilirana u odgovoru na CpG DNA unutar 60 min. ATF-2, supstrat za p38 i JNK (Gupta S., Campbell D., Derijard B. i Davis R. J. 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267:389) i komponenta AP-1 kompleksa, pokazuje slabu fosforilaciju nakon 30 minuta koja se povećava nakon 60 minuta. CpG DNA ne inducira znatniju fosforilaciju ERK. Nasuprot tome, anti-IgM, stimulirajući receptor B-stanica, pokreće fosforilaciju ERK. Anti-IgM aktivira različite izoforme JNK nego CpG DNA.

Primjer 12: Test za in vivo aktivnost adjuvansa

Razvijen je test *in vitro* probiranja da se identificira ODN koristan kao adjuvans *in vivo* kod ljudi i ostalih životinja koje nisu glodavci. Kako nismo vidjeli samo kvalitativnu već kvantitativnu razliku aktivnosti različitih CpG ODN kod miševa, prvo smo probrali skupinu CG i ne-CpG ODN na stanicama miša i našli *in vitro* testove s pouzdanom i jakom kolelacijom *in vivo* aktivnost adjuvansa s B površinskim antigenom hepatitisa (HBsAg). Zatim smo sistematski testirali skupinu više od 250 ODN u odgovarajućim humanim testovima da se identificiraju *in vitro* sekvencije imunostimulirajuće aktivnosti. Sljedeće smo ispitivali da li ODN s najvećom aktivnosti u tim humanim testovima također aktiviraju proliferaciju B-stanica čimnazna i majmuna i konačno da li aktiviraju kao adjuvansi s HBsAg u čimpanzama i cimolognim majmunima *in vivo*. Ta istraživanja su pokazala da sekvencija, broj i mjesto pojedinog CpG motiva doprinosi imunostimulirajućoj aktivnosti CpG fosforotioatnog ODN. ODN s TC dinukleotidom na 5 kraju za tri 6-metnim CpG motivima (5' GTCGTT 3') razdvojen s TT dinukleotidom konzistentno pokazuje najvišu aktivnost kod leukocita ljudi, čimpanzi i rhesus majmunima. Čimpanze i majmuni vakcinirani jedanput protiv hepatitisa B s CpG ODN adjuvansom su razvili 15 puta veću titar anti-HB antitijela nego oni koji su primili samu vakcinu.

Materijali i metode

Oligonukleotidi: Fosforotioatno modificirani ODN je kupljen od Operon Technologies (Alameda, CA) i Hybridon Specialty Products (Milford, MA). ODN je tesiran na endotoksin korištenjem LAL-testa (LAL-assay BioWittaker, Walkersville, MD; donja granica detekcije 0.1 EU/mL). Za *in vitro* test, ODN je razrijeđen u TE puferu (10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA), i čuvan je pri -20 °C. Za *in vivo* upotrebu, ODN je razrijeđen u fosfatnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (0.1 M PBS, pH 7.3) i čuvano je pri 4 °C. Sva razrjeđenja su izvedena korištenjem otapala bez pirogena.

Stanične kulture mišje slezene: Slezene su uklonjene iz 6-12 tjedana starih ženki BALB/c (The Jackson Laboratory), 2×10^6 splenocita je kultivirano s 0.2 μ M ODN kroz 4 hours (TNF- α) ili 24 hours (IL-6, IFN- γ , IL-12), te su citokini detektirani s ELISA kao što je prethodno opisano (Yi A. K., Klimn D. M., Martin T. L., Matson S. i Krieg A. M. 1996. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 157:5394). Da se procjeni proliferacija B-stanica inducirana s CpG, stanice slezene su odvojene od T stanica s anti-Thy-1.2 i komplementom, te su centrifugirane preko lympholyte M (Cedarlane Laboratories, Homby, ON, Canada), kultivirane 44 sata s naznačenim ODN, te su pulsirane 4 sata s 1 μ Ci 3 H timidina kao što je ranije opisano (Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A. i Klinman D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546). Da se istraži litička aktivnost NK stanica, stanicama slezene glodavaca su uklonjene B-stanice korištenjem magnetsko presvlačenje s kozjim anti-mišjim Ig, kao što je prethodno detaljno pokazano (Ballas Z. K. i Rasmussen W. 1993. Lymphokine-activated killer cells. VII. IL-4 induces an NK1.1 $^{+}$ CD8 α β TCR- α β B220 $^{+}$ lymphokine-activated killer subset. *J Immunol* 150:17). Stanice su kultivirane na 5×10^6 /jažici na ploči s 24 jažice i sakupljene sa sata 18 za upotrebu kao efektorske stanice u standardnom 4 stanom testu oslobađanja 51 Cr na YAC-1 ciljane stanice. Jedinica (LU) je definirana kao broj stanica potrebnih da djeluje na 30% specifičnih liza.

Imunizacija miševa protiv HBsAg i procjena humoralnog odgovora: Grupe od 6-8 tjedana starih ženki miševa BALB/c mice (n = 5 ili 10, Charles River, Montreal, QC) su imunizirane protiv HBsAg kao što je prethodno opisano (Davis H. L., et al 1998 *J Immunol* 160:870). Ukratko, svaki miš je primio jednu IM injekciju 50 μ L PBS koji sadrži 1 μ g recombinant HBsAg (Medix Biotech, Foster City, CA) i 10 μ g CpG ODN ili ne-CpG ODN kao jedini adjuvans ili kombiniran s alumom (Alhydrogel "85", Superfos Biosector, Vedbaek, Demnark; 25 mg Al $^{3+}$ /mg HBsAg). Kontrolni miševi su imunizirani s HBsAg bez adjuvansa ili s alumom. Plazma je uzeta od miševa u različitim vremenima nakon imunizacije i Abs specifičan na HBsAg (anti-HBs) je kvantificiran ELISA testom završnog razrjeđenja (u triplicatu) kao što je prethodno opisano (Davis H. L. et al 1998 *J Immunol* 160:870). Završni titri su određeni kao najviše razrjeđenje plazme čiji je rezultat dva puta veća vrijednost apsorbancije (OD450) nego ona od neimune plazme, a s odrezanom vrijednosti od 0.05.

Izolacija PBMC primata i stanične kulture: Mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) su izolirane iz periferne krvi zdravih volontera, čimpanzi ili rhesus majmuna Ficoll-Paque centrifugiranjem gradijenta gustoće (Histopaque-1077, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kao što je opisano (Hartmann G., et al 1996 *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:291). Stanice su suspendirane u RPMI 1640 mediju za kulturu uz dodatak 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog (56 °C, 1 h) FCS (HyClone, Logan, UT), 1.5 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina i 100 μ g/mL streptomicina (svo od Gibco BRL, Grand Island, NY) (kompletni medij). Stanice (konačna koncentracija 1×10^6 stanica/mL) su kultivirane u potpunom mediju u 5 % CO $_2$ vlažnom inkubatoru pri 37 °C. ODN i LPS (od *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ili anti-IgM su korišteni kao stimulatori. Za mjerenje litičke aktivnosti NK, PBMC su inkubirani pri 5×10^6 /jažici na ploči s 24 jažice. Kulture su sakupljene nakon 24 sata i stanice su korištene kao efektori u standardnom 4 stanom testu oslobađanja 51 Cr na K562 ciljane stanice, kao što je ranije opisano. (Ballas Z. K., Rasmussen W. L. i Krieg A. M. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157:1840; Ballas Z. K. i Rasmussen W. 1993. Lymphokine-activated killer cells. VII. IL-4 induces an NK1.1 $^{+}$ CD8 α β TCR- α β B220 $^{+}$ lymphokine-activated killer subset. *J Immunol* 150:17). Za proliferaciju B-stanice 1 μ Ci 3 H timidina je dodano 18 sati prije sakupljenja i ugradnja 3 H timidina je određena scintilacijskim brojanjem dana 5. Standardna devijacija kažic u triplicatu je <5%.

Protočna citometrija PBMC primata: Površinski antigeni na PBMC primata su bojeni kao što je prethodno opisano (Hartmann G et al 1998 *J Pharmacol Exp Ther* 285:920). Monoklonalna antitijela na CD3 (UCHT1), CD14 (M5E2), CD19 (B43), CD56 (B159), CD69 (FN50) i CD86 (2331 (FUN-1)) su kupljena od Pharmingen, San Diego, CA. IgG $_1$ (MOPC-21) i IgG $_{2b}$ (Hartmann G et al 1999 *PNAS* 96:9305) su korišteni za kontrolu nespecifičnog bojanja. NK stanice su identificirane CD56 ekspresijom na CD3, CD14 i CD19 negativnim stanicama, dok su B-stanice identificirane ekspresijom CD19. Podaci protočne citometrije od 10000 stanica po uzorku su dobiveni na FACScan (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Pogodnost stanica unutar FSC/SSC vrata korištena za analizu je ispirano bojanjem s propidium jodidom (2 μ g/mL) i nađeno je da je više od 98%. Podaci su analizirani korištenjem kompjutorskog programa FlowJo (verzija 2.5.1, Tree Star, Inc., Stanford, CA).

Imunizacija čimpanzi i cimolognih majmuna protiv HBsAg i procjena humoralnog odgovora: Četrnaest cimolognih majmuna je imunizirano s pedijatrijskom dozom Engerix-B (SmithKline Beecham Biologicals, Rixensart, BE) koji sadrži 10 µg HBsAg adsorbiran na alum (25 mg Al³⁺/Mg HBsAg). To je dano samo (n=5), ili kombinirano s CpG ODN 1968 (n=5, 500 µg) ili CpG ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) (n=4, 150 µg). Četiri čimpanze (10-20 kg) su imunizirane na isti način primanjem kontrolne vakcine (samo Engerix-B) te dvije primanjem eksperimentalne vakcine (Engerix-B plus 1 mg CpG ODN 2006). Sva vacine su dane IM u desni but u ukupnom volumenu od 1 mL. Miševi su čuvani u Primate Research Center (Bogor, Indonesia) i čimpanze su čuvane u Bioqual (Rockville, NM). Specijalisti za životinje su ih pratili svaki dan. Nisu zapaženi simptomi opće bolesti niti lokalne nepovoljne reakcije na mjestu injektiranja. Plazma je izolirana IV punktiranjem prije, te pri raznim vremenima nakon imunizacije i čuvana je zamrznuta (-20 °C) do testa antitijela. Anti-HBs antitijela su detektirana upotrebom komercijalnog ELISA kita (Monolisa Anti-HBs; Sanofi-Pasteur, Montreal, QC) i titri su izraženi u mIU/mL zasnovano na usporedbi s standardima definiranim od WHO (Monolisa Anti-HBs Standards; Sanofi-Pasteur).

