



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 33 145 T2** 2006.03.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 935 470 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 33 145.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/18084**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 945 544.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/014210**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.10.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.08.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/35** (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61B 17/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

725968 04.10.1996 US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**CARSON, A., Dennis, Del Mar, US; RAZ, Eyal, Del
Mar, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON ALLERGISCHEN LUNGENKRANKHEITEN**

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****1. Gebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von für Asthma-initiiierende Antigene kodierenden Polynucleotidzusammensetzungen bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von allergischem Asthma.

2. Stand der Technik

[0002] Asthma stellt in Industrieländern eine der häufigsten chronischen Lungenerkrankungen dar. Die für die Erkrankung charakteristische Verengung der Luftwege steht in Zusammenhang mit einer Antigen-stimulierten Immunsystemaktivierung und umfasst die Erhöhung der antigenspezifischen IgE-Werte im Frühstadium der Erkrankung und die Eosinophil-Infiltration von Lungengewebe im Spätstadium der Erkrankung.

[0003] Insbesondere stimuliert die Aktivierung von Th2-Lymphozyten im Frühstadium der Erkrankung die Produktion von IgE-Antikörpern, was wiederum die Freisetzung von Histamin und anderen Immunmediatoren aus Mastzellen auslöst. Im Spätstadium der Erkrankung wird die IL-4- und IL-5-Cytokinproduktion durch CD4+-Helfer-T-Lymphozytenzellen vom Typ 2 (Th2) erhöht. Von diesen Cytokinen wird angenommen, dass sie bei der Aufnahme von Eosinophilen in das Lungengewebe eine große Rolle spielen, was zu Gewebeschäden und Dysfunktionen führt.

[0004] Personen mit allergischem Asthma werden herkömmlicherweise durch Immunisierung gegen das Asthma-initiiierende Antigen mit einer Antigen-basierten Zusammensetzung behandelt. Antigenimmunisierung schränkt die antigenstimulierten Vorfälle im Frühstadium von allergischem Asthma ein, wenngleich dadurch das Risiko der Induktion einer IgE-vermittelten Anaphylaxie besteht. Solche klassischen Immunisierungsschemata zielen jedoch nicht auf die Cytokin-vermittelten Vorfälle der Immunantwort im Spätstadium bei allergischem Asthma ab.

[0005] Die WO 95/05853 und die WO 96/13277 lehren Verfahren zur Behandlung von Antigen-induzierten Allergien durch Verabreichung nackter Polynucleotide, die für ein Antigen kodieren. Diese zitierten Dokumente lehren keine bestimmte Sequenz für das Polynucleotid.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die Erfindung betrifft die Verwendung von für Asthma-initiiierende Antigene kodierenden Polynucleotidzusammensetzungen bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von allergischem Asthma eines Wirts, die allergische Immunreaktionen, welche sowohl für das Frühstadium als auch für das Spätstadium der Erkrankung charakteristisch sind, herabsetzen. Dies wird gemäß der Erfindung erreicht, indem dem Wirt ein für ein Asthma-initiiierendes Antigen kodierendes Polynucleotid in einer Art und Weise verabreicht wird, dass in den antigenpräsentierenden Zellen intrazelluläre Antigenexpression induziert wird. Das exprimierte Antigen wird den CD4+T-Lymphozyten des Wirts in einer Art und Weise präsentiert, die Helfer-T-Lymphozyten der Klasse 1 (Th1-Lymphozyten) gegenüber Th2-Lymphozyten bevorzugt aktiviert.

[0007] Somit ermöglicht die Verwendung der Erfindung dem Arzt, in einem Wirt Toleranz gegenüber einem Asthma-initiiierenden Antigen zu induzieren, ohne dabei zu riskieren, dass die Vorgänge der Th2-Lymphozyten-vermittelten Produktion von IgE-Antikörpern und der Mastzellenaktivierung stimuliert werden, die das Frühstadium von allergischem Asthma kennzeichnen. Zudem reduziert die Verwendung der Erfindung auch Th2-Zellen-Freisetzung von IL-4 und IL-5, womit die Eosinophil-Anhäufung im Lungengewebe, die das Spätstadium bei allergischem Asthma kennzeichnet, wesentlich verringert wird. Auf diese Weise stellt die Erfindung wirksamere, weniger risikoreiche Möglichkeiten zur Behandlung von allergischem Asthma bereit, als sie gegenwärtig auf dem Gebiet der Erfindung zur Verfügung stehen.

