



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 32 717 T2 2007.08.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 077 722 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 32 717.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/11359

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 925 754.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/061056

(86) PCT-Anmeldetag: 21.05.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.12.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 28.02.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.08.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.08.2007

(51) Int Cl.⁸: A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

86393 P 22.05.1998 US

(73) Patentinhaber:

Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario,
CA; Coley Pharmaceutical Group, Inc., Wellesley,
Mass., US

(74) Vertreter:

Bohmann & Loosen, 80335 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

MCCLUSKIE, J. Loeb Health Research Inst.,
Michael, Ottawa, Ontario K1Y 4E9, CA; DAVIS, L.,
Heather, Ottawa, Ontario K1S 1T4, CA

(54) Bezeichnung: METHODEN UND PRODUKTE ZUR INDUZIERUNG MUKOSALER IMMUNITÄT

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

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

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Produkte und Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Induktion von Schleimhautimmunität. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von immunstimulierenden Oligonukleotiden, die ein CpG-Motiv enthalten, alleine oder in Kombination mit einem oder mehreren Schleimhautadjuvanzien zur Induktion von Schleimhautimmunität.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Zwei distinkte Kompartimente des Immunsystems sind identifiziert worden: (i) das systemische, das das Knochenmark, die Milz und die Lymphknoten umfasst, und (ii) das mukosale, das das mit den Schleimhautoberflächen und externen sekretorischen Drüsen verbundene Lymphgewebe umfasst (McGhee et al., 1992). Schleimhautoberflächen sind mit den gastrointestinalen (GI), genitourinalen (GU) und respiratorischen Trakten verbunden. Ein jedes Kompartiment ist mit sowohl den humoralen (Antikörper) als auch Zell-vermittelten (zytotoxische T-Zellen) Antworten verbunden, es bestehen jedoch Unterschiede in der Art der Immunantworten, die in einem jeden Kompartiment induziert werden. Mit dem systemischen Kompartiment verbundene Antikörper sind überwiegend vom IgG-Isotyp, die so funktionieren, dass sie Pathogene im Kreislaufsystem neutralisieren. Im Gegensatz dazu sind Antikörper in den Schleimhäuten in erster Linie sekretorisches IgA (S-IgA), was so funktioniert, dass es den Eintritt des Pathogens in den Körper mittels der Schleimhautoberfläche verhindert (Lamm et al., 1992). Systemische Immunität kann den Eintritt von pathogenen Organismen an Schleimhautoberflächen nicht verhindern.

[0003] Eine erfolgreiche systemische Immunisierung (d. h. Abgabe von Antigen an das systemische Kompartiment) wird systemische Immunität induzieren, ergibt aber üblicherweise keine Schleimhautimmunantworten. Im Gegensatz dazu löst Antigen, das an Schleimhautoberflächen abgegeben wird, sowohl Schleimhaut-(an lokalen und manchmal an entfernten Stellen) als auch systemische Antworten aus (Haneberg et al., 1994, Galligan und Rosenthal, 1995).

[0004] Die meisten bis heute entwickelten Vakzine werden parenteral abgegeben, beispielsweise durch intramuskuläre (IM) oder intradermale (ID) Injektion und induzieren als solches in erster Linie systemische Immunität. Der kombinierte Oberflächenbereich der Schleimhaut ist jedoch mehr als 200-Mal größer als der der Haut und ist die Hauptstelle der Übertragung vieler Infektionskrankheiten. Deshalb erlauben derzeitige Vakzinierungsstrategien, dass das Pathogen in den Körper eintritt und bekämpfen es nur, wenn es sich einmal im Kreislauf befindet. Injektions- und Morbiditätsraten könnten verringert werden, wenn eine wirksame Schleimhautimmunität induziert werden könnte. Weiterhin gibt es Belege dafür, dass Schleimhautvakzine einen größeren Altersbereich von Empfängern aufweisen können. Schließlich werden Schleimhautvakzine oftmals durch nicht-invasive Mittel verabreicht (d. h. Nasentropfen, Nasenspray, inhalierter Zerstäuber), sie sind somit leichter und weniger teuer zu verabreichen, benötigen weniger ausgebildetes Personal und bergen auch nicht das Risiko einer Nadelstichverletzung oder Kreuzkontamination (für Übersichten siehe Mestecky et al., 1992, Staats et al., 1994, O'Hagan 1994).

[0005] Wie oben erwähnt ist das Kennzeichen der Schleimhautimmunität die lokale Produktion von S-IgA-Antikörpern. Diese bilden > 80 % aller Antikörper in Schleimhaut-assoziierten Geweben und werden durch Mechanismen induziert, transportiert und gesteuert, die sehr verschieden von jenen der systemischen Antwort sind. IgA ist von überragender Wichtigkeit für die Wirtsverteidigung, da es nicht nur so wirkt, dass es strikten Schleimhautpathogenen widersteht, sondern auch den vielen Mikroorganismen, die initial Schleimhautoberflächen kolonisieren, aber dann eine systemische Erkrankung bedingen. Es scheinen drei Orte der IgA-vermittelten Schleimhautverteidigung zu existieren: (i) im Lumen, wo S-IgA Viren, bakterielle Toxine und Enzyme neutralisieren kann und als eine Schleimhautbarriere dient, um virale Befestigung, mikrobielle Adhärenz und Adsorption von Antigenen zu verhindern; (ii) innerhalb von Epithelzellen, wo dimeres IgA an intrazelluläres Antigen binden kann; (iii) innerhalb der Lamina propria, wo dimeres IgA mit Antigen komplexieren kann und der so gebildete Immunkomplex in das Lumen transportiert wird (Lamm et al., 1992).

[0006] Viele in der Entwicklung befindliche Vakzine sind aus synthetischen oder rekombinanten Antigenen (Peptiden oder Polypeptiden) zusammengesetzt. Diese werden als sicherer als traditionelle attenuierte oder inaktivierte ganze Pathogene betrachtet, sie sind jedoch oft schwach immunogen und benötigen Adjuvanzien, um die spezifische Immunität zu erhöhen. Für die systemische Verabreichung können Aluminiumpräzipitate (Alaun) zu den Antigenen hinzugegeben werden, um die Immunantworten zu erhöhen. Alaun ist derzeit das

einige Adjuvans, das in den meisten Ländern, einschließlich den USA, für die Anwendung bei Menschen lizenziert ist, es ist jedoch nicht für die Abgabe an Schleimhautoberflächen geeignet. Deshalb enthalten die meisten derzeit verwendeten Schleimhautvakzine lebendattuierte Organismen und es wurden nur geringe Erfolge mit der Schleimhautabgabe von Untereinheiten-Vakzinen erzielt.

[0007] Choleratoxin (CT) ist das in Tiermodellen am häufigsten verwendete Schleimhautadjuvans. CT ist das primäre Enterotoxin, das von *Vibrio cholerae* produziert wird. Es ist ein polymeres Protein mit 84 Kilon Dalton, das aus zwei Untereinheiten besteht, einer monomeren A-Untereinheit und einer B-Untereinheit, die die Form eines fünfgliedrigen Ringes aufweist. Die B-Untereinheit bindet GM1-Ganglioside an der Oberfläche von Eukaryontenzellen und ermöglicht die Einführung der A-Untereinheit in das Zytosol, wo es das GTP-bindende regulatorische Protein, das mit Adenylylatcyclase verbunden ist, ADP-ribosyliert (Spangler, 1992).

[0008] CT verstärkt die Antigenpräsentation durch Makrophagen, Epithelzellen und B-Zellen, fördert die Differenzierung und das Isotyp-Umschalten in B-Zellen und weist komplexe inhibitorische und stimulierende Wirkungen auf die T-Zell-Proliferation und Lymphokin-Produktion auf (Snider, 1995). Einige Gruppen berichten, dass CT selektiv CD4+-T-Zellen vom Th2-Typ aktivieren kann, wohingegen Zellen vom Th1-Typ inhibiert werden (Takahashi et al., 1996), während andere die Aktivierung von CD4+-T-Zellen sowohl vom Th1- als auch Th2-Typ berichten (Hornquist und Lycke, 1993). Unterschiede können bedingt sein durch eine Anzahl von Faktoren, einschließlich des Immunisierungsweges und der Natur des Antigens.

[0009] Das hitzelabile Enterotoxin von *Escherichia coli* (labiles Toxin, LT) ist strukturell und funktional eng mit CT verwandt und weist ähnliche Adjuvanseigenschaften auf (Lycke et al., 1992). LT kann Immunität gegen co-verabreichte Antigene verleihen, die selbst nicht-immunogen sind, wenn sie über die Schleimhäute verabreicht werden. Dieser Adjuvanseffekt wird festgestellt, ob LT mit dem Antigen einfach gemischt oder physikalisch daran gekoppelt ist (Holmgren et al., 1993).

[0010] Während CT und LT in Tiermodellen als Schleimhautadjuvanzien sehr wirksam sind, sind sie hoch toxisch und insbesondere beim Menschen hoch toxisch. Genetisch detoxifizierte Mutanten von sowohl CT als auch LT sind entwickelt worden unter Verwendung von ortsgesteuerter Mutagenese, die, wenigstens in Tiermodellen, weniger toxisch zu sein scheinen, jedoch etwas an Adjuvanseigenschaft beibehalten (z.B. LTK63, das LT mit einer einzelnen Substitution an Serin-63 ist) (Rappouli et al., 1995, Douce et al., 1994, Pizza et al., 1994, De Haan et al., 1996). Nichtsdestotrotz scheint das Ausmaß der Adjuvanseigenschaft proportional zum Ausmaß der beibehaltenen Toxizität zu sein und es besteht somit ein eindeutiger Bedarf für ein alternatives sicheres und wirksames Schleimhautadjuvans.

[0011] Lipford et al. (Eur. J. Immunol. 1997, 27:2340-2344) berichten, dass CpG-enthaltende Oligonukleotide als Adjuvanzien für sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten verwendet werden können. Die Oligonukleotide und Antigene (OVA und das synthetische Peptid SIINFEKL) wurden in die hinteren Fußballen von murinen Lebewesen injiziert. Serumantikörper und Lymphknoten-CTL-Aktivität wurden untersucht.

[0012] Die veröffentlichte internationale Patentanmeldung WO 98/14210 berichtet über Verfahren zur Behandlung von allergischem Asthma unter Verwendung von Nukleinsäuren, die Asthmainitiierende Antigene codieren. Diese Nukleinsäuren werden an Gewebe verabreicht, die hohe Konzentrationen von Antigen-präsentierenden Zellen enthalten. Die Fähigkeit, die codierten Antigene in Antigen-präsentierenden Zellen zu exprimieren, aber nicht zu sekretieren, erhöht nach Berichten die Antigentoleranz.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft Produkte zum Induzieren von Immunantworten unter Verwendung von immunstimulierenden CpG-Dinukleotide enthaltenden Oligonukleotiden. In einem Aspekt ist die Erfindung eine Zusammensetzung zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort. Dieser Aspekt umfasst die Verwendung eines Oligonukleotids, das eine Sequenz aufweist, die wenigstens die folgende Formel umfasst:

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3'

wobei C nicht-methyliert ist, X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung an eine Schleimhautoberfläche eines Lebewesens, das einem Antigen ausgesetzt ist, zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort gegen das Antigen in dem Lebewesen.

[0014] In einer Ausführungsform ist das Antigen nicht in einem Nukleinsäurevektor codiert. In einer weiteren Ausführungsform ist das Antigen durch einen Nukleinsäurevektor codiert.

[0015] In einigen Ausführungsformen der Erfindung weist das Oligonukleotid ein Rückgrat auf, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Phosphodiester Rückgrat und einem chimären Rückgrat. In anderen Ausführungsformen weist das Oligonukleotid ein Phosphothioat Rückgrat auf. Bei den Ausführungsformen, wo das Oligonukleotid ein Phosphothioat Rückgrat aufweist und das Antigen durch einen Nukleinsäurevektor codiert ist und das CpG ein Oligonukleotid ist, ist eine bevorzugte, aber nicht beschränkte Ausführungsform, dass das Plasmid und die Oligonukleotide mit einem kolloidalen Dispersionssystem abgegeben werden. Bei einigen Ausführungsformen ist das kollodale Dispersionssystem ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus makromolekularen Komplexen, Nanokapseln, Mikrosphären, Kugelchen und Lipid-basierten Systemen. In anderen Ausführungsformen sind das Lipid und das Oligonukleotid auf Goldpartikel beschichtet und werden mit einer Gen-Kanone abgegeben.

[0016] In einem weiteren Aspekt wird ein Produkt zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort in einem Lebewesen bereitgestellt. Dieser Aspekt ist ein Produkt, das ein Oligonukleotid mit einer Sequenz, die wenigstens die folgende Formel

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3'

einschließt, wobei C nicht-methyliert ist und X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, ein Antigen und ein Hormon zur gleichzeitigen, separaten oder sequenziellen Verwendung zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort in einem Lebewesen gegen das Antigen umfasst.

[0017] In einer Ausführungsform werden das Antigen und das Oligonukleotid an eine Schleimhautoberfläche des Lebewesens verabreicht. In einer weiteren Ausführungsform wird das Hormon systemisch verabreicht. In einer Ausführungsform ist das Hormon durch einen Nukleinsäurevektor codiert.

[0018] Die Erfindung umfasst in anderen Aspekten Zusammensetzungen zum Induzieren einer Immunantwort. Diese Aspekte umfassen die Verwendung eines Oligonukleotids, das eine Sequenz aufweist, die wenigstens die folgende Formel

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3'

einschließt, wobei C nicht-methyliert ist und X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung an eine Schleimhautoberfläche eines Lebewesens, das auch gegenüber einem Antigen exponiert ist, zum Induzieren einer Schleimhautantwort gegen das Antigen in dem Lebewesen. Die Zusammensetzungen können oral, intranasal, okular, vaginal oder rektal verabreicht werden.

[0019] In einigen Ausführungsformen wird das Antigen oral, intranasal, okular, vaginal oder rektal verabreicht. In anderen Ausführungsformen wird das Antigen gleichzeitig mit dem Oligonukleotid verabreicht. Bevorzugterweise wird das Oligonukleotid in einer wirksamen Menge zum Induzieren von Schleimhautimmunität verabreicht.

[0020] Die Verabreichung von Zusammensetzungen und Produkten der Erfindung führt zu einer Induktion von Schleimhautimmunität. Schleimhautimmunität kann an einer lokalen und/oder entfernten Stelle induziert werden. In einigen Ausführungsformen wird die Schleimhautimmunität an einer lokalen Stelle induziert und bei anderen wird die Schleimhautimmunität an einer entfernten Stelle induziert, oder beides.

[0021] Um eine Schleimhautimmunantwort zu induzieren, kann das CpG-Oligonukleotid mit einer Aktivierungsdoxis, einer Auffrischungsdoxis oder beiden verabreicht werden. Beispielsweise kann das CpG-Oligonukleotid mit einer Aktivierungsdoxis des Antigens verabreicht werden. In einer weiteren Ausführungsform wird das CpG-Oligonukleotid mit einer Auffrischungsdoxis des Antigens verabreicht. In einigen Ausführungsformen wird dem Lebewesen eine Aktivierungsdoxis des Antigens und des CpG-Oligonukleotids vor der Auffrischungsdoxis verabreicht. In noch weiteren Ausführungsformen wird dem Lebewesen eine Auffrischungsdoxis des Antigens und CpG-Oligonukleotids nach der Aktivierungsdoxis verabreicht.

[0022] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer Zusammensetzung zum Induzieren einer systemischen Immunantwort. Dieser Aspekt umfasst die Verwendung eines Oligonukleotids mit einer Sequenz, die wenigstens die folgende Formel

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3'

einschließt, wobei C nicht-methyliert ist und X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, und eines Antigens, das nicht in einem Nukleinsäurevektor codiert ist, für die Herstellung eines Medikaments für die gleichzeitige, separate oder sequenzielle Verabreichung an eine Schleimhautoberfläche eines Lebewesens zum Induzieren einer systemischen Immunantwort gegen das Antigen. In einer Ausführungsform produziert das Antigen keine systemische Immunantwort, wenn es an die Schleimhautoberfläche alleine abgegeben wird.

[0023] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Produkt zum Induzieren einer systemischen Immunantwort bereitgestellt. Dieser Aspekt umfasst ein Oligonukleotid mit einer Sequenz, die wenigstens die folgende Formel



einschließt, wobei C nicht-methyliert ist und X_1 , X_2 , X_3 und X_4 Nukleotide sind, und ein Nicht-Oligonukleotid-Adjuvans, für die gleichzeitige, separate oder sequenzielle Verabreichung an eine Schleimhautoberfläche eines Lebewesens, das einem Antigen ausgesetzt ist, zum Induzieren einer systemischen Immunantwort gegen das Antigen.

[0024] In einer Ausführungsform wird das Antigen an eine Schleimhautoberfläche abgegeben. In einer weiteren Ausführungsform ist das Antigen nicht in einem Nukleinsäurevektor codiert.

[0025] Das Lebewesen kann dem Antigen aktiv oder passiv ausgesetzt sein. In einer Ausführungsform der Verwendung der Produkte und Zusammensetzungen, wie sie hierin beschrieben ist, ist das Lebewesen dem Antigen aktiv ausgesetzt und das Antigen wird an eine Schleimhautoberfläche abgegeben. In anderen Ausführungsformen wird das Antigen zusammen mit dem Oligonukleotid verabreicht. Das Antigen kann alleine oder zusammen mit einem Kolloiddispersionssystem abgegeben werden. In einigen Ausführungsformen ist das kolloide Dispersionssystem ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus makromolekularen Komplexen, Nanokapseln, Mikrosphären, Kugelchen und Lipid-basierten Systemen. Lipid-basierte Systeme umfassen optional Öl-in-Wasser-Emulsionen, Mizellen, gemischte Mizellen oder Liposome.

[0026] In weiteren Ausführungsformen ist das Lebewesen dem Antigen passiv durch Umweltkontakt ausgesetzt. Das Lebewesen, das dem Antigen passiv ausgesetzt ist, ist in einigen Ausführungsformen ein Lebewesen, für das ein Risiko besteht, dass es eine allergische Reaktion, eine infektiöse Krankheit oder einen Krebs entwickelt. In anderen Ausführungsformen weist das Lebewesen eine infektiöse Krankheit, einen Krebs, eine Allergie auf oder ist asthmatisch.

[0027] Das Antigen, das dem Lebewesen passiv oder aktiv verabreicht wird, ist irgendeine Art von in der Technik bekanntem Antigen und umfasst beispielsweise Zellen, Zellextrakte, Proteine, Polypeptide, Peptide, Polysaccharide, Polysaccharid-Konjugate, Peptidomimetika von Polysacchariden, Lipide, Glycolipide, Kohlenhydrate, Allergene, Viren und virale Extrakte und multizelluläre Organismen, wie beispielsweise Parasiten. In einer Ausführungsform wird das Antigen aus einem infektiösen Organismus gewonnen, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus infektiösen Bakterien, infektiösen Viren, infektiösen Parasiten und infektiösen Pilzen.

[0028] Die Verwendung der Produkte oder Zusammensetzungen der Erfindung kann auch den Schritt der Verabreichung von einem Nicht-Oligonukleotid-Schleimhautadjuvans zusammen mit dem Antigen umfassen. Nicht-Oligonukleotid-Schleimhautadjuvantien können, beispielsweise, Choleratoxin, Derivate von Choleratoxin, labiles Toxin, Derivate von labilem Toxin, Alaun, MLP, MDP, Saponine wie beispielsweise QS21, Zytokine, Öl-in-Wasser- und andere Emulsionsformulierungen wie beispielsweise MF59, SAF, Montanid ISA 720 und PROVAX, PCPP-Polymeren und ISCOMS umfassen.

[0029] In anderen Ausführungsformen umfasst die Verwendung der Produkte oder Zusammensetzungen den Schritt der Verabreichung eines Zytokins oder eines B-7-co-stimulierenden Moleküls an das Lebewesen.

[0030] In einigen Ausführungsformen wird das Oligonukleotid oral, mukosal, okular, vaginal, rektal oder durch Inhalation einem Lebewesen verabreicht.

[0031] Das Oligonukleotid kann modifiziert sein. Beispielsweise weist in einigen Ausführungsformen wenigstens ein Nukleotid eine Phosphatrückgrat-Modifikation auf. Die Phosphatrückgrat-Modifikation kann eine Phosphothioat- oder ein Phosphodithioat-Modifikation sein. In einigen Ausführungsformen tritt die Phosphatrückgrat-Modifikation an der 5'Stelle des Oligonukleotids oder der 3'-Stelle des Oligonukleotids auf.

[0032] Das Oligonukleotid kann eine beliebige Größe aufweisen. Bevorzugterweise weist das Oligonukleotid 8 bis 100 Nukleotide auf. In anderen Ausführungsformen weist das Oligonukleotid eine Länge von 8 bis 40 Nukleotiden auf.

[0033] In einigen Ausführungsformen sind $X_1 X_2$ Nukleotide, die aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT und TpG; und $X_3 X_4$ sind Nukleotide ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA und CpA.

Bevorzugterweise ist X_1X_2 GpA oder GpT und X_3X_4 TpT. In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist X_1 oder X_2 oder beide ein Purin und X_3 oder X_4 oder beide Pyrimidine oder X_1X_2 GpA und X_3 oder X_4 oder beide ein Pyrimidin. In einer Ausführungsform ist X_2 T und X_3 ein Pyrimidin. Das Oligonukleotid kann isoliert oder synthetisch sein.

[0034] In einigen Ausführungsformen weist das Oligonukleotid eine Sequenz auf, die wenigstens die folgende Formel

5' TCNTX₁X₂CGX₃X₄ 3'

einschließt, wobei X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, N eine Nukleinsäuresequenz ist, die aus 0–25 Nukleotiden zusammengesetzt ist.

[0035] In anderen Aspekten umfasst die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen für die orale, intranasale, okulare, vaginale oder rektale Verabreichung von CpG-Oligonukleotiden. In einem Aspekt ist die Zusammensetzung eine orale Formulierung eines CpG-Oligonukleotids in einem Puffer zum Neutralisieren biologischer Säuren. In einem weiteren Aspekt ist die Zusammensetzung eine intranasale Formulierung eines CpG-Oligonukleotids in einem Aerosol. In anderen Aspekten ist die Zusammensetzung eine Vaginal- oder Rektalformulierung eines CpG-Oligonukleotids in einem Suppositorium oder anderem Vehikel, das für die Abgabe an Vaginal- und Rektalgewebe geeignet ist. In einem weiteren Aspekt ist die Zusammensetzung eine Okularformulierung eines CpG-Oligonukleotids in einer Lösung, die mit dem Auge kompatibel ist. Derartige Formulierungen sind hierin ebenso wie in Remingtons Pharmaceutical Sciences beschrieben.

[0036] Eine jede der Beschränkungen der Erfindung kann verschiedene Ausführungsformen der Erfindung umfassen. Es wird deshalb angenommen, dass eine jede der Beschränkungen der Erfindung, die irgendein Element oder Kombinationen von Elementen umfasst, in einem jeden Aspekt der Erfindung umfasst ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0037] [Fig. 1](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung von verschiedenen Adjuvanzien auf Gesamt-IgG-Titer von anti-HBS zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 oder 10 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90)-Adjuvanzien immunisiert wurden.

[0038] [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, das die Wirkung von verschiedenen Adjuvanzien auf Gesamt-IgG-Titer von anti-HBS zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90)-Adjuvanzien immunisiert wurden und nach 8 Wochen die Mäuse in der gleichen Art und Weise, wie sie aktiviert wurden, aufgefrischt wurden.

[0039] [Fig. 3](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung von verschiedenen Adjuvanzien auf anti-HBs-IgG-Isootyp zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90)-Adjuvanzien (1 µg) immunisiert wurden und nach 8 Wochen die Mäuse in der gleichen Art und Weise, wie sie aktiviert wurden, aufgefrischt wurden.

[0040] [Fig. 4](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Adjuvanzien auf HBsAg-spezifische CTL-Antwort zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (10 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90)-Adjuvanzien bei verschiedenen Dosen (1 oder 10 µg) immunisiert wurden und vier Wochen nach Immunisierung die Mäuse durch eine Halothan-Überdosis getötet, die Splenocyten isoliert und HBsAG-spezifische CTL-Aktivität gemessen wurde.

[0041] [Fig. 5](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Adjuvanzien auf anti-HBs-IgA-Titer in Lungenspülungen zeigt, wobei die BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 oder 10 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90)-Adjuvanzien bei verschiedenen Dosen (1 oder 10 µg) immunisiert wurden und vier Wochen nach der Immunisierung (oder nach Auffrischung für die Gruppe, die mit * markiert ist) die Mäuse durch eine Halothan-Überdosis getötet und die Lungen mit 1 ml TBS gespült wurden.

[0042] [Fig. 6](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung von verschiedenen Adjuvanzien auf anti-HBs-IgA-Titer bei Stuhlpelletlösungen zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 oder 10 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) bei verschiedenen Dosen (1 oder 10 µg) immunisiert wurden und vier Wochen nach Immunisierung (oder nach Auf-

frischung für die Gruppe, die mit * markiert ist) die Mäuse für 24 Stunden isoliert und Stuhlpellets gesammelt und in TBS bei 0,1 mg/ml resuspendiert wurden.

[0043] [Fig. 7](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Adjuvanzien auf dem Gesamt-IgG-Titer von anti-HBs zeigt, wobei BALB/c-Mäuse durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT), Escherichia coli-Hitze-labilem Enterotoxin (LT), der B-Untereinheit von Choleratoxin (CTB), einer detoxifizierten Mutante von Escherichia coli-Hitze-labilem Enterotoxin (LTK63), CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) oder nicht-CpG-Kontrolloligonukleotid (Motiv #1982, SEQ ID NO. 90) als Adjuvanzien (1, 10 oder 500 µg) immunisiert wurden. Bei Gruppen, die reagierten, ergaben alle Mäuse Titer von > 10, ausgenommen im Falle von 10 µg LT, wo nur 1/5 Mäusen reagierte.

[0044] [Fig. 8](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien auf Gesamt-IgG-Titer von anti-HBs zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO.) oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) immunisiert wurden. Die Zahlen an der Spitze eines jeden Balkens gibt das Verhältnis IgGa/IgG1 an.

[0045] [Fig. 9](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien mit verschiedenen Adjuvanzien auf HBsAg-spezifische CTL-Antwort zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), und 4 Wochen nach der Aktivierung die Mäuse durch eine Halothan-Überdosis getötet wurden, die Splenocyten isoliert und die HBsAg-spezifische CTL-Aktivität gemessen wurde.

[0046] [Fig. 10](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien mit verschiedenen Adjuvanzien auf HBsAg-spezifische T-Zellproliferation zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), und 4 Wochen nach der Auffrischung die Mäuse durch eine Halothan-Überdosis getötet wurden, die Splenocyten isoliert und HBsAg-spezifische T-Zellproliferation gemessen wurde.

[0047] [Fig. 11](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien mit verschiedenen Adjuvanzien auf anti-HBs-IgA-Titer in Lungenspülungen zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90). Vier Wochen nach der Auffrischung wurden die Mäuse durch eine Halothan-Überdosis getötet und die Lungen mit 1 ml TBS gespült.

[0048] [Fig. 12](#) ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien mit verschiedenen Adjuvanzien auf anti-HBs-IgA-Titer im Speichel zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inha-

lation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90). Vier Wochen nach der Auffrischung wurden den Tieren 100 µl 0,5% Pilocarpin-Hydrochloridlösung injiziert und Speichel gesammelt.

[0049] **Fig. 13** ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien mit verschiedenen Adjuvanzien auf anti-HBs-IgA-Titer in Stuhlpelletlösungen zeigt, wobei BALB/c-Mäuse immunisiert wurden: (i) durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden, oder durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90), oder (ii) durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT)- und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) und nach 4 Wochen wie bei der Aktivierung aufgefrischt wurden oder durch IM-Injektion mit HBsAg (1 µg) in Kombination mit Alaun plus CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90). Vier Wochen nach der Auffrischung wurden die Tiere für 24 Stunden isoliert und Stuhlpellets gesammelt und in TBS zu 0,1 mg/ml resuspendiert.

Kurze Zusammenfassung der Tabellen

Tabelle 1 listet die immunstimulierenden Oligonukleotidsequenzen auf.

Tabelle 2 listet die Wirkung verschiedener Adjuvanzien auf HBsAg-spezifische Antikörperisotypen auf.

^aBALB/c-Mäuse wurden durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT), Escherichia coli-Hitze-labilen Enterotoxin (LT), der B-Untereinheit von Choleratoxin (CTB), einer detoxifizierten Mutante von Escherichia coli-Hitze-labilem Enterotoxin (LTK63) und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) (1 oder 10 µg) als Adjuvanzien immunisiert.

^bDie Werte geben den geometrischen Gruppenmittelwert (GMT) des ELISA-Endpunktverdünnungstitors für HBsAg-spezifische IgG1 oder IgG2a-Antikörper in Plasma an, das 4 Wochen nach der Immunisierung entnommen war. Die Titer wurden als die höchste Plasmaverdünnung definiert, die zu einem Absorbanzwert führt, der das Zweifache des nicht-Immunplasmas ist, mit einem Ausschlusswert von 0,05.

^cDie Verhältnisse von IgG2a zu IgG1 (IgG2a:IgG1) werden angegeben, wobei ein Wert >1 eine überwiegend Th-1-ähnliche Antwort anzeigt.

^dN/A: Nicht anwendbar, da keine Antikörperantworten nachweisbar.

^e=: Alle Mäuse, die mit diesen Adjuvanzkombinationen immunisiert wurden, starben innerhalb von 96 Stunden. Tabelle 3 listet die Wirkung verschiedener Adjuvanzien auf HBsAg-spezifische IgA-Antworten auf.

^aBALB/c-Mäuse wurden durch IN-Inhalation mit HBsAg (1 µg) ohne oder in Kombination mit Choleratoxin (CT), Escherichia coli-Hitze-labilem Enterotoxin (LT), der B-Untereinheit von Choleratoxin (CTB), einer detoxifizierten Mutante von Escherichia coli-Hitze-labilem Enterotoxin (LTK63) und/oder CpG-Oligonukleotid (Motiv #1826, SEQ ID NO. 90) (1 oder 10 µg) als Adjuvanzien immunisiert. Alle Gruppen enthielten 5 Mäuse, sofern nicht anders angegeben.

^bDie Werte stellen die geometrischen mittleren Titer ± Standardfehler des Mittelwertes (GMT ± SEM) des ELISA-Endpunktverdünnungstitors für HBsAg-spezifische IgA-Antikörper in Lungenspülungen oder Stuhllösungen dar, die 4 Wochen nach der Immunisierung genommen wurden.

^cIgA-Titer in Lungenspülungen wurden als die höchste Verdünnung definiert, die zu einem Absorbanzwert (OD 450) führten, der das Zweifache desjenigen von nicht-immunen Lungenspülungen ist, mit einem Ausschlusswert von 0,05.

^dIgA-Titer in Stuhlextrakten wurden als OD 450 × 10³ oberhalb des Hintergrundes (nicht-immuner Stuhlextrakte) ausgedrückt. Serokonversion wurde als ein Endpunktstiter für Gesamt-IgG > 100 definiert.

^e=: Alle Mäuse, die mit diesen Adjuvanzkombinationen immunisiert wurden, starben innerhalb von 96 Stunden. Tabelle 4 zeigt unterschiedliche mukosale/parenterale Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien, die verwendet wurden, um BALB-c-Mäuse zu immunisieren und fasst die Ergebnisse dahingehend zusammen, welcher Ansatz Antigen-spezifische systemische und Schleimhaut-Immunanworten induzierte.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0050] Die Erfindung betrifft Produkte und Zusammensetzungen, die immunstimulierende CpG-Oligonukleotide umfassen, zur Verwendung bei der Induktion von Immunität. Ein Aspekt der Erfindung basiert auf der Feststellung dass CpG-Oligonukleotide als potente Schleimhautadjuvanzien dienen, um Immunantworten sowohl an lokalen als auch entfernten Stellen gegen ein Antigen zu induzieren, das an das Schleimhautgewebe verabreicht wurde. Diese Feststellung ist überraschend selbst mit Blick auf frühere Beobachtungen, dass das

CpG-Oligonukleotid ein potentes Adjuvans für die systemische Abgabe ist, da bei systemischer Abgabe das Protein alleine nachweisbare Immunantworten induziert, aber bei Abgabe an die Schleimhaut das Protein alleine keine Immunantwort induziert. Wie in den Beispielen unten gezeigt, werden sowohl systemische als auch Schleimhautimmunität durch die Schleimhautabgabe von CpG-Oligonukleotiden induziert. Die systemische Immunität, die in Antwort auf CpG-Oligonukleotide induziert wurde, umfasste sowohl humorale als auch Zell-vermittelte Antworten gegen spezifische Antigene, die nicht in der Lage waren, systemische Immunität zu induzieren, wenn sie alleine an die Schleimhaut verabreicht wurden. Weiterhin induzierten sowohl CpG-Oligonukleotide als auch Choleratoxin (CT, ein Schleimhautadjuvans, das eine Th2-ähnliche Antwort induziert) CTL. Dies ist überraschend, da bei systemischer Immunisierung die Anwesenheit von Th2-ähnlichen Antikörpern normalerweise mit einem Mangel an CTL verbunden ist (Schirmbeck et al., 1995).