Rezultati

Identifikacija CpG ODN s različitim profilima *in vitro* imune aktivnosti: Naša istraživanja su pokazala da određene baze na 5' i 3' stranama CpG dinukleotidea unutar CpG motiva mogu imati utjecaj na razinu imune aktivacije sintetskog ODN, ali nije bilo jasno da li različiti CpG motivi mogu pokazati različite imune efekte. Da se procjeni ta mogućnost, mi smo testirali panel CpG ODN a prema njihovoj sposobnosti indukcije litičke aktivnosti NK, proliferacije B-stanica, te stimulaciju sinteze TNF-α, IL-6, IFN-γ i IL-12 u stanicama slezene glodavca. Imunostimulirajuća aktivnost ODN bez CpG motiva (ODN 1982 (SEQ ID NO.: 225), ODN 1983 (SEQ ID NO.: 226)) je negativna ili slaba u usporedbi s CpG ODN. ODN s motivom koji nije optimalni CpG (ODN 1628 (SEQ ID NO.: 767), ODN 1758 (SEQ ID NO.: 1)) je bio manje aktivan od ODN koji sadrži CpG motiv okružen dvama 5' purinima i trima 3' pirimidinima (ODN 1760 (SEQ ID NO.: 3), ODN 1826 (SEQ ID NO.: 69), ODN 1841 (SEQ ID NO.: 84)). ODN 1826 koji sadrže dva optimalna motiva glodavca CpG (5' GACGTT 3') (SEQ ID NO.: 1143) su imali najvišu aktivnost za 5 od 6 mjerenih završnih točaka. Osim za ODN 1628, svi ODN su općenito pokazali sličan oblik aktivnosti (liza posredovana NK stanicama, proliferacija B-stanica, IL-12, IL-6, TNFα, IFN-γ). Treba zabilježiti da ODN 1628, koji je jedinstven u toj skupini jer ima dvije G-obogaćene regije, je pokazao preferentnu indukciju sinteze IFN-γ ali relativno malu stimulaciju ostalih aktivnosti.

Identifikacija *in vitro* testa koji korelira s *in vivo* aktivnosti adjuvansa: Kako je aktivnost adjuvansa *in vivo* završna točka, nas je zanimalo identificirati *in vitro* test koji će predvidjeti aktivnost adjuvansa CpG ODN *in vivo*. Isti ODN korišten za *in vitro* završne točke je testiran prema aktivnosti adjuvasna u imunizaciji miševa protiv HBsAg. To je izvedeno sa samim ODN i ODN kombinirano s alumom jer su ranija istraživanja pokazala jaku sinergiju za CpG ODN i alum kao adjuvans (PCT Publicirana patentna aplikacija W098/40100).

BALB/c miševi imunizirani s HBsAg bez adjuvansa su imali samo niske titre anti-HBs od 4 tjedna, i na to nije utjecao dodatak kontrolnog ODN. Nasuprot tome, dodatak CpG ODN je povećao anti-HBs titre za 5 do 40 puta, ovisno o korištenoj sekvenciji. Kada je dodan alum, titri anti-HBs su bili približno 6 puta veći od samog HBsAg. Specifično, kontrolni ODN nije imao efekt, pa su različiti CpG ODN povećali su te titre za 2 do 36 puta. Rezultati dobiveni s različitim samim ODN korelirali su vrlo dobro (r = 0.96) s onima dobivenom sa samim ODN plus alum. Kada je izvedena linarna regresija, nađen je vrlo visoki stupanj korelacije između nekih *in vitro* testova i *in vivo* povećanja anti-HBs titara. Od svih ispitivanih završnih titara, indukcija litičke aktivnosti NK je pokazala najbolju korelaciju s *in vivo* aktivnosti adjuvasa (bez aluma, r = 0.98; s alumom, r = 0.95; p < 0.0001). Dobivena je također dobra korelacija koja se tiče aktivnosti adjuvasa za stimulaciju B-stanica (r=0.84 i 0.7), kao i izlučivanje TNF-α (r=0.9 i 0.88), IL-12 (r=0.88 i 0.86) i IL-6 (r=0.85 i 0.91). Jedini *in vitro* test koji nije korelirao dobro s *in vivo* rezultatima je izlučivanje IFN-γ (r=0.57 i 0.68). Ti poaci pokazuju da *in vitro* testovi za litičku aktivnost NK, aktivaciju B-stanica i produkciju production of TNFα, IL-6 i IL-12 pokazuju vrijedne informacije *in vitro* da bi predvidio aktivnost danog ODN *in vivo*. Probiranje skupine fosforotioatnih ODN na aktivaciju NK stanica: U prethodnim istraživanjem smo našli da je sinteza upalnih citokina u humanim PBMC inducirana pri izrazito malim količinama endotoksina (inducirano izlučivanje TNF-α se može detektirati sa sako 6 pg/mL endotoksina, 2 log osjetiviji od imunih stanica glodavca). Nasuprot tome, aktivacija humanih B-stanica i indukcija litičke aktivnosti humanih NK s endotoksinom je niska čak pri visokim koncentracijama endotoksina. Zasnovano na tim rezultatima smo odabrali aktivaciju NK stanica (litička aktivnost ekspresije CD69) i B-stanica (proliferacija ekspresije CD86) kao vrlo specifični i respektivni testovi s niskom raznolikosti među subjektima i koristili smo ih za *in vitro* probiranje grupe ODN.

Prvo smo ispitivali efekt fosforotioatnog ODN koji sadrži različite kombinacije i permutacije CpG motiva NK stanicama posredovane lize ciljanih stanica. Da bi bila jasna i da bi se olakšala prezentacija, pokazani su rezultati samo s odabranim predstavnicima CpG i kontrolnom ODN. Humane PBMC su inkubirane s različitim fosforotioatinim ODN (6 µg/mL) kroz 24 hours i testirane je njihova sposobnost lize ⁵¹Cr obilježenih K562 stanica. ODN s dva 6-merna CpG motiva (5' GACGTT 3' (SEQ ID NO.: 1143) ili 5' GTCGTT 3' (SEQ ID NO.: 1144)) u kombinaciji s TpCna 5' kraju ODN (ODN 1840 5'TCCATGTCGTTTCCTGTCGTT 3'(SEQ ID NO.: 83), ODN 18515'

TCCTGACGTTTCCTGACGTT 3' (SEQ ID NO.: 94) ili s najmanje tri 6-merna motiva bez TpC na 5' kraju (ODN 2013 (SEQ ID NO.: 253)) pokazuju srednju aktivnost. Nađena je visoka aktivnost 5' TpC koji je izravno prije 6-mernog humanog CpG motiva (5' **TCGTCGTT** 3' (SEQ ID NO.: 1145)) kojeg prate dva 6-merna motiva (ODN 2005 (SEQ ID NO.: 245), ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) i ODN 2007 (SEQ ID NO.: 247)). Najbolji rezultati su dobiveni kada su 6-merni CpG motivi odijeljeni jedan od drugog i od 5' 8-mernog CpG motiva s TpT (ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246)).

Ekspresija aktivacije markera CD69 je brzo povećana na površini NK stanica nakon stimulacije. Da se potvrde rezultati lize NK stanica, PBMC su inkubirane 18 sati s ODN (2 µg/mL). Ekspresija CD69 je ispitana na 56 pozitivnim NK stanicama (CD3, CD14 i CD19 negative). Mada je indukcija ekspresije CD69 bila manje sekvencijski spriječena nego stimulacija funkcionalne aktivnosti NK stanica, kontrolni ODN (ODN 1982, ODN 2116, ODN 2117, ODN 2010) su pokazali samo malu aktivnost sličnu baznoj razini. ODN s dva humana CpG motiva odvojeni s 5' TTTT 3' (ODN 1965 (SEQ ID NO.: 208)) ili četiri humana CpG motiva bez odvajanja (ODN 2013 (SEQ ID NO.: 253)) su relativno aktivniji pri indukciji ekspresije CD69 nego stimulira-juća litička aktivnost NK stanica. Optimalna funkcionalna aktivnost NK stanica kao i ekspresija CD69 je dobivena s ODNs koji sadrže TpC dinukleotide koji prethodi humanom CpG motif, i dodatnom humanom motivu unutar sekvencije (ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), ODN 2007 (SEQ ID NO.: 247)).

Aktivnost fosforotiatnog ODN za stimuliranje humanih B-stanica: U preliminarnim eksperimentima smo našli da je postotak proliferacije B stanica (test CFSE, vidi dio o metodama) korelira s površinskom ekspresijom kostimulirajuće CD86 na B-stanice, a mjereno protočnom citometrijom. Stoga smo koristili ekspresiju CD86 na B-stanice za probiranje skupine ODN prema imunostimulirajućoj aktivnosti. PBMC su inkubirani s 0.6 µg/mL ODN. Ekspresija CD86 (srednja vrijednost fluorescentnog intenziteta, MFI) je ispitana na CD19 pozitivnim B-stanicama. Poli-C ODN (ODN 2017 (SEQ ID NO.: 257)) ili ODN bez CpG dinukleotida (ODN 1982 (SEQ ID NO.: 225)) nisu stimulirali humane B-stanice pod ovim eksperimentalnim uvjetima. Fosforitotiatni ODN (ODN 2116 (SEQ ID NO.: 256)) s jednim optimalnim CpG motivom kojem prethodi TpC (5' **TCGTCGTT** 3' (SEQ ID NO.: 1145)) je imao nisku aktivnost. Prisutnost jednog humanog 6-mernog CpG mmotiva (5' **GTCGTT** 3' (SEQ ID NO.: 1144)) nije imao aktivirajući utjecaj. Dva od ta CpG motiva unutar sekvencije nisu pokazali aktivnosti (ODN 1960 (SEQ ID NO.: 203), ODN 2016 (SEQ ID NO.: 256)) ili su pokazali srednju aktivnost (ODN 1965 (SEQ ID NO.: 208)), a ovisnu o sadržaju sekvencije. Kada je ODN bio sastavljen od četiri kopije tog motiva (ODN 2012 (SEQ ID NO.: 252), ODN 2013 (SEQ ID NO.: 253), ODN 2014 (SEQ ID NO.: 254)), mogla se detektirati srednja aktivnosti na B-stanice. Kombinacija humanog 8-mernog CpG motiva na 5' kraju ODN s dva 6-merna CpG motiva (ODN 2005 (SEQ ID NO.: 245), ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), ODN 2007 (SEQ ID NO.: 247), ODN 2102 (SEQ ID NO.: 343), ODN 2103 (SEQ ID NO.: 344)) vodi značajnom povećanju sposobnosti ODN da stimulira B-stanice. Razmak između jednog motiva je kritičan. Odvajanje CpG motiva s TpT je preferirano (ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246)) u usporedbi s neodvojenom CpG motivom (ODN 2005 (SEQ ID NO.: 245)) također uspoređi ODN 1965 (SEQ ID NO.: 208) s ODN 1960 (SEQ ID NO.: 203)). Humani 6-merni CpG motiv (5' **GTCGTT** 3') je bolji od optimalnog mišjeg 6-mernog CpG motiva (5' **GACGTT** 3' (SEQ ID NO.: 246)) kada se kombinira s humanim 8-mernim CpG motivom na 5' kraju (ODN 2006 vs. ODN 2102 (SEQ ID NO.: 343) i ODN 2103 (SEQ ID NO.: 344)). A (TCG)_{poli} ODN je inaktivan ili samo slabo aktivan, kao što je bio ODN koji sadrži CpG dinukleotide koji okružuju gvanine ili druge CpG dinukleotide (ODN 2010 (SEQ ID NO.: 250)). Uzeto zajedno, pronalasci za NK stanice i B-stanice konzistentno pokazuju da od testiranih ODN, ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) ima najviši imunostimulirajuću aktivnost na humane imune stanice.