[0008] In der Praxis ist gemäß der Verwendung der Erfindung ein geeigneter Kandidat zur Behandlung ein Wirt, bei dem allergisches Asthma diagnostiziert worden ist und für den zumindest ein Asthma-initiiierendes Antigen (d.h. ein proteinhaltiges Antigen, das im Wirt eine allergische Reaktion hervorruft, die zu vom Wirt erlittenen Asthmasymptomen führt) identifiziert worden ist.

[0009] Gemäß der Verwendung der Erfindung wird der Wirt mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung immunisiert, die einen rekombinanten Expressionsvektor umfasst (vorzugsweise ein Plasmid oder Cosmid, in der Folge als "Polynucleotidzusammensetzung" bezeichnet). Der rekombinante Expressionsvektor umfasst ein Polynucleotid, das für ein Asthma-initiierendes Antigen kodiert. Um die Th-1-Lymphozyten-Aktivierung auf einen therapeutisch ausreichenden Wert zu bringen, wird die Polynucleotidzusammensetzung einem Gewebe des Wirts verabreicht, das im Vergleich mit anderen Wirtsgeweben eine relativ hohe Konzentration an antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Haut oder Schleimhaut, wie z.B. die Schleimhaut des Atemtrakts) aufweist.

[0010] Es ist von Vorteil, dass ein Abzielen der dichten Population antigenpräsentierender Zellen in der Haut und Schleimhaut auf Antigenexpression die Verabreichung relativ niedriger Dosen der Polynucleotidzusammensetzung erfordert, um eine therapeutische Wirkung im Wirt zu erzielen.

[0011] Je nach Bedarf kann der rekombinante Expressionsvektor der Polynucleotidzusammensetzung auch für andere therapeutisch signifikante, biologisch aktive Peptide kodieren, wie etwa für immunstimulierende Cytokine (z.B. TGF- β). Alternativ dazu können solche Peptide oder andere therapeutisch signifikante Verbindungen zusammen mit den erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen verabreicht werden.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0012] [Fig. 1](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Anti-NP-IgG vor der intranasalen Einführung von nacktem pCMVRNP in Balb/c-Mäuse dar.

[0013] [Fig. 2](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Anti-NP-IgG bei einer nicht anästhetisierten Gruppe von Balb/c-Mäusen dar.

[0014] [Fig. 3](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Anti-NP-IgG bei einer anästhetisierten Gruppe von Balb/c-Mäusen dar.

[0015] [Fig. 4](#) ist eine Fotografie der Ergebnisse von histologischen Studien der Haut an der Eintrittsstelle von pCMVRNP bei Balb/c-Mäusen, die die Aufnahme des Plasmids durch einkernige Zellen (APCs) anzeigt. Eine APC ist durch Pfeile, eine Gewebezelle (die das Plasmid nicht enthält) mittels einer strichlierten Linie gekennzeichnet.

[0016] [Fig. 5](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-2A-Typ in Seren von Mäusen dar, denen (1) intradermal oder intramuskulär ein für β -Galactosidase kodierendes Polynucleotid oder (2) das Enzym intradermal injiziert wurde.

[0017] [Fig. 6](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-1-Typ in Seren von Mäusen dar, denen (1) intradermal oder intramuskulär ein für β -Galactosidase kodierendes Polynucleotid oder (2) das Enzym intradermal injiziert wurde.

[0018] [Fig. 7](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-2A-Typ in Seren von Mäusen, wie sie für [Fig. 5](#) beschrieben wurden, nach Boosterinjektion von Antigen dar.

[0019] [Fig. 8](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-1-Typ in Seren von Mäusen, wie sie für [Fig. 6](#) beschrieben wurden, nach Boosterinjektion von Antigen dar.

[0020] [Fig. 9](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-2A-Typ in Seren von Mäusen dar, in die (1) ein für β -Galactosidase kodierendes Polynucleotid durch Aufkratzen der Haut mit damit beschichteten Zinken oder (2) ein intradermal injiziertes Enzym eingeführt wurde.