[0051] Zusätzlich hat man gefunden, dass CpG-Oligonukleotide eine Schleimhautreaktion sowohl an lokalen (z.B. Lunge) als auch entfernten Schleimhautstellen induziert (z.B. unterer Verdauungstrakt). Obwohl CpG-Oligonukleotid hinsichtlich der Induktion systemischer Antikörper (IgG) und lokaler Schleimhautantikörper (IgA) ähnlich wie CT war, wurden erhebliche Titer an IgA-Antikörper an entfernten Schleimhautstellen nur durch CpG-Oligonukleotide und nicht durch CT induziert. Dies war überraschend, da man allgemein davon ausgeht, dass CT ein hochwirksames Schleimhautadjuvans ist. Eine andere Art und Weise, hinsichtlich derer CpG-Oligonukleotid CT überlegen war, war die Art der Th-Antwort. Wie früher berichtet (Snider 1995) induziert CT überwiegend Antikörper vom IgG1-Isotyp, was eine Antwort vom Th2-Typ anzeigt. Im Gegensatz dazu war CpG-Oligonukleotid eher Th1 mit überwiegend IgG2a-Antikörpern, insbesondere nach Auffrischung oder wenn die zwei Adjuvantien kombiniert wurden. Antikörper vom Th1-Typ weisen im allgemeinen bessere neutralisierende Eigenschaften auf und weiterhin ist eine Th-Antwort in Lungen im höchsten Maße unerwünscht, da sie mit Asthma verbunden ist (Kay, 1996, Hogg, 1997). Die Verwendung von CpG-Oligonukleotid als ein Schleimhautadjuvans weist somit Vorteile auf, die andere Schleimhautadjuvantien nicht erreichen können.

[0052] Die Entdeckung, dass CpG-Oligonukleotid ein sicheres und wirksames Schleimhautadjuvans ist, ist auch deshalb vorteilhaft, weil, obwohl CT ein hochwirksames Schleimhautadjuvans ist, es aber für die Verwendung beim Menschen zu toxisch ist. Eine Maus (~20 g Körpergewicht) kann die toxischen Wirkungen von bis zu 10 µg CT tolerieren, jedoch eine Dosis von so wenig wie 1 bis 5 µg wird beim Menschen (~70 kg Körpergewicht) schwere Diarrhöe verursachen (Jertborn et al., 1992). Tiere, die CpG-Oligonukleotid inhalierten, zeigten keine kurzfristigen Stresszeichen verglichen mit jenen, die HBsAg alleine erhielten, und alle erholteten sich schnell ohne offenkundige langanhaltende Wirkungen. CpG-Oligonukleotid wird bei sehr hohen Dosen (z.B. mehr als 100 µg) sehr gut vertragen, wenn es systemisch oder über die Schleimhaut verabreicht wird. Die Erfindung ist somit in einem Aspekt eine Zusammensetzung zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort in einem Lebewesen. Dieser Aspekt umfasst die Verwendung eines Oligonukleotids mit einer Sequenz, die wenigstens die folgende Formel einschließt:

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3'

wobei C nicht-methyliert ist und X₁, X₂, X₃ und X₄ Nukleotide sind, für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung an eine Schleimhautoberfläche eines Lebewesens, das gegenüber einem Antigen exponiert ist, zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort gegenüber dem Antigen in dem Lebewesen. Das Oligonukleotid, hierin auch als das Oligonukleotid oder das CpG-Oligonukleotid bezeichnet, ist kein Plasmidvektor. Diese Unterscheidungen werden in den unten angegebenen Definitionen verdeutlicht.

[0053] Das CpG-Oligonukleotid ist besonders nützlich als ein prophylaktisches Vakzin für die Induktion von Schleimhautimmunität in einem Lebewesen, für das das Risiko besteht, dass es eine Infektion mit einem infektiösen Organismus entwickelt oder ein Lebewesen, für das das Risiko besteht, eine Allergie oder Krebs zu entwickeln. Ein „Lebewesen, für das ein Risiko besteht“, wie hierin verwendet, ist ein Lebewesen, das eine Art von Risiko einer Exposition gegenüber einem eine Infektion bedingenden infektiösen Pathogen oder einem Allergen oder für die Entwicklung von Krebs aufweist. Beispielsweise kann ein Lebewesen, für das ein Risiko besteht, ein Lebewesen sein, das beabsichtigt, in ein Gebiet zu reisen, wo eine spezielle Art von infektiösem Agens oder Allergen vorgefunden wird, und es kann ein Lebewesen sein, das durch seinen Lebensstil oder durch medizinische Eingriffe Körperflüssigkeiten ausgesetzt ist, die infektiöse Agenzien enthalten können, oder sogar ein Lebewesen, das in einem Gebiet lebt, in dem ein infektiöser Organismus oder ein Allergen identifiziert worden ist. Lebewesen, für die das Risiko besteht, eine Infektion zu entwickeln, können auch allgemein Populationen sein, für die eine Gesundheitsbehörde eine Vakzinierung mit einem spezifischen infektiösen Organismusantigen empfiehlt. Wenn das Antigen ein Allergen ist und das Lebewesen allergische Reaktionen auf das spezielle Antigen entwickelt und das Lebewesen dem Antigen ausgesetzt ist, beispielsweise während der Pollensaison, dann besteht für dieses Lebewesen das Risiko, dass es dem Antigen ausgesetzt wird. Lebewesen, für die das Risiko besteht, dass sie Krebs entwickeln, umfassen jene mit einer genetischen Prädisposition oder jene, die zuvor wegen Krebs behandelt worden sind, und jene, die Karzinogenen, wie beispielsweise Ta-

bak, Asbest und anderen chemischen Toxinen, oder exzessivem Sonnenlicht oder andere Arten von Strahlung ausgesetzt sind.

[0054] Zusätzlich zur Verwendung des CpG-Oligonukleotids für die prophylaktische Behandlung umfasst die Erfindung auch die Verwendung von CpG-Oligonukleotid für die Behandlung eines Lebewesens, das unter einer Infektion, einer Allergie oder einem Krebs leidet.

[0055] Ein „Lebewesen mit einer Infektion“ ist ein Lebewesen, das einem infektiösen Pathogen exponiert worden ist und akute oder chronische nachweisbare Titer des Pathogens im Körper aufweist. Das CpG-Oligonukleotid kann mit einem Antigen verwendet werden, um eine Antigen-spezifische Schleimhautimmunantwort zu steigern, die in der Lage ist, den Titer des infektiösen Agens zu verringern oder es zu beseitigen. Eine infektiöse Erkrankung, wie hierin verwendet, ist eine Erkrankung, die aus der Anwesenheit eines Fremdorganismus im Körper heraus entsteht. Es ist besonders wichtig, wirksame Vakzinierungsstrategien und Behandlungen zu entwickeln, um die Schleimhautoberflächen des Körpers, die die primäre Eintrittspforte für Pathogene ist, zu schützen.

[0056] Ein „Lebewesen, das unter einer Allergie leidet“, ist ein Lebewesen, das eine allergische Reaktion in Antwort auf ein Allergen zeigt oder ein Risiko aufweist, diese zu entwickeln. Eine „Allergie“ bezeichnet eine erworbene Hyperüberempfindlichkeit gegenüber einer Substanz (Allergen). Allergische Zustände umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Ekzeme, Rhinitis allergica oder Nasenschleimhautentzündung, Heuschnupfen, Konjunktivitis, bronchiales Asthma, Nesselfieber (Urtikaria) und Lebensmittelallergien, und andere atopische Zustände.

[0057] Derzeit werden allergische Erkrankungen im allgemeinen durch die Injektion geringer Dosen von Antigen behandelt, gefolgt von nachfolgenden sich steigernden Antigendosierungen. Man nimmt an, dass diese Verfahrensweise eine Tolerierung gegenüber dem Allergen induziert, um weitere allergische Reaktionen zu verhindern. Diese Verfahren können jedoch mehrere Jahre brauchen, um wirksam zu sein und sind mit dem Risiko von Nebenwirkungen verbunden, wie beispielsweise anaphylaktischem Schock. Die Verfahren der Erfindung vermeiden diese Probleme.

[0058] Allergien werden im allgemeinen durch die Erzeugung von IgE-Antikörpern gegen harmlose Allergene verursacht. Die Cytokine, die durch Schleimhautverabreichung von nicht-methylierten CpG-Oligonukleotiden induziert werden, sind vorwiegend von einer Klasse, die als „Th1“ (Beispiele hierfür sind IL-12 und IFN- γ) bezeichnet werden und diese induzieren sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten. Die Arten von mit einer Th1-Antwort verbundenen Antikörpern sind im allgemeinen schützender Natur, da sie eine hohe Neutralisierungs- und Opsonisierungs-Fähigkeit aufweisen. Der andere Haupttyp von Immunantwort, der mit der Produktion von IL-4-, IL-5- und IL-10-Cytokinen verbunden ist, wird als Th2-Immunantwort bezeichnet. Th2-Antworten umfassen ausschließlich Antikörper und diese haben eine geringere schützende Wirkung gegen Infektion und einige Th2-Isotypen (z.B. IgE) sind mit Allergie verbunden. Im allgemeinen scheint es so zu sein, dass allergische Erkrankungen durch Immunantworten vom Typ Th2 vermittelt sind, wohingegen Th1-Antworten den besten Schutz gegen Infektion bereitstellen, obwohl exzessive Th1-Antworten mit Autoimmunerkrankung verbunden sind. Auf der Grundlage der Fähigkeit der CpG-Oligonukleotide, die Immunantwort in einem Lebewesen von einer Th2 (die mit der Produktion von IgE-Antikörpern und Allergie verbunden ist) zu einer Th1-Antwort zu verschieben (die vor allergischen Reaktionen schützt), kann eine wirksame Menge eines CpG-Oligonukleotids zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort einem Lebewesen verabreicht werden, um eine Allergie zu behandeln oder zu verhindern.

[0059] Das CpG-Oligonukleotid weist somit einen erheblichen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von allergischen Zuständen wie beispielsweise Asthma auf. Die Th2-Cytokine, insbesondere IL-4 und IL-5 sind bei dem Atemwegen von asthmatischen Lebewesen erhöht. Diese Cytokine fördern wichtige Aspekte der asthmatischen entzündlichen Antwort, einschließlich des Umschaltens von IgE-Isotypen, der eosinophilen Chemoataxis und Aktivierung und Mastzellwachstum. Th1-Cytokine, insbesondere IFN- γ und IL-12, können die Bildung von Th2-Klonen und die Produktion von Th2-Cytokinen unterdrücken. „Asthma“ bezeichnet eine Störung des Atemsystems, das durch Entzündung, Verengen der Atemwege und erhöhte Aktivität der Atemwege gegenüber inhalierten Agensien gekennzeichnet ist. Asthma ist häufig, gleichwohl nicht ausschließlich mit atopischen oder allergischen Symptomen verbunden.

[0060] Ein „Lebewesen mit einem Krebs“ ist ein Lebewesen, das nachweisbare Krebszellen aufweist. Der Krebs kann ein maligner oder nicht-maligner Krebs sein. Krebs oder Tumoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Gallengangkrebs; Hirnkrebs; Brustkrebs; Gebärmutterhalskrebs; Chorionkarzinom; Kolonkrebs;

Endometriumkrebs; Endometriumkrebs; Speiseröhrenkrebs; Magenkrebs; intraepitheliale Neoplasmen; Lymphome; Leberkrebs; Lungentumoren (z.B. kleinzelliger und nicht-kleinzelliger); Melanom; Neuroblastome; Mundkrebs; Eierstockkrebs; Pankreaskrebs; Prostatakrebs; Rektumkrebs; Sarkome; Hautkrebs; Hodenkrebs; Schilddrüsenkrebs und Nierenkrebs; ebenso wie andere Karzinome und Sarkome.

[0061] Ein „Lebewesen“ soll einen Menschen oder ein Wirbeltier bezeichnen, einschließlich aber nicht beschränkt auf einen Hund, eine Katze, ein Pferd, eine Kuh, ein Schwein, ein Schaf, eine Ziege, ein Küken, einen Primaten, z.B. ein kleiner Affe, Fische (Aquakulturarten) z.B. Lachs, Ratte und Maus.

[0062] Ein CpG-Oligonukleotid ist ein Oligonukleotid, das wenigstens ein nicht-methyliertes CpG-Dinukleotid umfasst. Ein Oligonukleotid, das wenigstens ein nicht-methyliertes CpG-Dinukleotid umfasst, ist eine Nukleinsäure, die eine nicht-methylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotidsequenz enthält (z.B. „CpG-DNA“ oder DNA, die ein 5' Cytosin gefolgt von einem 3' Guanosin enthält und durch eine Phosphatbildung verbunden ist) und das Immunsystem aktiviert. Die CpG-Oligonukleotide können doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Im allgemeinen sind die doppelsträngigen Moleküle in vivo stabiler, wohingegen einzelsträngige Moleküle eine erhöhte Immunaktivität aufweisen.

[0063] Die Begriffe „Nukleinsäure“ und „Oligonukleotid“ werden hierin in austauschbarer Weise verwendet, um multiple Nukleotide zu bezeichnen (d. h. Moleküle, die einen Zucker (z.B. Ribose oder Desoxyribose) umfassen, der mit einer Phosphatgruppe und einer austauschbaren organischen Base verbunden ist, die entweder ein substituiertes Pyrimidin (z.B. Cytosin (C), Thymin (T) oder Uracil (U)) oder ein substituiertes Purin (z.B. Adenin (A) oder Guanin (G)) ist). Wie hierin verwendet bezeichneten die Begriffe Oligoribonukleotide ebenso wie Oligodesoxyribonukleotide. Die Begriffe sollen auch Polynukleoside umfassen (d. h. ein Polynukleotid minus dem Phosphat) oder irgendein anderes, eine organische Base enthaltendes Polymer. Nukleinsäuremoleküle können aus bestehenden Nukleinsäurequellen (z.B. genomisch oder cDNA) erhalten werden, sind aber bevorzugterweise synthetisch (z.B. hergestellt durch Oligonukleotidsynthese). Das gesamte CpG-Oligonukleotid kann nicht-methyliert sein oder Teile davon können nicht-methyliert sein, aber wenigstens das C des 5' CG 3' muss nicht-methyliert sein.

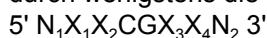
[0064] Mehrere Aspekte der Erfindung können erzielt werden durch Verabreichen eines CpG-enthaltenden Oligonukleotids an das Lebewesen, um eine Schleimhautimmunantwort hervorzurufen. Wie hierin verwendet schließen sich die Begriff ein „CpG-Oligonukleotid“ und ein „Plasmidexpressionsvektor“ wechselseitig aus. Die Begriffe „CpG-Oligonukleotid“ oder „CpG-Nukleinsäuren“ werden verwendet, um irgendeine CpG-enthaltende Nukleinsäure zu bezeichnen, ausgenommen einen CpG-enthaltenden Plasmidvektor. Ein Plasmidexpressionsvektor ist ein Nukleinsäuremolekül, das wenigstens eine Promotor und ein Gen einschließt, das ein Peptid oder Peptidfragment codiert. Der Plasmidexpressionsvektor umfasst eine Nukleinsäuresequenz, die das Peptid codiert, die funktionsfähig mit einer Genexpressionsequenz verbunden ist, die die Expression des Peptids innerhalb einer eukaryontischen Zelle steuert. Die „Genexpressionssequenz“ ist irgendeine regulatorische Nukleotidsequenz, wie beispielsweise eine Promotorsequenz oder Promotor-Enhancer-Kombination, die die wirksame Transkription und Translation des Peptids erleichtert, an die sie in funktionsfähiger Weise gebunden ist. Die Genexpressionssequenz kann, beispielsweise, ein Säugetier- oder viraler Promotor sein, wie beispielsweise ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor. Derartige Konstrukte sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt.

[0065] In einer bevorzugten Ausführungsform liefert die Erfindung ein CpG-Oligonukleotid, das durch wenigstens die Formel



wiedergegeben ist, wobei wenigstens ein Nukleotid konsekutive CpGs voneinander trennt; X₁ Adenin, Guanin oder Thymin ist; X₂ Cytosin, Adenin oder Thymin ist; N ein beliebiges Nukleotid und N₁ und N₂ Nukleinsäuresequenzen sind, die jeweils aus etwa 0 bis 25 Ns zusammengesetzt sind.

[0066] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein isoliertes CpG-Oligonukleotid bereit, das durch wenigstens die Formel:



wiedergegeben ist, wobei wenigstens ein Nukleotid konsekutive CpGs voneinander trennt; X₁X₂ Nukleotide sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT und TpG umfasst; und X₃X₄ Nukleotide sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die TpT, CpT, ApT, tpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA und CpA umfasst; N ein beliebiges Nukleotid ist und N₁ und N₂ Nukleinsäuresequenzen sind, die jeweils aus etwa 0 – 25 Ns zusammengesetzt sind. Bevorzugterweise sind X₁X₂ GpA oder GpT und X₃X₄ TpT. In anderen bevorzugten Ausführungsformen sind X₁ oder X₂ oder beide ein Purin und

X_3 oder X_4 oder beide ein Pyrimidin oder X_1X_2 ist GpA und X_3 oder X_4 oder beide ein Pyrimidin. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten N_1 und N_2 der Nukleinsäure kein CCGG- oder CGCG-Quadmer oder mehr als ein CCG- oder CGG-Trimer. Die Wirkung eines CCGG- oder CGCG-Quadmers oder mehr als einem CCG- oder CGG-Trimer hängt teilweise vom Status des Oligonukleotidrückgrates ab. Beispielsweise wird, wenn das Oligonukleotid ein Phosphodiesterrückgrat oder ein chimäres Rückgrat aufweist, der Einschluss dieser Sequenzen in dem Ribonukleotid nur minimal, wenn überhaupt, die biologische Aktivität des Oligonukleotids beeinträchtigen. Wenn das Rückgrat vollständig Phosphothioat oder im Wesentlichen Phosphothioat ist, dann kann der Einschluss dieser Sequenzen einen größeren Einfluss auf die biologische Aktivität oder die Kinetik der biologischen Aktivität aufweisen. Im Falle, wo das CpG-Oligonukleotid zusammen mit einem Antigen verabreicht wird, das in einem Nukleinsäurevektor codiert ist, ist bevorzugt, dass das Rückgrat des CpG-Oligonukleotids ein Phosphodiester oder Chimär ist. Es kann vollständig Phosphothioat sein, wenn das Oligonukleotid direkt in die Zelle abgegeben wird. Die Zelle kann ein Problem haben mit der Aufnahme eines vollständigen Phosphothioatoligonukleotids in Gegenwart eines Plasmidvektors. Wenn somit sowohl ein Vektor als auch ein Oligonukleotid einem Lebewesen verabreicht werden, ist es bevorzugt, dass das Oligonukleotid ein Phosphodiester- oder chimäres Rückgrat oder ein Phosphothioatrückgrat aufweist, aber mit einem Vehikel verbunden ist, das es direkt in die Zelle abgibt. Derartige Vehikel sind in der Technik bekannt und umfassen, beispielsweise, Liposome und Genkanonen.

[0067] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das CpG-Oligonukleotid die Sequenz 5' TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄ 3' auf.

[0068] Bevorzugterweise umfassen die CpG-Oligonukleotide der Erfindung X₁X₂, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die GpT, GpG, GpA und ApA umfasst, und X₃X₄ ist ausgewählt aus der Gruppe, die TpT, CpT und TpC umfasst. Zur Erleichterung der Aufnahme in die Zellen weisen CpG-enthaltende Oligonukleotide bevorzugterweise eine Länge im Bereich von 8 bis 30 Basen auf. Nukleinsäuren mit einer beliebigen Größe von mehr als 8 Nukleotiden (selbst viele kb lang) sind in der Lage, eine Immunantwort gemäß der Erfindung zu induzieren, wenn ausreichend immunstimulierende Motive vorhanden sind, da größere Nukleinsäuren innerhalb von Zellen zu Oligonukleotiden abgebaut werden. Bevorzugte synthetische Oligonukleotide umfassen keine CCGG- oder CGCG-Quadmer oder nicht mehr als ein CCG- oder CGG-Trimer an oder nicht nahe den 5'- und/oder 3'-Enden. Stabilisierte Oligonukleotide, wo das Oligonukleotid eine Phosphatrückgratmodifikation aufweist, wie detaillierter unten diskutiert, sind ebenfalls bevorzugt. Die Modifikation kann, beispielsweise, eine Phosphothioat- oder Phosphodithioatmodifikation sein. Bevorzugterweise tritt die Phosphatrückgratmodifikation am 5'-Ende der Nukleinsäure auf, beispielsweise an den ersten zwei Nukleotiden des 5'-Endes des Oligonukleotids. Weiter kann die Phosphatrückgratmodifikation am 3'-Ende der Nukleinsäure auftreten (beispielsweise an den letzten fünf Nukleotiden des 3'-Endes der Nukleinsäure). Alternativ kann das Oligonukleotid vollständig oder teilweise modifiziert sein.

[0069] Bevorzugterweise weist das CpG-Oligonukleotid eine Größe im Bereich zwischen 8 und 100 und bevorzugterweise zwischen 8 und 30 Nukleotiden auf. Alternativ können CpG-Oligonukleotide im großen Maßstab in Plasmiden produziert und zu Oligonukleotiden abgebaut werden.

[0070] Das CpG-Oligonukleotid kann einem Lebewesen direkt oder zusammen mit einem Nukleinsäureabgabekomplex verabreicht werden. Ein „Nukleinsäureabgabekomplex“ soll ein Nukleinsäuremolekül bezeichnen, das mit einem Zielmittel (z.B. einem Molekül, das zu einer höher affinen Bindung an eine Zielzelle (z.B. die Oberfläche von dentritischen Zellen) und/oder zellulären Aufnahme durch Zielzellen führt) verbunden ist (z.B. ionisch oder kovalent daran gebunden; oder damit verkapselt). Beispiele für Nukleinsäureabgabekomplexe umfassen Nukleinsäuren, die assoziiert sind mit: einem Sterol (z.B. Cholesterin), einem Lipid (z.B. einem kationischen Lipid, Virosom oder Liposom) oder einem Zielzellen-spezifischen Bindemittel (z.B. einem Liganden, der durch einen Zielzellen-spezifischen Rezeptor erkannt wird). Bevorzugte Komplexe können *in vivo* ausreichend stabil sein, um ein signifikantes Entkoppeln vor der Internalisierung durch die Zielzelle zu verhindern. Bevorzugterweise kann der Komplex unter geeigneten Bedingungen innerhalb der Zelle spaltbar sein, so dass die Nukleinsäure in einer funktionalen Form freigesetzt wird.

[0071] Abgabevehikel zum Abgeben von Antigen an Schleimhautoberflächen sind beschrieben worden. Die CpG-Oligonukleotide und/oder das Antigen kann alleine (z.B. in Saline oder Puffer) oder unter Verwendung von irgendeinem der Abgabevehikel verabreicht werden, die in der Technik bekannt sind. Beispielsweise sind die folgenden Abgabevehikel beschrieben worden: Cochleate (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Emulsomen (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); Liposomen (Childers et al., 1999; Michalek et al., 1989, 1992; de Haan 1995a, 1995b); lebende bakterielle Vektoren (z.B. *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigelly*, *Lactobacil-*

lus) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); lebende virale Vektoren (z.B. 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); Mikrosphären (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); Nukleinsäurevakzine (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishü et al., 1997); Polymere (z.B. Carboxymethylzellulose, Chitosan) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); Polymerringe (Wyatt et al., 1998); Proteosomen (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); Natriumfluorid (Hashi et al., 1998); transgene Pflanzen (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); Virosomen (Gluck et al., 1992, Mengardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); Virus-ähnliche Partikel (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Andere Abgabevehikel sind in der Technik bekannt und einige zusätzliche Beispiele werden unten bei der Diskussion von Vektoren angeführt.

[0072] „Palindromsequenz“ soll eine umgekehrte Wiederholung bezeichnen (d. h. eine Sequenz wie beispielsweise ABCDEE'D'C'B'A', wobei A und A' Basen sind, die in der Lage sind, die üblichen Watson-Crick-Basenpaare auszubilden. In vivo können derartige Sequenzen doppelsträngige Strukturen ausbilden. In einer Ausführungsform enthält das CpG-Oligonukleotid eine Palindromsequenz. Eine Palindromsequenz, wie sie in diesem Zusammenhang verwendet wird, bezeichnet ein Palindrom, bei dem das CpG Teil des Palindroms ist und bevorzugterweise das Zentrum des Palindroms. In einer weiteren Ausführungsform ist das CpG-Oligonukleotid frei von einem Palindrom. Ein CpG-Oligonukleotid, das frei von einem Palindrom ist, ist ein solches, bei dem das CpG-Dinukleotid nicht Teil eines Palindroms ist. Ein derartiges Oligonukleotid kann ein Palindrom enthalten, bei dem das CpG nicht Teil des Palindroms ist.

[0073] Ein „stabilisiertes Nukleinsäuremolekül“ soll ein jegliches Nukleinsäuremolekül bezeichnen, das gegenüber in vivo-Abbau vergleichsweise resistent ist (z.B. vermittels einer Exo- oder Endonuklease). Die Stabilisierung kann eine Funktion der Länge oder Sekundärstruktur sein. Nicht-methylierte CpG-Oligonukleotide, die zehn bis hunderte von kbs lang sind, sind vergleichsweise resistent gegenüber in vivo-Abbau. Bei kürzeren CpG-Oligonukleotiden kann die Sekundärstruktur ihre Wirkung stabilisieren und erhöhen. Beispielsweise wird, wenn das 3'-Ende eines Oligonukleotides eine selbstkomplementäre stromaufwärtige Region aufweist, so dass sie sich zurückfalten und eine kurze Stammschleifenstruktur ausbilden kann, das Oligonukleotid dann stabilisiert und weist deshalb eine größere Aktivität auf.

[0074] Bevorzugte stabilisierte Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung weisen ein modifiziertes Rückgrat auf. Es ist gezeigt worden, dass die Modifikation des Oligonukleotidrückgrates eine erhöhte Aktivität der CpG-Oligonukleotide vorsieht, wenn sie in vivo verabreicht werden. CpG-Konstrukte, die wenigstens zwei Phosphothioatverbindungen am 5'-Ende des Oligonukleotides in multiplen Phosphothioatverbindungen am 3'-Ende enthalten, bevorzugterweise fünf, liefern eine maximale Aktivität und schützen das Oligonukleotid vor Abbau gegenüber intrazellulären Exo- und Endonukleasen. Andere modifizierte Oligonukleotide umfassen Phosphodiester-modifizierte Oligonukleotide, Kombinationen von Phosphodiester und Phosphothioat-Oligonukleotid, Methylphosphonat, Methylphosphothioat, Phosphodithioat und Kombinationen davon. Eine jede dieser Kombinationen und ihre speziellen Wirkungen auf Immunzellen sind detaillierter in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 98/18810 beschrieben, die die Priorität der US-Patentanmeldungen 08/738,652 und 08/960,774, eingereicht am 30. Oktober 1996 bzw. 30. Oktober 1997, beanspruchen. Man geht davon aus, dass diese modifizierten Oligonukleotide eine größere stimulierende Aktivität aufweisen können infolge erhöhter Nukleaseresistenz, erhöhter zellulärer Aufnahme, erhöhter Proteinbindung und/oder geänderter intrazellulärer Lokalisierung.

[0075] Sowohl Phosphothioat- als auch Phosphodiesteroligonukleotide, die CpG-Motive enthalten, sind bei Immunzellen aktiv. Auf der Grundlage der Konzentration, die erforderlich ist, um CpG-spezifische Wirkungen zu induzieren, sind jedoch die Nuklease-resistenten Phosphothioatrückgrat-CpG-Oligonukleotide potenter (2 µg/ml für das Phosphothioat gegenüber insgesamt 90 µg/ml für Phosphodiester).

[0076] Andere stabilisierte Oligonukleotide umfassen: nicht-ionische DNA-Analoga, wie beispielsweise Alkyl- und Arylphosphate (bei denen das geladene Phosphonat-Sauerstoff durch eine Alkyl- oder Arylgruppe ersetzt ist) Phosphodiester und Alkylphosphotriester, bei denen der geladene Sauerstoffteil alkyliert ist. Man hat auch gezeigt, dass Oligonukleotide, die Diol, wie beispielsweise Tetraethylenglykol oder Hexaethylenglykol, entweder an einem oder beiden Enden enthalten, im Wesentlichen gegenüber Nukleaseabbau resistent sind.

[0077] Die Nukleinsäuresequenzen der Erfindung, die als Schleimhautadjuvanzien nützlich sind, sind jene, wie sie oben breit beschrieben und in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 98/18810 offenbartsind, die die Priorität der US-Patentanmeldungen 08/738,652 und 08/960,774 beansprucht, eingereicht am 30. Oktober

1996 bzw. 30. Oktober 1997. Beispielhafte Sequenzen umfassen, sind aber nicht auf die in Tabelle 1 gezeigten immunstimulierenden Sequenzen beschränkt.

Tabelle 1-Sequenzen

GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 1)
GCTAGATGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 2)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 3)

GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 4)
GCATGACGTTGAGCT;	(SEQ ID NO: 5)
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 6)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 7)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 8)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 9)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 10)
GAGAACGCTGGACCTCCAT;	(SEQ ID NO: 11)
GAGAACGCTCGACCTTCAT;	(SEQ ID NO: 12)
GAGAACGCTCGACCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 13)
GAGAACGCTGGACCTTCAT;	(SEQ ID NO: 14)
GAGAACGATGGACCTTCAT;	(SEQ ID NO: 15)
GAGAACGCTCCAGCACTGAT;	(SEQ ID NO: 16)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 17)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 18)
TCCATGACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 19)
TCCATGTCGGTCCTGCTGAT;	(SEQ ID NO: 20)
TCAACGTT;	(SEQ ID NO: 21)
TCAGCGCT;	(SEQ ID NO: 22)
TCATCGAT;	(SEQ ID NO: 23)
TCTTCGAA;	(SEQ ID NO: 24)
CAACGTT;	(SEQ ID NO: 25)
CCAACGTT;	(SEQ ID NO: 26)
AACGTTCT;	(SEQ ID NO: 27)
TCAACGTC;	(SEQ ID NO: 28)
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 29)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 30)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 31)
ATGGAGGCTCCATCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 32)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 33)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 34)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 35)
TCCATGCCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 36)
TCCATGGCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 37)
TCCATGACGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 38)
TCCATGTCGATCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 39)
TCCATGTCGCTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 40)
TCCATGTCGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 41)
TCCATGACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 42)
TCCATAACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 43)
TCCATGACGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 44)
TCCATCACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 45)
GGGGTCAACGTTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 46)
GGGGTCAACGTTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 47)
GCTAGACGTTAGTGT;	(SEQ ID NO: 48)

TCCATGTCGTTCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 49)
ACCATGGACGATCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 50)
TCTCCCAGCGTGCGCCAT;	(SEQ ID NO: 51)
ACCATGGACGAACGTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 52)
ACCATGGACGAGCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 53)
ACCATGGACGACCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 54)
ACCATGGACGTACTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 55)
ACCATGGACGGTCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 56)
ACCATGGACGTTCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 57)
CACGTTGAGGGGCAT;	(SEQ ID NO: 58)
TCAGCGTGCGCC;	(SEQ ID NO: 59)
ATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 60)
TCTCCCAGCGGGCGCAT;	(SEQ ID NO: 61)
TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 62)
TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 63)
TCGTCGCTGTCTCCCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 64)
TCCTGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 65)
TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 66)
TCCATGTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 67)
TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 68)
TCCTTGTCTGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 69)
TCCTGTCGTTTTTGTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 70)
TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 71)
TCGTCGCTGTTGTGTCGTTTCTT;	(SEQ ID NO: 72)
TCCATGCGTGCCTGCGTTTT;	(SEQ ID NO: 73)
TCCATGCGTTGCGTTGCGTT;	(SEQ ID NO: 74)
TCCACGACGTTTCGACGTT;	(SEQ ID NO: 75)
TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 76)
TCGTCGTTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 77)
TCGTCGTTGTCGTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 78)
GCGTGCCTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 79)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 80)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 81)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 82)
TCGTCGTCGTCGTT;	(SEQ ID NO: 83)
TGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 84)
TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 85)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 86)
GTCGYT;	(SEQ ID NO: 87)
TGTCGYT;	(SEQ ID NO: 88)
AGCTATGACGTTCCAAGG;	(SEQ ID NO: 89)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 90)
ATCGACTCTCGAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 92)
TCCATGTCGGTCCTGACGCA;	(SEQ ID NO: 93)
TCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 94)
ATAGGAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 95)

[0078] Der Stimulierungsindex einer speziellen immunstimulierenden CpG-DNA kann in verschiedenen Immunzelltests getestet werden. Bevorzugterweise beträgt der Stimulierungsindex des CpG-Oligonukleotides bezüglich B-Zellproliferation wenigstens etwa 5, bevorzugterweise wenigstens etwa 10, bevorzugterweise

wenigstens etwa 15 und am bevorzugtesten wenigstens etwa 20, wie durch Einbau von ^3H -Uridin in eine murine B-Zellkultur bestimmt, die mit 20 μM Oligonukleotid für 20 h bei 37° C kontaktiert worden ist und mit 1 μCi ^3H -Uridin gepulst wurde; und 4 h später, wie detailliert in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 98/18810 beschrieben, die die Priorität der US-Anmeldungen 08/738,652 und 08/960,774, eingereicht am 30. Oktober 1996 bzw. 30. Oktober 1997, später geerntet und ausgezählt wurde. Zur Verwendung in vivo, beispielsweise, ist es wichtig, dass das CpG-Oligonukleotid in der Lage ist, wirksam die IgA-Expression zu induzieren.