Komparativna analiza mogućnosti CpG fosforotiotiatnih ODN u različitim primatima: Različiti CpG motivi su optimalni za aktivaciju imunih stanica ljudi i glodavaca. Nadalje, broj i mjesto CpG motiva unutar aktivnog fosforotiatnog ODN je različita u miševima i ljudima. Nas je interesiralo da li CpG fosforotiotiatni ODN pokazuje sličnu aktivnost među različitim vrstama primata. Usporedili smo grupu CpG ODN prema njihovoj sposobnosti da induciraju proliferaciju B-stanica kod ljudi, čimpanza i rhesus ili cinomolginih majmuna. Sposobnost ODN da stimuliraju proliferaciju humanih B-stanica (Tablica J) daje dobru korelaciju s njihovom sposobnosti da induciraju ekspresiju CD86 B-stanica. ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246), koji pokazuje najvišu aktivnost u humanim B stanicama i NK stanicama je također najaktivniji u stimuliranju proliferacije B-stanica čimpanzi i rhesus majmuna (Tablica J). ODN 1968 (SEQ ID NO.: 211) i ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) daju najvišu aktivaciju B-stanica cinomolgnih majmuna *in vitro* (SI od 25 odnosno 29 pri 6 µg ODN/mL). Iznenadujuće, CpG ODN 2007 (SEQ ID NO.: 247), koji pokazuje sličnu visoku aktivnosti kao optimalni ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) u humanim stanicama, ne stimuliraju proliferaciju B-stanica Resus majmuna ili čimpanze, te ODN 1968 (SEQ ID NO.: 211) spokazuju nisku aktivnost. CpG ODN originalno izdvojeni zbog velike aktivnsoti kod miševa (ODN 1760 (SEQ ID NO.: 3), ODN 1826 (SEQ ID NO.: 69)) su pokazali malu aktivnost od majmuna (Tablica J).

Tablica J: Poliferativni odgovor PBMC na fosforotioatne CpG ODN kod primata

	Ljudi	Čimpanze	Rhesus majmuni
bez dodatka	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.0
ODN 1760 (SEQ ID NO.: 3)	23±7	0.3±0.1	0.5±0.3
ODN 1826 (SEQ ID NO.: 69)	0.8±0.1	0.4±0.1	0.6±0.1
ODN 1968 (SEQ ID NO.: 211)	35±9	20.0±3.8	1.9±0.7
ODN 1982 (SEQ ID NO.: 225)	9.7±1.1	2.5±1.1	0.7±0.1
ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246)	58±8	27.4±8.9	6.3±3.3
ODN 2007 (SEQ ID NO.: 247)	47±11	0.5±0.1	0.4±0.3

PBMC su pripravljani iz periferne krvi i inkubirani s ODN (0.6 µg/mL) kao što je naznačeno za pet dana. Proliferacija je mjerena prihvatom ³H/timidina (cpm/1000) tijekom zadnjih 18 sati. Više od 95% proliferiranih stanica su B-stanice određene CFSE testom. Testirane su četiri humane provrpe, šest od čimpanzi i dvije od rhesus majmuna.

In vivo aktivnost adjuvansa od CpG ODN u čimpazama i cinomolgnim mamunima: Da bi se odredilo da li CpG ODN s jakim *in vitro* stimulirajućim efektima na stanicama primata imaju aktivnost adjuvansa *in vivo* koja se može detektirati, cinomolgni majmuni i čimpanze su imunizirani s Engerix B, koji sadrži HBsAg adsorbiran na alum sam ili s dodatkom ODN 1968 (500 µg) odnosno ODN 2006 (SEQ ID NO.: 246) (1 µg). U usporedbi s kontrolom koja nije primila CpG ODN, anti-HBs titri 4 tjedna iza početka i 2 nakon stimulacije su bili 66 odnosno 16 puta viši kod majmuna, te 15 i 3 puta viši kod čimpanzi (Tablica K). Stoga je jasno da je viđen efekt adjuvansa CpG ODN, a to je bilo posebno izračeno nakon jedne imunizacije.

Tablica K: Anti-HBs odgovori kod primata imuniziranih protiv HBsAg s CpG ODN³

Vrsta primata	n	CpG ODN	Anti-HBs (mIU/mL)	
			4 tjedana nakon početka	2 tjedna nakon stimulacije
Cynologni majmun	5	bez	15±44	4880±13113
	5	ODN 1968 (500 µg) (SEQ ID NO. 211)	995±1309	76449±42094
Čimpanze	2	bez	6.11	3712.4706
	2	ODN 2006 (1 mg) (SEQ ID NO. 246)	125.125	9640, 16800

³ Životinje su imunizirane IM injekcijom Engerix B koja sadrži 10 µg HBsAg adsorbirane na alum, sam ili dodan s CpG ODN. Cinomolgni majmuni su stimulirani nakon 10 tjedana a čimpazne su stimulirane nakon 4 tjedana. Anti-HBs je određen ELISA testom; vrijednosti majmunima su GMT ± SEM (n=5) dok su prikazane pojedine vrijednosti kod čimpazna svake skupine.

PATENTNI ZAHTEJEVI

- Metoda stimulacije imunog odgovora, **naznačeno time** da sadrži davanje Py-obogaćene nukleinske kiseline subjektu koji nije glodavac u učinkovitoj količini koja inducira imuni odgovor u subjektu koji nije glodavac, pri čemu T-obogaćena nukleinska kiselina sadrži više od 60% T i sadrži CpG dinuleotid.
- (opozvan)
- Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina poli-T nukleinska kiselina koja sadrži 5' TTTT 3'.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 3, **naznačeno time** da poli-T nukleinska kiselina sadrži 5' X₁X₂TTTTX₃X₄ 3', pri čemu su X₁, X₂, X₃ i X₄ nukleotidi.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 3, **naznačeno time** da T-obogaćena imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži više motiva poli-T nukleinske kiseline.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 4, **naznačeno time** da X₁X₂ jeste TT.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 4, **naznačeno time** da X₃X₄ jeste TT.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 4, **naznačeno time** da je X₁X₂ odabran iz skupine koju čine: TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GT, GG, GA i GC.
- Metoda iz patentnog zahtjeva 4, **naznačeno time** da X₃X₄ odabran iz skupine koju čine: TA, TG, TC, AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GT, GG, GA i GC.
- (opozvan)
- (opozvan)
- (opozvan)

13. (opozvan)
14. (opozvan)
15. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je u sastavu T-obogaćene imunostimulirajuće nukleinske kiseline više od 80% T.
- 5 16. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži barem 20 nukleotida.
17. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži barem 24 nukleotida.
18. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima nukleotidni skelet koji uključuje barem jednu modifikaciju skeleta.
- 10 19. Metoda iz patentnog zahtjeva 18, **naznačeno time** da je modifikacija skeleta fosforotiatna modifikacija.
20. Metoda iz patentnog zahtjeva 18, **naznačeno time** da je nukleotidni skelet kimeran.
21. Metoda iz patentnog zahtjeva 18, **naznačeno time** da je nukleotidni skelet kompletno modificiran.
22. (opozvan)
- 15 23. (opozvan)
24. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ne sadrži CpG dinukleotide.
25. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ne sadrži poli-C sekvenciju.
- 20 26. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina uključuje poli-A sekvenciju.
27. Metoda iz patentnog zahtjeva 20, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina uključuje poli-G sekvenciju.
28. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 25% C.
- 25 29. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 25% A.
30. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je imunostimulirajuća nukleinska kiselina dana oralno.
31. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je imunostimulirajuća nukleinska kiselina dana lokalno.
- 30 32. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je imunostimulirajuća nukleinska kiselina dana u napravi za odgođeno oslobađanje.
33. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je imunostimulirajuća nukleinska kiselina dana mukozno na površinu sluznice.
34. Metoda iz patentnog zahtjeva 33, **naznačeno time** da je imuni odgovor mukozni imuni odgovor .
- 35 35. Metoda iz patentnog zahtjeva 33, **naznačeno time** da je imuni odgovor sistemski imuni odgovor .
36. Metoda iz patentnog zahtjeva 33, **naznačeno time** da je površina sluznice odabrana iz skupine koju čine: oralna, nazalna, rektalna, vaginalna ili okularna površina.
37. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da dalje sadrži izlaganje subjekta antigenu, te da je imuni odgovor na antigen specifičan odgovor.
- 40 38. Metoda iz patentnog zahtjeva 37, **naznačeno time** da je subjektu dan vektor nukleinske kiseline koja kodira antigen, te da je nukleinska kiselina odvojena od imunostimulirajuće nukleinske kiseline.
39. Metoda iz patentnog zahtjeva 37, **naznačeno time** da je antigen peptidni antigen.
40. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da dalje sadrži izolaciju imune stanice iz subjekta, dovođenje u kontakt imune stanice s učinkovitom količinom imunostimulirajuće nukleinske kiseline za aktiviranje imune stanice, te ponovnim davanjem aktivirane imune stanice subjektu.
- 45 41. Metoda iz patentnog zahtjeva 40, **naznačeno time** da je imuna stanica leukocit.
42. Metoda iz patentnog zahtjeva 41, **naznačeno time** da dalje sadrži dovođenje u kontakt imune stanice s antigenom.
43. Metoda iz patentnog zahtjeva 40, **naznačeno time** da je antigen odabran iz skupine koju čine: tumorski antigen, virsuni antigen, bakterijski antigen i antigen parazita.
- 50 44. Metoda iz patentnog zahtjeva 40, **naznačeno time** da je imuna stanica dendrična stanica.
45. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da subjekt ima astmu ili je rizičan na razvitak astme, a metoda je metoda tretmana ili prevencije astme kod subjekta.
46. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je subjekt ima alergiju ili je rizičan na razvitak alergije, a metoda je metoda tretmana ili prevencije alergije.
- 55 47. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je subjekt ima karcinom, a metoda je metoda tretmana karcinoma.
48. Metoda iz patentnog zahtjeva 47, **naznačeno time** da je karcinom odabran iz skupine koju čine: karcinom žučnog trakta, karcinom mozga, karcinom dojke, karcinom cerviksa, koriokarcinom, karcinom CNS, karcinom debelog crijeva, karcinom vezivnog tkiva, endometrijalni karcinom, karcinom oka, karcinom želuca, intraepitelne neoplazme, karcinom grla, limfomi, Hodgkinov limfom, karcinom jetre, karcinom pluća (npr. malih i ne-malih stanica), melanom, neuroblastomi, oralni karcinom, karcinom usne šupljine, karcinom jajnika, karcinom pankreasa,
- 60

karcinom prostate, karcinom rektuma, sarkomi, karcinom tiroidne žljezde, karcinom bubrega kao i drugi karcinomi i sarkomi.

49. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je karcinomodabran iz skupine koju čine: karcinom kosti, karcinom mozga i CNS, karcinom konektivnog tkiva, ezofagealni karcinom, karcinom oka, Hodgkinov limfom, karcinom grla, karcinom usne šupljine, karcinom kože i karcinom testisa.
50. Metoda iz patentnog zahtjeva 47, **naznačeno time** da dalje sadrži davanje antikancerogene terapije.
51. Metoda iz patentnog zahtjeva 50, **naznačeno time** da je antikancerogena terapija antitijelo.
52. Metoda iz patentnog zahtjeva 47, **naznačeno time** da je subjekt čovjek.
53. Metoda iz patentnog zahtjeva 47, **naznačeno time** da je subjekt odabrani iz skupine koju čine: pas, mačka i konj.
54. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da dalje sadrži davanje antitijela specifična na antigen sa stanične površine, te da je rezultat imunog odgovora o antigenu ovisna stanična citotoksičnost (ADCC).
55. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je subjekt ima infektivnu bolest ili je rizičan na razvitak infektivne bolesti, a metoda je metoda tretmana ili prevencije infektivne bolesti.
56. Metoda iz patentnog zahtjeva 54, **naznačeno time** da je subjekt čovjek.
57. Metoda iz patentnog zahtjeva 54, **naznačeno time** da dalje sadrži davanje antigena subjektu.
58. Metoda iz patentnog zahtjeva 57, **naznačeno time** da je antigen odabran iz skupine koju čine: bakterijski antigen, virsuni antigen, antigen parazita i fungalni antigen.
59. Metoda iz patentnog zahtjeva 56, **naznačeno time** da je subjekt odabrani iz skupine koju čine: pas, mačka, konj, govedo, svinja, koza, pile, majmun i riba.
60. Metoda iz patentnog zahtjeva 59, **naznačeno time** da dalje sadrži davanje antigena subjektu.
61. Metoda iz patentnog zahtjeva 59, **naznačeno time** da je antigen izveden iz mikroorganizama koji su odabrani iz skupine koju čine: herpesviridae, retroviridae, orthomyroviridae, toxoplasma, haemophilus, campylobacter, clostridium, E. coli, te staphylococcus.
62. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina dalje sadrži TG motiv.
63. Metoda iz patentnog zahtjeva 62, **naznačeno time** da TG nukleinska kiselina sadrži 5'N₁X₁TGX₂N₂3'.
64. Metoda iz patentnog zahtjeva 62, **naznačeno time** da TG nukleinska kiselina sadrži 5'N₁X₁X₂TGX₃X₄N₂3'.
65. Metoda iz patentnog zahtjeva 63, **naznačeno time** da je sekvencija N₁ nukleinske kiseline sastavljena od broja nukleotida koji se kreće od (11-N₂) do (21-N₂).
66. Metoda iz patentnog zahtjeva 63, **naznačeno time** da je sekvencija N₂ nukleinske kiseline sastavljena od broja nukleotida koji se kreće od (11-N₁) do (21-N₁).
67. Metoda iz patentnog zahtjeva 64, **naznačeno time** da je sekvencija N₁ nukleinske kiseline sastavljena od broja nukleotida koji se kreće od (9-N₂) do (19-N₂).
68. Metoda iz patentnog zahtjeva 64, **naznačeno time** da je sekvencija N₂ nukleinske kiseline sastavljena od broja nukleotida koji se kreće od (9-N₁) do (19-N₁).
69. Metoda iz patentnog zahtjeva 63, **naznačeno time** da X₂ jeste timidin.
70. Metoda iz patentnog zahtjeva 64, **naznačeno time** da X₃ jeste timidin.
71. Metoda iz patentnog zahtjeva 64, **naznačeno time** da su X₁X₂ nukleotidi odabran iz skupine koju čine: GT, GG, GA, AA, AT, AG, CT, CA, CG, TA i TT.
72. Metoda iz patentnog zahtjeva 64, **naznačeno time** da su X₃X₄ nukleotidi odabran iz skupine koju čine: TT, CT, AT, AG, CG, TC, AC, CC, TA, AA o CA.
73. Metoda iz patentnog zahtjeva 63, **naznačeno time** da su X₃X₄ nukleotidi odabran iz skupine koju čine: TT, TC, TA i TG.
74. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da je subjekt rizičan na razvitak karcinoma, a metoda je metoda prevencije karcinoma.
75. Metoda iz patentnog zahtjeva 50, **naznačeno time** da je antikancerogena terapija odabrana iz skupine koju čine: kemoterapijsko sredstvo, imunoterapijsko sredstvo i vakcina protiv karcinoma.
76. Metoda prevencije bolesti kod subjekta, **naznačeno time** da sadrži: davanje subjektu imunostimulirajuće nukleinske kiseline redovito, a da se spriječi bolest kod subjekta, pri čemu je imunostimulirajuća nukleinska kiselina odabrana iz skupine koju čine: T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži više od 60% T i sadrži CpG dinukleotid, TG nukleinska kiselina koja nema CpG dinukleotide, te T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži između 25% T i 60% T i nema CpG dinukleotid.
77. Metoda indukcije urođenog imunog odgovora, **naznačeno time** da sadrži: davanje subjektu imunostimulirajuće nukleinske kiseline u učinkovitoj količini koja aktivira urođeni imuni odgovor, pri čemu je imunostimulirajuća nukleinska kiselina odabrana iz skupine koju čine: T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži više od 60% T i sadrži CpG dinukleotid, TG nukleinska kiselina koja nema CpG dinukleotide, te T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži između 25% T i 60% T i nema CpG dinukleotid.
78. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži: napravu za odgođeno oslobađanje koja sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu, pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema nemetiliranih CpG motiva i odabrana je iz skupine koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina i TG nukleinska kiselina.
79. Pripravak iz patentnog zahtjeva 78, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži

polidiesterski skelet.

80. Pripravak dodatka hrani, **naznačeno time** da sadrži imuno-stimulirajuću nukleinsku kiselinu u napravi za isporuku koja je odabrana iz skupine koju čine: kapsule, pilule i sublingvalne tablete, pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema nemetiliranih CpG motiva i odabrana je iz skupine koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina i TG nukleinska kiselina.
81. Pripravak iz patentnog zahtjeva 80, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži polidiesterski skelet.
82. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i antigen pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema nemetiliranih CpG motiva i odabrana je iz skupine koju čine TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina koja sadrži sekvenciju

$$5'N_1X_1X_2TGX_2X_3N_23'$$

pri čemu su X_1X_2 je odabrani iz skupine koju čine TA, TG, TC, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GG, GA i GC, te su X_3X_4 je odabrano iz skupine koju čine: AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC, te sekvenciju

$$5'X_1X_2TTTTX_3X_43'$$

pri čemu je X_1X_2 je odabran iz skupine koju čine TA, TG, TC, AA, AG, AC, CC, CA, GG, GA i GC, te je X_3X_4 odabran iz skupine koju čine: AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC.

83. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži: imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i antimikrobno sredstvo, pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema nemetiliranih CpG motiva i odabrana je iz skupine koju čine T-obogaćena nukleinska kiselina i TG nukleinska kiselina.
84. Pripravak iz patentnog zahtjeva 83, **naznačeno time** da je antimikrobno sredstvo odabrano iz skupine koju čine: antivirusni sredstvo, antifungalno sredstvo, sredstvo protiv parazita i antibakterijsko sredstvo.
85. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži najmanje 3, najmanje 4, najmanje 5, najmanje 6, najmanje 7, ili najmanje 8 poli-T motiva.
86. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** da najmanje dva motiva od više motiva poli-T nukleinskih kiselina sadrži najmanje tri uzastopna T nukleotidna ostatka.
87. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** da je najmanje dva motiva poli-T nukleinske kiseline sadrži najmanje četiri uzastopna T nukleotidna ostatka.
88. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** je više poli-T motiva najmanje 3 motiva poli-T nukleinske kiseline, pri čemu svaka od najmanje 3 poli-T nukleinske kiseline sadrži najmanje 3 uzastopna T nukleotidna ostatka.
89. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** je više poli-T motiva najmanje 4 motiva poli-T nukleinske kiseline, pri čemu svaka od najmanje 4 poli-T nukleinske kiseline sadrži najmanje 3 uzastopna T nukleotidna ostatka.
90. Pripravak iz patentnog zahtjeva 5, **naznačeno time** da više motiva poli-T nukleinske kiseline sadrži 5, najmanje 6, najmanje 7, ili najmanje 8 uzastopnih T nukleotidnih ostataka.
91. (opozvano)
92. (opozvano)
93. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina sadrži najmanje dvoje poli-C sekvencije s najmanje 3 uzastopna C nukleotidna ostatka.
94. Metoda iz patentnog zahtjeva 1, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema poli-A sekvencije od najmanje 3 uzastopna A nukleotidna ostatka.
95. Farmaceutski pripravak, **naznačeno time** da sadrži učinkovitu količinu izolirane imunostimulirajuće nukleinske kiseline za stimulaciju imunog odgovora, a iz patentnog zahtjeva 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 40, 41, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, ili 94, te farmaceutski prihvatljiv nosač.
96. Pripravak tvari, **naznačeno time** da sadrži izoliranu imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu iz patentnog zahtjeva 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 40, 41, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, ili 94, te farmaceutski prihvatljiv nosač.
97. Metoda iz patentnog zahtjeva 90, **naznačeno time** da nukleinska kiselina dalje sadrži više CpG motiva, pri čemu više jeste najmanje 3 motiva, najmanje 4 motiva i pri čemu svaki od najmanje 4 motiva sadrži najmanje 3 uzastopna T nukleotidna ostatka.
98. Metoda iz patentnog zahtjeva 97, **naznačeno time** da su više CpG motiva i poli-T motivi razasuti.
99. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži: imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i antikancerogenu terapiju, formulirane s farmaceutski prihvatljivim nosačem, a u učinkovitoj količini za tretman karcinoma ili za smanjenje rizika od razvitka karcinoma, pri čemu je imunostimulirajuća nukleinska kiselina odabrana iz skupine koju čine: T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži

više od 60% T i sadrži CpG dinukleotid, TG nukleinska kiselina koja nema CpG dinukleotide, te T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži između 25% T i 60% T i nema CpG dinukleotid.

100. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži:

imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i lijek protiv astme/alergije, formuliran s farmaceutski prihvatljivim nosačem, a u učinkovitoj količini za prevenciju ili tretman imunog odgovora povezanog s izlaganjem medijatoru astme ili alergije, pri čemu je imunostimulirajuća nukleinska kiselina odabrana iz skupine koju čine: T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži više od 60% T i sadrži CpG dinukleotid, TG nukleinska kiselina koja nema CpG dinukleotide, te T-obogaćena nukleinska kiselina koja sadrži između 25% T i 60% T i nema CpG dinukleotid.

101. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži:

imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu odabranu iz skupine koju čine: SEQ ID NO:95-119, SEQ ID NO: 121-136, SEQ ID NO: 137-152, SEQ ID NO: 154-210, SEQ ID NO:212-222, SEQ ID NO:224-244, SEQ ID NO:247-260, SEQ ID NO:261-272, SEQ ID NO:274-299, SEQ ID NO:301, SEQ ID NO:303-409, SEQ ID NO:414-420, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:427-758, SEQ ID NO:760-947, SEQ ID NO:959-963, SEQ ID NO:968-1022, te SEQ ID NO: 1024-1093, te farmaceutsko prihvatljivi nosač.

102. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži

imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu koja se suštinski sastoji od

5' M₁TCGTCGTTM₂3',

pri čemu najmanje jedan od Cs nije metiliran, te pri čemu je M₁ nukleinska kiselina koja ima najmanje jedan nukleotid, te pri čemu je M₂ nukleinska kiselina koja ima između 0 i 50 nukleotida, te pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima manje od 100 nukleotida.

103. Farmaceutski pripravak, **naznačeno time** da sadrži imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu koja sadrži

5' TCGTCGTT3',

pri čemu najmanje jedan od Cs nije metiliran, te pri čemu imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima manje od 100 nukleotida i fosfodiesteri kostur, te napravu za odgođeno oslobađanje.

104. Farmaceutski pripravak iz patentnog zahtjeva 103, **naznačeno time** da je naprava za odgođeno oslobađanje mikročestica.