[0021] [Fig. 10](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Antikörper vom IgG-1-Typ in Seren von Mäusen dar, in die (1) ein für β -Galactosidase kodierendes Polynucleotid durch Aufkratzen der Haut mit damit beschichteten Zinken oder (2) ein intradermal injiziertes Enzym eingeführt wurde.

[0022] [Fig. 11](#) stellt eine Karte des eukaryotischen pGREtk-Expressionsvektors dar.

[0023] [Fig. 12](#) stellt eine Karte des eukaryotischen pVDRtk-Expressionsvektors dar.

[0024] [Fig. 13](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf die Gesamtmengen an IgE-Antikörpern in Mäusen

nach Immunisierung mit einem Antigen-kodierenden Plasmid (pCMV-Lac-Z), mit dem Antigen selbst (β -Galactosidase) oder mit einem Kontrollplasmid (pCMV-BL) dar.

[0025] [Fig. 14](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf die Mengen an Antigen-spezifischen IgE-Antikörpern in Mäusen nach Immunisierung mit einem Antigen-kodierenden Plasmid (pCMV-Lac-Z), mit dem Antigen selbst (β -Galactosidase) oder mit einem Kontrollplasmid (pCMV-BL) dar.

[0026] [Fig. 15](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf die Mengen an IL-2 und INF γ nach Immunisierung von Mäusen mit einem Antigen-kodierenden Plasmid (pCMV-Lac-Z) oder mit dem Antigen selbst (β -Galactosidase) dar.

[0027] [Fig. 16](#) stellt die Ergebnisse eines Tests zur Detektion von Antigen-spezifischer Zellauflösung durch T-Lymphozyten von Mäusen dar, die durch epidermale Verabreichung von pCMV-NP-Plasmid immunisiert wurden.

[0028] [Fig. 17](#) stellt die Ergebnisse eines Tests zur Detektion von Antigen-spezifischer Zellauflösung durch T-Lymphozyten von Mäusen, wie sie für [Fig. 16](#) beschrieben wurden, ohne Pulsierung der Zellen mit dem Antigen dar.

[0029] [Fig. 18](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Anti- β -Galactosidase-Antikörper nach Verabreichung (1) eines für das Enzym kodierenden Polynucleotids durch intramuskuläre oder intradermale Injektion und (2) des Enzyms durch intradermale Injektion dar.

[0030] [Fig. 19](#) stellt die Ergebnisse eines ELISA-Tests auf Anti- β -Galactosidase-Antikörper in Seren von Mäusen, wie sie für [Fig. 18](#) beschrieben wurden, nach einer Boosterinjektion von Antigen dar.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

I. DEFINITIONEN

[0031] Die nachstehenden Definitionen dienen zur Vereinfachung der Beschreibung der Erfindung. Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung ist jedoch klar, dass diese Definitionen in weiterem Sinne auch Äquivalente umfassen können, ohne vom legitimen Schutzzumfang oder von der Lehre der Erfindung abzuweichen. Deshalb sollten diese Definitionen nicht als Einschränkung der Erfindung interpretiert werden.

a) "Polynucleotid" bezieht sich auf DNA oder RNA und kann – je nach den Zielen der erfindungsgemäß durchgeführten Therapie – kodierende und Antisense-Stränge umfassen. Polynucleotid kann in diesem Zusammenhang Oligonucleotide umfassen. Für die Erfindung geeignete Polynucleotide sind jene, die in rekombinante Expressionsvektoren eingebaut sind, welche einen Promotor und andere Sequenzen einschließen, die für die Expression des/der gewünschten Translationsprodukts/e erforderlich sind; z.B. ein Peptid oder Protein. Das erfindungsgemäße Verfahren kann unter Verwendung bekannter viraler oder nichtviraler rekombinanter Expressionsvektoren angewandt werden, wobei das letztere bevorzugt wird. Vorzugsweise umfassen diese Vektoren komplementäre DNA (cDNA), die für das/die gewünschte(n) Translationsprodukt(e) kodieren.

b) "Polynucleotidzusammensetzung" bezieht sich auf ein pharmazeutisch sicheres Polynucleotid, das frei von Transportvehikeln (wie etwa Liposomen oder kolloidalen Teilchen) ist, d.h. ein "nacktes" Polynucleotid in einem Träger, der die Antigenerkennung des Polynucleotids nicht stört.