[0079] Das CpG-Oligonukleotid kann zusammen mit einem weiteren Schleimhautadjuvans verabreicht werden. Man hat gemäß der Erfindung festgestellt, dass die Kombination eines CpG-Oligonukleotids und eines Schleimhautadjuvans eine synergistische Immunantwort produziert. Wenn das CpG-Oligonukleotid zusammen mit einem weiteren Adjuvans verabreicht wird, kann das CpG-Oligonukleotid vor, nach und/oder gleichzeitig mit dem anderen Schleimhautadjuvans verabreicht werden. Beispielsweise kann das CpG-Oligonukleotid mit einer Aktivierungsdosis von Antigen verabreicht werden. Ein jedes oder beide der Adjuvanzien können dann mit der Auffrischungsdosis verabreicht werden. Alternativ kann das CpG-Oligonukleotid mit einer Auffrischungsdosis des Antigens verabreicht werden. Ein jedes oder beide Adjuvanzien können dann mit der Aktivierungsdosis verabreicht werden.

[0080] Zusätzlich hat man festgestellt, dass Schleimhautimmunität induziert werden kann, solange eine der Dosierungen von CpG-Oligonukleotid an eine Schleimhautoberfläche verabreicht wird. Andere Dosen können systemisch oder mucosal verabreicht werden, ohne die Induktion der Immunantwort zu beeinträchtigen. Beispielsweise kann das Lebewesen durch Schleimhautabgabe von Antigen und CpG-Oligonukleotid hinsichtlich seines Immunsystems aktiviert werden, mit oder ohne andere Schleimhautadjuvanzien, und durch einen parenteralen (z.B. intramuskulären, intradermalen oder subkutanen) Verabreichungsweg des Antigens alleine aufgefrischt werden, mit CpG-Oligonukleotide, mit einem Nicht-Oligonukleotidadjuvans oder einer Kombination von Adjuvanzien, die CpG-Oligonukleotid einschließen können oder auch nicht. Alternativ kann die Aktivierungsdosis parenteral verabreicht und mucosal aufgefrischt werden unter Verwendung der Erfindung. All diese Ansätze können starke systemische und Schleimhautimmunantworten induzieren. Die Verfahren der Erfindung umfassen somit die Verabreichung von wenigstens einer Dosis, entweder als Aktivierung oder Auffrischung oder beides, an die Schleimhautoberfläche. Die andere Dosen von CpG-Oligonukleotid könne mucosal oder systemisch verabreicht werden.

[0081] Eine „Aktivierungsdosis“ ist die erste Dosis eines Antigens, das einem Lebewesen verabreicht wird. Im Falle eines Lebewesens, das eine Infektion aufweist, kann die Aktivierungsdosis die anfängliche Exposition des Lebewesens gegenüber der infektiösen Mikrobe (passive Exposition) sein und somit wird die folgende absichtliche Verabreichung des Antigens (aktive Exposition) mit CpG-Oligonukleotid die Auffrischungsdosis. Eine „Auffrischungsdosis“ ist eine zweite oder dritte, etc. Dosis von Antigen, die einem Lebewesen verabreicht worden ist, das bereits gegenüber dem Antigen exponiert war. In einigen Fällen ist die Aktivierungsdosis, die mit dem CpG-Oligonukleotid verabreicht wird, so wirksam, dass eine Auffrischungsdosis nicht erforderlich ist, um ein Lebewesen vor einer Infektion zu schützen, für das ein Risiko besteht, dass es infiziert wird.

[0082] Das Lebewesen wird gegenüber dem Antigen exponiert. Wie hierin verwendet bezeichnet der Begriff „exponiert gegenüber“ entweder den aktiven Schritt des Kontaktierens des Lebewesens mit einem Antigen oder die passive Exposition des Lebewesens gegenüber dem Antigen in vivo. Verfahren für die aktive Exposition eines Lebewesens gegenüber einem Antigen sind in der Technik gut bekannt. Im Allgemeinen wird ein Antigen direkt dem Lebewesen durch ein beliebiges Mittel wie beispielsweise intravenöse, intramuskuläre, orale, transdermale, mucosale, intranasale, intratracheale, oder subkutane Verabreichung verabreicht. Das Antigen kann systemisch oder lokal verabreicht werden. Verfahren zur Verabreichung des Antigens und des CpG-Oligonukleotids sind detaillierter unten beschrieben. Ein Lebewesen wird gegenüber einem Antigen passiv exponiert, wenn ein Antigen für die Exposition gegenüber den Immunuzellen im Körper verfügbar wird. Ein Lebewesen kann gegenüber einem Antigen passiv exponiert werden, beispielsweise, bei Eintritt eines fremden Pathogens in den Körper oder durch die Entwicklung einer Tumorzelle, die ein fremdes Antigen auf ihrer Oberfläche exprimiert. Wenn ein Lebewesen einem Antigen gegenüber passiv exponiert wird, ist es bevorzugt, dass bei einigen Ausführungsformen das CpG-Oligonukleotid ein Oligonukleotid mit einer Länge vom 8 bis 100 Nukleotiden ist und/oder ein Phosphat-modifiziertes Rückgrat aufweist.

[0083] Die Verfahren, bei denen ein Lebewesen einem Antigen gegenüber passiv exponiert wird, können insbesondere von der Wahl des richtigen Zeitpunktes des CpG-Oligonukleotids abhängig sein. Beispielsweise kann, bei einem Lebewesen, für das das Risiko besteht, dass es einen Krebs oder eine infektiöse Krankheit oder eine allergische oder asthmatische Reaktion entwickelt, dem Lebewesen das CpG-Oligonukleotid regelmäßig verabreicht werden, wenn das Risiko am größten ist, d. h. während der Allergiesaison oder nach Expo-

sition gegenüber einem Krebs erzeugenden Agens. Zusätzlich kann das CpG-Oligonukleotid Reisenden verabreicht werden, bevor sie in fremde Länder reisen, wo das Risiko besteht, dass sie infektiösen Agenzien ausgesetzt sind. In ähnlicher Weise kann das CpG-Oligonukleotid Soldaten oder Zivilisten verabreicht werden, für die das Risiko besteht, dass sie biologischen Waffen ausgesetzt werden, um eine Schleimhautimmunreaktion auf das Antigen zu induzieren, wenn und sofern das Lebewesen diesem gegenüber exponiert wird.

[0084] Ein „Antigen“, wie hierin verwendet, ist ein Molekül, das in der Lage ist, eine Immunantwort zu produzieren. Antigene umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Zellen, Zellextrakte, Proteine, Polypeptide, Peptide, Polysaccharide, Polysaccharidkonjugate, Peptidomimetika von Polysacchariden, Lipide, Glykolipide, Kohlenhydrate, Viren und virale Extrakte und multizelluläre Organismen, wie beispielsweise Parasiten und Allergene. Der Begriff Antigen umfasst breit eine jegliche Art von Molekül, das von einem Wirtsimmunsystem als fremd erkannt wird. Antigene umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Krebsantigene, mikrobielle Antigene und Allergene.

[0085] Ein „Krebsantigen“, wie hierin verwendet, ist eine Verbindung, wie beispielsweise ein Peptid oder Protein, das mit einer Tumor- oder Krebszelloberfläche verbunden ist und das in der Lage ist, eine Immunreaktion zu produzieren, wenn es auf der Oberfläche einer Antigenpräsentierenden Zelle im Kontext eines MHC-Moleküls exprimiert wird. Krebsantigene können aus Krebszellen hergestellt werden entweder durch Herstellen von rohen Extrakten von Krebszellen, wie beispielsweise beschrieben in Cohen et al., 1994, Cancer Research, 54: 1055, durch teilweises Reinigen der Antigene, durch Gentechnologie oder durch de novo-Synthese bekannter Antigene. Krebsantigene umfassen Antigene, die rekombinant ein immunogener Teil eines ganzen Tumors oder Krebs sind. Derartige Antigene können isoliert oder rekombinant hergestellt werden durch ein jegliches andere, in der Technik bekannte Mittel.

[0086] Ein „mikrobielles Antigen“, wie hierin verwendet, ist ein Antigen eines Mikroorganismus und umfasst, ist aber nicht beschränkt auf, infektiöse Viren, infektiöse Bakterien, infektiöse Parasiten und infektiöse Pilze. Derartige Antigene umfassen den intakten Mikroorganismus ebenso wie natürliche Isolate und Fragmente oder Derivate davon und auch synthetische Verbindungen, die identisch zu oder ähnlich den natürlichen Mikroorganismenantigenen sind und eine Immunantwort induzieren, die für den Mikroorganismus spezifisch ist. Eine Verbindung ist einem natürlichen Mikroorganismenantigen ähnlich, wenn es eine Immunantwort (humoral und/oder zelluläre) gegenüber einem natürlichen Mikroorganismenantigen induziert. Derartige Antigene werden in der Technik routinemäßig verwendet und sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt.

[0087] Beispiele für Viren, die man bei Menschen gefunden hat, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: Retroviridae (z.B. menschliches Immundefizienzvirus wie beispielsweise HIV (auch als HTLV-III, LAV oder HTLV-III/LAV oder HIV-III bezeichnet; und andere Isolate wie beispielsweise HIV-LP)); Picornaviridae (z.B. Polioviren, Hepatitis A-Virus, Enteroviren, menschliche Coxsackieviren, Rhinoviren, Echoviren); Caliciviridae (z.B. Stämme, die Gastroenteritis verursachen); Togaviridae (z.B. Pferdeencephalitisviren, Rubellaviren); Flaviviridae (z.B. Dengueviren, Encephalitisviren, Gelbfieberviren); Coronaviridae (z.B. Coronaviren); Rhabdoviridae (z.B. vesikuläre Stomatitisviren, Tollwutviren); Coronaviridae (z.B. Coronaviren); Rhabdoviridae (z.B. vesikuläre Stomatitisviren, Tollwutviren); Filoviridae (z.B. Ebolaviren); Paramyxoviridae (z.B. Parainfluenzaviren, Mumpsvirus, Masernvirus, respiratorisches syncytiales Virus); Orthomyxoviridae (z.B. Influenzaviren); Bungaviridae (z.B. Hantaanviren, Bungaviren, Phleboviren und Nairoviren); Arenaviridae (hämmorrhagische Fieberviren); Reoviridae (z.B. Reovirus, Orbiviren und Rotaviren); Birnaviridae; Hepadnaviridae (Hepatitis B-Virus); Parvoviridae (Parvoviren); Papovaviridae (Papillomaviren, Polyomaviren); Adenoviridae (die meisten Adenoviren); Herpesviridae (Herpes simplex-Virus (HSV)1 und 2, Varicella zoster-Virus, Cytomegalievirus (CMV), Herpesvirus); Poxviridae (Variolaviren, Vacciniaviren, Pockenviren); und Iridoviridae (z.B. afrikanischer Schweinefiebervirus); und nichtklassifizierte Viren (z.B. ätiologische Agenzien der spongiformen Encephalopathien, das Agens der Delta-Hepatitis (von der man annimmt, dass es ein defekter Satellit des Hepatitis B-Virus ist), die Agenzien der nicht-A, nicht-B-Hepatitis (Klasse 1 = innerlich übertragen; Klasse 2 = parenteral übertragen (d. h. Hepatitis C); Norwalk- und verwandte Viren, und Astroviren).

[0088] Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien dienen als Antigene bei Vertebraten. Derartige Gram-positive Bakterien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Pasteurella-Arten, Staphylococci-Arten und Streptococcus-Arten. Gram-negative Bakterien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Escherichia coli, Pseudomonas Arten und Salmonella-Arten. Spezifische Beispiele für infektiöse Bakterien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: Helicobacter pyloris, Borelia burgdorferi, Legionella pneumophila, Mycobacteria-Arten (z.B. M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii, M. gordonae), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes (Gruppe A-Streptococcus), Streptococcus agalactiae (Gruppe B-Streptococcus), Streptococcus (Viridansgruppe), Streptococcus

faecalis, Streptococcus bovis, Streptococcus (anaerobe Arten), Streptococcus pneumoniae, pathogene Campylobacter sp., Enterococcus sp., Haemophilus influenzae, Bacillus antracis, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium sp., Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringers, Clostridium tetani, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pasteurella multocida, Bacteroides sp., Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponema pallidum, Treponema partenue, Leptospira, Rickettsia und Actinomyces israelii.

[0089] Beispiele für infektiöse Pilze umfassen: Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis, Candida albicans. Andere infektiöse Organismen (z.B. Protisten) umfassen: Plasmodium wie beispielsweise Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale und Plasmodium vivax und Taxoplasma gondii.

[0090] Andere medizinisch relevanten Mikroorganismen sind intensiv in der Literatur beschrieben worden, siehe z.B. C.G.A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Großbritannien 1983.

[0091] Obwohl viele der mikrobiellen Antigene, die oben beschrieben sind, menschliche Erkrankungen betreffen, ist die Erforschung auch nützlich für die Behandlung von nicht-menschlichen Vertebraten. Nicht-menschliche Vertebraten sind auch in der Lage, Infektionen zu entwickeln, die mit den hierin offensichtlichen CpG-Oligonukleotiden verhindert oder behandelt werden können. Beispielsweise sind, zusätzlich zur Behandlung der infektiösen menschlichen Erkrankung, die Verfahren der Erforschung auch nützlich bei der Behandlung von Infektionen von Tieren.

[0092] Wie hierin verwendet bezeichnet der Begriff „behandeln“, wenn er bezüglich einer Infektionskrankheit verwendet wird, eine prophylaktische Behandlung, die die Resistenz eines Lebewesens (ein Lebewesen, für das das Risiko einer Infektion besteht) gegenüber einer Infektion mit einem Pathogen erhöht oder, mit anderen Worten, die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Lebewesen mit dem Pathogen infiziert wird, ebenso wie die Behandlung, nachdem das Lebewesen (ein Lebewesen, das infiziert worden ist) infiziert worden ist, um die Infektion zu bekämpfen, z.B. Verringern oder Eliminieren der Infektion oder Verhindern, dass sie schlimmer wird.

[0093] Viele Vakzine für die Behandlung von nicht-menschlichen Vertebraten sind offenbar in Bennett, K. Compendium of Veterinary Products, 3. Ausgabe, North American Compendiums, Inc., 1995. Wie oben diskutiert umfassen Antigene infektiöse Mikroben wie beispielsweise Viren, Bakterien und Pilze und Fragmente davon, die aus natürlichen Quellen gewonnen oder synthetisch sind. Infektiöse Viren von sowohl menschlichen als auch nicht-menschlichen Vertebraten umfassen Retroviren, RNA-Viren und DNA-Viren. Diese Gruppe von Retroviren umfasst sowohl einfache Retroviren als auch komplexe Retroviren. Die simplen Retroviren umfassen die Untergruppen der Retroviren vom B-Typ, Retroviren vom C-Typ und Retroviren vom D-Typ. Ein Beispiel für einen Retrovirus vom B-Typ ist das Maus-Brusttumor-Virus (MMTV).

[0094] Die Retroviren vom C-Typ umfassen Untergruppen C-Typ-Gruppe A (einschließlich Roussarkomavirus (RSV), Vogelleukämievirus (ALV) und Vogelmyeloblastosevirus (AMV)) und C-Typ-Gruppe B (einschließlich murinem Leukämievirus (MLV), Katzenleukämievirus (FeLV), murines Sarkomavirus (MSV), Gibbonleukämievirus (GALV), Milznekrosevirus (SNV), Reticulendotheliosevirus (RV) und Affensarkomavirus (SSV)). Die Retroviren vom D-Typ umfassen den Mason-Pfizer-Affenvirus (MPMV) und Affenretrovirus vom Typ 1 (SRV-1). Die komplexen Retroviren umfassen die Untergruppen der Lentiviren, T-Zellleukämieviren und die Schaumviren. Lentiviren umfassen HIV-1, aber auch HIV-2, SIV, Visnavirus, Katzenimmundefizienzvirus (FIV) und infektiöses Pferdeanämievirus (EIAV).

[0095] Die T-Zellleukämieviren umfassen HTLV-1, HTLV-II, Affen-T-Zellleukämievirus (STLV) und Rinderleukämievirus (BLV). Die Schaumviren umfassen das menschliche Schaumvirus (HFV), das Affenschaumvirus (SFV) und das Rinderschaumvirus (BFV).

[0096] Beispiele für andere RNA-Viren, die Antigene bei Vertebratentieren sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die folgenden: Mitglieder der Familie Reoviridae, einschließlich des Genus Orthoreovirus (mehrere Serotypen von sowohl Säugetier- als auch Vogelretroviren), des Genus Orbivirus (Blauzungenvirus, Eugenangeevirus, Kemerovovirus, Afrikanische Pferdekrankheitvirus und Coloradozeckenfiebervirus), des Genus Rotavirus (menschlicher Rotavirus, Nebraskakälberdiarrhövirus, muriner Rotavirus, Affenrotavirus, Rinder- oder Schafrotavirus, Vogelrotavirus); der Familie Picornaviridae, einschließlich des Genus Enterovirus (Poliovirus, Coxsackievirus A und B, enterozytopathische menschliche Waisen (ECHO)-Viren, Hepatitis A-Virus, Affenenteroviren, murine Encephalitis (ME)-Viren, Poliovirus muris, Rinderenteroviren, Schweineenterovi-

ren, des Genus Cardiovirus (Encephalomyocarditisvirus (EMC), Mengovirus), des Genus Rhinovirus (menschliche Rhinoviren einschließlich wenigstens 113 Subtypen; andere Rhinoviren), des Genus Apthovirus (Maul- und Kluenseuche (FMDV); die Familie Caliciviridae, einschließlich vesikulärem Exanthem von Schweinevirus, San Miguel-Seelöwenvirus, Katzenpicornavirus und Norwalkvirus; die Familie Togaviridae, einschließlich des Genus Alphavirus (östlicher Pferdeencephalitisvirus, Semliki-Forst-Virus, Sindbisvirus, Chikungunyavirus, O'Nyong-Nyong-Virus, Rossflussvirus, venezulanischer Pferdeencephalitisvirus, westlicher Pferdeencephalitisvirus), des Genus Falivirus (moskitoübertragenes Gelbfiebervirus, Denguevirus, japanisches Encephalitisvirus, St. Louis-Encephalitisvirus, Murray-Tal-Encephalitisvirus, West-Nile-Virus, Kunjin-Virus, zentraleuropäisches Zecken-übertragenes Virus, Far Eastern Zecken-übertragenes Virus, Kyasanur-Forrest-Virus, Louping-III-Virus, Powassan-Virus, Omsk-hämorrhagisches Fiebervirus), des Genus Rubivirus (Rubella-Virus), des Genus Pestivirus (Schleimhautkrankheiten-Virus, Schweine-Cholera-Virus, Borderdisease-Virus); die Familie Bunyaviridae, einschließlich des Genus Bunyavirus (Bunyamwera und verwandte Viren, die Gruppe der kalifornischen Encephalitis-Viren), des Genus Phlebovirus (sizilianisches Sandfliegenfieber-Virus, Rift Valley Fieber-Virus), des Genus Nairovirus (hämorragisches Krim-Kongo-Fiebervirus, Nairobi-Schafskrankheit-Virus) und des Genus Uukuvirus (Uukuniemi und verwandte Viren); der Familie Orthomyxoviridae, einschließlich des Genus Influenzavirus (Grippevirus Typ A, viele menschliche Subtypen); Schweinegrippevirus und Vogel- und Pferde-Grippe-Viren; Influenzatyp B (viele menschliche Subtypen), und Influenzatyp C (mögliche separate Gattung); der Familie Paramyxoviridae, des Genus Paramyxovirus (Parainfluenzavirus Typ 1, Sendai-Virus, Hämadsorptions-Virus, Parainfluenza-Viren Typ 2-5, Newcastle-Disease-Virus, Mumpsvirus), des Genus Morbillivirus (Masernvirus, subakute sklerosierende Panencephalitis-Virus, Distemper-Virus, Rinderpest-Virus), des Genus Pneumovirus (respiratorisches syncytiales Virus (RSV), respiratorisches syncytiales Rinder-Virus und Pneumonia-Virus von Mäusen); Forest-Virus, Sindbis-Virus, Chikungunya-Virus, O'Nyong-Nyong-Virus, Ross-river-Virus, venezulanische Pferdeencephalitis, westliche Pferdeencephalitis-Virus), des Genus Flavivirus (Mosquito-übertragenes Gelbfiebervirus, Dengue-Virus, japanisches Encephalitis-Virus, St. Louis Encephalitis-Virus, Murray Valley Encephalitis-Virus, West-Nile-Virus, Kunjin-Virus, zentraleuropäisches Zecken-übertragenes Virus, Far Eastern Zecken-übertragenes Virus, Kyasanur Forest-Virus, Louping III-Virus, Powassan-Virus, hämorragisches Omsk-Fiebervirus), des Genus Rubivirus (Rubella-Virus), des Genus Pestivirus (Schleimhautkrankheit-Virus, Schweine-Cholera-Virus, Border-disease-Virus); der Familie Bunyaviridae, einschließlich des Genus (Bunyamwera und verwandte Viren, kalifornische Encephalitisgruppe-Viren), des Genus Phlebovirus (sizilianisches Sandfliegen-Fiebervirus, Rift Valley-Fiebervirus), des Genus Nairovirus (hämorragisches Krim-Kongo-Fiebervirus, Nairobi-Schafskrankheitsvirus) und des Genus Uukuvirus (Uukuniemi und verwandte Viren); der Familie Orthomyxoviridae, einschließlich des Genus Influenza-Virus (Influenza-Virus Typ A, viele menschliche Subtypen); Schweine-Influenza-Virus und Vogel- und Pferdeinfluenza-Viren; Influenzatyp B (viele menschliche Subtypen) und Influenzatyp C (mögliche separate Gattung); der Familie Paramyxoviridae, einschließlich des Genus Paramyxovirus (Parainfluenzavirus Typ 1, Sendai-Virus, Hämadsorptions-Virus, Parainfluenzaviren Typ 2-5, Newcastle-disease-Virus, Mumpsvirus), des Genus Morbillivirus (Masernvirus, subakute sklerosierende Panencephalitis-Virus, Distemper-Virus, Rinderpestvirus), des Genus Pneumovirus (respiratorisches syncytiales Virus (RSV), respiratorisches syncytiales Rinder-Virus und Lungenentzündungsviren der Mäuse); der Familie Rhabdoviridae, einschließlich des Genus Vesiculovirus (VSV), Chandipura-Virus, Flanders-Hart-Park-Virus), des Genus Lyssavirus (Tollwut-Virus), Fisch-Rhabdo-Viren, und zwei wahrscheinliche Rhabdoviren (Marburg-Virus und Ebola-Virus); der Familie Arenaviridae, einschließlich des lymphozytischen Choriomeningitis-Virus (LCM), Tacaribe-Virus-Komplexes und Lassa-Virus; der Familie Coronaviridae, einschließlich des infektiösen Bronchitisvirus (IBV), Maus-Hepatitis-Virus, menschlichen enteralen Coronavirus, und der infektiösen Katsenperitonitis (Katzen-Coronavirus).

[0097] Beispielhafte DNA-Viren, die bei Wirbeltieren Antigene darstellen, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: die Familie Poxviridae, einschließlich des Genus Orthopoxvirus (Variola major, Variola minor, Afenpocken-Vaccinia, Kuhpocken, Büffelpocken, Kanninchenpocken, Ectromelie), des Genus Leporipoxvirus (Myxom, Fibrom), des Genus Avipoxvirus (Geflügelpocken, andere Vogelpockenviren), des Genus Capripoxvirus (Schafpocken, Ziegenpocken), des Genus Suipoxvirus (Schweinepocken), des Genus Parapoxvirus (ansteckender postularer Dermatitisvirus, Pseudokuhpocken, papillärer Rinder-Stomatitis-Virus); der Familie Iridoviridae (afrikanisches Schweinefiebervirus, Froschviren 2 und 3, Fisch-Lymphocystis-Virus); der Familie Herpesviridae, einschließlich der α-Herpesviren (Herpes simplex-Typen 1 und 2, Varicella-Zoster, Pferde-Abort-Virus, Pferde-Herpesvirus 2 und 3, Pseudotollwutvirus, infektiöser Rinderkeratoconjunctivitis-Virus, infektiöser Rinderrhinotracheitis-Virus, Katzenrhinotracheitis-Virus, infektiöser Laryngotracheitis-Virus), der Beta-Herpes-Viren (menschliches Cytomegalievirus und Cytomegalieviren von Schweinen, Affen und Nagetieren); der Gamma-Herpesviren (Epstein-Barr-Virus (EBV), Marek-Virus, Herpes saimiri, Herpesvirus atelis, Herpesvirus sylvilagus, Meerschweinchen-Herpesvirus, Lucke-Tumor-Virus); der Familie Adenoviridae, einschließlich des Genus Mastadenovirus (menschliche Untergruppen A, B, C, D, E, und ungruppierte; Affenadenoviren (mindestens 23 Serotypen), infektiöse Hunde-Hepatitis und Adenoviren von Rindern, Schweinen,

Schafen, Fröschen und vielen anderen Arten, des Genus Aviadenovirus (Vogel-Adenoviren); und nicht-kultivierbare Adenoviren; der Familie Papoviridae, einschließlich des Genus Papillomavirus (menschliche Papillomaviren, Rinderpapillomaviren, Shope-Kanninchen-Papillomavirus und verschiedene pathogene Papilloma-Viren anderer Arten), des Genus Polyomavirus (Polyomavirus, Affen-bläschenbildendes Agens (SV-40), Kanninchen-bläschenbildendes Agens (RKV), K-Virus, BK-Virus, JC-Virus und andere Primaten-Polyomaviren wie lymphotropher Papillomavirus); der Familie Parvoviridae, einschließlich des Genus Adeno-assoziierte Viren, des Genus Parvovirus (Katzen-Panleukopenie-Virus, Rinderparvovirus, Hunde-Parvovirus, Aleut-Nerz-Krankheit-Virus, etc.). Schließlich können DNA-Viren Viren umfassen, die nicht in die obigen Familien passen, wie Kuru- und Creutzfeld-Jacob-Krankheit-Viren und chronische infektiöse neuropathische Agenzien (CHINA-Virus).

[0098] Eine jede der vorstehenden Listen dient der Veranschaulichung und soll nicht beschränkend sein.

[0099] Zusätzlich zur Verwendung der CpG-Oligonukleotide, um eine Antigen-spezifische Immunantwort beim Menschen zu induzieren, sind die Produkte und Zusammensetzungen der bevorzugten Ausführungsformen besonders gut geeignet für die Behandlung von Geflügel wie beispielsweise Hühnern, Hünchen, Truthähnen, Enten, Gänsen, Wachteln und Fasanen. Geflügel sind Hauptziel für viele Arten von Infektionen.

[0100] Schlüpfende Vögel sind kurz nach der Geburt pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Obwohl diese Vögel initial gegen Pathogene durch mütterliche Antikörper geschützt sind, ist dieser Schutz nur vorübergehend und das unreife Immunsystem des Vogels muss anfangen, den Vogel gegen die Pathogene zu schützen. Es ist oft wünschenswert, eine Infektion bei Jungvögeln zu vermeiden, wenn sie am empfindlichsten sind. Es ist auch wünschenswert, ältere Vögel gegen Infektionen zu schützen, insbesondere wenn die Vögel in geschlossenen Stallungen untergebracht sind, was zu einem schnellen Verbreiten der Erkrankung führt. Es ist somit wünschenswert, Vögeln das CpG-Oligonukleotid und das nicht-Nukleinsäure-Adjuvans der Erfindung zu verabreichen, um eine Antigen-spezifische Immunantwort zu verstärken, wenn Antigen vorhanden ist.

[0101] Ein Beispiel für eine übliche Infektion bei Hühnchen ist das infektiöse Hühnchenanämievirus (CIAV). CIAV wurde erstmalig in Japan 1979 während einer Studie eines Vakzinierungsausbruches der Marekschen Krankheit isoliert (Yuasa et al., 1979, Avian Dis. 23:366-385). Seit dieser Zeit ist CIAV in der kommerziellen Geflügelzucht in allen wichtigen Geflügel-produzierenden Ländern nachgewiesen worden (van Bulow et al., 1991, pp. 690-699) in Diseases of Poultry, 9th edition, Iowa State University Press).

[0102] CIAV-Infektion führt zu einer klinischen Erkrankung, die durch Anämie, Hämorrhagie und Immunsuppression bei jungen empfindlichen Küken gekennzeichnet ist. Atrophy des Thymus und des Knochenmarks und konsistente Läsionen von CIAV-infizierten Hühnchen sind ebenfalls für eine CIAV-Infektion charakteristisch. Lymphozytenverarmung im Thymus und gelegentlich in der Bursa fabricius führen zu einer Immunsuppression und erhöhten Empfindlichkeit gegenüber sekundären viralen, bakteriellen oder Pilzinfektionen, die dann den Verlauf der Krankheit verkomplizieren können. Die Immunsuppression kann eine erschwerte Krankheit nach Infektion mit einem oder mehreren der folgenden Viren zur Folge haben: Virus der Marekschen Erkrankung (MDV), infektiöses Bursaerkrankungs-Virus, Reticuloendotheliose-Virus, Adenovirus oder Reovirus. Es ist berichtet worden, dass die Pathogenese von MDV durch CIAV erhöht wird (DeBoer et al., 1989, S. 28 in Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference, Tempe, Ariz.). Weiterhin ist berichtet worden, dass CIAV die Zeichen von infektiöser Bursakrankheit verschlimmern kann (Rosenberger et al., 1989, Avian Dis. 33:707-713). Hühnchen entwickeln eine Altersresistenz gegen experimentell induzierte Erkrankungen infolge CAA. Dies ist im wesentlichen im Alter von zwei Wochen abgeschlossen, ältere Vögel sind aber noch gegenüber der Infektion empfindlich (Yuasa, N. et al., 1979 supra; Yuasa, N. et al., Avian Diseases 24, 202-209, 1980.). Wenn jedoch Hühnchen dual mit CAA und einem immunsupprimierenden Agens (IBDV, MDV etc.) infiziert sind, ist die Altersresistenz gegen die Erkrankung verzögert (Yuasa, N. et al., 1979 und 1980 aaO; Bulow von V. et al., J. Veterinary Medicine 33, 93-116, 1986). Merkmale von CIAV, die die Übertragung der Krankheit potenzieren können, umfassen eine hohe Resistenz gegenüber Umweltaktivierung und einige übliche Desinfektionsmittel. Der ökonomische Einfluss von CIAV-Infektion auf die Geflügelindustrie ist offenkundig aus der Tatsache, dass 10% bis 30% der infizierten Vögel bei Ausbruch der Krankheit sterben.