105. Farmaceutski pripravak iz patentnog zahtjeva 103, **naznačeno time** da dalje sadrži antigen.

106. Metoda stimulacije imunog odgovora, **naznačeno time** da sadrži

davanje TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline subjektu koji nije glodavac, a u učinkovitoj količini da inducira imuni odgovor kod subjekta koji nije glodavac, pri čemu TG imunostimulirajuća nukleinska kiselina nema CpG dinukleotid.

107. Pripravak, **naznačeno time** da sadrži oligonukleotid koji ima sekvenciju nukleinske kiseline TCG TCG TTT TGA CGT TTT GTC GTT (SEQ ID NO- 343).

108. Metoda tretmana ili prevencije od alergije ili astme, **naznačeno time** da sadrži

davanje pripravka iz patentnog zahtjeva 107 subjektu koji nije glodavac a ima potrebu za učinkovitom količinom za tretman ili prevenciju alergije ili astme.

109. Metoda tretmana ili prevencije od alergije ili astme, **naznačeno time** da sadrži

davanje TG imunostimulirajuće nukleinske kiseline subjektu koji nije glodavac, a u učinkovitoj količini da inducira imuni odgovor kod subjekta koji nije glodavac, pri čemu nukleinska kiselina sadrži sekvenciju

5'N₁X₁X₂TGX₂X₃N₂3'

pri čemu je X₁X₂ odabrani iz skupine koju čine TA, TG, TC, AA, AG, AC, CT, CC, CA, GG, GA i GC, te je X₃X₄ je odabran iz skupine koju čine: AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC, te pri čemu nukleinska kiselina nema CpG dinukleotid.

110. Metoda stimuliranja imunog odgovora, **naznačeno time** da sadrži

davanje Py-obogaćene imunostimulirajuće nukleinske kiseline subjektu koji nije glodavac, a u učinkovitoj količini da inducira imuni odgovor kod subjekta koji nije glodavac, pri čemu nukleinska kiselina sadrži sekvenciju

5'X₁X₂TTTTX₃X₄3'

pri čemu je X₁X₂ je odabran iz skupine koju čine TA, TG, TC, AA, AG, AC, CC, CA, GG, GA i GC, te je X₃X₄ odabran iz skupine koju čine: AT, AA, AG, AC, CT, CC, CA, CG, GT, GG, GA i GC, te pri čemu nukleinska kiselina nema CpG dinukleotid.

111. Metoda iz patentnog zahtjeva 106, **naznačeno time** da je nukleinska kiselina T-obogaćena nukleinska kiselina.

112. Metoda iz patentnog zahtjeva 111, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom

sastavu više od 25% T.

113. Metoda iz patentnog zahtjeva 111, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 35% T.

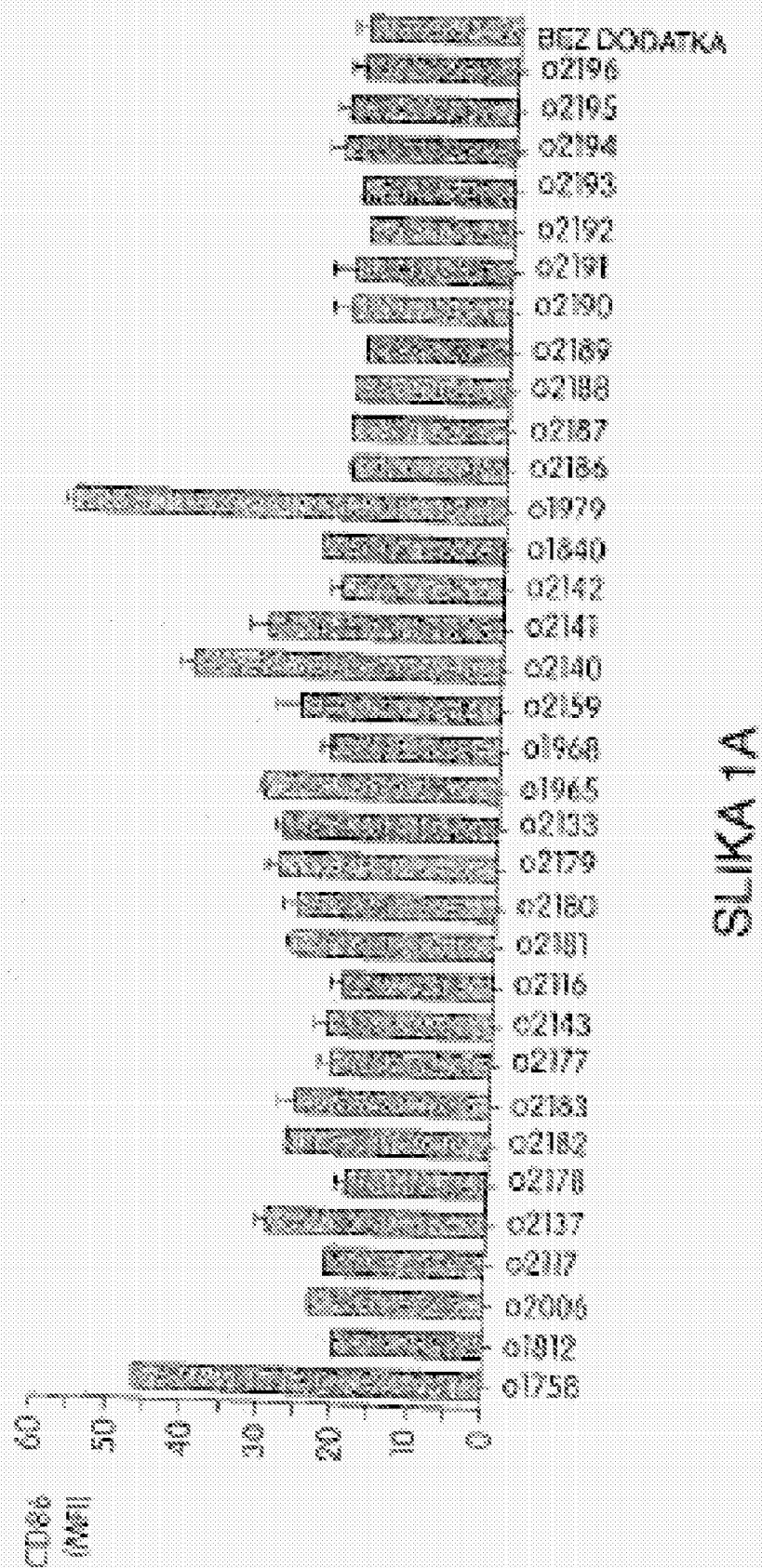
114. Metoda iz patentnog zahtjeva 111, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 40% T.

115. Metoda iz patentnog zahtjeva 111, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 50% T.

116. Metoda iz patentnog zahtjeva 111, **naznačeno time** da imunostimulirajuća nukleinska kiselina ima u nukleotidnom sastavu više od 60% T.

SAŽETAK

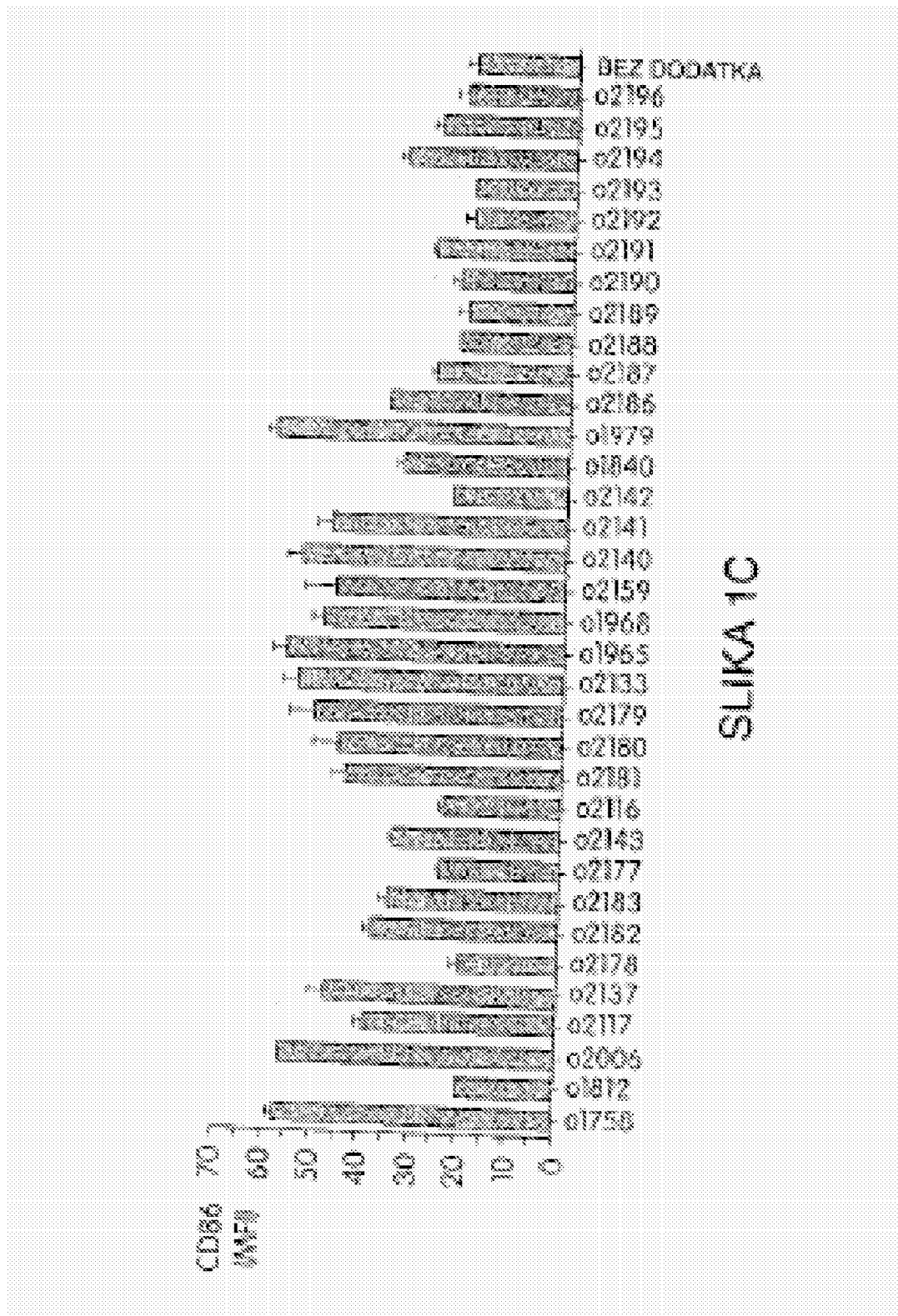
Izum se odnosi na imunostimulirajuću nukleinsku kiselinu i pripravke i metode primjene pripravaka. T-obogaćene nukleinske kiseline sadrže poli-T sekvencije i/ili imaju više od 25% T nukleotidnih ostataka. TG nukleinske kiseline imaju TG dinukleotide. C-obogaćene nukleinske kiseline imaju barem jednu poli-C regiju i/ili više od 50% C nukleotida. Te imunostimulirajuće nukleinske kiseline djeluju na sličan način kao nukleinske kiseline koje imaju CpG motive. Izum također obuhvaća preferirane CpG nukleinske kiseline.