c) "Asthma-initiierendes Antigen" bezieht sich auf ein oder mehrere proteinhaltige Antigene, (1) gegen die der Wirt erwiesenermaßen allergisch ist und (2) die beim Wirt asthmatische Symptome hervorrufen.

d) "Antigenpräsentierende Zellen" oder "APCs" umfassen bekannte APCs, wie etwa Langerhanssche Zellen, "verschleierte Zellen" in den zuführenden Lymphgefäßen, dendritische Zellen und verflochtene Zellen von Lymphorganen. Die Definition umfasst auch mononukleäre Zellen, wie etwa (1) Lymphozyten und Makrophagen, die gemäß der Erfindung Polynucleotide über die Haut aufnehmen und exprimieren und (2) mononukleäre Zellen (etwa wie in hierin enthaltenen histologischen Fotografien dargestellt). Diese Zellen sind keine Gewebezellen, jedoch wahrscheinlich Antigenpräsentierende Zellen. Die hinsichtlich vorliegender Erfindung wichtigsten Zellen dieser Art sind jene APCs, von denen bekannt ist, dass sie in großer Anzahl im Epithel und in Thymus-abhängigen Bereichen der Lymphgewebe vorliegen, einschließlich Epidermis und Schleimhautschuppenepithel der Wangenschleimhaut, Vagina, Cervix und Speiseröhre (Bereiche mit "relativ hohen" APC-Konzentrationen). Zusätzlich zu deren unten angeführten Definitionen beziehen sich die hierin verwendeten Bezeichnungen "Haut" und "Schleimhaut" deshalb speziell auf diese Bereiche von APC-Konzentrationen.

- e) "Wirt" bezieht sich auf die Empfänger von gemäß der Erfindung praktizierter Therapie. Der Wirt kann jedes beliebige Wirbeltier sein, wobei jedoch Säugetiere bevorzugt werden. Im Falle eines Säugetiers ist der Wirt vorzugsweise ein Mensch, kann aber ebenso ein Nutztier, ein Labortier oder ein Haustier sein.
- f) "Zielgewebe" bezieht sich auf jenes Wirtsgewebe, in dem die Expression eines Polynucleotids angestrebt wird.
- g) "Haut" bezieht sich hierin auf das epidermale, dermale und subkutane Gewebe eines Wirts.
- h) "Schleimhaut" bezieht sich auf Schleimhautgewebe eines Wirts, ungeachtet dessen wo im Körper sich dieses befindet, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, der Atemwege (einschließlich Bronchien, Lungenepithel und Nasenepithel), der Genitalien (einschließlich Vaginal-, Penis- und Analschleimhaut), der Harnwege (Harnröhre, Blase), des Mundes, der Augen und der Stimmbänder. Die Atemwege sind das primäre Zielgewebe zur Einführung von Polynucleotidzusammensetzungen für die Behandlung von allergischem Asthma gemäß vorliegender Erfindung.
- i) "Eintrittsstelle" bezeichnet jene Stelle, an der das nackte Polynucleotid in den Wirt eingeführt wird, einschließlich des unmittelbar benachbarten Gewebes.
- j) "Th1/Tfh2-Antwort(en)" bezieht sich auf durch Helfer-T-Lymphozyten- (Th-) vom Typ 1 bzw. Typ 2 vermittelte Immunantworten. Die Th2-Antworten umfassen die mit Allergien in Zusammenhang stehende IgE-Antikörper-Klasse sowie erhöhte Spiegel an IL-4- und IL-5-Cytokinen durch Th2-Lymphozyten. Lösliche Proteinantigene neigen zur Stimulierung relativ starker Th2-Antworten. Im Gegensatz dazu werden Th1-Antworten durch Bindung von Antigenen an Makrophagen und dendritische Zellen induziert, die vorzugsweise von Antigenen induziert wird, die sich an bestimmte APCs binden und diese aktivieren, nämlich Makrophagen und dendritische Zellen. Th1-Zellen sondern IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) ab (wobei die beiden Letzteren an der Makrophagenaktivierung und der verzögerten Überempfindlichkeit als Antwort auf Antigenstimulierung beteiligt sind).
- k) "Synthese" bezieht sich auf allgemein bekannte Möglichkeiten zur Synthetisierung von Polynucleotidsequenzen und kann die Isolierung und Reinigung von nativen Polynucleotiden umfassen.
- l) "Peptid" bezieht sich auf kleine Peptide, Polypeptide, Oligopeptide und Proteine, die in vivo eine gewünschte biologische Wirkung zeigen.
- m) "Iontophorese" bezieht sich auf bekannte Möglichkeiten transdermalen Übertragung, die gegenwärtig angewandt werden, um einem Wirt kontinuierlich Peptide zuzuführen. Dabei handelt es sich genauer gesagt um ein Verfahren, das den Transport von Ionenspezies durch Anlegen von elektrischem Strom in physiologisch annehmbaren Ausmaß erleichtert. Dieses Verfahren und andere transdermale Übertragungsmöglichkeiten werden von Chien et al., Transdermal Drug Delivery, "Novel Drug Delivery Systems", Kap. 7, Teil C (Marcel Dekker, 1992), beschrieben, wobei die relevanten Offenbarungen durch diese Bezugnahme hierin aufgenommen sind, um den Wissensstand auf dem Gebiet der Erfindung hinsichtlich Verfahren zum Transport von Medikamenten zu veranschaulichen.
- n) "Detergenzien/Absorptionspromotoren" bezieht sich auf Chemikalien, die gegenwärtig auf dem Gebiet der Erfindung dafür bekannt sind, die Absorption und Transfektion bestimmter kleiner Moleküle und Peptide zu erleichtern.
- o) Als "dermale" und "epidermale Verabreichung" werden Verabreichungswege bezeichnet, die das oder die nackte(n) Polynucleotid(e) auf die Haut aufbringen oder durch selbige zuführen. Dermale Wege umfassen intradermale und subkutane Injektionen sowie transdermale Übertragung. Epidermale Wege umfassen beliebige Reizungen der äußersten Hautschichten, die ausreichen, um eine Immunantwort auf den Reizstoff herbeizuführen. Der Reizstoff kann ein mechanisches oder ein chemisches (vorzugsweise topisches) Mittel umfassen.
- p) "Epitheliale Verabreichung" beinhaltet im Wesentlichen dasselbe Verfahren wie epidermale Verabreichung, mit der Ausnahme, dass der chemische Reizstoff auf ein Schleimhautepithel angewandt wird.
- q) "IL" bezeichnet Interleukin.
- r) "IFN" bezeichnet Interferon.