[0103] Die Impfung von Vögeln, wie von anderen Vertebraten kann in einem jeden Alter vorgenommen werden. Normalerweise werden Impfungen vorgenommen bis zum Alter von 12 Wochen für einen lebenden Mikroorganismus und zwischen 14 bis 18 Wochen für einen inaktivierten Mikroorganismus oder eine andere Art von Vakzin. Für in ovo-Vakzinierung kann die Vakzinierung im letzten Viertel der Embryonalentwicklung durchgeführt werden. Das Vakzin kann subkutan, durch Sprühen, oral, intraokular, intratracheal, nasal oder durch andere Schleimabgabeverfahren, wie sie hierin beschrieben sind, verabreicht werden. Das CpG-Oligonukleo-

tid der Erfindung kann somit den Vögeln und anderen nicht-menschlichen Vertrebraten unter Verwendung von routinemäßigen Vakzinierungsschemata verabreicht werden und das Antigen wird nach einer geeigneten Zeitspanne, wie hierin beschrieben, verabreicht.

[0104] Rinder und Viehbestände können ebenfalls gegenüber Infektionen empfindlich sein. Die Erkrankung, die diese Tiere betrifft, kann schwere wirtschaftliche Verluste, insbesondere bei Rindern verursachen. Die Verfahren der Erfindung können verwendet werden, um Viehbeständen, wie beispielsweise Kühe, Pferde, Schweine, Schafe und Ziegen vor Infektion zu schützen.

[0105] Kühe können durch Rinderviren infiziert werden. Rindervirusdiarröhovirus (BVDV) ist ein kleines umhülltes positiv-strängiges RNA-Virus und ist, zusammen mit dem Schweincholeravirus (HOCV) und Schaf-Border disease-Virus (BDV) in der Gattung Pestivirus. Obwohl Pestiviren früher als zur Familie der Togaviride klassifiziert wurden, haben einige Studien ihre Umklassifikation innerhalb der Familie der Flaviviride zusammen mit dem Flavivirus und Hepatitis C-Virus (HCV)-Gruppen vorgeschlagen (Francki, et al., 1991).

[0106] BVDV, das ein wichtiges Pathogen bei Rindern ist, kann, auf der Grundlage von Zellkulturanalyse, in cytopathogene (CP) und nicht-cytopathogene (NCP) Biotypen unterteilt werden. Der NCP-Biotyp ist weiter verbreitet, obwohl beide Biotypen bei Rindern gefunden werden können. Wenn eine trächtige Kuh mit einem NCP-Stamm infiziert wird, kann die Kuh ein persistent infiziertes und spezifisch immuntolerantes Kalb gebären, das das Virus während seiner Lebensspanne weiter verbreiten wird. Das persistent infizierte Rind kann der Schleimhauterkrankung erliegen und beide Biotypen können dann aus dem Tier isoliert werden. Klinische Manifestationen können Verwerfen, Teratogenese und respiratorische Probleme, Schleimhautkrankheit und milde Diarrhöe umfassen. Zusätzlich ist schwere Thrombocytopänie, verbunden mit Herdenepidemien, die zum Tod des Tieres führen können, beschrieben worden und Stämme, die mit dieser Erkrankung verbunden sind, scheinen virulenter zu sein als die klassischen BVDVs.

[0107] Pferdeherpesvirus (EHV) umfasst eine Gruppe von antigenisch distinkten biologischen Agenzien, die eine Vielzahl von Infektionen bei Pferden verursachen, die von subklinischer bis tödlicher Erkrankung reichen. Diese umfassen Pferdeherpesvirus-1 (EHV-1), ein ubiquitäres Pathogen bei Pferden. EHV-1 ist mit Epidemien von Verwerfen, Erkrankung des respiratorischen Traktes und Störung des zentralen Nervensystems verbunden. Primärinfektion des oberen respiratorischen Traktes von jungen Pferden führt zu einer fiebrigen Erkrankung, die 8 bis 10 Tage dauert. Immunologisch erfahrene Stuten können erneut über den respiratorischen Trakt infiziert werden, ohne dass die Erkrankung apparent wird, so dass ein Verwerfen üblicherweise ohne Warnung erfolgt. Das neurologische Syndrom ist mit respiratorischer Erkrankung oder Verwerfen verbunden und kann Tiere in jedem Alter und von jedem Geschlecht betreffen, und zu Unkoordinationen, Schwäche und posteriore Paralyse (Telford, E. A. R. et al., Virology 189, 304-316, 1992) führen. Andere EHV's umfassen EHV-2 oder Pferde-Cytomegalievirus, EHV-3, Pferde-koitales Exanthem-Virus und EHV-4, früher als EHV-1-Subtyp 2 klassifiziert.

[0108] Schafe und Ziegen können durch eine Vielzahl von gefährlichen Mikroorganismen infiziert werden, einschließlich visna-maedi.

[0109] Primaten wie beispielsweise kleine Affen, Menschenaffen und Makaken können durch das Affenimmundefizienzvirus infiziert werden. Es ist berichtet worden, dass inaktivierte Zell-Viren und zellfreie komplett Affenimmundefizienzvakzine Schutz bei Makaken verleihen (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; und Carlson et al. (1990) AIDS Res. Human Retroviruses 6:1239-1246). Es ist berichtet worden, dass ein rekombinantes HIV-gp120-Vakzin Schutz bei Schimpansen verleiht (Berman et al. (1990) Nature 345:622-625).

[0110] Katzen, sowohl Hauskatzen als auch wilden Katzen, sind für eine Infektion mit einer Vielzahl von Mikroorganismen empfindlich. Beispielsweise ist die infiziöse Karzenperitonitis eine Erkrankung, die bei sowohl Hauskatzen als auch wilden Katzen wie beispielsweise Löwen, Leoparden, Geparden und Jaguaren auftritt. Wenn es erwünscht ist, eine Infektion mit diesem oder einer anderen Art von pathogenen Mikroorganismen bei Katzen zu vermeiden, können die Produkte und Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden, um Katzen zu impfen, um sie gegen Infektionen zu schützen.

[0111] Hauskatzen können mit mehreren Retroviren infiziert werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf Katzen-Leukämievirus (FeLV), Katzen-Sarcomavirus (FeSFV), endogenem Typ C-Oncornavirus (RD-114) und Katzen-Syncytium-bildendes Virus (FeSFV). Von diesen ist FeLV das wesentlichste Pathogen, das diverse Symptome verursacht, einschließlich lymphoreticuläre und myeloide Neoplasmen, Anämien, immunvermittelte

Erkrankungen und ein Immundefizienzsyndrom, das ähnlich dem menschlichen erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS) ist. Kürzlich ist eine spezielle Replikations-defekte FeLV-Mutante, die als FeLV-AIDS bezeichnet wird, insbesondere mit immunsuppressiven Eigenschaften in Verbindung gebracht worden.

[0112] Die Entdeckung des Katzen-T-Lymphotropen-Lentivirus (auch als Katzen-Immundefizienz bezeichnet) wurde zuerst von Pedersen et al. (1987) Science 235:790-793 berichtet. Merkmale von FIV sind von Yamamoto et al. (1988) Leukemia, December Ergänzung 2:204S-215S; Yamamoto et al. (1988) Am. J. Vet. Res. 49:1246-1258; und Ackley et al. (1990) J. Virol 64:5652-5655 berichtet worden. Die Klonierung und Sequenzanalyse von FIV wurde von Olmsted et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sei. USA 86:2448-2452 und 86:4355-4360 berichtet.

[0113] Infektiöse Peritonitis bei Katzen (FIP) ist eine sporadische Erkrankung, die in unhervorragbarer Weise bei domestizierten und wilden Katzenartigen auftritt. Während FIP in erster Linie eine Erkrankung von Hauskatzen ist, ist sie bei Löwen, Berglöwen, Leoparden, Geparden und beim Jaguar diagnostiziert worden. Kleinere Wildkatzen, die mit FIP infiziert worden sind, schließen den Lux und Carakahl, Sandkatze und Pallas-Katze ein. Bei Hauskatzen tritt die Erkrankung überwiegend bei jungen Tieren auf, obwohl Katzen allen Alters empfindlich sind. Eine Spitzeninzidenz tritt im Alter zwischen 6 und 12 Monaten auf. Eine Verringerung der Inzidenz wird im Alter von 5 bis 13 Jahren beobachtet, gefolgt von einer erhöhten Inzidenz bei Katzen im Alter von 14 bis 15 Jahren.

[0114] Virale, bakterielle und parasitische Erkrankungen bei Flossenfischen, Schalentieren oder anderen aquatischen Lebensformen stellen ein ernstes Problem für die Aquakulturindustrie dar. Infolge der hohen Dichte von Tieren in den Schlüpfanks oder umschlossenen marinen Zuchtbereichen können infektiöse Erkrankungen einen großen Teil des Bestandes, beispielsweise von Einrichtungen für Flossenfische, Schalentiere oder andere aquatische Lebensformen auslöschen. Die Verhinderung einer Erkrankung ist ein erwünschter Mittel für diese Bedrohungen der Fischen als die Intervention, wenn die Krankheit am Voranschreiten ist. Die Impfung von Fischen ist das einzige präventive Verfahren, das einen langfristigen Schutz durch Immunität verleihen kann. Nukleinsäure-basierte Vakzine sind in dem US-Patent 5,780,448 beschrieben, das an Davis erteilt wurde.

[0115] Das Fischimmunsystem weist viele Merkmale auf, die dem Säugetierimmunsystem ähnlich sind, wie beispielsweise das Vorhandensein von B-Zellen, T-Zellen, Lymphokinen, Komplement und Immunglobulinen. Fische haben Lymphozytenunterklassen mit Rollen, die in vielerlei Hinsicht ähnlich jenen von B- und T-Zellen von Säugetieren zu sein scheinen. Impfstoffe können durch Immersion oder oral verabreicht werden.

[0116] Aquakulturarten umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Flossenfische, Schalentiere und andere aquatische Tiere. Flossenfische umfassen alle Vertebratenfische, die Knochen- oder Knorpelfische sein können, wie beispielsweise Salmonide, Karpfen, Wels, Gelbschwanz, Seebrasse und Seebarsch. Salmonide sind eine Familie von Flossenfischen, die Forelle (einschließlich Regenbogenforelle), Lachs und arktische Rotforelle einschließt. Beispiele für Schalentiere umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Muscheln, Hummer, Garnele, Krabbe und Austern. Andere kultivierte aquatische Tiere umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Aale, zehnarmige Tintenfische und Kraken.

[0117] Polypeptide von viralen Aquakulturpathogenen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Glykoprotein (G) oder Nukleoprotein (N) von viralem hämorrhagischen Septikämievirus (VHSV); G- oder N-Proteine von infektiösen hämatopoietischem Nekrosevirus (IHNV); VP1, VP2, VP3 oder N-Strukturproteine von infektiösem pankreatischen Nekrosevirus (IPNV); G-Protein der Frühjahrsvirämie von Karpfen (SVC); und ein Membran-assoziiertes Protein, Tegumin oder Kapsidprotein oder Glykoprotein des Kanalwelsvirus (CCV).

[0118] Polypeptide von bakteriellen Pathogenen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf ein eisenreguliertes Außenmembranprotein (IROMP), einem Protein der äußeren Membran (OMP) und einem A-Protein von Aeromonis salmonicida, das Furunkulose verursacht, p57-Protein von *Renibacterium salmoninarum*, das bakterielle Nierenkrankheit (BKD) verursacht, das hauptsächliche Oberflächen-assoziierte Antigen (msa), ein Oberflächen-exprimiertes Cytotoxin (mpr), ein Oberflächen-exprimiertes Hämolysin (ish) und ein Flagellen-Antigen von Yersiniosis; ein extrazelluläres Protein (ECP), ein Eisen-reguliertes Außenmembranprotein (IROMP) und ein Strukturprotein von Pasteurelloose; ein OMP und ein Flagellenprotein von *Vibrosis anguillarum* und *V. ordalii*; ein Flagellenprotein, ein OMP-Protein, aroA, und purA von *Edwardsiella ictaluri* und *E. tarda*; und Oberflächenantigen von *Ichthyophthirius*; und ein Struktur- und regulatorisches Protein von *Cytophaga columaris*; und ein Struktur- und regulatorisches Protein von *Rickettsia*.

[0119] Polypeptide eines parasitischen Pathogens umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Oberflächenantigene von Ichthyophthirius.

[0120] Ein „Allergen“ bezeichnet eine Substanz (Antigen), die eine allergische oder asthmatische Reaktion in einem empfindlichen Lebewesen verursachen kann. Die Liste von Allergenen ist enorm und kann Pollen, Insektenstiche, Tierhaarschuppenstaub, Pilzsporen und Wirkstoffe (z. B. Penicillin) umfassen. Beispiele für natürliche, tierische und Pflanzenallergene umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Proteine, die für die folgenden Genera spezifisch sind: Canine (*Canis familiaris*); Dermatophagoides (z.B. *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*; *Lolium* (z.B. *Lolium perenne* or *Lolium multiflorum*); Cryptomeria (*Cryptomeria japonica*); Alternaria (*Alternaria alternata*); Erle; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); Betula (*Betula verrucosa*); Quercus (*Quercus alba*); Olea (Olea europaea); Artemisia (*Artemisia vulgaris*); Plantago (z.B. *Plantago lanceolata*); Parietaria (z. B. *Parietaria officinalis* oder *Parietaria judaica*); Blattella (z.B. *Blattella germanica*); Apis (z.B. *Apis mellifera*); Cupressus (z.B. *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* und *Cupressus macrocarpa*); Juniperus (z.B. *Juniperus sabina*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* und *Juniperus ashei*); Thuya (z.B. *Thuya orientalis*); Chamaecyparis (z. B. *Chamaecyparis obtusa*); Periplaneta (z.B. *Periplaneta americana*); Agropyron (z.B. *Agropyron repens*); Secale (z.B. *Secale cereale*); Triticum (z.B. *Triticum aestivum*); Dactylis (z.B. *Dactylis glomerata*); Festuca (z.B. *Festuca elatior*); Poa (z.B. *Poa pratensis* oder *Poa compressa*); Avena (z.B. *Avena sativa*); Holcus (z.B. *Holcus lanatus*); Anthoxanthum (z.B. *Anthoxanthum odoratum*); Arrhenatherum (z.B. *Arrhenatherum elatius*); Agrostis (z.B. *Agrostis alba*); Phleum (z.B. *Phleum pratense*); Phalaris (z.B. *Phalaris arundinacea*); Paspalum (z.B. *Paspalum notatum*); Sorghum (z.B. *Sorghum halepense*); and Bromus (z.B. *Bromus inermis*).

[0121] Das Antigen kann ein Antigen sein, das von einem Nukleinsäurevektor codiert ist, oder nicht von einem Nukleinsäurevektor codiert ist. Im ersten Falle wird der Nukleinsäurevektor dem Lebewesen verabreicht und das Antigen wird *in vivo* exprimiert. Im letzteren Falle wird das Antigen direkt dem Lebewesen verabreicht. Ein „Antigen, das nicht von einem Nukleinsäurevektor codiert ist“, wie hierin verwendet, bezeichnet eine jegliche Art von Antigen, das nicht eine Nukleinsäure ist. Beispielsweise ist in einigen Aspekten der Erforschung das Antigen, das nicht von einem Nukleinsäurevektor codiert ist, ein Polypeptid. Geringfügige Modifikationen der primären Aminosäuresequenz von Polypeptidantigenen können auch zu einem Polypeptid führen, das verglichen mit dem nicht-modifizierten Gegenstück-Polypeptid eine im Wesentlichen äquivalente Antigenaktivität aufweist. Derartige Modifikationen können vorsätzlich, wie beispielsweise durch ortsgerichtete Mutagenese, oder spontan sein. Alle Polypeptide, die durch diese Modifikationen produziert werden, sind hierin umfasst, solange noch eine Antigenität existiert. Das Polypeptid kann, beispielsweise, ein virales Polypeptid sein. Ein nicht-beschrankendes Beispiel eines Antigens, das gemäß der Erforschung nützlich ist, ist das Oberflächenantigen von Hepatitis B. Experimente, die dieses Antigen verwenden, sind in den Beispielen unten beschrieben.

[0122] Der Begriff „im Wesentlichen gereinigt“, wie hierin verwendet, bezeichnet ein Polypeptid, das im Wesentlichen frei von anderen Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten oder anderen Materialien ist, mit denen es natürlicherweise verbunden ist. Der Fachmann auf dem Gebiet kann virale oder bakterielle Polypeptide reinigen unter Verwendung von Standardtechniken für die Proteinreinigung. Das im Wesentlichen reine Polypeptid wird oft eine einzelne Hauptbande in einem nicht-reduzierenden Polyacrylamidgel ergeben. Im Falle eines teilweise glycosylierten Polypeptids oder jenen, die mehrere Startcodons aufweisen, können mehrere Banden auf einem nicht-reduzierenden Polyacrylamidgel existieren, diese werden aber ein distinktes Muster für das Polypeptid ausbilden. Die Reinheit des viralen oder bakteriellen Polypeptids kann auch bestimmt werden durch aminoterminale Aminosäuresequenzanalyse.

[0123] Die Erforschung verwendet auch Polynukleotide, die die antigenen Polypeptide codieren. Es wird ins Auge gefasst, dass das Antigen einem Lebewesen in einem Nukleinsäuremolekül verabreicht wird, das für das Antigen codiert, beispielsweise so, dass das Antigen *in vivo* exprimiert werden muss. Derartige Antigene, die dem Lebewesen in einem Nukleinsäurevektor verabreicht werden, werden als „Antigene, die durch einen Nukleinsäurevektor codiert werden“ bezeichnet. Die das Antigen codierende Nukleinsäure ist funktionsfähig mit einer Genexpressionssequenz verbunden, die die Expression der Antigennukleinsäure innerhalb einer eukaryontischen Zelle steuert. Die „Genexpressionssequenz“ ist eine jegliche regulatorische Nukleotidsequenz, wie beispielsweise eine Promotorsequenz oder Promotor-Enhancer-Kombination, die die wirksame Transkription und Translation der Antigennukleinsäure, an die sie funktionsfähig gebunden ist, erleichtert. Die Genexpressionssequenz kann, beispielsweise, ein Säugetier- oder viralen Promotor sein, wie beispielsweise ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor. Konstitutive Säugetierpromotoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Promotoren für die folgenden Gene: Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPTR), Adenosin-Desaminase, Pyruvat-Kinase, β-Actin-Promotor und andere konstitutive Promotoren. Beispielhafte virale Promotoren, die in eukaryontischen Zellen konstitutiv funktionieren, umfassen, beispielsweise, Promotoren des Cytomeg-

lievirus (CMV), Affenvirus (z.B. SV40), Papillomavirus, Adenovirus, menschliches Immundefizienzvirus (HIV), Rous-Sarcoma-Virus, Cytomegalievirus, die langen terminalen Wiederholungen (LTR) von Moloney-Leukämievirus und anderen Retroviren, und der Thymidin-Kinase-Promotor von Herpes simplex-Virus. Andere konstitutive Promotoren sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Die als Genexpressionssequenzen nützlichen Promotoren der Erfindung umfassen auch induzierbare Promotoren. Induzierbare Promotoren werden in Gegenwart eines induzierenden Agens exprimiert. Beispielsweise wird der Metallothioneinpromotor induziert, um die Transkription und Translation in Gegenwart bestimmter Metallionen zu fördern. Andere induzierbare Promotoren sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

[0124] Im Allgemeinen soll die Genexpressionssequenz, wie erforderlich, 5'-nicht-transkribierende und 5'-nicht-translatierende Sequenzen umfassen, die an der Initierung der Transkription bzw. Translation beteiligt sind, wie beispielsweise eine TATA-Box, Kappensequenzen, CAAT-Sequenz und dergleichen. Insbesondere werden derartige 5'-nicht-transkribierende Sequenzen eine Promotorregion umfassen, die eine Promotorsequenz umfasst für die transkriptionelle Steuerung der funktionsfähigen verbundenen Antigennukleinsäure. Die Genexpressionssequenzen umfassen optional Enhancer-Sequenzen oder stromaufwärtige Aktivatorsequenzen, wie erwünscht.

[0125] Die Antigennukleinsäure ist funktionsfähig mit der Genexpressionssequenz verbunden. Wie hierin verwendet sollen die Antigennukleinsäuresequenz und die Genexpressionssequenz „funktionsfähig miteinander verbunden sein“, wenn sie in einer solchen Art und Weise kovalent miteinander verbunden sind, dass die Expression oder Transkription und/oder Translation der Antigen-codierenden Sequenz unter dem Einfluss oder der Kontrolle der Genexpressionssequenz steht. Zwei DNA-Sequenzen sollen als funktionsfähig miteinander verbunden gelten, wenn die Induktion eines Promoters in der 5'-Genexpressionssequenz zur Transkription der Antigensequenz führt und wenn die Art der Verbindung zwischen den zwei DNA-Sequenzen (1) nicht zur Einführung einer Leserahmenverschiebungsmutation führt, (2) nicht die Fähigkeit der Promotorregion stört, die Transkription der Antigensequenz zu steuern oder (3) die Fähigkeit der entsprechenden RNA-Transkripte stört, in ein Protein translatiert zu werden. Eine Genexpressionssequenz würde mit einer Antigennukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden sein, wenn die Genexpressionssequenz in der Lage wäre, die Transkription dieser Antigennukleinsäuresequenz so zu bewirken, dass das ergebende Transkript in das erwünschte Protein oder Polypeptid translatiert wird.

[0126] Die Antigennukleinsäure der Erfindung kann an das Immunsystem alleine oder zusammen mit einem Vektor verabreicht werden. Im breitesten Sinne ist ein „Vektor“ ein jegliches Vehikel, das in der Lage ist, den Transfer der Antigennukleinsäure in die Zellen des Immunsystems zu erleichtern, so dass das Antigen auf der Oberfläche der Immunzelle exprimiert und präsentiert werden kann. Der Vektor transportiert im Allgemeinen die Nukleinsäure an die Immunzellen mit einem verringerten Abbau verglichen mit dem Umfang des Abbaus, der sich bei Abwesenheit des Vektors ergeben würde. Der Vektor umfasst optional die oben beschriebene Genexpressionssequenz, um die Expression der Antigennukleinsäure in Immunzellen zu verstärken. Im Allgemeinen umfassen Vektoren, die bei der Verwendung nützlich sind, sind aber nicht darauf beschränkt, Plasmide, Phagomide, Viren, andere Vehikel, die von viralen oder bakteriellen Quellen gewonnen sind, die durch Einfügen oder Einbau der Antigennukleinsäuresequenzen manipuliert worden sind. Virale Vektoren sind ein bevorzugter Vektortyp und umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Nukleinsäuresequenzen von den folgenden Viren: Retrovirus wie beispielsweise murines Moloney-Leukämievirus, murines Harvey-Sarkoma-Virus, murines Brusttumorvirus und Rous-Sarkoma-Virus; Adenovirus, adeno-assoziiertes Virus; Viren vom Typ SV40; Polyomaviren; Epstein-Barr-Viren; Papilloma-Viren; Herpes-Viren; Vaccinia-virus; Poliovirus; und andere RNA-Viren wie Retrovirus. Man kann leicht andere Vektoren verwenden, die nicht angeführt sind, aber in der Technik bekannt sind.

[0127] Bevorzugte virale Vektoren basieren auf nicht-zytopathischen eukaryotischen Viren, bei denen nicht-essentielle Gene durch das interessierende Gen ersetzt worden sind. Nicht-zytopathische Viren umfassen Retroviren, deren Lebenszyklus die reverse Transkription genomischer viraler RNA in DNA mit nachfolgender proviraler Integration in die zelluläre Wirts-DNA umfasst. Retroviren sind für Gentherapieversuche am Menschen zugelassen worden. Am nützlichsten sind jene Retroviren, die replikationsdefizient sind (d. h. in der Lage sind, die Synthese der erwünschten Proteine zu steuern, aber nicht in der Lage sind, ein infektiöses Partikel herzustellen). Derartige genetisch veränderte retrovirale Expressionsvektoren sind allgemein nützlich bei der hochwirksamen Transduktion von Genen in vivo. Standardprotokolle für die Produktion von replikationsdefizienten Retroviren (einschließlich des Schrittes des Einbaus von exogenem genetischen Materials in ein Plasmid, Transfektion einer Verpackungszelle mit Plasmid, Produktion von rekombinanten Retroviren durch die Verpackungszelllinie, Gewinnen von viralen Partikeln aus dem Gewebekulturmedium und Transfektion der Zielzellen mit viralen Partikeln) können entnommen werden aus Kriegler, M., „Gene Transfer and Expression,

A Laboratory Manual", W. H. Freeman C. O., New York (1990) und Murry, E. J. Ausgabe „Methods in Molecular Biology", Bd. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991).

[0128] Ein bevorzugtes Virus für bestimmte Anwendungen ist das adeno-assoziierte Virus, ein doppelsträngiges DNA-Virus. Das adeno-assoziierte Virus kann genetisch so konstruiert werden, dass es replikationsdefizient und in der Lage ist, einen großen Bereich von Zelltypen und Arten zu infizieren. Es weist weitere Vorteile auf, wie beispielsweise Hitze- und Lipidlösungsmittelstabilität; hohe Transduktionsfrequenzen in Zellen diversen Ursprungs, einschließlich hämatopoietischen Zellen; und dem Fehlen von Superinfektionsinhibition, was mehrfache Transduktionsserien erlaubt. Es ist berichtet worden, dass das adenoassoziierte Virus in die menschliche zelluläre DNA in einer ortsspezifischen Art und Weise integrieren kann, wodurch die Möglichkeit der Insertionsmutagenese und die Variabilität der Expression der eingeführten Gene, wie sie charakteristisch für die retrovirale Infektion ist, minimiert wird. Zusätzlich sind Infektionen mit dem adeno-assoziierten Virus vom Wildtyp in Gewebekultur für mehr als 100 Passagen bei Abwesenheit eines Selektionsdruckes nachverfolgt worden, was impliziert, dass die genomische Integration des adeno-assoziierten Virus ein vergleichsweise stabiles Ereignis ist. Das adeno-assoziierte Virus kann auch in einer extrachromosomal Art und Weise funktionieren.

[0129] Andere Vektoren umfassen Plasmidvektoren. Plasmidvektoren sind in der Technik umfänglich beschrieben worden und sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Siehe z.B. Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual", zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. In den vergangenen letzten Jahren hat man festgestellt, dass Plasmidvektoren bei der Abgabe von Genen in Zellen in vivo besonders vorteilhaft sind infolge ihrer Unfähigkeit, innerhalb eines Wirtsgenoms zu replizieren und darin zu integrieren. Diese Plasmide, die jedoch einen Promotor aufweisen, der mit der Wirtszelle kompatibel ist, können ein Peptid von einem Gen exprimieren, das operativ innerhalb des Plasmids codiert ist. Einige üblicherweise verwendete Plasmide umfassen pBR322, pUC 18, pUC19, pRC/CMV, SV40 und pBlueScript. Andere Plasmide sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Zusätzlich können Plasmide maßgeschneidert sein unter Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligationsreaktionen, um spezifische DNA-Fragmente zu entfernen und hinzuzufügen.

[0130] Es ist kürzlich entdeckt worden, dass gentragende Plasmide an das Immunsystem unter Verwendung von Bakterien verabreicht werden können. Modifizierte Formen von Bakterien wie beispielsweise Salmonella können mit dem Plasmid transfiziert und als Abgabevehikel verwendet werden. Die bakteriellen Abgabevehikel können einem Wirtslebewesen oral oder durch andere Verabreichungsmittel verabreicht werden. Die Bakterien geben das Plasmid an Immunzellen ab, z.B. dendritische Zellen, mutmaßlich indem sie durch die Darmbarriere hindurchtreten. Ein höheres Ausmaß an Immunschutz ist unter Verwendung dieser Verfahrensweise etabliert worden. Derartige Abgabeverfahren sind für den Aspekte der Erfindung nützlich, der die systemische Abgabe von Antigen, CpG-Oligonukleotid und/oder Hormon verwendet.

[0131] CpG-Oligonukleotid kann in einer synergistischen Art und Weise mit anderen Schleimhautadjuvanzien agieren, um Immunantworten zu verstärken. Das CpG-Oligonukleotid und das Schleimhautadjuvans können gleichzeitig oder sequenziell verabreicht werden. Wenn die Adjuvanzien gleichzeitig verabreicht werden, können sie in der gleichen oder in verschiedenen Formulierungen verabreicht werden, werden aber zur gleichen Zeit verabreicht. Die Adjuvanzien werden sequenziell verabreicht, wenn die Verabreichung von wenigstens zwei Adjuvanzien zeitlich getrennt ist. Die zeitliche Trennung zwischen der Verabreichung der zwei Adjuvanzien kann eine Frage von Minuten oder länger sein.

[0132] Wie in dem Beispielteil gezeigt, waren die Titer von Serum-anti-HBs-IgG, das mit systemischer Immunität verbunden ist, bei Mäusen, die mit CpG-Oligonukleotid plus CT immunisiert waren, wenigstens fünfzigfach höher als mit CT oder CpG-Oligonukleotid alleine ([Fig. 1](#)). Weiterhin ergaben Titer mit 1 µg der zwei Adjuvanzien zusammen bessere Ergebnisse als 10 µg eines jeden Adjuvans alleine. Die Ergebnisse zeigen eine synergistische Wirkung der zwei Adjuvanzien. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit CpG und LT erhalten. Eine derartige Synergie wurde für sowohl humorale ([Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#)) als auch Zell-vermittelte (CTL) und T-Zellproliferation ([Fig. 4](#))-Antworten beobachtet. Ebenso war der Anteil von Antikörpern des Isotyps IgG2a etwa zehnfach höher mit CpG-ODN als CT, was einen größeren Th1-Einfluss von CpG-ODN verglichen mit CT anzeigt. Weiterhin ergab die Kombination von CpG-ODN mit CT ein fünfzigfach höheres Verhältnis von IgG2a:IgG1 als CT alleine. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse eine starke Synergie der humoralen Immunantworten von Adjuvanskombination sowohl bezüglich der Stärke als auch der Th1-Verschiebung und der zellulären Immunantworten an ([Fig. 3](#)).

[0133] Das Merkmal der Schleimhautimmunität ist die Anwesenheit von sekretorischen IgA-Antikörpern zu-

sammen mit Schleimhautoberflächen. IgA-Antikörper sind wesentlich, um den Eintritt des Pathogens in den Körper zu verhindern. IN-Immunisierung von Mäusen mit HBsAg alleine, 1 oder 10 µg, war nicht in der Lage, nachweisbares IgA in Lungenspülungen zu induzieren. Es gab auch kein IgA mit der niedrigen Antigendosis und einer niedrigen Dosis (1 µg) CT oder CpG-ODN. Es gab jedoch signifikantes IgA mit einer hohen Antigendosis und einer niedrigen Dosis von entweder CT oder CpG-ODN oder einer niedrigen Antigendosis und einer niedrigen Dosis aus kombinierten Adjuvanzien. In der Tat waren IgA-Titer mit 1 µg von jeweils CpG-ODN und CT kombiniert höher als mit 10 µg eines jeden alleine, wenn zusammen mit 10 µg HBsAg verabreicht (Fig. 5). Weiterhin wurde IgA in Stuhlextrakten, was die Induktion von Schleimhautimmunität an entfernten Stellen anzeigen, nur mit den kombinierten Adjuvanzien nachgewiesen (Fig. 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass CpG-ODN ein potentes Adjuvans für die Induktion von Schleimhautimmunität ist und dass es eine starke synergistische Antwort gibt, wenn es mit einem weiteren Schleimhautadjuvans wie beispielsweise CT verwendet wird.

[0134] Ähnliche Ergebnisse wurden gefunden, wenn LT anstelle von CT verwendet wurde (Fig. 7, Tabellen 2 und 3). CT und LT, die mit erheblicher struktureller und funktionaler Homologie eng verwandt sind, sind beide für die Anwendung beim Menschen zu toxisch. Es gibt jedoch eine Anzahl von Abwandlungen von CT und LT, die etwas an Adjuvansaktivität beibehalten, aber viel weniger toxisch sind. Ein Beispiel ist die B-Untereinheit von CT (CTB) die nicht toxisch ist, da die Toxizität mit der Untereinheit A verbunden ist. Ein weiteres Beispiel ist LTK63, eine genetisch detoxifizierte Mutante von LT mit keiner toxischen enzymatischen Aktivität. Obwohl diese Adjuvanzien in klinischen Studien am Menschen verwendet werden, war keine so stark wie CpG-ODN für die Induktion von systemischer Immunität (Serum-IgG), wenn ein jedes mit 1 µg verwendet wurde (Fig. 7). Es gab auch eine synergistische Wirkung, wenn CpG-ODN und CTB oder LTK63 zusammen verwendet wurden, dies war jedoch eher bemerkbar in der Th1-Verschiebung denn in der Stärke der Antikörperantwort (Fig. 7 und Tabelle 2). Die Kombination von CpG-ODN und LTK63 induzierte ebenfalls IgA in Lungenspülungen, obgleich keines der Adjuvanzien selbst IgA bei niedrigen Konzentrationen induzierte (Tabelle 3).