SLIKA 1A

STATISTIČKA ANALIZA							
	SREDNJA VRIJEDNOST	STAND. DEVIJACIJA	STAND. POGRESKA	BRUJ	MINIMUM	MAKSIMUM	NEKOSTAJE BRUJ
o1758	46.70	-	-	1	46.70	46.70	3
o1812	20.70	.34	.39	2	20.60	20.80	2
o2006	23.60	.14	.10	2	23.50	23.70	2
o2117	22.10	0.00	0.00	2	22.10	22.10	2
o2137	29.75	1.48	1.05	2	28.70	30.80	2
o2178	20.00	.71	.50	2	19.50	20.50	2
o2182	27.15	.35	.25	2	26.30	27.40	2
o2183	26.35	2.90	2.05	2	24.30	29.40	2
o2177	21.55	1.77	1.25	2	20.30	22.80	2
o2143	22.55	1.48	1.05	2	21.50	23.60	2
o2116	20.55	1.48	1.05	2	19.50	21.60	2
o2181	26.90	.57	.40	2	26.50	27.30	2
o2180	26.75	1.77	1.25	2	25.50	28.00	2
o2179	29.10	1.98	1.40	2	27.70	30.50	2
o2133	28.80	.90	.70	2	28.10	29.50	2
o1965	31.05	.92	.65	2	30.40	31.70	2
o1968	22.95	1.20	.85	2	22.10	23.80	2
o2159	26.55	4.88	3.45	2	23.10	30.00	2
o2140	40.85	2.47	1.75	2	39.10	42.60	2
o2141	31.30	3.11	2.20	2	29.10	33.50	2
o2142	22.10	1.13	.80	2	21.10	22.90	2
o1840	24.45	.07	.05	2	24.40	24.50	2
o1979	57.65	.49	.35	2	57.30	58.00	2
o2186	20.85	.35	.25	2	20.80	21.10	2
o2187	21.15	.07	.05	2	21.10	21.20	2
o2188	20.70	.14	.10	2	20.60	20.80	2
o2189	19.45	.07	.05	2	19.40	19.50	2
o2190	21.85	2.47	1.75	2	20.10	23.60	2
o2191	21.40	3.25	2.30	2	19.10	23.70	2
o2192	19.50	.14	.10	2	19.40	19.60	2
o2193	20.65	.21	.15	2	20.50	20.80	2
o2194	23.50	1.70	1.20	2	22.30	24.70	2
o2195	23.00	.85	.60	2	22.40	23.60	2
o2196	21.05	1.77	1.25	2	19.80	22.30	2
BEZ DODATKA	29.90	2.77	1.98	4	18.60	24.90	0