II. DISKUSSION

A) Theorie der Erfindung

[0032] Die Verwendung der Erfindung nutzt die unerwartete Entdeckung, dass für Asthmainitierende Antigene kodierende Polynucleotidzusammensetzungen, die in Wirts-APCs aufgenommen und exprimiert werden, (1) die Produktion von Th1-Lymphozyten, welche den Th2-Lymphozyten vorgezogen werden, stimulieren, (2) die IgE-Antikörperproduktion, die für das Frühstadium bei allergischem Asthma charakteristisch ist, konsequent unterdrücken und (3) die IL-4/IL-5-stimulierte Eosinophil-Infiltration in Lungengewebe, welche für das Spätstadium der Erkrankung charakteristisch ist, konsequent reduzieren. Die Verabreichung von Polynucleotidzusammensetzungen, die für Asthma-initiiierende Antigene (oder Fragmente davon) kodieren, unterdrückt

nicht nur merklich die IgE-Antikörperproduktion, sondern wirkt von Therapiebeginn an auf diese Weise, womit das Risiko einer in der klassischen Immuntherapie gegebenen Anaphylaxie reduziert wird. Somit manipuliert die Verwendung der Erfindung die T-Lymphozyten-Abteilung der Wirts-Immunantwort auf effektive und unmittelbare Weise, wodurch sowohl IgE-vermittelte als auch zellimmunitätsvermittelte Vorfälle in Zusammenhang mit allergischem Asthma reduziert werden.