[0135] Die starke Adjuvanseigenschaft und niedrige Toxizität von CpG-Oligonukleotid, wenn es an eine Schleimhautoberfläche verabreicht wird, hat wichtige Implikationen. Sie wird erlauben, dass viele Antigene an Schleimhautoberflächen für die Induktion von starken systemischen Immunantworten verabreicht werden. Nicht-invasive Vakzinabgabe ist für die Immunisierung von Kindern, Tieren, bei Massenvakzinierungsprogrammen und auch deshalb wünschenswert, um das Risiko von Nadelstichverletzungen zu vermeiden. Derartige Vakzine könnten intranasal durch Nasentropfen oder Nasenspray oder mit einem Abgabesystem verabreicht werden, oder sie könnten über andere Wege (oral, rektal, Okular) an andere Schleimhautoberflächen verabreicht werden, einschließlich mit verschiedenen Abgabesystemen.

[0136] Die synergistische Wechselwirkung von CpG-Oligonukleotid mit Schleimhautadjuvanzien weist wichtige Implikationen bei der Entwicklung von Vakzinen auf. Infolge der synergistischen Antwort ist es nun möglich, niedrigere und weniger toxische Dosen von Schleimhautadjuvanzien wie beispielsweise CT oder anderen verwandten Toxinen oder Untereinheiten davon, zusammen mit CpG-Oligonukleotid zu verwenden, um sogar bessere Immunantworten mit geringerer Toxizität zu erhalten. Beispielsweise wäre es möglich, CpG-Oligonukleotid in Kombination mit einer weniger toxischen genetisch modifizierten Mutante von CT oder LT für ein hochwirksames Vakzin mit akzeptabler Toxizität zu verwenden. Man könnte nicht nur den kombinierten Adjuvansansatz vorteilhafterweise mit unterschiedlichen Toxinen verwenden, sondern auch mit verschiedenen Formen von Antigenen und verschiedenen Abgabesystemen an verschiedene Schleimhautwege. Eine wirksame Menge, wie bezüglich dieses Aspektes der Erfindung verwendet ist, eine Menge, die eine synergistische Immunantwort produziert. Eine synergistische Menge ist jene Menge, die eine Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen produziert, die größer ist als die Summe der einzelnen Wirkungen von entweder dem CpG oder dem Schleimhautadjuvans alleine.

[0137] Die Erfindung kann auch in Kombination mit parenteralen Immunisierungsstrategien (z.B. Intramuskulär-, Intradermal-, oder Subkutaninjektion) verwendet werden, die normalerweise für die Induktion von systemischen Immunantworten verwendet werden. Es ist beachtlich, dass Mäuse, die mit HBsAg immunisiert und die CpG-Oligonukleotid als wenigstens ein Adjuvans erhalten hatten, wenn sie über einen parenteralen Weg (IM) aktiviert und über einen Schleimhautweg (IN) aufgefrischt oder IN-aktiviert und IM-aufgefrischt wurden, bis zu zehnfach höheres IgG (d. h. systemische humorale Antwort) aufwiesen, als wenn sowohl die Aktivierung als auch die Auffrischung über den IM-Weg erfolgten (Fig. 8). Zelluläre Immunantworten waren auch stärker mit den kombinierten Ansätzen aus parenteral/mukosal als mit nur IN oder nur IM, wie durch stärkere CTL (Fig. 9) und höhere T-Zellproliferation (Fig. 10) gezeigt. Während die IN-Aktivierung und -Auffrischung gute Schleimhautantworten ergibt, ergibt die IM-Aktivierung und -Auffrischung keine nachweisbaren Schleimhautantworten (Fig. 11 bis Fig. 13). Der IM-Aktivierungs- und IN-Auffrischungs-Ansatz ergab auch signifikantes IgA in Lungenspülungen (Fig. 11) und Speichel (Fig. 12), aber nicht im Stuhl (Fig. 13).

[0138] Die gemäß der Erfindung nützlichen Schleimhautadjuvanzien sind Nicht-Oligonukleotid-Schleimhautadjuvanzien. Ein „Nicht-Oligonukleotidschleimhautadjuvans“, wie hierin verwendet, ist ein Adjuvans, das verschieden ist von CpG-Oligonukleotid, das in der Lage ist, eine Schleimhautimmunantwort in einem Lebewesen zu induzieren, wenn es an eine Schleimhautoberfläche zusammen mit einem Antigen verabreicht wird. Schleimhautadjuvanzien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf bakterielle Toxine: z.B. Cholera toxin (CT), CT-Derivate, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die B-Untereinheit von CT (CTB) (Wu et al., 1998, Tochikubo et al., 1998); CTD53 (Val zu Asp) (Fontana et al., 1995); CTK97 (Val zu Lys) (Fontana et al., 1995); CTK104 (Tyr zu Lys) (Fontana et al., 1995); CTD53/K63 (Val zu Asp, Ser zu Lys) (Fontana et al., 1995); CTH54 (Arg zu His) (Fontana et al., 1995); CTN107 (His zu Asn) (Fontana et al., 1995); CTE114 (Ser zu Glu) (Fontana et al., 1995); CTE112K (Glu zu Lys) (Yamamoto et al., 1997a); CTS61F (Ser zu Phe) (Yamamoto et al., 1997a, 1997b); CTS 106 (Pro zu Lys) (Douce et al., 1997, Fontana et al., 1995); und CTK63 (Ser zu Lys) (Douce et al., 1997, Fontana et al., 1995), Zonula-Occludens-Toxin, Zot, Escherichia coli-Hitze-labiles Enterotoxin, labiles Toxin (LT), LT-Derivate, einschließlich aber nicht beschränkt auf die B-Untereinheit von LT (LTB) (Verweij et al., 1998); LT7K (Arg zu Lys) (Komase et al., 1998, Douce et al., 1995); LT61F (Ser zu Phe) (Komase et al., 1998); LT112K (Glu zu Lys) (Komase et al., 1998); LT118E (Gly zu Glu) (Komase et al., 1998); LT146E (Arg zu Glu) (Komase et al., 1998); LT192G (Arg zu Gly) (Komase et al., 1998); LTK63 (Ser zu Lys) (Marchetti et al., 1998, Douce et al., 1997, 1998, Di Tommaso et al., 1996); und LTR72 (Ala zu Arg) (Giuliani et al., 1998), Pertussis-Toxin, PT. (Lycke et al., 1992, Spangler BD, 1992, Freytag und Clemments, 1999, Roberts et al., 1995, Wilson et al., 1995), einschließlich PT-9K/129G (Roberts et al., 1995, Cropley et al., 1995); Toxinderivate (siehe unten) (Holmgren et al., 1993, Verweij et al., 1998, Rappuoli et al., 1995, Freytag und Clements, 1999); Lipid A-Derivate (z.B. Monophosphoryllipid A, MPL) (Sasaki et al., 1998, Vancott et al., 1998; Muramyl-Dipeptid (MDP)-Derivate (Fukushima et al., 1996, Ogawa et al., 1989, Michalek et al., 1983, Morisaki et al., 1983); bakterielle Außenmembranproteine (z.B., äußeres Oberflächenprotein A (OspA)-Lipoprotein von Borrelia burgdorferi, Außenmembranprotein von Neisseria meningitidis)(Marinaro et al., 1999, Van de Verg et al., 1996); Öl-in-Wasser-Emulsionen (e.g., MF59) (Barchfield et al., 1999, Verschoor et al., 1999, O'Hagan, 1998); Aluminumsalze (Isaka et al., 1998, 1999); und Saponine (e.g., QS21) Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worster, MA) (Sasaki et al., 1998, MacNeal et al., 1998), ISCOMS, MF-59 (eine mit Span 85 und Tween 80 stabilisierte Squalen-in-Wasser-Emulsion; Chiron Corporation, Emeryville, CA); die Seppic ISA-Serie von Montanid-Adjuvanzien (z.B. Montanide ISA 720; AirLiquide, Paris, Frankreich); PROVAX (eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die ein stabilisierendes Detergens und ein Mizellen bildendes Agens enthält; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA); Syntex Adjuvans Formulierung (SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO); Poly[di(carboxylat-phenoxy)phosphazene (PCPP-Polymer; Virus Research Institute, USA) und Elongationsfaktor von Leishmania (Corixa Corporation, Seattle, WA).

[0139] Obwohl die Schleimhautabgabe des Antigens als eine Voraussetzung für die Induktion von starken Schleimhautimmunantworten betrachtet wird, ist es möglich, eine starke Schleimhautimmunität gegen systemisch verabreichte Antigene zu induzieren, indem die Immunantwort mit Steroidhormonen moduliert wird, wie beispielsweise für 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] beschrieben (Daynes et al., 1996). Die Erfindung umfasst auch Verfahren für die Verabreichung von CpG-Oligonukleotid alleine oder in Kombination mit anderen Schleimhautadjuvanzien und Antigen an hormonell behandelten Personen. Eine jede der Verbindungen kann zusammen oder getrennt, systemisch oder über die Schleimhaut verabreicht werden. Bei einigen Ausführungsformen werden das CpG-Oligonukleotid und das Antigen und optional andere Schleimhautadjuvanzien mukosal und das Hormon systemisch verabreicht. Das Hormon kann parenteral (z.B. subkutane Induktion) oder mukosal (z.B. oral) gegeben werden.

[0140] Schleimhautimmunantworten können auch mit der Co-Verabreichung von Cytokinen mit dem CpG-Oligonukleotid induziert werden. Immunantworten können auch durch co-lineare Expression von Cytokinen (Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) oder B-7 co-stimulierende Moleküle (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997) verstärkt werden. Die Cytokine können direkt mit CpG-Oligonukleotiden oder können in Form eines Nukleinsäurevektors verabreicht werden, der das Cytokin codiert, so dass das Cytokin in vivo exprimiert werden kann. In einer Ausführungsform kann, wenn das CpG in der Form eines Plasmidexpressionsvektors verabreicht wird, der Vektor das Cytokin codieren und eine getrennte Verabreichung des Cytokins ist nicht erforderlich. Der Begriff „Cytokin“ wird hierin als eine generische Bezeichnung für eine diverse Gruppe von Proteinen und Peptiden verwendet, die als humorale Regulatoren bei nano- bis picomolaren Konzentrationen wirken und die, unter normalen pathologischen Bedingungen, die funktionale Aktivität von einzelnen Zellen und Geweben modulieren. Diese Proteine vermitteln auch direkt die Wechselwirkung zwischen Zellen und regulieren Prozesse, die in der extrazellulären Umgebung ablaufen. Beispiele für Cytokine umfassen, sind aber nicht beschränkt auf IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, Granulocyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), Granulocyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GCSF), Interferon-γ (γ-INF), Tumornekrosefaktor (TNF), TGF-β, FLT-3 Ligand, und CD40-Ligand.

[0141] Cytokine spielen eine Rolle beim Steuern der T-Zellantwort. Helfer (CD4+)-T-Zellen dirigieren die Immunantwort von Säugetieren durch die Produktion von löslichen Faktoren, die auf andere Immunsystemzellen wirken, einschließlich anderer T-Zellen. Die meisten reifen CD4+-T-Helfer-Zellen exprimieren eines von zwei Cytokinprofilen: Th1 oder Th2. Th1-Zellen exprimieren IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF und niedrige Titer an TNF- α . Die TH1-Untergruppe fördert die Hyperempfindlichkeit vom verzögerten Typ, Zellvermittelte Immunität und Immunglobulinklassenumschaltung auf IgG_{2a}. Die Th2-Untergruppe induziert humorale Immunität, indem B-Zellen aktiviert werden, die Antikörperfunktion gefördert wird und Klassenumschaltung auf IgG₁ und IgE induziert wird. Bei einigen Ausführungsformen ist bevorzugt, dass das Cytokin ein Th1-Cytokin ist.

[0142] Man fand, dass, überraschenderweise, CpG-Oligonukleotide Schleimhautimmunität an entfernten Stellen ebenso wie an lokalen Stellen induzierten. Eine „entfernte Stelle“, wie hierin verwendet, ist ein Schleimhautgewebe, das in einer anderen Region des Körpers als das Schleimhautgewebe angeordnet ist, an das das CpG-Oligonukleotid verabreicht worden ist. Beispielsweise wäre, wenn das CpG-Oligonukleotid intranasal verabreicht wird, eine entfernte Stelle die Schleimhautauskleidung des Darms.

[0143] Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können die Nukleinsäuren de novo unter Verwendung einer Anzahl von Verfahrensweisen synthetisiert werden, die in der Technik gut bekannt sind. Beispielsweise das b-Cyanoethyl-Phosphoramidit-Verfahren (Beaucage, S.L., und Caruthers, M.H., Tet. Let. 22:1859, 1981); das Nucleosid-H-Phosphonat-Verfahren (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). Diese Chemien können durch eine Vielzahl von automatisierten Oligonukleotidsyntheseapparaten durchgeführt werden, die in der Technik verfügbar sind. Alternativ können CpG-Dinukleotide im großen Maßstab in Plasmiden hergestellt werden (siehe Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) und in kleinere Stücke oder als ganzes verabreicht werden. Nachdem es einem Lebewesen verabreicht worden ist, kann das Plasmid zu Oligonukleotiden abgebaut werden. Oligonukleotide können aus bestehenden Nukleinsäuresequenzen (z.B. genomische oder cDNA) unter Verwendung bekannter Techniken hergestellt werden, wie beispielsweise die Verwendung von Restriktionsenzymen, Exonukleasen oder Endonukleasen.

[0144] Zur Verwendung in vivo sind die Nukleinsäuren bevorzugterweise vergleichsweise resistent gegen Abbau (z.B. durch Endo- und Exo-Nukleasen). Sekundärstrukturen wie beispielsweise Stammschleifen können Nukleinsäuren gegen Abbau stabilisieren. Alternativ kann die Nukleinsäurerestabilisierung erreicht werden durch Phosphatrückgratmodifizierung. Eine Art von stabilisierter Nukleinsäure weist wenigstens ein teilweise Phosphothioat-modifiziertes Rückgrat auf. Phosphothioate können synthetisiert werden unter Verwendung von automatisierten Techniken, die entweder Phosphoramidit- oder H-Phosphonat-Chemien verwenden. Aryl- und Alkyl-Phosphonate wie, beispielsweise, in US-Patent Nr. 4,469,863 beschrieben; und Alkylphosphotriester (bei denen der geladene Sauerstoffteil wie in US-Patent Nr. 5,023,243 und dem europäischen Patent Nr. 092,574 beschrieben alkyliert ist) können hergestellt werden durch automatisierte Festphasensynthese unter Verwendung kommerziell verfügbarer Reagenzien. Verfahren zur Herstellung von anderen DNA-Rückgratmodifikationen und -Substitutionen sind beschrieben worden (Uhlmann, E. and Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1:165, 1990).

[0145] Nukleinsäuren, die ein geeignetes nicht-methyliertes CpG enthalten, können in einem jeglichen Wirbeltier wirksam sein. Unterschiedliche Nukleinsäuren, die ein nicht-methyliertes CpG enthalten, können eine optimale Immunstimulierung abhängig von der Säugetierspezies bedingen. Somit muss ein Oligonukleotid, das eine optimale Stimulierung beim Menschen bedingt, keine optimale Stimulierung in einer Maus bedingen und umgekehrt. Die Fachleute auf dem Gebiet können die optimalen Oligonukleotide, die für eine spezielle, interessierende Säugetierspezies nützlich sind, identifizieren unter Verwendung von Routine-Tests, die hierin beschrieben und/oder in der Technik bekannt sind, unter Verwendung der hierin gegebenen Anleitung.

[0146] Der Begriff „wirksame Menge“ eines CpG-Oligonukleotids bezeichnet die Menge, die erforderlich oder ausreichend ist, um eine erwünschte biologische Wirkung zu realisieren. Beispielsweise ist eine wirksame Menge eines Oligonukleotids, das wenigstens ein nicht-methyliertes CpG enthält, für die Induktion von Schleimhautimmunität jene Menge, die erforderlich ist, um die Entwicklung von IgA in Reaktion auf ein Antigen nach Exposition gegenüber dem Antigen zu bedingen. Kombiniert mit den hierin gegebenen technischen Lehren kann, durch Auswahl unter den verschiedenen aktiven Verbindungen und Gewichten der Faktoren wie beispielsweise Potenz, relative Bioverfügbarkeit, Patientenkörbergewicht, Schwere der nachteiligen Nebenwirkungen und bevorzugte Verabreichungswege, ein wirksames prophylaktisches oder therapeutisches Behandlungsregime geplant werden, das keine wesentliche Toxizität bedingt und dennoch vollständig wirksam ist bei

der Behandlung des speziellen Lebewesens. Die wirksame Menge für eine besondere Applikation kann variieren, abhängig von Faktoren wie der Erkrankung oder dem zu behandelnden Zustand, dem zu verabreichen den speziellen CpG-Oligonukleotid (z.B. die Anzahl von nicht-methylierten CpG-Motiven und ihre Lokalisation in der Nukleinsäure), dem Antigen, der Größe des Lebewesens, der Schwere der Erkrankung oder des Zustandes. Ein Fachmann auf dem Gebiet kann empirisch die wirksame Menge eines speziellen CpG-Oligonukleotids und Antigens bestimmen, ohne dass dies über den Rahmen des üblichen hinausgehende Experimente erfordern würde.

[0147] Gegenständliche Dosierungen der hierin beschriebenen Verbindungen reichen typischerweise von etwa 80 mg/Tag bis 16.000 mg/Tag, typischerweise von etwa 800 mg/Tag bis 8.000 mg/Tag und am typischsten von etwa 800 mg/Tag bis 4.000 mg/Tag. Ausgedrückt bezüglich des Körpergewichtes des Lebewesens reichen typische Dosierungen von etwa 1 bis 200 mg/kg/Tag, typischerweise von etwa 10 bis 100 mg/kg/Tag und am typischsten von etwa 10 bis 50 mg/kg/Tag. Bezüglich Körperoberfläche des Lebewesens reichen typische Dosierungen von etwa 40 bis 8000 mg/m²/Tag, typischerweise von etwa 400 bis 4000 mg/m²/Tag und am typischsten von etwa 400 bis 2000 mg/m²/Tag.

[0148] In einigen Ausführungsformen werden wenigstens 50 µg des CpG einem Lebewesen verabreicht. In anderen Ausführungsformen werden dem Lebewesen wenigstens 75 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg und jede ganze Zahl dazwischen des CpG verabreicht.

[0149] Für eine jegliche hierin beschriebene Verbindung kann die therapeutisch wirksame Menge initial aus Zellkulturtests bestimmt werden. Beispielsweise kann die wirksame Menge von CpG-Oligonukleotid, das für die Induktion von Schleimhautimmunität nützlich ist, bewertet werden unter Verwendung der oben beschriebenen in vitro-Tests bezüglich des Stimulierungsindex. Der Stimulierungsindex kann verwendet werden, um eine wirksame Dosis des speziellen Oligonukleotids für das spezielle Lebewesen zu bestimmen und die Dosierung kann nach oben oder unten angepasst werden, um die erwünschten Titer in dem Lebewesen zu erreichen. Therapeutisch wirksame Mengen können auch aus Tiermodellen bestimmt werden. Eine therapeutisch wirksame Dosis kann auch bestimmt werden aus Daten vom Menschen für CpG-Oligonukleotide, die beim Menschen (klinische Versuche am Menschen sind initiiert worden) getestet worden sind, und für Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie ähnliche pharmakologische Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise andere Schleimhautadjuvanzien, z.B. LT und andere Antigene für Vakzinierungszwecke. Die verabreichte Dosis kann auf der Grundlage der relativen Bioverfügbarkeit und Potenz der verabreichten Verbindung eingestellt werden. Das Einstellen der Dosis, um eine maximale Wirksamkeit zu erreichen auf der Grundlage der oben beschriebenen Verfahren und anderen, in der Technik gut bekannten Verfahren, ist im Rahmen der Kenntnisse der Fachleute auf dem Gebiet.

[0150] Die Formulierungen der Erfindung werden in pharmazeutisch akzeptablen Lösungen verabreicht, die routinemäßig pharmazeutisch akzeptable Konzentrationen an Salz, Puffern, Konservierungsstoffen, kompatiblen Trägern, Adjuvanzien und optional anderen therapeutischen Bestandteilen enthalten.

[0151] Für die Verwendung bei der Therapie kann eine wirksame Menge des CpG-Oligonukleotides einem Lebewesen über einen jeglichen Weg verabreicht werden, der das Oligonukleotid an eine Schleimhautoberfläche verabreicht. „Verabreichen“ der pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann erreicht werden durch ein jegliches den Fachleuten auf dem Gebiet bekannte Mittel. Bevorzugte Verabreichungswege umfassen, sind aber nicht beschränkt auf oral, intranasal, intratracheal, Inhalation, Okular, vaginal und rektal.

[0152] Für die orale Verabreichung können die Verbindungen (d. h. CpG-Oligonukleotide, Antigen, Schleimhautadjuvans) leicht formuliert werden, indem das/die aktive(n) Verbindung(en) mit pharmazeutisch akzeptablen Trägern kombiniert wird/werden, die in der Technik gut bekannt sind. Derartige Träger erlauben, dass die Verbindungen der Erfindung als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirupe, Schlämme, Suspensionen und dergleichen für die orale Aufnahme durch ein zu behandelndes Lebewesen formuliert werden. Pharmazeutische Präparate für die orale Verwendung können als feste Bindemittel, optionalem Malen einer sich ergebenden Mischung und Verarbeiten der Mischung aus Granula, nach Hinzufügen geeigneter Hilfsstoffe, sofern erwünscht, erhalten werden, um Tabletten oder Drageekerne zu erhalten. Geeignete Bindemittel sind, insbesondere, Füllmittel, wie beispielsweise Zucker, einschließlich Laktose, Saccharose, Mannitol oder Sorbitol; Zellulosepräparate wie beispielsweise Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragantgummi, Methylzellulose, Hydroxypropylmethylzellulose, Natriumcarboxymethylzellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP). Sofern erwünscht können Sprengmittel hinzugegeben werden, wie beispielsweise quervernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginäsäure oder ein Salz davon wie beispielsweise Natriumalgi-

nat. Optional können die Formulierungen auch in Saline oder Puffern zum Neutralisieren von inneren sauren Bedingungen formuliert werden.

[0153] Drageekerne werden mit geeigneten Beschichtungen versehen. Zu diesem Zweck können konzentrierte Zuckerlösungen verwendet werden, die optional Gummi arabicum, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Carbopol-gel, Polyethylenglykol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelmischungen enthalten. Farbstoffe oder Pigmente können den Tabletten oder Drageebeschichtungen hinzugegeben werden, um verschiedene Kombinationen von Dosen aktiver Verbindung zu identifizieren oder zu charakterisieren.

[0154] Pharmazeutische Präparate, die oral verwendet werden können, umfassen Push-fit-Kapseln, die aus Gelatine hergestellt sind, ebenso wie weiche, versiegelte Kapseln, die aus Gelatine und einem Weichmacher hergestellt sind, wie beispielsweise Glycerol oder Sorbitol. Die Push-fit-Kapseln können die aktiven Bestandteile gemischt mit Füllmitteln wie beispielsweise Laktose, Bindern wie beispielsweise Stärken und/oder Schmiermitteln wie beispielsweise Talk oder Magnesiumstearat und, optional, Stabilisatoren enthalten. In Weichkapseln können die aktiven Verbindungen in geeigneten Flüssigkeiten wie beispielsweise Fettölen, flüssigem Paraffin oder flüssigen Polyethylenglykolen gelöst oder suspendiert sein. Zusätzlich können Stabilisatoren hinzugefügt sein. Mikrosphären, die für die orale Verabreichung formuliert sind, können ebenfalls verwendet werden. Derartige Mikrosphären sind in der Technik gut definiert worden. Alle Formulierungen für die orale Verabreichung sollten in Dosierungen vorliegen, die für eine derartige Verabreichung geeignet sind.

[0155] Für die bukkale Verabreichung können die Zusammensetzungen die Form von Tabletten oder Pastillen einnehmen, die in herkömmlicher Art und Weise formuliert sind.

[0156] Für die Verabreichung durch Inhalation können die Verbindungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung in bequemer Weise in der Form eines Aerosolsprays aus unter Druck befindlichen Verpackungen oder einem Zerstäuber unter Verwendung eines geeigneten Treibmittels, z.B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas abgegeben werden. Im Falle eines unter Druck befindlichen Aerosols kann die Dosierungseinheit bestimmt werden, indem ein Ventil bereitgestellt wird, um eine abgemessene Menge abzugeben. Kapseln und Kartuschen von, z. B., Gelatine zur Verwendung in einem Inhalator oder Insufflator können formuliert werden, die eine Pulvermixschung der Verbindung und eine geeignete Pulverbasis wie beispielsweise Laktose oder Stärke enthält.

[0157] Die Verbindungen können, wenn es erwünscht ist, sie systemisch zu verabreichen, formuliert sein für die parenterale Verabreichung durch Injektion, z.B. Bolus-Injektion oder kontinuierliche Infusion. Formulierungen für die Injektion können in Einheitsdosierungsformen vorliegen, beispielsweise in Ampullen in Mehrfachdosisbehältern, mit einem hinzugefügten Konservierungsstoff. Die Zusammensetzungen können die Form einnehmen von Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in ölichen oder wässrigen Vehikeln und können Formulierungsmittel wie beispielsweise Suspendierungs-, Stabilisierungs- und/oder Dispersionsmittel enthalten.

[0158] Pharmazeutische Formulierungen für die parenterale Verabreichung umfassen wässrige Lösungen der aktiven Verbindungen in Wasser-löslicher Form. Zusätzlich können Suspensionen der aktiven Verbindungen hergestellt werden als geeignete ölige Injektionssuspensionen. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel umfassen Fettöle wie beispielsweise Sesamöl oder synthetische Fettsäureester wie beispielsweise Ethyloleat oder Triglyceride oder Liposomen. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, wie beispielsweise Natriumcarboxymethylzellulose, Sorbitol oder Dextran. Optional kann die Suspension auch geeignete Stabilisatoren oder Agenzien enthalten, die die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen, um die Herstellung von hochkonzentrierten Lösungen zu erlauben.

[0159] Alternativ können die aktiven Formulierungen in Pulverform zur Konstitution mit einem geeigneten Vehikel, z.B. steriles Pyrogen-freiem Wasser, vor der Verwendung vorliegen.

[0160] Die Verbindungen können auch als Rektal- oder Vaginalzusammensetzungen formuliert sein, wie beispielsweise Suppositorien oder Retentionsklistiere, die, z.B., herkömmliche Suppositorienbasen wie beispielsweise Kakaobutter oder andere Triglyceride enthalten.

[0161] Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Formulierungen können die Verbindungen auch als ein Depot-präparat formuliert sein. Derartige langwirkende Formulierungen können mit geeigneten Polymeren oder hydrophoben Materialien (z.B. eine Emulsion in einem akzeptablen Öl) oder Ionenaustauscherharzen, oder als schwer lösliche Derivate, z.B. als ein schwer lösliches Salz formuliert sein.

[0162] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch geeignete feste oder Gelphasenträger oder Bindemittel umfassen. Beispiele für derartige Träger oder Bindemittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Calciumcarbonat, Calciumphosphat, Zucker, Stärken, Zellulosederivate, Gelatine und Polymere wie beispielsweise Polyethylenglycole.

[0163] Geeignete flüssige oder feste pharmazeutische Präparatformen sind, beispielsweise, wässrige oder Saline-Lösungen für die Inhalation, mikroenkapsulierte, encochleierte, auf mikroskopische Goldpartikel beschichtete, in Liposomen enthaltene, vernebelte, Aerosole, Pellets für die Implantation in die Haut oder auf ein scharfes Objekt getrocknete, um in die Haut geritzt zu werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen auch Granula, Pulver, Tabletten, beschichtete Tabletten, (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Cremes, Tropfen oder Präparate mit langanhaltender Freisetzung von aktiven Verbindungen, bei deren Herstellung Bindemittel und Zusatzstoffe und/oder Hilfsstoffe wie beispielsweise Sprengmittel, Binder, Beschichtungsmittel, Quellmittel, Gleitmittel, Geschmacksmittel, Süßmittel oder Lösungsvermittler üblicherweise wie oben beschrieben verwendet werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sind für die Verwendung bei einer Vielzahl von Wirkstoffabgabesystemen geeignet. Für eine kurze Übersicht gegenwärtiger Verfahren zur Wirkstoffabgabe, siehe Langer, Science 249: 1527-1533, 1990.

[0164] Die CpG-Oligonukleotide und Antigene können per se (nackt) oder in der Form eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes verabreicht werden. Wenn in der Medizin verwendet, sollten die Salze pharmazeutisch akzeptabel sein, aber nicht-pharmazeutisch akzeptable Salze können bequemerweise verwendet werden, um pharmazeutisch akzeptable Salze daraus herzustellen. Derartige Salze umfassen, sind aber nicht beschränkt auf jene, die aus den folgenden Säuren hergestellt werden: Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, Maleinsäure, Essigsäure, Salicylsäure, p-Toluensäure, Weinsäure, Zitronensäure, Methansulfonsäure, Ameisensäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Naphthalen-2-sulfonsäure und Benzensulfonsäure. Derartige Salze können auch als Alkalimetall- oder Erdalkalisalze hergestellt werden, wie beispielsweise Natrium-, Kalium- oder Calciumsalze der Carboxylsäuregruppe.

[0165] Geeignete Puffermittel umfassen Essigsäure und ein Salz (1-2 % Gew./Vol.); Zitronensäure und ein Salz (1-3 % Gew./Vol.); Borsäure und ein Salz (0,5-2,5 % Gew./Vol.) und Phosphorsäure und ein Salz (0,8-2 % Gew./Vol.). Geeignete Konservierungsmittel umfassen Benzalkoniumchlorid (0,003-0,03 % Gew./Vol.); Chlorbutanol (0,3-0,9 % Gew./Vol.); Parabene (0,01-0,25 % Gew./Vol.) und Thimerosal (0,004-0,02 % Gew./Vol.).

[0166] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung enthalten eine wirksame Menge eines CpG-Oligonukleotides und Antigene, die optional in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten sind. Der Begriff „pharmazeutisch akzeptabler Träger“ bedeutet einen oder mehrere kompatible feste oder flüssige Füllmittel, Verdünnungsmittel oder Verkapselungssubstanzen, die für die Verabreichung an einen Menschen oder einen anderen Vertebraten geeignet sind. Der Begriff „Träger“ bezeichnet einen organischen oder anorganischen Bestandteil, natürlich oder synthetisch, mit dem der aktive Bestandteil kombiniert ist, um die Anwendung zu erleichtern. Die Bestandteile der pharmazeutischen Zusammensetzungen sind auch in der Lage, eng mit den Verbindungen der vorliegenden Erfindung und miteinander vermischt zu werden, in einer Art und Weise, so dass keine Wechselwirkung auftritt, die die erwünschte pharmazeutische Wirksamkeit wesentlich stören würde.

[0167] Die CpG-Oligonukleotide oder Antigene, die bei der Erfindung nützlich sind, können als Mischung mit zusätzlichem/zusätzlichem Schleimhautadjuvans/Schleimhautadjuvanzen oder Antigen(en) abgegeben werden. Eine Mischung kann aus mehreren Schleimhautadjuvanzen zusätzlich zu dem CpG-Oligonukleotid oder deren Antigenen bestehen.

[0168] Eine Vielzahl von Verabreichungswegen sind verfügbar. Der speziell ausgewählte Weg wird, natürlich, von den besonderen ausgewählten Adjuvanzen oder Antigen abhängen, dem speziell zu behandelnden Zustand und der für die therapeutische Wirksamkeit erforderlichen Dosierung. Die Verfahren der Erfindung können, allgemein gesprochen, unter Verwendung irgendeines Verabreichungsweges, der medizinisch akzeptabel ist, durchgeführt werden, was bedeutet, eine jegliche Art, die wirksame Titer einer Immunantwort liefert, ohne klinisch inakzeptable nachteilige Wirkungen zu bedingen. Bevorzugte Verabreichungsweisen sind oben diskutiert.