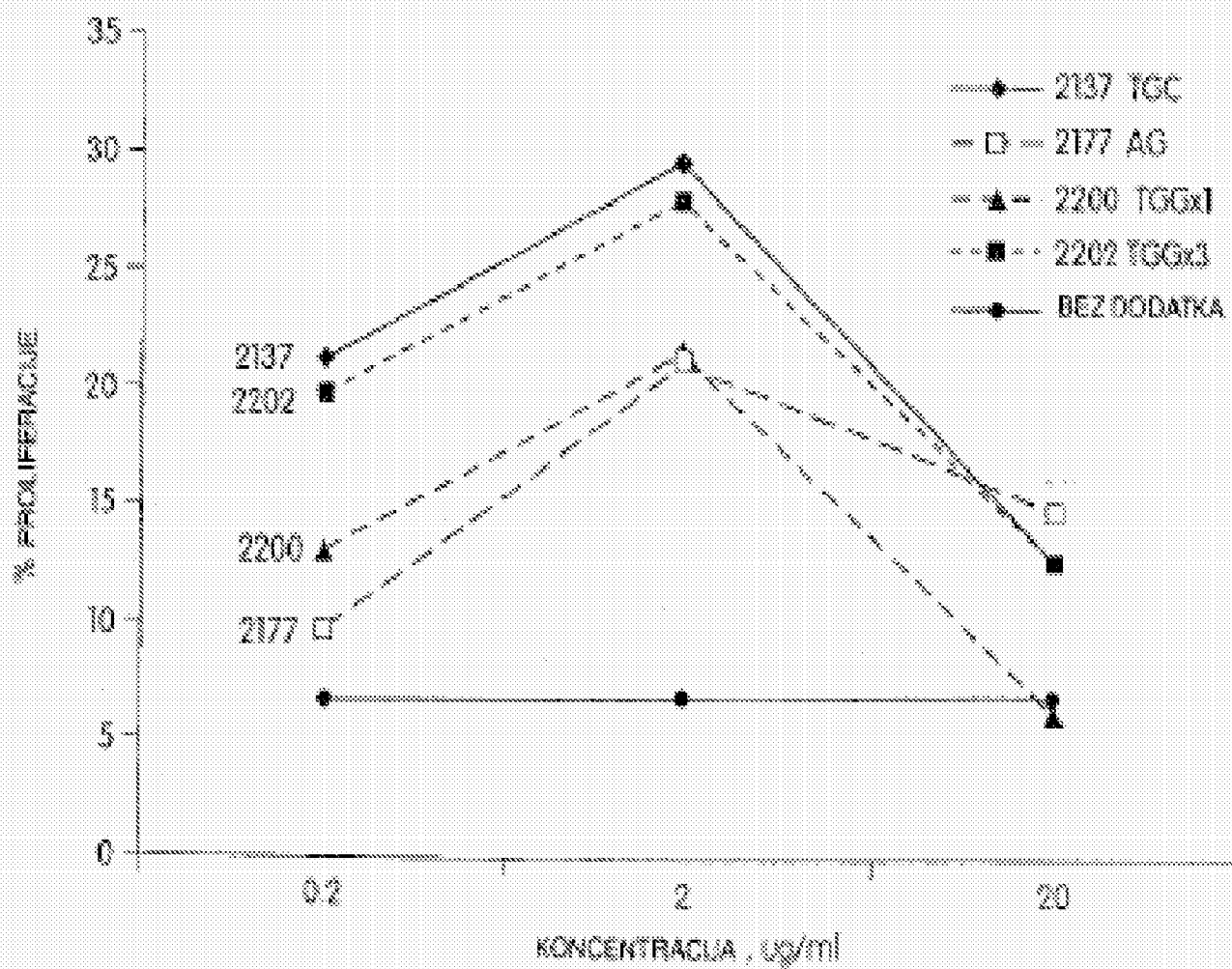
SLIKA 1B



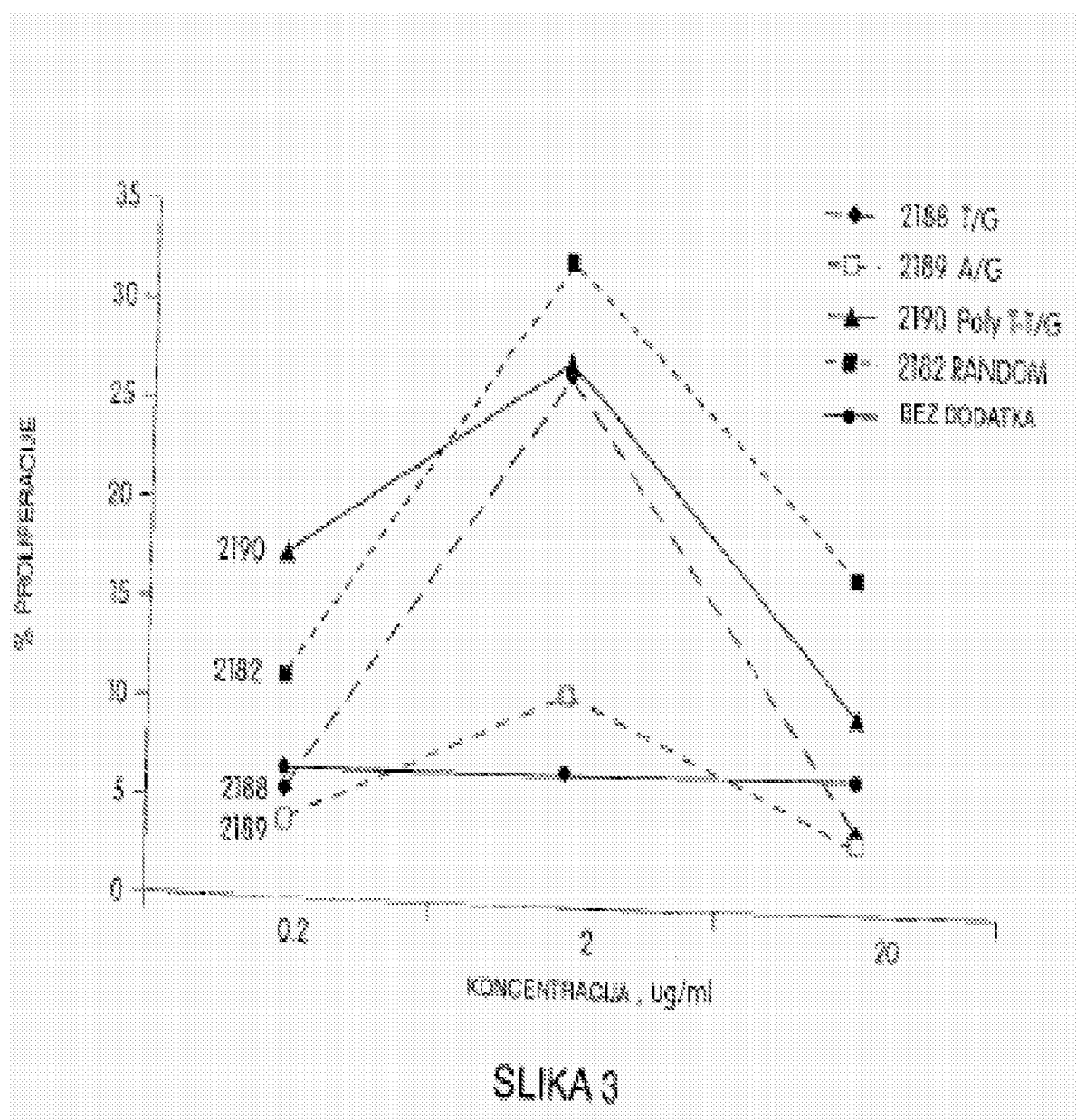
STATISTIČKA ANALIZA

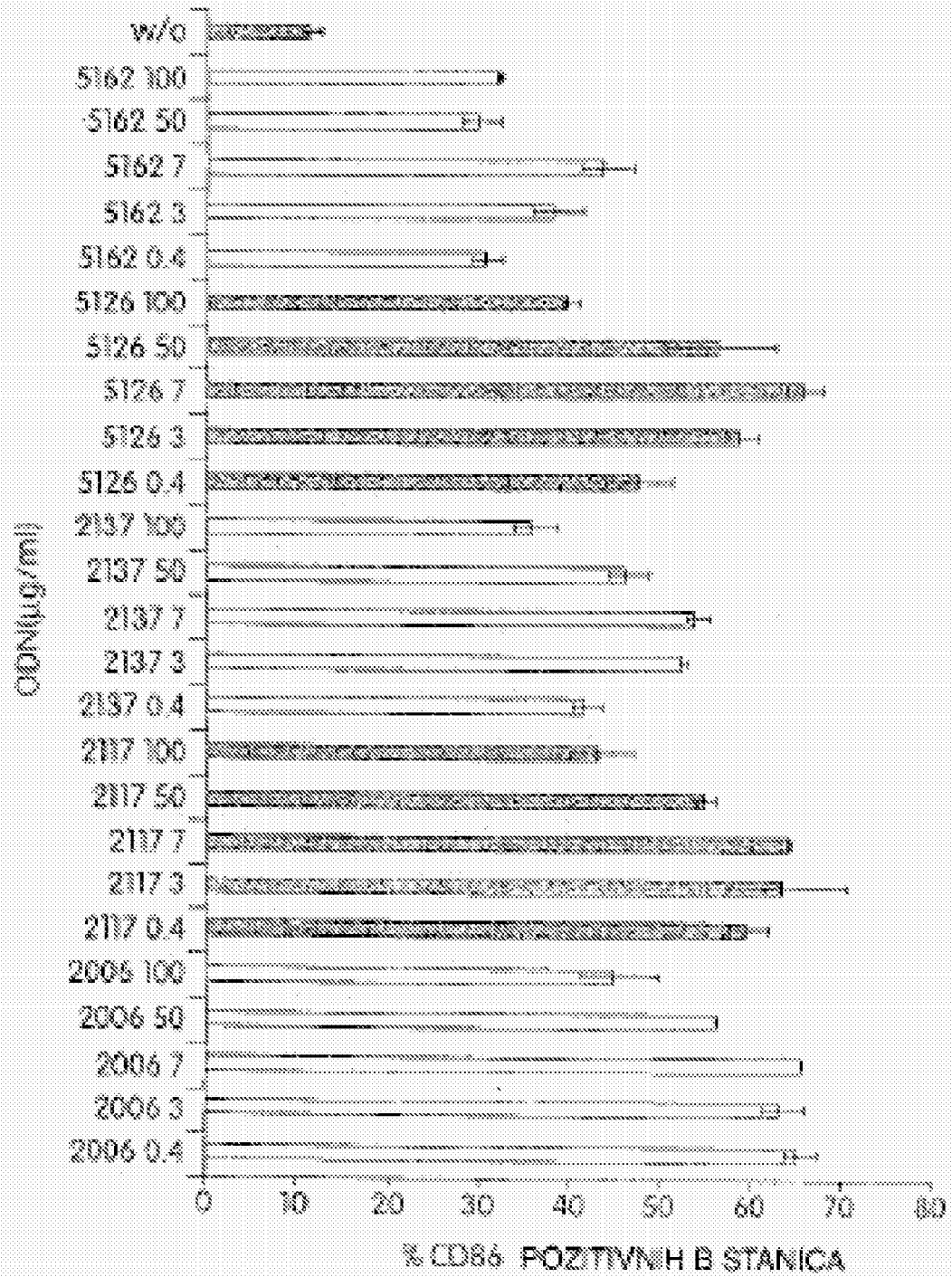
	SREDNJA VRIJEDNOST	STANO DEVIJACIJA	STANO POGREŠKA	BRDZ	MAKSIMUM	MINIMUM	PROSJEČAJE BRDZ
o1758	57.60	.71	.50	2	57.10	58.10	2
o1812	20.70	.57	.40	2	20.30	21.10	2
o2006	56.35	.35	.23	2	56.10	56.60	2
o2117	40.00	1.13	.80	2	39.20	40.80	2
o2137	47.60	3.39	2.40	2	45.20	50.00	2
o2178	21.00	.99	.70	2	20.30	21.70	2
o2182	37.75	.35	.25	2	37.50	38.00	2
o2183	35.30	1.84	1.30	2	34.00	36.60	2
o2177	25.00	.71	.50	2	24.50	25.50	2
o2143	34.70	.71	.50	2	34.20	35.20	2
o2116	24.35	.64	.45	2	23.90	24.80	2
o2181	44.25	3.18	2.25	2	42.00	46.50	2
o2150	45.90	5.94	4.20	2	41.70	50.10	2
o2179	50.70	6.93	4.90	2	45.80	55.60	2
o2133	53.75	4.31	3.05	2	50.70	56.80	2
o1965	56.20	3.82	2.70	2	53.50	58.90	2
o1968	49.35	1.91	1.35	2	48.00	50.70	2
o2159	46.80	7.92	5.60	2	41.20	52.40	2
o2140	53.25	4.74	3.35	2	49.90	56.60	2
o2141	47.40	4.30	2.90	2	44.50	50.30	2
o2142	23.20	.42	.30	2	22.90	23.50	2
o1840	53.50	1.13	.80	2	52.70	54.30	2
o1979	59.50	1.70	1.20	2	58.30	60.70	2
o2186	36.90	.14	.10	2	36.80	37.00	2
o2187	27.15	.78	.55	2	26.60	27.70	2
o2188	22.25	.21	.15	2	22.10	22.40	2
o2189	21.45	1.20	.85	2	20.60	22.30	2
o2190	22.95	1.20	.85	2	22.10	23.80	2
o2191	28.35	.49	.35	2	28.00	28.70	2
o2192	20.40	1.70	1.20	2	19.20	21.60	2
o2193	19.70	.57	.40	2	19.30	20.10	2
o2194	34.00	1.70	1.20	2	32.80	35.20	2
o2195	27.30	1.27	.90	2	26.40	28.20	2
o2196	22.45	2.76	1.95	2	20.50	24.40	2
BEZ DODATKA	20.90	2.77	1.98	4	18.60	24.90	0