[0033] Insbesondere führt die Verwendung der Erfindung Asthma-initiierende Antigene in das intrazelluläre Kompartiment der im Zielgewebe vorliegenden Wirts-APCs ein, wo das Antigen ohne wesentliche Ausscheidungen daraus verbleibt (siehe Beispiele IV bis VII). Diese intrazelluläre Expression und Retention des Antigens stimuliert vorzugsweise Th1-Antworten gegen das Antigen. Da die in der klassischen Immuntherapie erzielte Th2-Antwort auf extrazelluläres Antigen vermieden wird, wird die IgE-Produktion und IL-4/IL-5-Freisetzung als Antwort auf extrazelluläres Antigen ebenfalls vermieden.

[0034] Wie beispielsweise in den Beispielen VII und VIII gezeigt wird, waren die IgE- und IL-4-Spiegel bei gegenüber exprimiertem Antigen ausgesetzten Mäusen überraschenderweise äußerst gering, während die für Asthma-initiierendes Antigen spezifischen CTL-Spiegel (Beispiel IX) und die Th1-Zellausscheidung an INF γ (Beispiel VIII) erhöht waren (verglichen mit Mäusen, die Protein ausgesetzt worden waren, und mit Kontrollmäusen). Die bei erfindungsgemäß immunisierten Mäusen erzielte Unterdrückung der IgE- und IL-4-Produktion setzte sich trotz der anschließenden Aussetzung gegenüber Plasmid oder Protein fort, sogar bei Kombinationen mit Hilfsmitteln (Beispiele VII bis VIII). Während somit sowohl Mäuse, die Proteinantigen ausgesetzt wurden, als auch jene, die erfindungsgemäß immunisiert worden waren, eine IgG-vermittelte Toleranz gegenüber dem Immunisierungsantigen entwickelten, erlitten die letzteren Mäuse weitaus weniger IgE-vermittelte Immunvorfälle, die für das Frühstadium von allergischem Asthma charakteristisch sind.

[0035] Zudem ergeht es Mäusen, die erfindungsgemäß immunisiert werden, im Spätstadium von allergischem Asthma besser als mit Proteinantigen immunisierten Mäusen. Die Daten aus Beispiel II zeigen insbesondere, dass die Verabreichung von Ovalbumin-Antigen-kodierenden Polynucleotidzusammensetzungen an Modellmäuse mit allergischem Asthma im Vergleich mit Kontrollmäusen bei einer anschließenden Aussetzung gegenüber Asthma-initiierendem Antigen eine bis zu 90%ige Reduktion der Eosinophil-Infiltration im Lungengewebe der Mäuse hervorrief. Somit waren die erfindungsgemäß immunisierten Mäuse vor einer Eosinophil-Infiltration im Lungengewebe viel besser geschützt als die Proteinantigen-immunisierten Mäuse desselben Wurfs.

[0036] Im Gegensatz zur klassischen Immuntherapie bei allergischem Asthma hebt die erfindungsgemäße Immuntherapie mit für Asthma-initiierendes Antigen kodierenden Genen sowohl die für Asthma-initiierendes Antigen spezifische als auch die nichtspezifische IgE-Produktion im Frühstadium von allergischem Asthma auf, schützt den Wirt vor einer weiteren IgE-Produktion sogar bei anschließender Aussetzung gegenüber Asthma-initiierendem Antigen und reduziert die zelluläre Lungeninfiltration und die Überempfindlichkeit der Atemwege im Spätstadium der Erkrankung.

B) Für die Erfindung geeignete Polynucleotidzusammensetzungen

1. Konstrukte aus geeigneten Antigen-kodierenden Polynucleotiden und rekombinanten Expressionsvektoren

[0037] Bei allergischem Asthma werden die Krankheitssymptome in einem Wirt durch eine allergische Antwort auf ein Allergen ausgelöst. Die Polynucleotidsequenzen zahlreicher Nucleinsäuren, die für Asthma-initiierende Antigen-Allergene kodieren, sind bekannt. Alle diese Polynucleotidsequenzen sind für die Erfindung geeignet. Beispiele für einige der herkömmlicheren Allergene zur Verwendung in der Erfindung sind nachstehend angeführt. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung sind mit zusätzlichen Beispielen vertraut, deren Verwendung von der Erfindung mitumfasst ist.