[0169] Die Zusammensetzungen können bequem in Einheitsdosierungsform präsentiert werden und können hergestellt werden durch ein jegliches der auf dem Gebiet der Pharmazie bekannten Verfahren. Alle Verfahren umfassen den Schritt, die Verbindungen mit einem Träger in Verbindung zu bringen, der ein oder mehrere zu-

sätzliche Bestandteile darstellt. Im Allgemeinen werden die Zusammensetzungen hergestellt, indem die Verbindungen gleichförmig und eng mit einem flüssigen Träger, einem fein verteilten Feststoffträger oder beiden in Kontakt gebracht werden und dann, sofern erforderlich, das Produkt geformt wird. Flüssigdosierungseinheiten sind Glasmehrchen und Ampullen. Feste Dosiseinheiten sind Tabletten, Kapseln und Suppositorien. Für die Behandlung eines Patienten können, abhängig von der Aktivität der Verbindung, der Art der Verabreichung, dem Ziel der Immunisierung (z. B. prophylaktisch oder therapeutisch), der Natur und Schwere der Erkrankung, des Alters und Körpergewichtes des Patienten, verschiedene Dosierungen erforderlich sein. Die Verabreichung einer gegebenen Dosis kann durchgeführt werden sowohl durch einzelne Verabreichungen in der Form einer einzelnen Dosiseinheit als auch durch mehrere kleinere Dosierungseinheiten. Mehrfachverabreichung von Dosen in spezifischen Intervallen von Wochen oder Monaten ist daneben für das Auffrischen der Antigen-spezifischen Antworten üblich.

[0170] Andere Abgabesysteme können Systeme zur zeitlich gesteuerten, verzögerten oder langsamen Abgabe umfassen. Derartige Systeme können die wiederholten Verabreichungen der Verbindungen vermeiden, was sowohl für das Lebewesen als auch für den Arzt bequem ist. Viele Arten von Freisetzungssystemen sind verfügbar und den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Sie umfassen Polymer-basierte Systeme wie beispielsweise Poly(Lactid-Glycolid), Copolyoxalate, Polycaprolactone, Polyesteramide, Polyorthoester, Polyhydroxybuttersäure und Polyanhydride. Mikrokapseln der vorstehenden Polymere, die Wirkstoffe enthalten, sind, beispielsweise, im US-Patent 5,075,109 beschrieben. Abgabesysteme umfassen auch Nicht-Polymersysteme wie: Lipide, einschließlich Sterolen wie beispielsweise Cholesterin, Cholesterolester und Fettsäuren oder Neutralfette wie beispielsweise Mono-, Di- und Triglyceride; Hydrogelfreisetzungssysteme, sylastische Systeme, Peptid-basierte Systeme, Wachsbeschichtungen, komprimierte Tabletten unter Verwendung herkömmlicher Binder und Bindemittel; teilweise verschmolzene Implantate; und dergleichen. Spezifische Beispiele umfassen, sind aber nicht beschränkt auf (a) Erosionssysteme, bei denen ein Agens der Erfindung in einer Form innerhalb einer Matrix enthalten ist, wie jener, die in den US-Patenten 4,452,775, 4,675,189 und 5,736,152 beschrieben sind, und (b) Diffusionssysteme, bei denen ein aktiver Bestandteil mit einer gesteuerten Geschwindigkeit aus einem Polymer permeiert, wie beispielsweise in den US-Patenten 3,854,480, 5,133,974 und 5,407,686 beschrieben. Zusätzlich können Pumpenbasierte Hardware-Abgabesysteme verwendet werden, von denen einige für die Implantation angepasst sind.

[0171] Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht, die in keinster Weise als weiter beschränkend ausgelegt werden sollen.

Beispiele

Beispiel 1: Materialien und Methoden

1. Materialien und Tiere

[0172] Mäuse. Alle Experimente wurden durchgeführt unter Verwendung von weiblichen BALB/c-Mäusen, im Alter von 6 bis 8 Wochen, mit 5 bis 10 Mäuse pro experimenteller- oder Kontroll-Gruppe. Für intranasale Immunisierungen wurden die Mäuse leicht mit Halothane® (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ) betäubt.

[0173] Adjuvanzien: Die Mäuse wurden immunisiert durch IN-Verabreichung von 1 µg HBsAg (Plasma-gewonnenes HBV S-Protein, ad subtype, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA), alleine oder kombiniert mit 1 oder 10 µg CT (gereinigt aus *Vibrio cholerae*, Sigma, St. Louis, MO), LT (gereinigt aus *Escherichia coli*, Sigma), CTB (gereinigt aus *Vibrio cholerae*, Sigma), LTK63 (Mutante von LT, die ein Ser-Lys an Position 63 trägt, großzügiger Weise bereitgestellt von Dr. Rino Rappuoli, IRIS, Chiron S.p.A., Italien) und/oder CpG-ODN (5'-TC-CATGACGTTCTGACGTT-3', CpG-ODN #1826 SEQ ID NO.90) oder nicht-CpG-Kontroll-ODN (5'TCCAG-GACTTCTCTCAGGTT-3', CpG-ODN #1982 SEQ ID NO. 91) (Hybridon Specialty Products, Milford, MA). Das Antigen und das/die Adjuvans/Adjuvanzien wurden mit 0,15 M NaCl auf ein Volumen von 150 µl gebracht und wurden durch IN-Inhalation verabreicht. ODN wurden erneut in 10 mM Tris (pH 7,0), 1 mM EDTA zu Lagerungszwecken bei 4°C vor Verdünnung in Saline für Immunisierung suspendiert. LPS-Titer in ODN war nicht bestimmbar durch Limulus-Test (< 1 ng/mg) (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD).

2. Schleimhautimmunisierung

[0174] Ein jedes Tier wurde mit 1 oder 10 Fg Plasma-gewonnenem HBV S-Protein (HBsAg, ad-Subtyp, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA) immunisiert, das alleine oder in Kombination mit 1 oder 10 µg CT oder LT oder einem Derivat davon und/oder CpG-Oligonukleotid #1826 verabreicht wurde. Die Derivate von CT waren

die B-Untereinheit von CT (CTB). Die detoxifizierten Derivate von LT wurden alle durch genetische Mutationen produziert, die die Untereinheit A oder die enzymatische Aktivität betrafen, und umfassten LTK63. Alle Vakzine wurden in einem Gesamtvolumen von 150 µl abgegeben, die als Tröpfchen direkt über beide äußere Nasenöffnungen von leicht betäubten Mäusen verabreicht wurden. Einige Mäuse wurden erhielt eine Auffrischung in der gleichen Art und Weise 8 Wochen nach der Aktivierung. Alle experimentellen Gruppen enthielten 5 oder 10 Mäuse.

3. Sammeln von Proben

[0175] Plasma: Plasma wurde aus Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung (1, 2, 4 und 8 Wochen nach Aktivierung und 1, 2 und 4 Wochen nach Auffrischung) durch retroorbitales Ausbluten gewonnen und bis zum Testen bei -20°C gelagert.

[0176] Stuhlpellets: Stuhlpellets wurden von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung (1, 2, 4 und 8 Wochen nach Aktivierung und 1, 2 und 4 Wochen nach Auffrischung) gesammelt. Die Mäuse wurden in Einzelkäfigen ohne Einstreu für 24 Stunden isoliert, wonach Stuhlpellets gesammelt und in 0,1 mg Aliquots abgewogen wurden. 1 ml TBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5) und 0,1 Fg Natriumazid (Sigma) wurden pro 0,1 mg Stuhlmaterial hinzugegeben. Man erlaubte, dass die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur rehydratisierten, diese wurden dann bei 6000 Upm für 15 Minuten abzentrifugiert, um Stuhldebris zu entfernen und die Überstände wurden gesammelt und bei -20°C gelagert, bis sie auf S-IgA durch ELISA getestet wurden.

[0177] Lungenspülungen: Lungenspülungen wurden durchgeführt an Mäusen 4 Wochen nach der primären Immunisierung oder Aktivierung. Eine 0,33 cc Insulinspritze mit einer daran befestigten 29G1/2-Nadel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) wurde verwendet, um die Lungenspülungen durchzuführen. Ein ml TBS wurde in die Spritze aufgezogen und ein Abschnitt eines Polyethylen (PE)-Schlauches, der 1 cm länger war als die Nadel, wurde befestigt (PE20, ID = 0,38 mm, Becton Dickinson). Die Maus wurde durch eine Betäubungsmitteleüberdosis getötet und die Trachea unmittelbar durch einen anterioren Mittellinieneinschnitt exponiert, der gemacht wurde unter Verwendung einer feinspitzigen chirurgischen Schere (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC). Dann wurde ein kleiner Einschnitt dann in die Trachea vorgenommen und eine Klemme (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC) wurde oberhalb desselben angebracht. Der PE-Schlauch wurde durch den Einschnitt einige wenige mm die Trachea hinunter eingeführt und eine zweite Klemme wurde gerade oberhalb des Einschnittes angebracht, um den PE-Schlauch in der Trachea vor Ort zu halten. Die TBS-Lösung wurde langsam in die Lungen eingeträufelt, dann dreimal zurückgezogen (es wurde eine Wiedergewinnungsrate von 80% erwartet). Die wiedergewonnenen Proben wurden bei 13.000 Upm für 7 Min. zentrifugiert und die Überstände gesammelt und bei -20°C gelagert, bis sie durch ELISA getestet wurden.

4. Evaluierung von Immunantworten

[0178] Systemische humorale Antwort: HBsAg-spezifische Antikörper (anti-HBs) in dem Mausplasma wurden nachgewiesen und durch Endpunktverdünnungs-ELISA-Test (dreifach) für einzelne Tiere quantifiziert, wie früher beschrieben (Davis et al., 1998). Kurz gesagt wurden Polystyrolplatten mit 96 Näpfen (Corning) über Nacht (RT) mit aus Plasma gewonnenen HbsAg-Partikeln beschichtet (wie sie für die Immunisierung verwendet wurden) (100 FI von 1 Fg/ml in 0,05 M Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer, pH 9,6) wurden mit dem Plasma für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eingefangene Antikörper wurden dann mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG, -IgG1 oder -IgG2a (1:4000 in PBS-Tween, 10 % PBS: 100 FI/Napf; Southern Biotechnology Inc., Birmingham, AL) nachgewiesen, gefolgt von Zugabe von o-Phenyldiamin-Dihydrochloridlösung (OPD, Sigma), 100 FI/Napf für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 N H₂SO₄, 50 FI/Napf abgestoppt.

[0179] Endpunktverdünnungstiter wurden als die höchste Plasmaverdünnung definiert, die zu einem Absorbanzwert (OD 450) führte, der zweifach größer ist, als der von nicht-Immunplasma mit einem Ausschlusswert von 0,05. Anti-HBs-Titer von reagierenden Mäusen (Endpunkttiler > 10) wurden als mittlere SEM einzelner Tierwerte exprimiert, die selbst der Durchschnitt von Dreifachtests waren.

[0180] Humorale Schleimhautantwort: Dies wurde wie für Plasma (oben) durchgeführt an Stuhlderivaten oder wiedergewonnenen Lungenspülungen mit der Ausnahme, dass die Proben auf beschichteten Platten für 2 Stunden bei 37°C inkubiert wurden und eingefangene Antikörper mit HRP-konjugiertem Ziegen-anti-Maus IgA (1:1000 in PBS-Tween, 10 % PBS: 100 FI/Napf, Southern Biotechnology Inc.) nachgewiesen wurden. Nicht-Immune Stuhlpellets oder -Lungenspülungslösungen wurden verwendet, um Negativkontrollen zu bestimmen. Für Lungenwaschlösungen wurden anti-HBs-Endpunktverdünnungstiter berichtet (wie oben be-

schrieben), wohingegen für Stuhlpelletlösungen Absorbanzwerte (OD 450) von mehr als dem von Nicht-Immunstuhlpelletlösung berechnet wurden und als mittlere SEM einzelner OD 450-Werte exprimiert wurden, die selbst der Durchschnitt von Dreifachtests waren.

[0181] Evaluierung von CTL Antworten: Milzen wurden von 4 Wochen alten Mäusen nach primärer Immunisierung oder Auffrischung entfernt. In vitro Tests von HBs-Ag-spezifischer zytolytischer Aktivität wurde durchgeführt, wie früher beschrieben (Davis et al., 1998). Kurz gesagt wurden einzelne Zellsuspensionen hergestellt und in Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % FBS, Life Technologies, Grand Island, NY, supplementiert mit Penicillin-Streptomycin-Lösung, 1000 U/ml, 1 mg/ml Endkonzentrationen, Sigma) suspendiert. Splenozyten (3×10^7) wurden für 5 Tage co-kultiviert (37°C , 5 % CO₂) mit $1,5 \times 10^6$ syngeneischen HbsAg-exprimierenden Stimulatorzellen (P815-präS, großzügigerweise zur Verfügung gestellt von F. V. Chisari, Scripps Institute, La Jolla, CA), die zuvor durch Bestrahlung (20 000 rad) inaktiviert worden waren. Effektorzellen wurden geerntet, gewaschen, seriell verdünnt und mit 5×10^4 ^{51}Cr -markierten HbsAg-exprimierenden Zielzellen (P815S) in Kulturplatten mit 96 Näpfen mit Rundboden kultiviert (37°C , 5 % CO₂, 4 Stunden). Überstand (100 FI) wurde entfernt zur Strahlen(gamma)zählung. Spontanfreisetzung wurde bestimmt durch Inkubieren von Zielzellen ohne Effektorzellen und Gesamtfreisetzung durch Hinzugabe von 100 FI 2 N HCl zu den Zielzellen. Der Prozentsatz Lyse wurde berechnet als $\frac{[(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})]}{(\text{Gesamtfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})} \times 100$. Der Prozentsatz spezifische Lyse wurde berechnet als Prozentsatz Lyse mit P815S – % Lyse mit P815-Zellen. CTL-Aktivität für reagierende Mäuse [prozentspezifische Lyse > 10 bei Effektor: Target (E:T) von 25:1] wurden auch als mittlere SEM für individuelle Tierwerte exprimiert, die selbst der Durchschnitt von Dreifachtests waren.

5. Statistische Analyse

[0182] Daten wurden analysiert unter Verwendung des GraphPAD InStat Programmes (Graph PAD Software, San Diego). Die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen wurde bestimmt aus den Mittelwerten und Standardabweichungen durch den zweischwänzigen Student t-Test und zwischen zwei oder mehr Gruppen durch Einfaktorvarianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey Test für Mehrbereichstesten. Unterschiede mit $P > 0,05$ wurden als nicht signifikant erachtet.

Beispiel 2. Systemische humorale Antworten nach Schleimhautimmunisierung

[0183] BALB/c-Mäuse, die bei einer einzelnen Gelegenheit durch IN-Inhalation von HBsAg ohne Adjuvans immunisiert wurden, zeigten keine nachweisbaren anti-HBs-IgG-Antikörper in ihrem Plasma mit 1 µg HBsAg und nur sehr niedrige Titer (<20) bei einigen wenigen Mäusen mit 10 µg Antigen ([Fig. 1](#)).

[0184] Im Gegensatz dazu waren Titer von anti-HBs-IgG erheblich größer, wenn HBsAg zusammen mit entweder CpG-Oligonukleotid oder CT als Adjuvans verabreicht wurde ([Fig. 1](#)). Mit einer niedrigen Dosis Adjuvans (1 µg) und entweder einer niedrigen oder hohen Dosis Antigen (1 oder 10 µg HBsAg) stellte sich CpG-Oligonukleotid als äquivalent zu CT hinsichtlich Induktion von Plasma-anti-HBs-IgG heraus ($p = 0,73$ mit 1 µg HBsAg und $0,13$ mit 10 µg HBsAg). CpG-Oligonukleotid und CT waren ebenfalls äquivalent zu einer höheren Dosis Adjuvans (10 µg) und höheren Dosis Antigen (10 µg HBsAg) ($p = 0,08$), mit einer niedrigeren Dosis von Antigen waren die höheren Dosen von CT CpG-Oligonukleotid jedoch überlegen ($p = 0,01$) ([Fig. 1](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass CpG-Oligonukleotid im wesentlichen hinsichtlich der Verstärkung von systemischen Immunantworten bei Schleimhautabgabe (IN) eines Proteinantigens gleichwertig zu CT ist.

[0185] Eine kombinierte niedrige Dosis aus CpG-Oligonukleotid und CT (jeweils 1 µg) ergab eine bessere systemische humorale Antwort als 10 µg CpG-Oligonukleotid alleine ($p = 0,01$) und war gleichwertig zu der mit 10 µg CT alleine ($p = 0,22$), bei Verabreichung mit einer Dosis von 1 µg HBsAg. Weiterhin induzierten, bei einer Dosis von HBsAg von 10 µg, die kombinierten Adjuvanzien (jeweils 1 µg) anti-HBs IgG-Titer so hoch wie jene mit 10 µg von einem jeden Adjuvans alleine (CT, $p = 0,27$; CpG-Oligonukleotid, $p = 0,09$) ([Fig. 1](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass CpG-Oligonukleotid synergistisch mit CT wirken kann, wenn es an Schleimhautgewebe verabreicht wird, um starke systemische humorale Antworten zu induzieren und erlaubt damit, dass eine geringere Adjuvantsdosis verabreicht wird.

[0186] Antikörpertiter wurden weiter um das etwa Zehnfache erhöht durch Auffrischen nach 8 Wochen. Post-Auffrischungs-Titer von Plasma IgG waren äquivalent für CT und CpG-Oligonukleotid, wenn alleine verwendet, und waren 5 bis 10-fach höher als jene mit beiden Adjuvanzien zusammen ([Fig. 2](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Adjuvanswirkung von CpG-Oligonukleotid alleine oder in Kombination mit CT durch Auffrischung verstärkt werden kann.

[0187] Die Evaluierung von Plasma auf IgG-Antikörperisotypen nach einer einzelnen Schleimhautimmunisierung zeigte überwiegend IgG1-Antikörper (Th2-ähnlich) mit CT und gemischte IgG1/IgG2a-Antikörper (Th0) mit CpG-Oligonukleotid alleine oder in Kombination mit CT. Der Anteil von IgG2a-Isotypantikörpern war etwa zehnfach höher mit CpG-ODN als mit CT, was einen größeren Th1-Einfluss von CpG-ODN verglichen mit CT zeigt. Weiterhin ergab die Kombination von CpG-ODN und CT ein fünfzigfach erhöhtes IgG2a:IgG1-Verhältnis als CT alleine ([Fig. 3](#)). Nach Auffrischung waren HBs überwiegend noch IgG1 mit CT und gemischt mit CpG-Oligonukleotid, obwohl im letzteren Fall der Anteil von IgG2a nun höher war. Überraschenderweise waren Plasma-anti-HBs nach Auffrischung mit CpG-Oligonukleotid und CT überwiegend IgG2a (Th1-ähnlich) ([Fig. 3](#)). Diese Beobachtungen zeigten, dass CpG-Oligonukleotid als ein Schleimhautadjuvans eine Th1-ähnliche Antwort stimuliert, selbst in Gegenwart eines starken Th2-ähnlichen Adjuvans wie CT.

[0188] Ähnliche Ergebnisse wurden gefunden, wenn LT anstelle von CT verwendet wurde ([Fig. 7](#), Tabellen 2 und 3). CT und LT, die eng verwandt sind mit beachtlicher struktureller und funktionaler Homologie, sind beide für die Anwendung bei Menschen zu toxisch. Es gibt jedoch eine Anzahl von Abwandlungen von CT und LT, die eine Adjuvanzaktivität beibehalten, aber viel weniger toxisch sind. Ein Beispiel ist die Untereinheit B von CT (CTB), die nicht-toxisch ist, da die Toxizität mit der Untereinheit A verbunden ist. Ein weiteres Beispiel ist LTK63, eine genetisch detoxifizierte Mutante von LT mit keiner toxischen enzymatischen Aktivität. Obwohl diese Adjuvanzien in klinischen Versuchen an Menschen verwendet werden, war keines so stark wie CpG-ODN hinsichtlich der Induktion systemischer Immunität (Serum-IgG), wenn ein jedes mit 1 µg verwendet wurde ([Fig. 7](#)). Es gab auch eine synergistische Wirkung, wenn CpG-ODN und CTB oder LTK63 zusammen verwendet wurden, dies war jedoch stärker erkennbar hinsichtlich einer Th1-Verschiebung als hinsichtlich der Stärke der Antikörperantwort ([Fig. 7](#) und Tabelle 2).

Beispiel 3: Systemische CTL-Antworten nach Schleimhautimmunisierung

[0189] Nur niedrige Titer an CTL wurden mit HBsAg alleine induziert, jedoch erhöhte das Hinzugeben von entweder CpG-Oligonukleotid oder CTB signifikant die HBsAg-spezifische CTL-Aktivität. CTL-Antworten waren äquivalent für CT und CpG-Oligonukleotid, unabhängig von der Dosis. Eine Kombination aus CT und CpG-Oligonukleotid (jeweils 1 µg) erhöhte jedoch die CTL-Antworten etwa um das Zweifache ([Fig. 4](#)).

Beispiel 4: Humorale Schleimhautantworten nach Schleimhautimmunisierung

[0190] Es wurden kein anti-HBs S-IgA in Lungenspülungen von Mäusen nachgewiesen, die mit 1 oder 10 µg HBsAg alleine immunisiert wurden. Auch wurde kein anti-HBs-IgA nachgewiesen, wenn die niedrige Antigendosis mit einer niedrigen Dosis (1 µg) von entweder CpG-Oligonukleotid oder CT oder mit einer hohen Dosis von CpG-Oligonukleotid kombiniert war; nur niedrige Titer wurden nachgewiesen mit niedrigen Antigendosen und hohen CT-Dosen ([Fig. 5](#)). Wenn jedoch niedrige Dosen von sowohl CpG-Oligonukleotid als auch CT (jeweils 1 µg) zusammen mit der niedrigen Antigendosis verwendet wurden, konnten erhebliche Titer an HBsAg-spezifischem S-IgA in Lungenspülungen nachgewiesen werden ([Fig. 5](#)).

[0191] Mit einer höheren Antigendosis (10 µg) wurde S-IgA in Lungenspülungen von Mäusen nachgewiesen, denen man entweder niedrige oder hohe Dosen von CT und/oder CpG-Oligonukleotid verabreicht hatte. Titer von IgA waren signifikant höher mit 1 µg der zwei Adjuvanzien zusammen als mit 10 µg CT oder CpG-Oligonukleotid alleine ($p = 0,0003$ bzw. $< 0,0001$) ([Fig. 5](#)). IgA-Titer erhöhten sich etwa um das Zehnfache nach Auffrischen mit beiden Adjuvanzien. Das CpG-Oligonukleotid kann somit eine spezifische lokale Schleimhautimmunität gegen Antigen induzieren, das intranasal verabreicht ist. Weiterhin, ähnlich zu dem was für die systemische Antwort (oben) gefunden wurde, wirkt CpG-Oligonukleotid synergistisch mit CT für die Induktion von Schleimhautimmunität.

[0192] IgA wurde auch in Stuhlpellets von Mäusen nachgewiesen, die mit HBsAg und 10 µg CpG-Oligonukleotid immunisiert waren. Im Gegensatz dazu wurden nur sehr geringe Titer in Mäusen nachgewiesen, die mit HBsAg in Kombination mit CT (1 oder 10 µg) immunisiert wurden ([Fig. 6](#)). CpG-Oligonukleotid kann somit Schleimhautimmunität an entfernten Schleimhautstellen induzieren.

Beispiel 5: Schleimhaut und systemische Immunantwort gegen andere Schleimhautadjuvanzien

Systemische Immunantworten

[0193] IN-Abgabe von HBsAg (1 µg) ohne Adjuvans führte nicht zu einer Induktion von nachweisbaren anti-HBs-IgG-Antikörper im Plasma von irgendeiner Maus (0/15). Im Gegensatz dazu wurden hohe Titer von an-

ti-HBs-IgG in allen Mäusen induziert, wenn HBsAg in Kombination mit CpG, CT oder LT als Adjuvans verabreicht wurde ([Fig. 7](#), Tabelle 2). Bei niedrigen Dosen (1 µg) ergaben LT, CT und CpG äquivalente anti-HBs-IgG-Titer ($p = 0,22$). Bei einer hohen Dosis (10 µg) ergaben CT und LT höhere Titer als CpG, jedoch starben 5/10 Mäuse, die diese LT-Dose erhielten, innerhalb von 10 Tagen. Es war kein nachweisbares anti-HBs-IgG bei einer niedrigen Dosis (1 µg) CTB oder LTK63 nachweisbar, eine hohe Dosis (10 µg) CTB ergab jedoch niedrige anti-HBs-IgG-Endpunkt-ELISA-Titer und eine hohe Dosis (10 µg) LTK63 ergab gute Titer an anti-HBs-IgG ebenso wie eine hohe Dose (10 µg) von CpG ($p = 0,97$) ([Fig. 7](#), Tabellen 2 und 3).

[0194] Wenn zusammen verwendet, schien CpG und endweder LT oder CT (jeweils 1 µg) eine synergistische Wirkung zu haben, da anti-HBs-Titer fünf- bis zehnfach höher waren als jene mit irgendeinem der drei Adjuvanzien alleine ([Fig. 7](#)). In der Tat ergab CpG plus LT (jeweils 1 µg) eine bessere Antwort als 10 µg CpG oder LT alleine ($p = 0,007$ bzw. 0,015) und die Antwort mit CpG plus CT (jeweils 1 µg) war gleichwertig zu der mit 10 µg CT alleine ($p = 0,65$). Im Gegensatz dazu trat keine synergistische Wirkung mit LTK63 plus CpG (jeweils 1 µg) für anti-HBs-IgG-Titer auf, die gleichwertig zu jenen waren mit 1 µg CpG alleine ($p = 0,40$). Überraschenderweise ergab CTB plus CpG (jeweils 1 µg) niedrigere anti-HBs-Titer als 1 µg CpG alleine ($p = 0,007$) ([Fig. 7](#)). Adjuvanzwirkungen mit CpG-ODN beruhten auf dem CpG-Motiv und nicht auf nicht-spezifischen Wirkungen des ODN-Rückgrats, da Mäuse, die mit 1 µg HBsAg plus 10 µg nicht-CpG-ODN immunisiert waren, keine (7/10) oder sehr niedrige (3/10)-Titer von anti-HBs-IgG-Antikörpern (Daten nicht gezeigt) aufwiesen.

[0195] Antikörper waren vorwiegend IgG1 (Th2-ähnlich) mit CT, CTB und LT und gemischt IgG1/IgG2a (Th1/Th2) mit LTK63. Bei niedrigen Dosen (1 µg) waren Antworten mit CpG gemischt IgG1/IgG2a (Th1/Th2), aber bei einer höheren Dosis (10 µg) mehr Th1 (IgG2a » IgG1). Antworten waren gemischt Th1/Th2 mit CT/CpG oder CTB/CpG und mehr Th1 mit LT/CpG. Bei einer niedrigen Dosis (jeweils 1 µg) LTK63/CpG waren die Antworten Th1/Th2, aber bei einer höheren Dosis (jeweils 10 µg) mehr Th1 (Tabelle 3). Die Coverabreitung von CpG mit anderen Adjuvanzien verschob somit die Antworten zu einer mehr Th1-ähnlichen Antwort, wie durch einen größeren Anteil von IgG2a-Antikörpern angezeigt.

Schleimhautimmunantworten

[0196] Wenn Adjuvanzien alleine verwendet wurden, hatten nur Mäuse, die LT oder LTK63 erhielten, nachweisbares IgA in Lungenspülungen, wenn CpG-ODN jedoch auch mit CT oder LT umfasst war, antwortete eine größere Anzahl von Tieren oder die Titer waren höher als mit vergleichbaren Dosen alleine, was eine synergistische Wirkung nahe legt. CpG alleine induzierte IgA nicht. Auch CTB, alleine oder in Kombination mit CpG tat dies nicht (Tabelle 3).

[0197] Nur einige Adjuvanzien für sich genommen (LT und CpG) induzierten IgA in Stuhl und dann nur bei einigen Tieren. Kein erhebliches IgA wurde mit CT, CTB, LTK63 oder nicht-CpG-ODN nachgewiesen. CpG und LT führten zusammen zu IgA im Stuhl bei einem größeren Anteil von Tieren als ein jedes Adjuvans alleine, was eine additive oder synergistische Wirkung vorschlägt. Keine Wirkungen waren mit anderen Kombinationen evident (Tabelle 3).

Tabelle 2: Wirkung von Adjuvans auf HBsAg-spezifische Antikörperisotypen

Adjuvans ^a	Dosis (μ g)	Anti-HBs-Antwort		
		IgG2a ^b	IgG1 ^b	IgG2a:IgG1 ^c
keines	-	0	0	N/A ^d
CT	1	36	1632	0.02
CT	10	406	3849	0.1
CTB	1	0	0	N/A
CTB	10	6	59	0.1
LT	1	226	6457	0.04
LT	10	895	2024	0.44
LTK63	1	0	0	N/A
LTK63	10	231	455	0.5
CpG-ODN	1	146	403	0.4
CpG-ODN	10	549	41	13.4
Kontroll-ODN	1	0	0	N/A
Kontroll-ODN	10	0	0	N/A
CT + CpG-ODN	jeweils 1	3376	2374	1.4
CTB + CpG-ODN	jeweils 1	0	0	N/A
LT + CpG-ODN	jeweils 1	6268	1438	4.4
LTK63 + CpG-ODN	jeweils 1	185	272	0.7
CT + Kontroll-ODN	jeweils 1	402	5087	0.08
CT + CpG-ODN	jeweils 10	= ^e	=	=
CTB + CpG-ODN	jeweils 10	227	208	1.1
LT + CpG-ODN	jeweils 10	=	=	=
LTK63 + CpG-ODN	jeweils 10	3170	413	7.7

Tabelle 3. Wirkung von Adjuvans auf HBsAg-spezifische IgA-Antworten

Adjuvans ^a	Dosis (μ g)	Anti-HBs-Antwort ^b			
		Lunge		Stuhl	
		IgA ^c	Anzahl von Respodern	IgA ^d	Anzahl von Respondern
keines	-	0	0	0	0
CT	1	0	0	0	0
CT	10	0	0	0	0
CTB	1	0	0	0	0
CTB	10	0	0	0	0
LT	1	160 \pm 68	5	100,200	2
LT	10	17 \pm 5	3/3 (2 tot)	200 \pm 50	3/3 (2 tot)
LTK63	1	0	0	0	0
LTK63	10	26 \pm 6	4	0	0
CpG-ODN	1	0	0	100	1
CpG-ODN	10	0	0	0	0
Kontroll-ODN	1	0	0	0	0
Kontroll-ODN	10	0	0	0	0
CT + CpG-ODN	jeweils 1	17,49	2	120	1
CTB + CpG-ODN	jeweils 1	0	0	0	0
LT + CpG-ODN	jeweils 1	232 \pm 34	5	150 \pm 20	4
LTK63 + CpG-ODN	jeweils 1	14	1	0	0
CT + Kontroll-ODN	jeweils 1	0	0	0	0
CT + CpG-ODN	jeweils 10	= ^e	=	=	=
CTB + CpG-ODN	jeweils 10	17	1	0	0
LT + CpG-ODN	jeweils 10	=	=	=	=
LTK63 + CpG-ODN	jeweils 10	28 \pm 46	3/4	130	1/4

Table 4: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Aktivierungs-/Auffrischungs-Strategien auf HBsAg-spezifische Immunantworten

AKTIVIERUNG	AUFFRISCHUNG	IgA			IgG	CTL	TCP
		L	S	F			
IM Ag + Alaun + CpG	keines				X		X
	IM Ag + Alaun + CpG			X	X	X	X
	IN Ag	X	X		X	X	X
	IN Ag + CT	X	X		X	X	X
	IN Ag + CpG	X	X		X	X	X
	IN Ag+CT+CpG	X	X	X	X	X	X
IN Ag					X		
IN Ag + CT	IM Ag + Alaun + CpG			X	X	X	X
IN Ag+CpG					X	X	X
IN Ag + CT + CpG		X	X	X	X	X	X
IN Ag + CT + CpG	IN Ag + CT + CpG	X	X	X	X	X	X
IN Ag + CT + CpG	keines				X		X

Ag: 1 µg HBsA

CpG: 1 µg #1826,

CT: 1 µg, Alaun: 25 µg

L: Lunge, Ausschluss GMT = 10

S: Speichel, Ausschluss $OD_{450} \times 10^3 = 100$

F: Stuhl, Ausschluss $OD_{450} \times 10^3 = 100$

CTL, Ausschluss 20% bei E:T 100:1

TCP, Ausschluss 2500 Cpm

LITERATURSTELLEN

- Alpar HO, Ozsoy Y, Bowen J, Eyles JE, Conway BR, Williamson ED. Potential of particulate carriers for the mucosal delivery of DNA vaccines. Biochemical Society Transactions 1997; 25(2): 3375.
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, and A. M. Krieg. 1996. Induction of natural killer activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. J. Immunol. 157, 1840.
- Bird, A. P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. 1987. Trends in Genetics 3: 342.
- Bowersock TL, Shalaby WS, Levy M, Samuels ML, Lallone R, White MR, Borie DL, Lehmyer J, Park K. Evaluation of an orally administered vaccine, using hydrogels containing bacterial exotoxins of Pasteurella haemolytica, in cattle. Am. J. Vet. Res. 1994; 55: 502-9.
- Bueler H and Mulligan RC. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocytemacrophage colony-stimulating factor and B7-1. 1996; 2; 545-555.
- Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg, and J. S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-γ production is dependent on macrophage secretion of IL-12. Clin. Immunol. Immunopath., 84: 185.
- Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. Journal of Virology 1997; 71(1): 169-78.
- Cong Y, Weaver CT, Elson CO. The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. J. Immunol. 1997; 159: 5301-8.
- Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+T cell responses: the alternative approaches. Ann. Rev. Immunol. 1997; 15: 297-322.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace, and A. M. Krieg. 1996. Bacterial DNA induces in vivo interferon-γ production by NK cells and increases sensitivity to endotoxin. J. Immunol. 156: 4570.

- Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Schorr J and Krieg AM. CpG DNA is a potent adjuvant in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998; 160: 870-876.
- de Haan L, Verweij WR, Feil IK, Lijnema TH, Hol WG, Agsteribbe E, Wilschut J. Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native holotoxin. *Infect. Immun.* 1996; 64: 5413-6.
- Delong R, Stephenson K, Loftus T, Fisher M, Alahari S, Nolting A, Juliano RL. Characterization of complexes of oligonucleotides with polyamidoamine starburst dendrimers and effects on intracellular delivery. *J. Pharmac. Sci.* 1997; 86: 762-4.
- Douce G, Turcotte C, Cropley I, Roberts M, Pizza M, Domenghini M, Rappuoli R, Dougan G. Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *PNAS.* 1995; 92: 1644-8.
- Eldridge J, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology* 1991; 28: 287-294.
- Gallican WS, Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intra-nasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995; 13(16): 1589-95.
- Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158(3): 1231-7. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotech.* 1995; 13: 527-537.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander, and D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α . *Cell. Immunol.* 167: 72.
- Haneberg B, Kendall D, Amerongen HM, Apter FM, Kraehenbuhl J-P, and Neutra MR. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 1994; 15-23.
- Hogg JC. The pathology of asthma. *APMIS.* 1997; 105; 10: 735-45.
- Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 1993; 11: 1179-1184.
- Hornquist E, Lycke N. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 2136-43.
- Kay AB. TH2-type cytokines in asthma. *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 796: 1-8.
- Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Dang K, Wang B, Boyer JD, and Weiner D B. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 1997; 158: 816-26.
- Klinman DM, Yamshchikov G, and Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 1997; 158: 3635-3659.
- Klinman, D., A. -K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2879.
- Krieg, A. M., A. -K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky, and D. Klinman. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. 1995. *Nature* 374: 546.
- Krieg, A. M. 1996 An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.* 128: 128.
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *PNAS.* 1996; 93: 4897-902.
- Lamm ME, Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS. Mechanisms of IgA-mediated mucosal defense. *Vaccine Res.* 1992; 1: 169-173.
- Lycke N, Tsuji T, and Holmgren J. The adjuvant effect of Vibrio cholerae and Escherichia coli heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 2277-2281.
- Maloy KJ, Donachie AM, Mowat AM. Induction of Th1 and Th2 CD4+T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2835-41.
- Mannino RJ and Gould-Fogerite S. Lipid matrix-based vaccines for mucosal and systemic immunization. In: *Vaccine Design; The subunit and adjuvant approach.* (Hrsg. Powell MF und Newman MJ) Plenum Press, New York. 1995; 363-387.
- McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10: 75-88.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson, and D. S. Pisetsky. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147: 1759.
- Mestecky J, McGhee JR. Prospects for human mucosal vaccines. In: Ciardi JE, Hrsg. *Genetically Engineered vaccines.* New York: Plenum Press, 1992: 13-23.
- O'Hagan DT. Oral immunization and the common mucosal immune system. In: O'Hagan DT, ed. *Novel Delivery*

- Systems for Oral Vaccines. Boca Raton: CRC Press, 1994: 1-24.
- O'Hagan DT, Rahman D, Jeffery H, Sharif S, Challacombe SJ. Controlled release microparticles for oral immunization. *Int. J. Pharm.* 1994; 108: 133-139.
- Pizza M, Fontana MR, Giuliani MM, Domenighini M, Magagnoli C, Giannelli V, Nucci D, Hol W, Manetti R, Rappuoli R. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2147-53.
- Rappuoli R, Douce G, Dougan G, Pizza M. Genetic detoxification of bacterial toxins: a new approach to vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 108: 327-33.
- Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. Immuno-stimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 1996; 273: 352-4.
- Schirmbeck R, Melber K, Kuhröber A, Janowicz ZA and Reimann J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* 1994; 152: 1110-1119.
- Sjolander A, Lovgren Bengtsson K, Johansson M, Morein B. Kinetics, localization and isotype profile of antibody responses to immune stimulating complexes (ISCOMS) containing human influenza virus envelope glycoproteins. *Scand. J. Immunol.* 1996; 43: 164-72.
- Sjolander A, van't Land B, Lovgren Bengtsson K. ISCOMS containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell. Immunol.* 1997; 177: 69-76.
- Snider DP. The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit. Rev. Immunol.* 1995; 15: 317-48.
- Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 622-647.
- Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee JR. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Current Biology.* 1994; 6: 572-583.
- Tokunaga, T. H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, N. Makiguchi, and T. Suganuma. 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis GCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *JNCI* 72: 955.
- Tsuji T, Hamajima K, Ishii N, Aoki I, Fukushima J, Xin KQ, Kawamoto S, Sasaki S, Matsunaga K, Ishigatubo Y, Tani K, Okubo T, and Okuda K. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 782-7.
- Valodas, J., Davies, J. K., Wright, P.J., Strugnell R.A. Intranasal immunization with liposomes induces strong mucosal immune responses in mice. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 969-975.
- Weeratna R, Brazolot Millan CL, Krieg AM, and Davis HL. Reduction of antigen expression from DNA vaccines by co-administered oligodeoxynucleotides. *Anti. Nucl. Acid Res.*(im Druck).
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka, and T. Tokunaga. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36: 983.
- Yi, A.-K., Cowdery, J.S., J.H. Chace, and A.M. Krieg. 1996. IFN- γ promotes IL-6 and Ig-M secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and ODN. *J. Immunol.*, 156: 558.

[0198] Es wird erachtet, dass die vorstehende schriftliche Beschreibung ausreichend ist, um den Fachmann auf dem Gebiet in die Lage zu versetzen, die Erfindung auszuführen. Die vorliegende Erfindung soll in ihrem Umfang durch die bereitgestellten Beispiele nicht beschränkt sein, da die Beispiele als eine Veranschaulichung eines Aspekts der Erfindung betrachtet werden.

Sequenzprotokoll

<110> Ottawa Civic Hospital Loeb Research Institute
<120> Verfahren und Mittel zur Induktion
von Schleimhautimmunität
<130> C1040/7006WO/HCL
<150> US 60/086,393
<151> 1998-05-21
<160> 95
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0
<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<400> 1
gctagacgtt agcgt 15
<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<400> 2
gctagatgtt agcgt 15
<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (7)...(7)
<223> m5c
<400> 3
gctagacgtt agcgt 15
<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (13)...(13)
<223> m5c

<400> 4	
gctagacgtt agcgt	15
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 5	
gcatgacgtt gagct	15
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 6	
atggaaaggtc cagcgttctc	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 7	
atcgactctc gagcggttctc	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<221> modifizierte_Base	
<222> (3)...(3)	
<223> m5c	
<400> 8	
atcgactctc gagcggttctc	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<221> modifizierte_Base	
<222> (18)...(18)	
<223> m5c	
<400> 9	
atcgactctc gagcggttctc	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Künstliche Sequenz

<400> 10

atggaaggtc caacgttctc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 11

gagaacgctg gaccttccat

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 12

gagaacgctc gaccttccat

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 13

gagaacgctc gacattcgat

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> modifizierte_Base

<222> (14)...(14)

<223> m5c

<400> 14

gagaacgctg gacattccat

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 15

gagaacgatg gacattccat

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 16

gagaacgctc cagcactgat	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 17	
tccatgtcgg tcctgatgct	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<221> modifizierte_Base	
<222> (12) ... (12)	
<223> m5c	
<400> 18	
tccatgtcgg tcctgatgct	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 19	
tccatgacgt tcctgatgct	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 20	
tccatgtcgg tcctgctgat	20
<210> 21	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 21	
tcaacgtt	8
<210> 22	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 22	
tcagcgct	8
<210> 23	

<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 23	
tcatcgat	8
<210> 24	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 24	
tcttcgaa	8
<210> 25	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 25	
caacgtt	7
<210> 26	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 26	
ccaacgtt	8
<210> 27	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 27	
aacgttct	8
<210> 28	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 28	
tcaacgtc	8
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<400> 29	
atggactctc cagcggttctc	20
<210> 30	

```

<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 30
atggaaggtc caacgttctc 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 31
atcgactctc gagcgttctc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 32
atggaggctc catcggttctc 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (14)...(14)
<223> m5c

<400> 33
atcgactctc gagcggttctc 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (18)...(18)
<223> m5c

<400> 34
atcgactctc gagcggttctc 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 35
tccatgtcgg tcctgatgtct 20

```

<210> 36		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 36		
tccatgccgg tcctgatgct	20	
<210> 37		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 37		
tccatggcgg tcctgatgct	20	
<210> 38		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 38		
tccatgacgg tcctgatgct	20	
<210> 39		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 39		
tccatgtcga tcctgatgct	20	
<210> 40		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 40		
tccatgtcgc tcctgatgct	20	
<210> 41		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 41		
tccatgtcgt ccctgatgct	20	
<210> 42		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 42		
tccatgacgt gcctgatgct	20	

<210> 43		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 43		
tccataaacgt tcctgatgct	20	
<210> 44		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 44		
tccatgacgt ccctgatgct	20	
<210> 45		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 45		
tccatcacgt gcctgatgct	20	
<210> 46		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 46		
ggggtaaacg ttgacgggg	19	
<210> 47		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 47		
ggggtcagtc gtgacgggg	19	
<210> 48		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 48		
gctagacgtt agtgt	15	
<210> 49		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 49		
tccatgtcgt tcctgatgct	20	

```

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 50
accatggacg atctgtttcc cctc                                24

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 51
tctcccaagcg tgcgccat                                18

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 52
accatggacg aactgtttcc cctc                                24

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 53
accatggacg agctgtttcc cctc                                24

<210> 54
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 54
accatggacg acctgtttcc cctc                                24

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 55
accatggacg tactgtttcc cctc                                24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 56
accatggacg gtctgtttcc cctc                                24

```

<210> 57		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 57		
accatggacg ttctgttcc cctc	24	
<210> 58		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 58		
cacgttgagg ggcatt	15	
<210> 59		
<211> 12		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 59		
tcagcgtgcg cc	12	
<210> 60		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 60		
atgacgttcc tgacgtt	17	
<210> 61		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 61		
tctcccagcg ggcat	17	
<210> 62		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 62		
tccatgtcgt tcctgtcggtt	20	
<210> 63		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 63		
tccatagcgt tcctagcggtt	20	

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 64
tcgtcgctgt ctcccccttct t

21

<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 65
tcctgacgtt cctgacgtt

19

<210> 66
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 66
tcctgtcggtt cctgtcggtt

19

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 67
tccatgtcggt ttttgtcggtt

20

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 68
tcctgtcggtt ccttgcgtt

20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 69
tcctgtcggt tcctgtcggtt

20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 70
tcctgtcggtt ttgtcggtt

20

<210> 71		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 71		
tgcgtcgctgt ctgcccttct t		21
<210> 72		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 72		
tgcgtcgctgt tgtcgtttct t		21
<210> 73		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 73		
tccatgcgtg cgtgcgtttt		20
<210> 74		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 74		
tccatgcgtt gcgttgcgtt		20
<210> 75		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 75		
tccacgacgt ttgcacgtt		20
<210> 76		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 76		
tgcgtcggtt cgttgtcggt		20
<210> 77		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 77		
tcgtcggtt gtcgttttgtt cgtt		24

<210> 78		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 78		
tcgtcgttgt cgttttgcgt tt	22	
<210> 79		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 79		
gcgtgcgttg tcgttgcgt t	21	
<210> 80		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 80		
tgtcgttgtc cgtttgcgt t	21	
<210> 81		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 81		
tgtcgttgtc gttgtcggtt tgcgtt	25	
<210> 82		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 82		
tgtcgttgtc gttgtcggtt	19	
<210> 83		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 83		
tcgtcggtc cgtt	14	
<210> 84		
<211> 13		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 84		
tgtcgttgtc gtt	13	

<210> 85		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 85		
tccatagcgt tcctagcgtt	20	
<210> 86		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 86		
tccatgacgt tcctgacggt	20	
<210> 87		
<211> 6		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 87		
gtcgyt	6	
<210> 88		
<211> 7		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 88		
tgtcgyt	7	
<210> 89		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 89		
agctatgacg ttccaagg	18	
<210> 90		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 90		
tccatgacgt tcctgacggt	20	
<210> 91		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<400> 91		
tccaggactt ctctcaggtt	20	

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 92
atcgactctc gaacgttctc 20

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 93
tccatgtcg 20
tcctgacgca

<210> 94
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 94
tcttcgat 8

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<400> 95
ataggaggtc 20
caacgttctc

Sequenzprotokoll

<110> Ottawa Civic Hospital Loeb Research Institute
<120> Verfahren und Mittel zur Induktion
 von Schleimhautimmunität
<130> C1040/7006WO/HCL

<150> US 60/086,393
<151> 1998-05-21

<160> 95

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 1
gctagacgtt agcgt 15

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 2
gctagatgtt agcgt 15

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (7)...(7)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 3
gctagacgtt agcgt 15

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

```

<221> modifizierte_Base
<222> (13)...(13)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 4
gcttagacgtt agcgt 15

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 5
gcatgacgtt gagct 15

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 6
atggaaaggtc cagcgttctc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 7
atcgactctc gagcgttctc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (3)...(3)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 8
atcgactctc gagcgttctc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

```

```

<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (18)...(18)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 9
atcgactctc gagcgttctc                                20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 10
atggaaggtc caacgttctc                                20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 11
gagaacgctg gaccttccat                                20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 12
gagaacgctc gacccat                                    20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 13
gagaacgctc gaccctcgat                                20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

```

```

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (14)...(14)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 14
gagaacgctg gacccatccat                                20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 15
gagaacgatg gacccatccat                                20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 16
gagaacgctc cagcaatgtat                                20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 17
tccatgtcg gg tcctgatgtct                                20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte_Base
<222> (12)...(12)
<223> m5c

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 18
tccatgtcg gg tcctgatgtct                                20

<210> 19

```

<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 19
tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 20
tccatgtcgg tcctgctgat 20

<210> 21
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 21
tcaacgtt 8

<210> 22
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 22
tcagcgct 8

<210> 23
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 23
tcatcgat 8

<210> 24
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

```

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 24
tcttcgaa                                         8
<210> 25
<211> 7
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 25
caacgtt                                         7
<210> 26
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 26
ccaacgtt                                         8
<210> 27
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 27
aacgttct                                         8
<210> 28
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 28
tcaacgtc                                         8
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 29
atggactctc cagcgttctc                         20

```

<210> 30
 <211> 20'
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

 <400> 30
 atggaaggc caacgttctc 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

 <400> 31
 atcgactctc gagcgttctc 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

 <400> 32
 atggaggc catcggttctc 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> modifizierte_Base
 <222> (14)...(14)
 <223> m5c

 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

 <400> 33
 atcgactctc gagcgttctc 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> modifizierte_Base
 <222> (18)...(18)
 <223> m5c

 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

```

<400> 34
atcgactctc gagcgttctc
20
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 35
tccatgtcgg tcctgatgct
20
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 36
tccatgccgg tcctgatgct
20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Séquenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 37
tccatggcgg tcctgatgct
20
<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 38
tccatgacgg tcctgatgct
20
<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 39
tccatgtcga tcctgatgct
20
<210> 40
<211> 20

```

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 40
tccatgtcgc tcctgatgct 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 41
tccatgtcgt ccctgatgct 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 42
tccatgacgt gcctgatgct 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 43
tccataacgt tcctgatgct 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 44
tccatgacgt ccctgatgct 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 45
 tccatcacgt gcctgatgct 20
 <210> 46
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 46
 ggggtcaacg ttgacgggg 19
 <210> 47
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 47
 ggggtcagtc gtgacgggg 19
 <210> 48
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 48
 gctagacgtt agtgt 15
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 49
 tccatgtcggt tcctgatgct 20
 <210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 50
 accatggacg atctgtttcc cctc 24
 <210> 51

```

<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 51
tctcccaagcg tgcggcat                                18

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 52
accatggacg aactgtttcc cctc                                24

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 53
accatggacg agctgtttcc cctc                                24

<210> 54
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 54
accatggacg acctgtttcc cctc                                24

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 55
accatggacg tactgtttcc cctc                                24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

```

```

<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 56
accatggacg gtctgttcc cctc
                                         24

<210> 57
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 57
accatggacg ttctgttcc cctc
                                         24

<210> 58
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 58
cacgttgagg ggcat
                                         15

<210> 59
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 59
tcagcgtgcg cc
                                         12

<210> 60
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 60
atgacgttcc tgacgtt
                                         17

<210> 61
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 61
tctcccagcg ggcgcgt
                                         17

```

```

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 62
tccatgtcgt tcctgtcggt
20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 63
tccatagcgt tcctagcggt
20

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 64
tcgtcgctgt ctccccttct t
21

<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 65
tcctgacgtt cctgacggt
19

<210> 66
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 66
tcctgtcggtt cctgtcggt
19

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 67
 tccatgtcgt ttttgtcggtt 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 68
 tcctgtcggtt ccttgtcggtt 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 69
 tccttgtcggt ttcgtcggtt 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 70
 tcctgtcggtt ttttgtcggtt 20
 <210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 71
 tcgtcgctgt ctgccttct t 21
 <210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
 <400> 72
 tcgtcgctgt tgtcgttct t 21

<210> 73
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 73
tccatgcgtg cgtgcgttt 20

<210> 74
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 74
tccatgcgtt gcgttgcgtt 20

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 75
tccacgacgt tttcgacgtt 20

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 76
tcgtcgttgt cgttgctgtt 20

<210> 77
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 77
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 78
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 78
tcgtcggtgt cgtttgtcg tt                                22

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 79
gcgtgcgttg tcgttgtcgt t                                21

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 80
tgtcgttgtc cggttgtcgt t                                21

<210> 81
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 81
tgtcgttgtc gttgtcggtt tcgtt                                25

<210> 82
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 82
tgtcgttgtc gttgtcggtt                                19

<210> 83
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid

<400> 83

```

tcgtcgtcgt cgtt	14
<210> 84	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid	
<400> 84	
tgtcggtgtc gtt	13
<210> 85	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid	
<400> 85	
tccatagcgt tcctagcgtt	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid	
<400> 86	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 87	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid	
<400> 87	
gtcgyt	6
<210> 88	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid	
<400> 88	
tgtcgyt	7
<210> 89	
<211> 18	
<212> DNA	

```

<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 89
agctatgacg ttccaagg 18
<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 90
tccatgacgt tcctgacgtt 20
<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 91
tccaggactt ctctcagggtt 20
<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 92
atcgactctc gaacgttctc 20
<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 93
tccatgtcgg tcctgacgca 20
<210> 94
<211> 8
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 94
tcttcgat 8
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> immunstimulatorisches synthetisches Oligonukleotid
<400> 95
ataggaggtc caacgttctc 20

```

Patentansprüche

1. Verwendung eines OligoNucleotids, das eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:



wobei C unmethyliert ist und X_1 , X_2 , X_3 und X_4 Nucleotide sind, für die Herstellung einer Zusammensetzung für die Verabreichung auf einer Schleimhautfläche eines Patienten, der einem Antigen ebenfalls ausgesetzt ist, zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort auf das Antigen in dem Patienten.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung oral verabreicht wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung intranasal verabreicht wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung rektal verabreicht wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung vaginal verabreicht wird.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung Okular verabreicht wird.
7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung durch Inhalieren verabreicht wird.
8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sowohl das Antigen als auch die Zusammensetzung oral verabreicht werden.
9. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sowohl das Antigen als auch die Zusammensetzung intranasal verabreicht werden.
10. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sowohl das Antigen als auch die Zusammensetzung rektal verabreicht werden.
11. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sowohl das Antigen als auch die Zusammensetzung vaginal verabreicht werden.
12. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sowohl das Antigen als auch die Zusammensetzung okular verabreicht werden.
13. Verwendung eines OligoNucleotids nach Anspruch 1, wobei das Antigen nicht in einem Nucleinsäurevektor codiert ist.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der Patient dem Antigen aktiv ausgesetzt wird.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Antigen intranasal verabreicht wird.
16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Antigen vaginal verabreicht wird.
17. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Antigen rektal verabreicht wird.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Antigen gleichzeitig mit der Zusammensetzung verabreicht wird.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Patient dem Antigen passiv ausgesetzt wird.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-19, wobei die Zusammensetzung in einer wirksamen Menge zum Induzieren der Schleimhautimmunität verabreicht wird.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei der Patient ein Asthmatiker ist oder Gefahr läuft, eine allergische Reaktion, eine Infektionskrankheit oder Krebs zu entwickeln.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei die Zusammensetzung in Verbindung mit einem Zytokin oder einem B-7-Costimulationsmolekül verabreicht wird.

23. Verwendung eines OligoNucleotids nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung gleichzeitig mit einem Antigen auf einer Schleimhautfläche eines Patienten verabreicht wird.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, wobei die Schleimhautimmunität an einer entfernten Stelle induziert wird.

25. Verwendung nach Anspruch 14 oder 23, wobei ein NichtoligoNucleotid-Schleimhautadjuvans in Verbindung mit dem Antigen verabreicht wird.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 14, 23 oder 25, wobei eine OligoNucleotidauffrischung dem Patienten verabreicht wird.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei eine Auffrischung eines NichtoligoNucleotid-Schleimhautdajuvans dem Patienten ebenfalls verabreicht wird.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei X_1X_2 Nucleotid sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT und TpG; und X_3X_4 Nucleotide sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA und CpA.

29. Produkt umfassend ein OligoNucleotid, das eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:

5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3'

wobei C unmethyliert ist und X_1 , X_2 , X_3 und X_4 Nucleotide sind, ein Antigen und ein Hormon, für die gleichzeitige, getrennte oder sequentielle Anwendung zum Induzieren einer Schleimhautimmunantwort auf das Antigen in einem Patienten.

30. Produkt nach Anspruch 29, wobei das Antigen und das OligoNucleotid einer Schleimhautfläche des Patienten verabreicht werden.

31. Produkt nach Anspruch 29 oder 30, wobei das Hormon systemisch verabreicht wird.

32. Verwendung eines OligoNucleotids, der eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:

5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3'

wobei C unmethyliert ist, wobei X_1 , X_2 , X_3 und X_4 Nucleotide sind, und eines Antigens, das nicht in einem Nucleinsäurevektor codiert ist, für die Herstellung eines Medikaments für die gleichzeitige, getrennte oder sequentielle Verabreichung auf einer Schleimhautfläche eines Patienten zum Induzieren einer systemischen Immunantwort auf das Antigen.

33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das Antigen keine systemische Immunantwort hervorruft, wenn es als solches auf einer Schleimhautfläche verabreicht wird.

34. Verwendung nach Anspruch 14 oder 33, wobei das Antigen in Verbindung mit einem kolloidalen Dispersionssystem abgegeben wird.

35. Verwendung nach Anspruch 32, wobei ein NichtoligoNucleotid-Schleimhautadjuvans in Verbindung mit dem Antigen und dem OligoNucleotid verabreicht wird.

36. Produkt umfassend ein OligoNucleotid, das eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:

5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3'

wobei C unmethyliert ist, wobei X_1 , X_2 , X_3 und X_4 Nucleotide sind, und ein NichtoligoNucleotid-Schleimhautadjuvans für die gleichzeitige, getrennte oder sequentielle Verabreichung auf einer Schleimhautfläche eines Patienten, der auch einem Antigen ausgesetzt wird, zum Induzieren einer systemischen Immunantwort auf das Antigen.

37. Produkt umfassend ein ÖligoNucleotid, das eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:

5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3'

wobei C unmethyliert ist, wobei X₁, X₂, X₃ und X₄ Nucleotide sind, ein NichtoligoNucleotid-Schleimhautadjuvans und ein Antigen für die gleichzeitige, getrennte oder sequentielle Verabreichung auf einer Schleimhautfläche eines Patienten.

38. Produkt nach Anspruch 37, wobei der Patient dem Antigen aktiv ausgesetzt und das Antigen in Verbindung mit einem kolloidalen Dispersionsystem abgegeben wird.

39. Verwendung nach Anspruch 34 oder Produkt nach Anspruch 38, wobei das kolloidale Dispersionssystem aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus makromolekularen Komplexen, Nanokapseln, Mikrosphären, Perlen und Systemen auf Lipidbasis.

40. Verwendung oder Produkt nach Anspruch 39, wobei das System auf Lipidbasis aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Öl-in-Wasser-Emulsion, Mizellen, gemischten Mizellen und Liposomen.

41. Produkt nach Anspruch 38, wobei das Antigen auf einer Schleimhautfläche abgegeben wird.

42. Verwendung nach Anspruch 26 oder 35 oder Produkt nach Anspruch 41, wobei das NichtoligoNucleotid-Schleimhautadjuvans aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Choleratoxin, Derivaten des Choleratoxins, wärmelabilem Enterotoxin, Derivaten von wärmelabilem Enterotoxin, Alaun, MLP, MDP, Saponinen wie QS21, Zytokinen, Öl-in-Wasser- und anderen Emulsionsrezepturen wie MF59, SAF, Montanide ISA 720 und PROVAX; PCPP-Polymeren und ISCOMS.

43. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 36 bis 42, wobei das OligoNucleotid längenmäßig 8 bis 100 Nucleotide beträgt.

44. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28 oder 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31, 36 bis 42 oder 43, wobei das OligoNucleotid:

- (a) eine Phosphatrückgratkettenmodifikation einschließt, die eine Phosphorthionat- oder Phosphordithionat-modifikation ist; oder
- (b) eine chimäre Rückgratkette aufweist.

45. Verwendung oder Produkt nach Anspruch 44, wobei die Phosphatrückgratkettenmodifikation am 5'-Ende des OligoNucleotids und/oder am 3'-Ende des Nucleotids stattfindet.

46. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 36 bis 42, wobei X₁X₂ Nucleotide sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: GpT, GpG, GpA und ApA und X₃X₄ Nucleotide sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: TpT, CpT oder TpC.

47. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 36 bis 42, wobei das OligoNucleotid eine Sequenz aufweist, die mindestens folgende Formel einschließt:

5' TCNTX₁X₂CGX₃X₄ 3'

wobei C unmethyliert ist und X₁, X₂, X₃ und X₄ Nucleotide sind und N eine Nucleinsäuresequenz ist, die aus ca. 0-25 Nucleotiden besteht.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 37 bis 42, wobei das Antigen aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Zellen, Zellextrakten, Proteinen, Polypeptiden, Peptiden, Polysacchariden, Polysaccharidkonjugaten, Peptid-mimikern von Polysacchariden, Lipiden, Glykolipiden, Kohlehydraten, Allergenen, Viren und Virusextrakten und multizellulären Organismen wie Parasiten.

49. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 37 bis 42, wobei das Antigen ein Allergen ist.

50. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 37 bis 42, wobei das Antigen von einem infektiösen Organismus deriviert ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus infektiösen Bakterien, infektiösen Viren, infektiösen Parasiten und infektiösen Pilzen.