SLIKA 1D

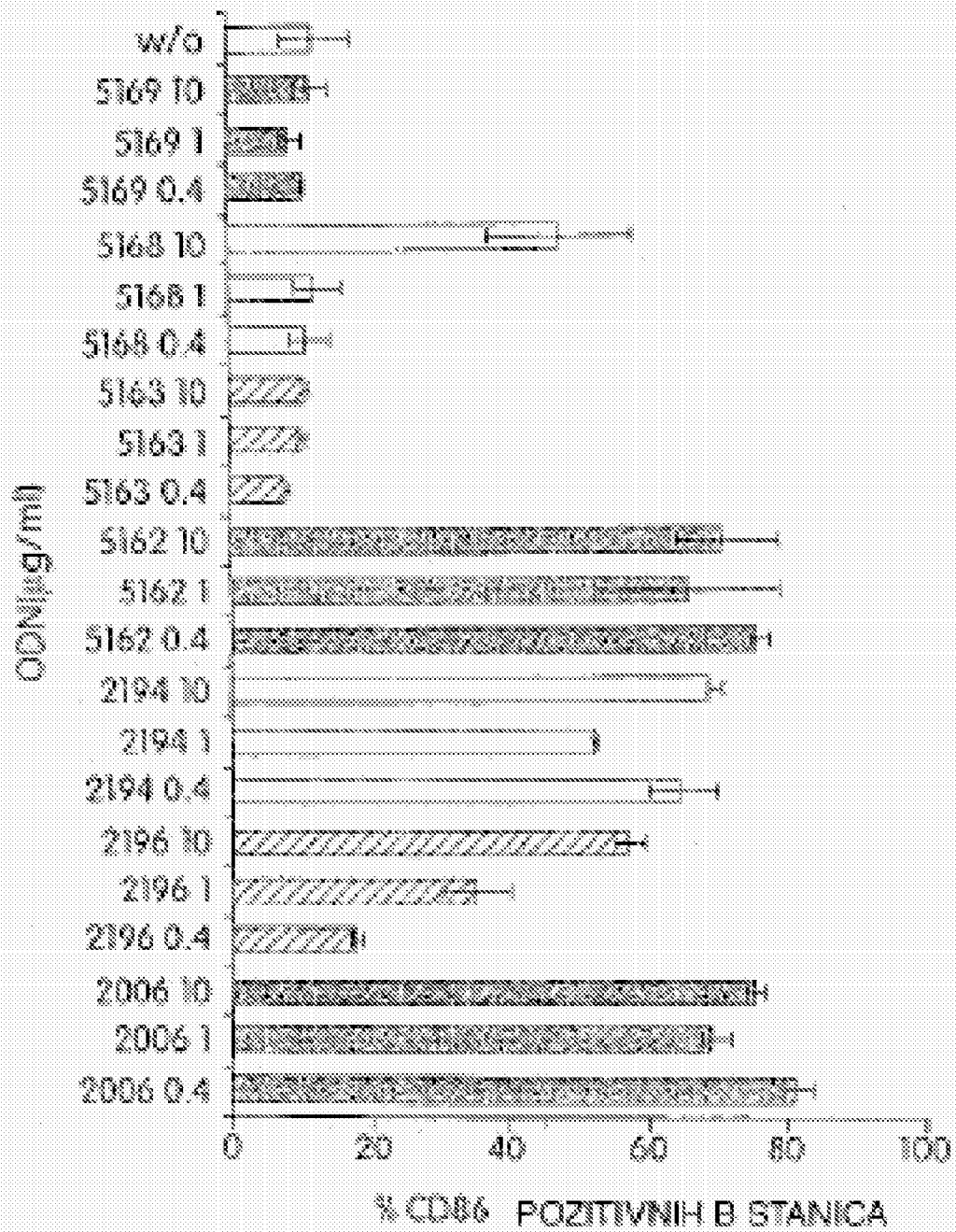


SLIKA 2

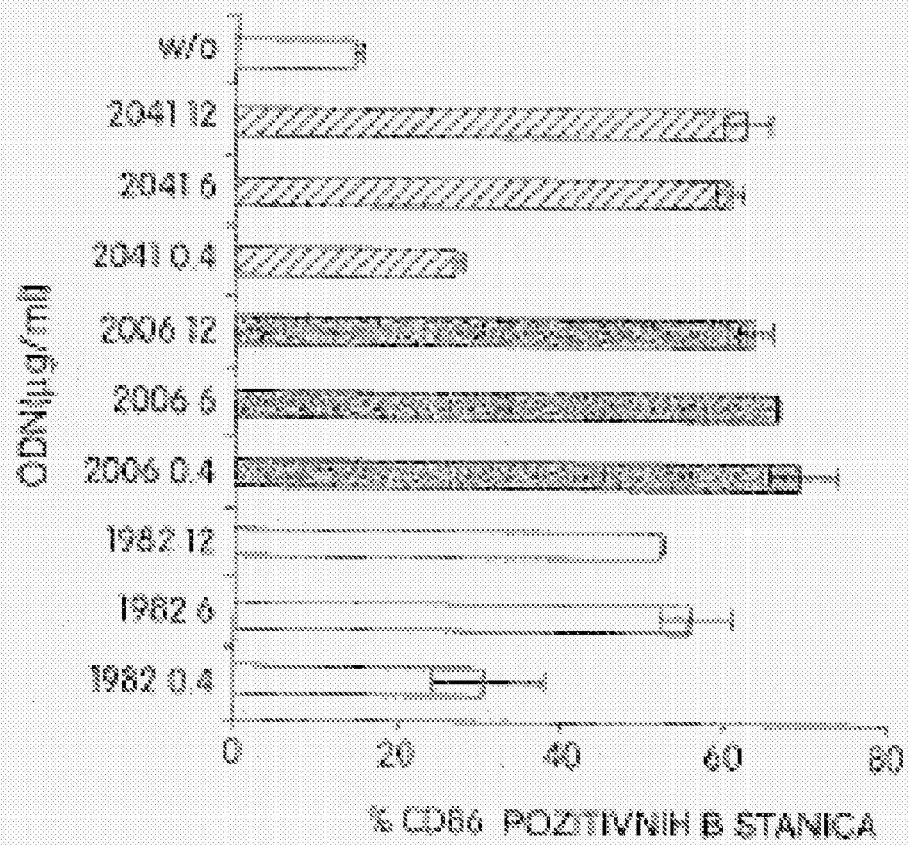




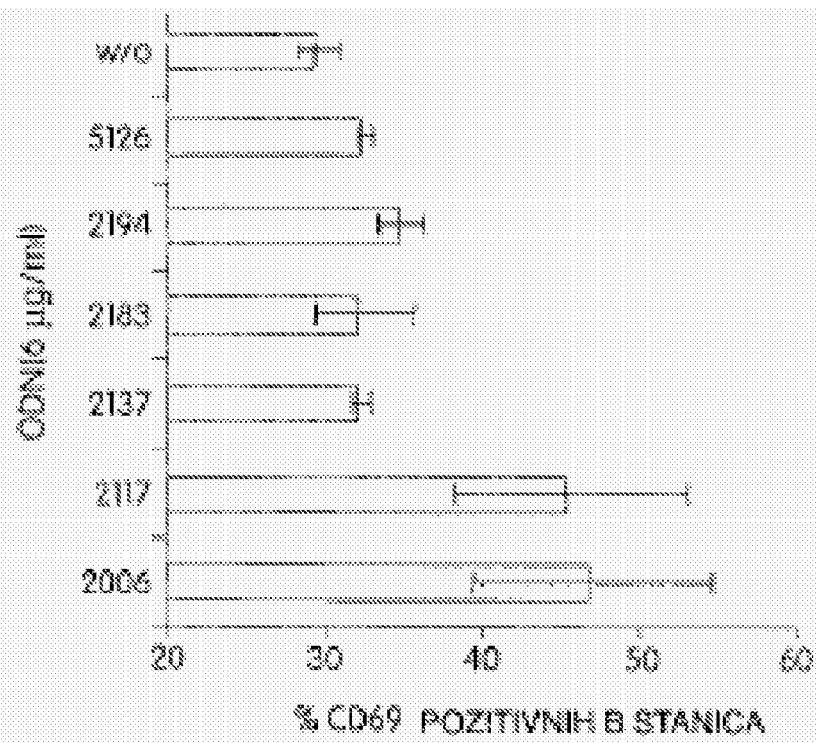
SLIKA 4



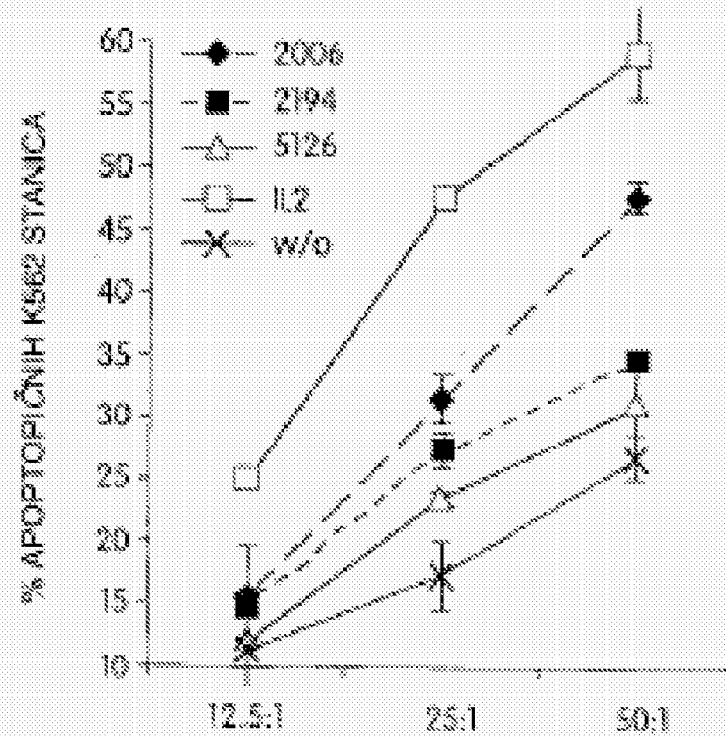
SLIKA 5



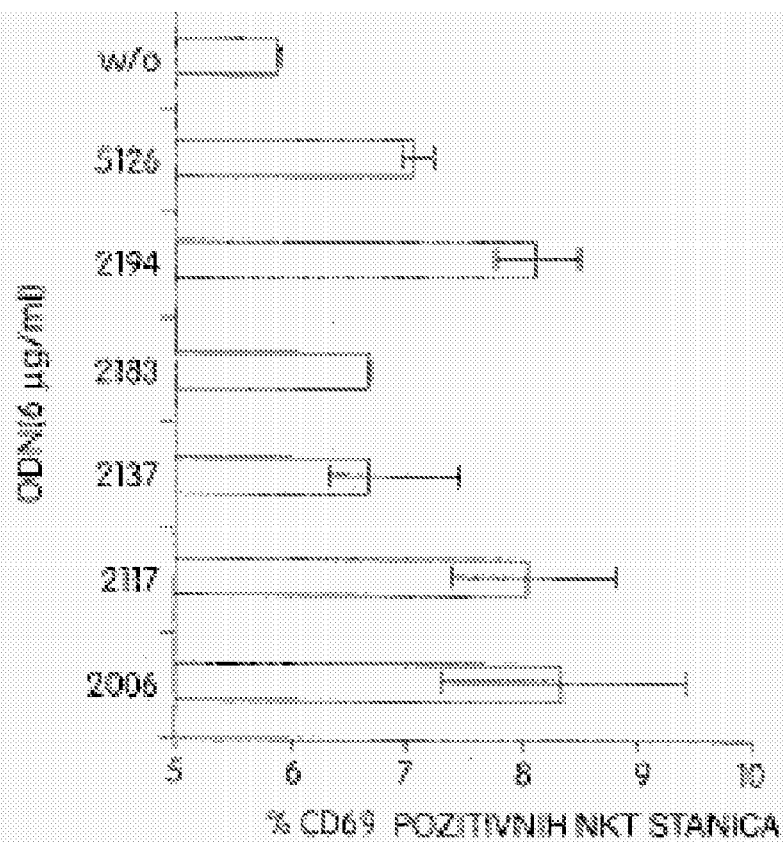
SLIKA 6



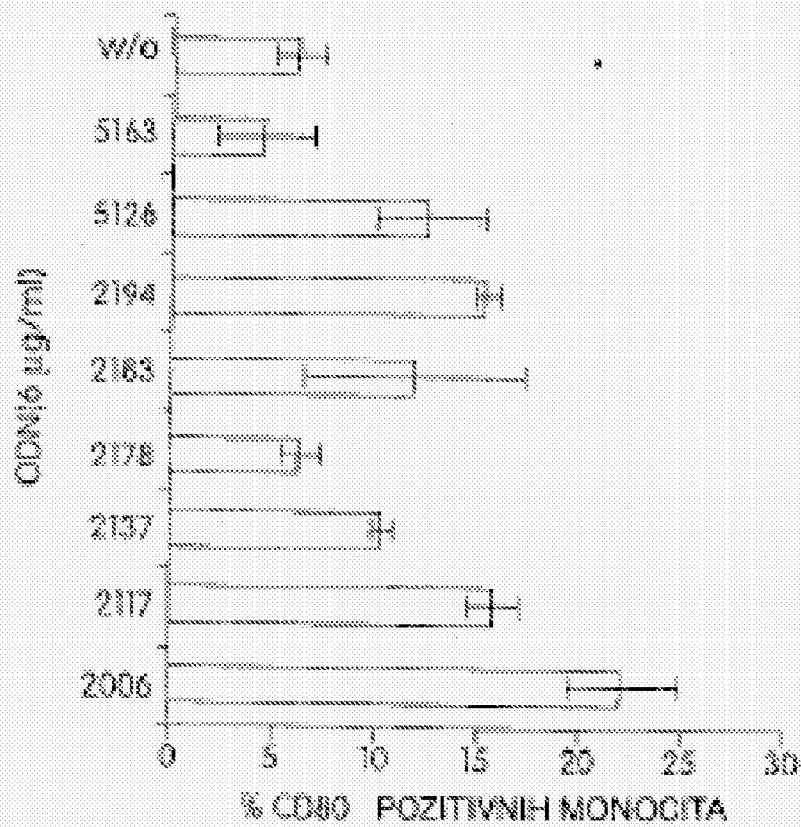
SLIKA 7



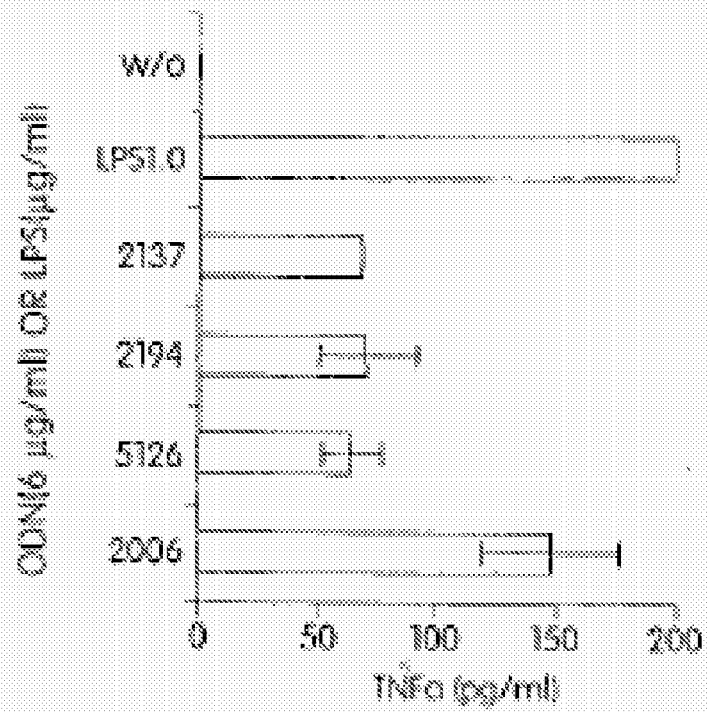
SLIKA 8



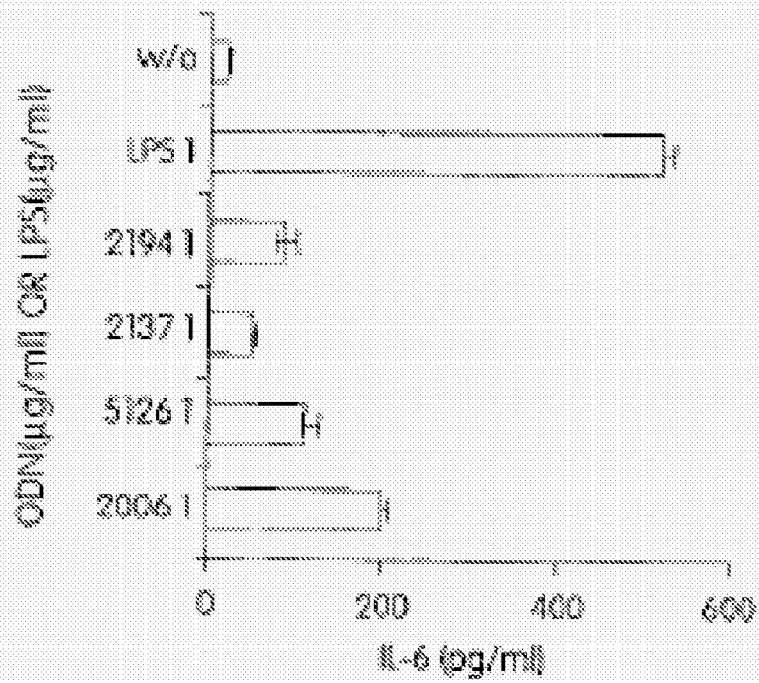
SLIKA 9



SLIKA 10



SLIKA 11



SLIKA 12