51. Produkt nach Anspruch 36, wobei das Antigen nicht in einem Nucleinsäurevektor codiert ist.

52. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Antigen auf einer Schleimhautfläche abgegeben wird.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 37 bis 42, wobei das Antigen ein Peptid ist.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 28, 32 bis 35 oder 39 bis 43 oder Produkt nach einem der Ansprüche 29 bis 31 oder 37 bis 42, wobei das Antigen ein Protein ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

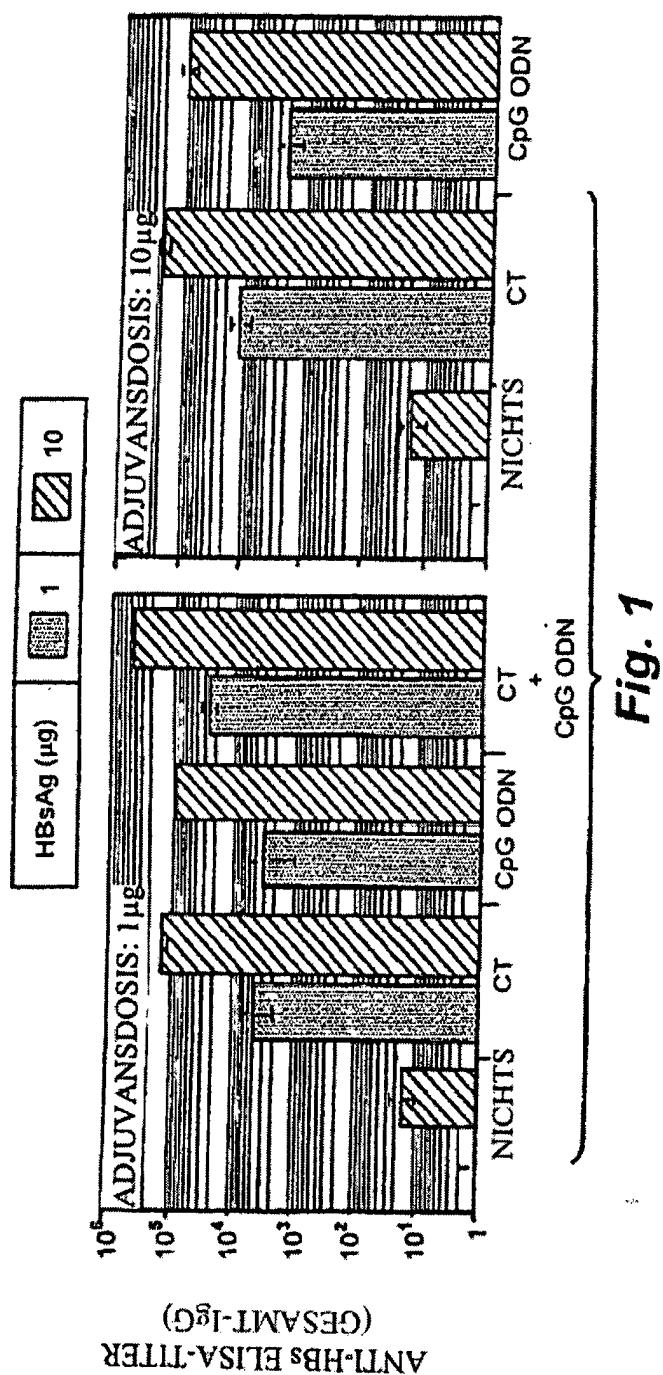


Fig. 1

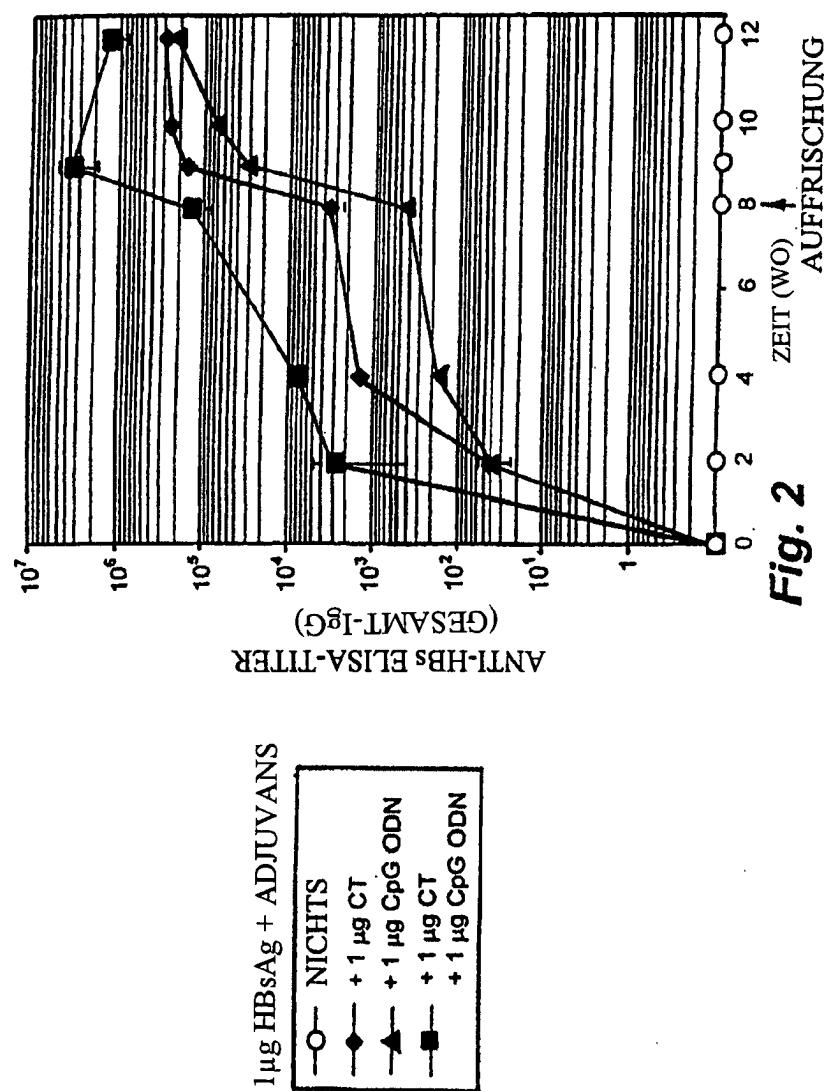
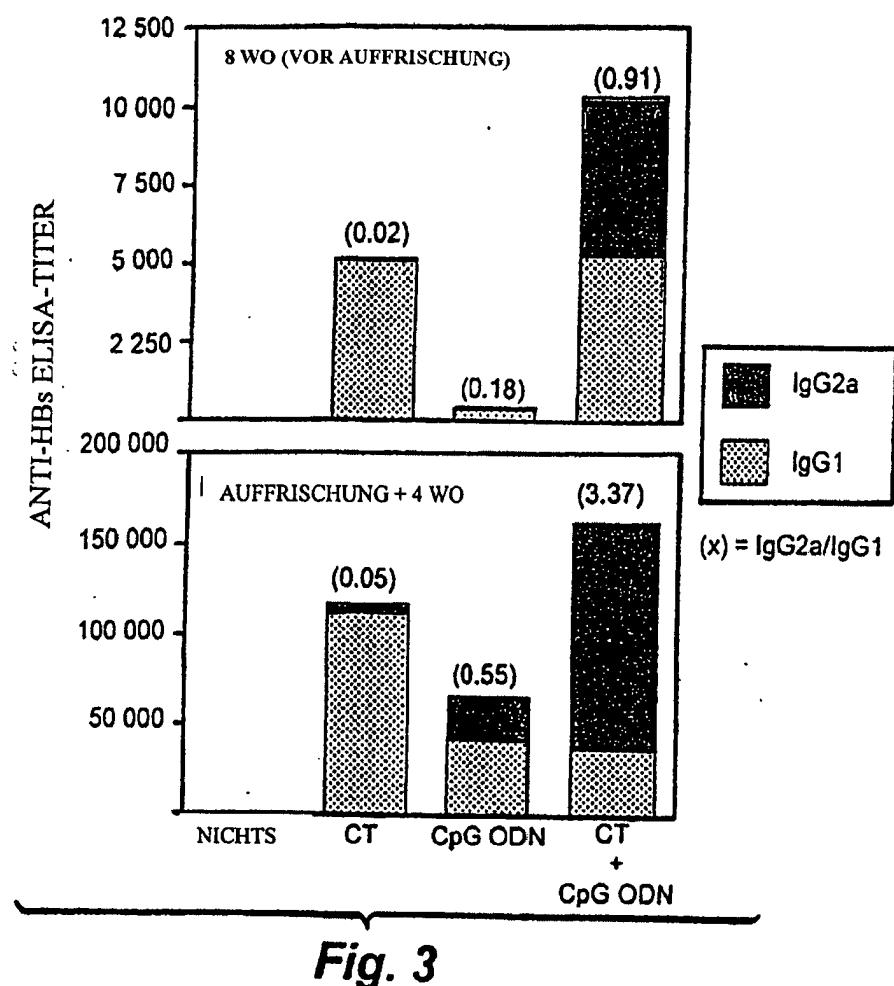


Fig. 2



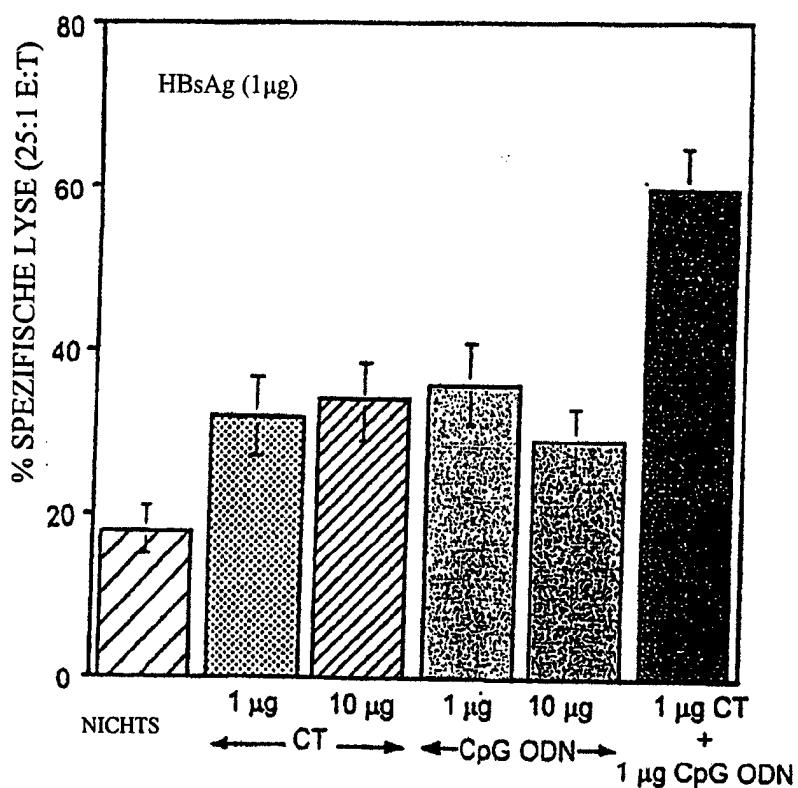


Fig. 4

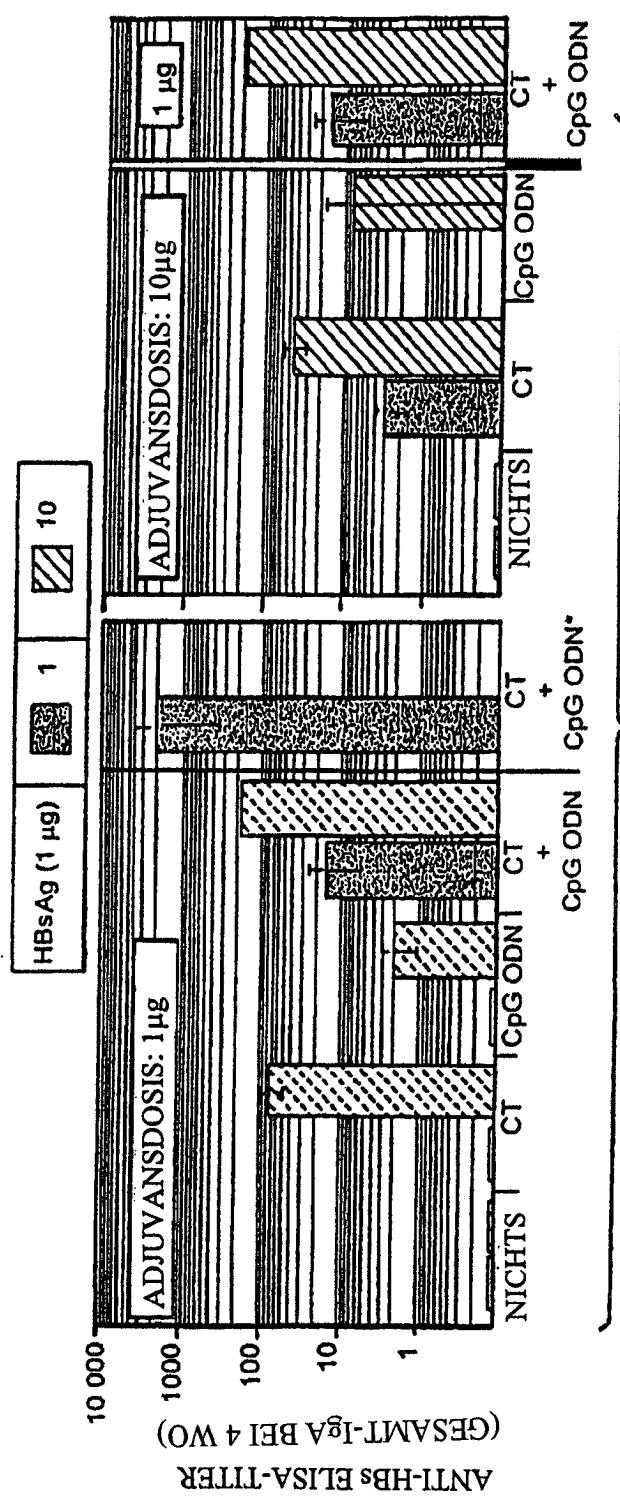


Fig. 5

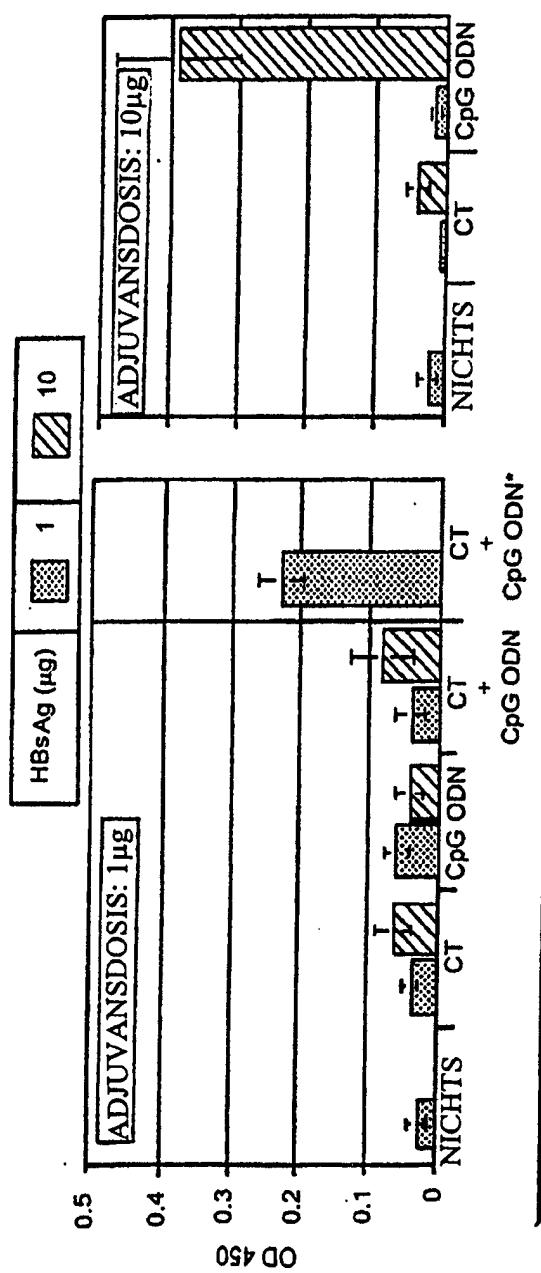


Fig. 6

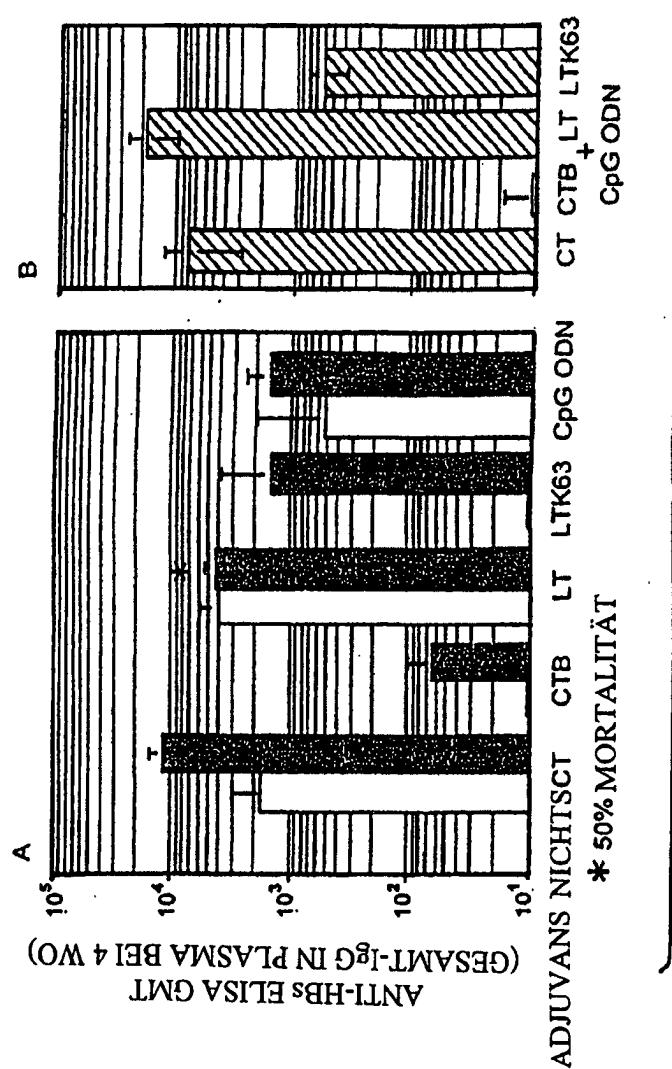


Fig. 7

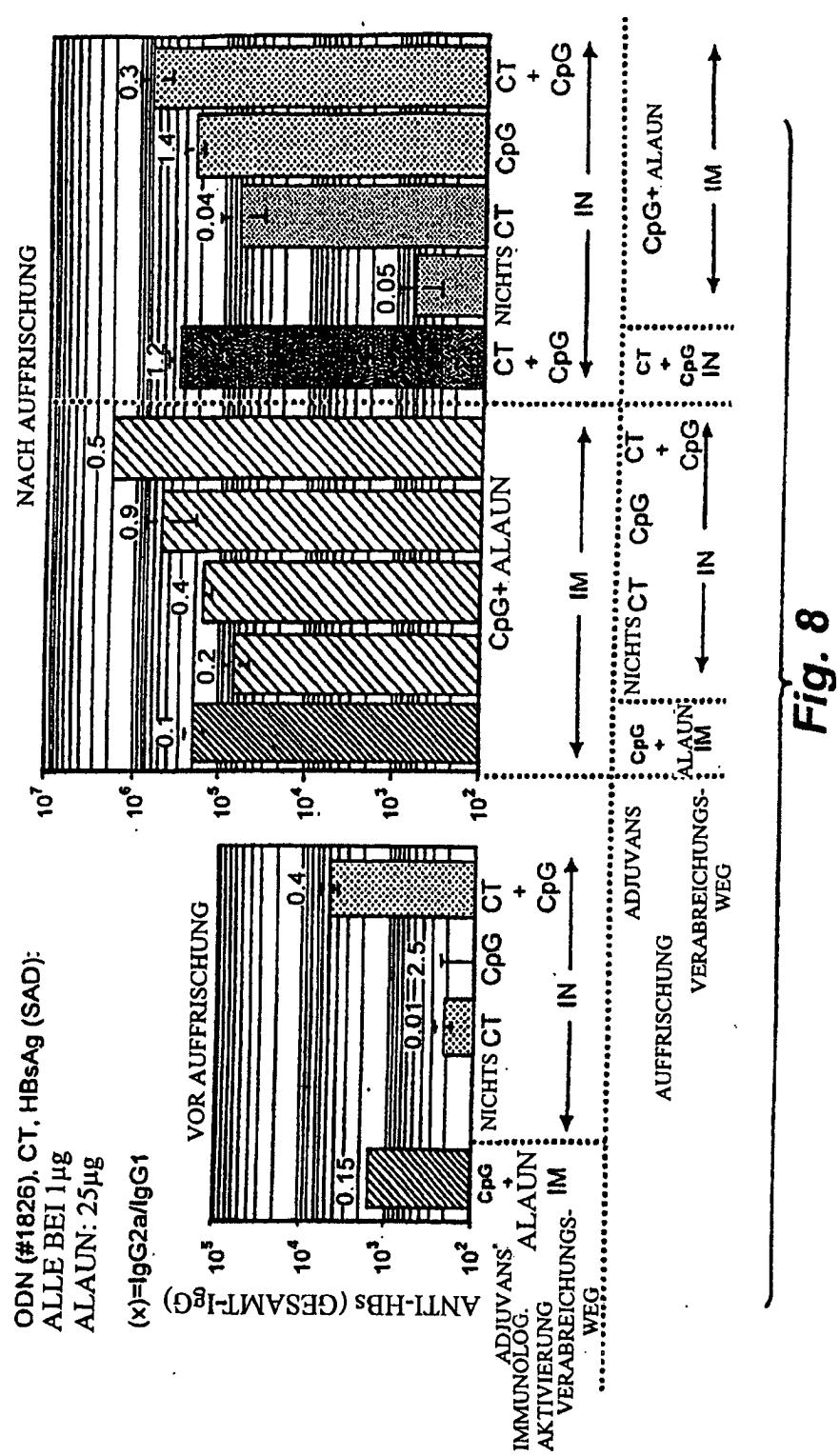


Fig. 8

WIRKUNG VON VERSCHIEDENEN AKTIVIERUNGS-AUFRISCHUNGSSTRATEGIEN
AUF CTL

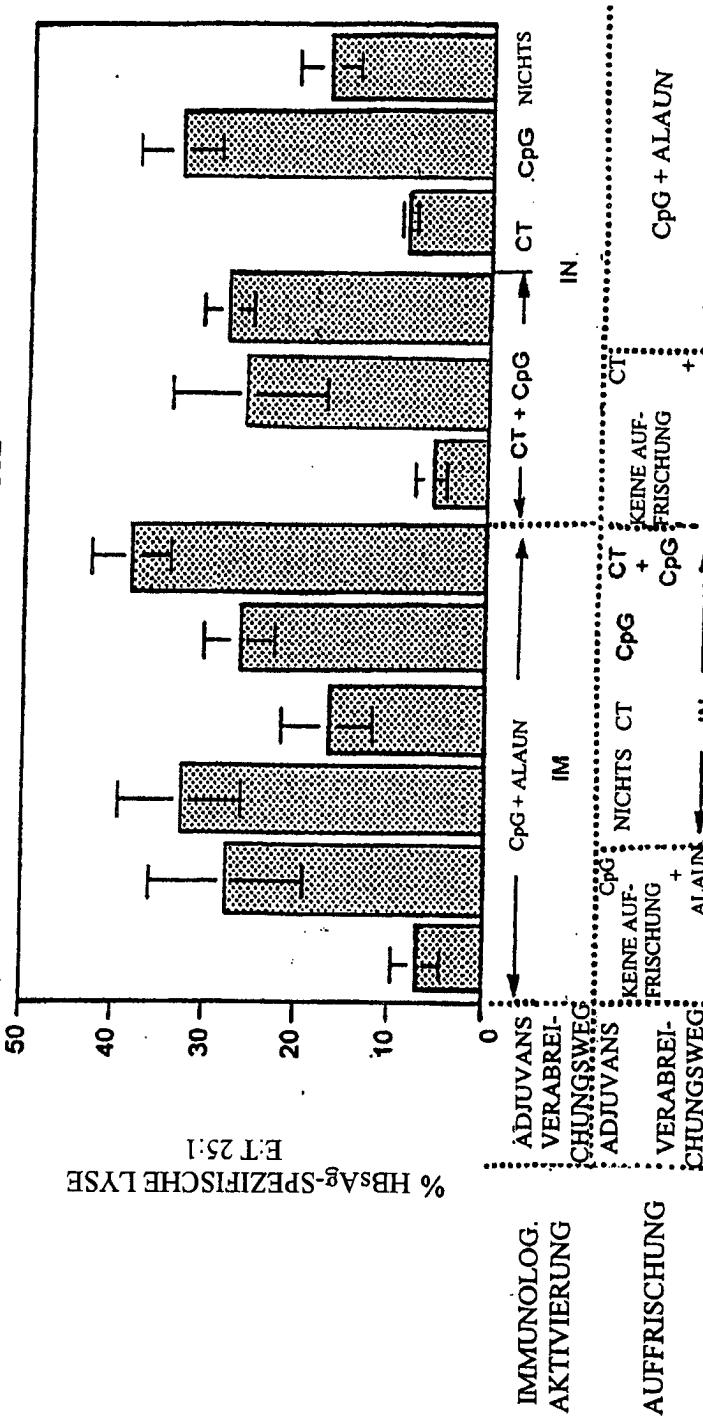


Fig. 9

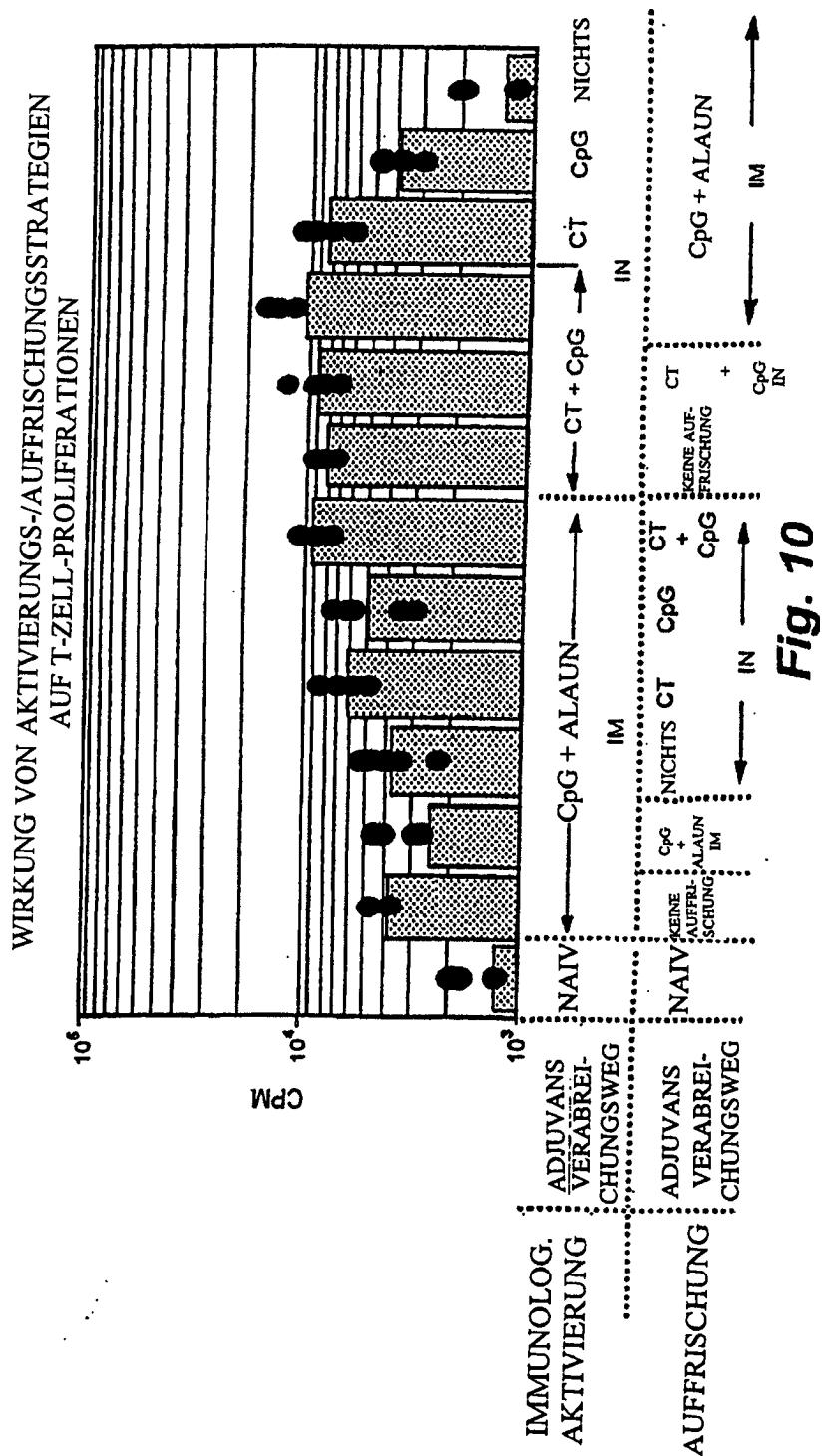


Fig. 10

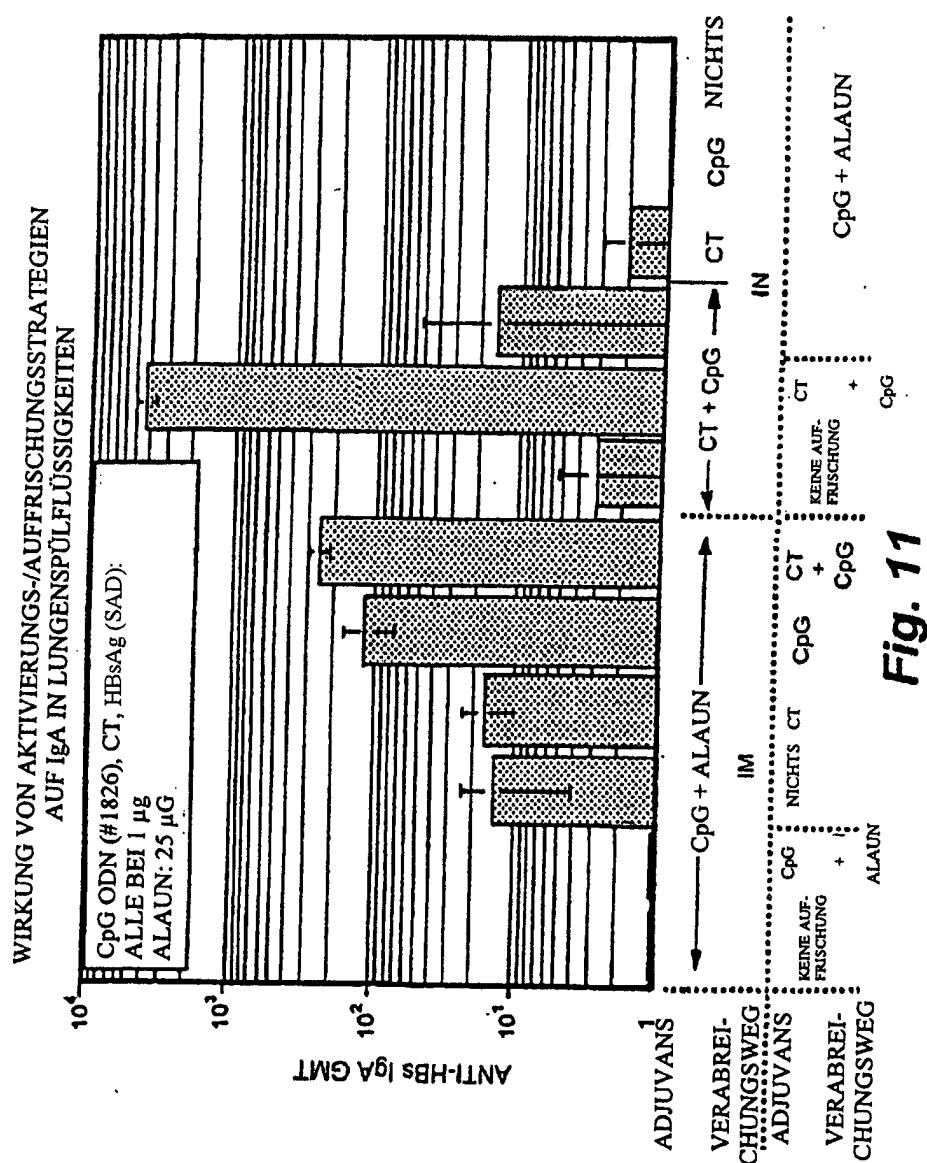


Fig. 11

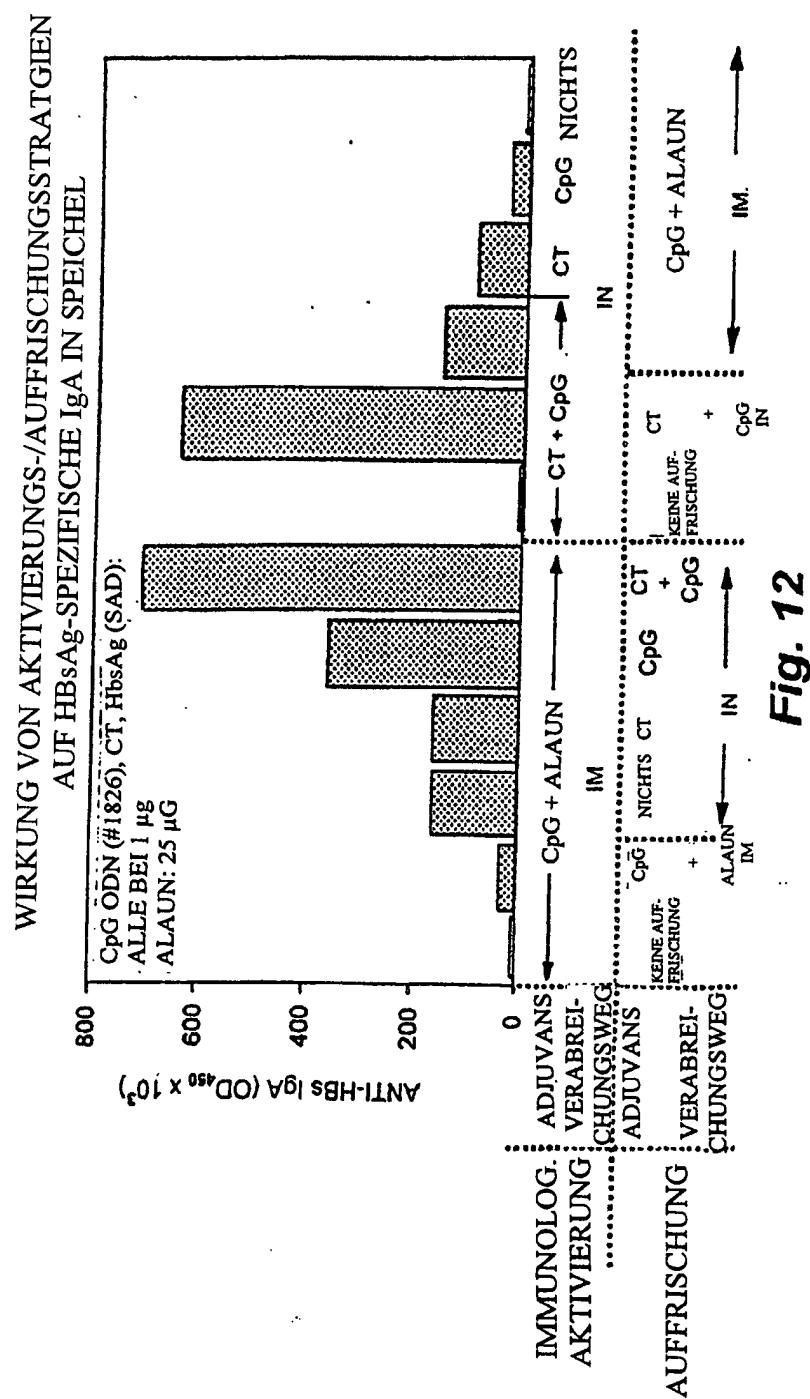


Fig. 12