[0038] Zur Verwendung in der Erfindung kann die Komponente des rekombinanten Expressionsvektors der erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen für mehr als ein Asthma-initiierendes Antigen, verschiedene Peptide eines Asthma-initiierenden Antigens oder eine Kombination der beiden kodieren. Die Polynucleotide können für intakte Asthma-initiierende Antigene oder T-Zellepitope eines Asthma-initiierenden Antigens kodieren, die durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Mittel so manipuliert werden, dass sie nicht-sekretierend sind.

[0039] Wie oben erläutert sind auf dem Gebiet der Erfindung zahlreiche für Asthma-initiierende Antigene kodierende Polynucleotide bekannt; andere können unter Anwendung herkömmlicher Verfahren, wie etwa die

weiter unten beschriebenen Verfahren, identifiziert werden. Beispiele für bekannte für Asthma-initiiierende Antigene kodierende Polynucleotide umfassen cDNA, die für die IgE-reaktiven, Asthma-initiiierenden Haupt-Hausstaubmilben-Antigene Der pI und Der pII (siehe Chua, et al., J. Exp. Med. 167, 175–182 (1988) und Chua et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91, 124–129 (1990)), T-Zell-Epitop-Peptide von Der-pII-Asthma-initiiierendem-Antigen (siehe Joost van Neerven et al., J. Immunol. 151, 2326–2335 (1993)), das im Überfluss vorhandene Asthma-initiiierende Antigen-E- (Amb al-) Ambrosiapollen-Antigen (siehe Rafnar et al., J. Biol. Chem. 266, 1229–1236 (1991)), Asthma-initiiierendes Phospholipase-A2- (Bienengift-) Antigen und T-Zell-epitope darin (siehe Dhillon et al., J. Allergy Clin. Immunol. 90, 42–51 (1992)), Betv1-Weißbirkenpollen-Antigen (siehe Breiteneder et al., EMBO 8, 1935–1938 (1989)) und Asthma-initiiierendes Fel-d1-Haupt-Hauskatzen-Antigen (siehe Rogers et al., Mol. Immunol. 30, 559–568 (1993)) kodiert. Die in diesen Artikeln beschriebenen veröffentlichten Sequenzen und Verfahren für deren Isolierung und Synthese sind hierin durch diesen Verweis aufgenommen, um des Wissensstand auf dem Gebiet der Erfindung hinsichtlich für Asthma-initiiierende Antigene kodierender Polynucleotide zu veranschaulichen.

[0040] Zudem verstärken die Expression (mit demselben oder einem anderen Expressionsvektor) oder die gleichzeitige Verabreichung therapeutisch vorteilhafter Peptide, wie z.B. TGF- β , TNF- β , IL-2 und IFN γ , die durch das erfindungsgemäße Verfahren beabsichtigte Th1-Antwort. In diesem Zusammenhang sind IL-2 und IFN γ von besonderem Interesse, da sich IL-2 und Gammainterferon in jüngsten klinischen Tests in einer Dosis, die zur Beeinflussung der IgE-Produktion ausreicht, als toxisch erwiesen haben.

[0041] Die in dieser Erfindung zu verwendenden Polynucleotide können DNA oder RNA umfassen, wobei sie vorzugsweise eine komplementäre DNA- (cDNA-) Sequenz sind. Die in dieser Erfindung zu verwendenden Polynucleotidsequenzen müssen (a) exprimierbar und (b) entweder nicht replizierbar oder durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Mittel so manipuliert sein, dass sie nicht im Wirtsgenom repliziert werden. Im Folgenden wird die Herstellung von Polynucleotiden veranschaulicht, die zur Verwendung in der Erfindung geeignet sind. Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung ist jedoch klar, dass andere bekannte Mittel zur Herstellung von nichtreplizierenden Polynucleotiden ebenso geeignet sein können.

[0042] Im Allgemeinen können DNA-Sequenzen zur Verwendung bei der Herstellung von erfindungsgemäßen therapeutischen und/oder immunogenen Peptiden mittels mehrerer Verfahren erhalten werden. Die DNA kann beispielsweise isoliert werden, indem auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannte Hybridisierungsverfahren angewandt werden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf: 1) Hybridisierung von Sonden an genomische oder cDNA-Bibliotheken, um gemeinsame Strukturmerkmale zu detektieren; 2) Antikörper-Screening von Expressionsbibliotheken, um gemeinsame Strukturmerkmale zu detektieren; 3) Synthese durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Entwicklung spezifischer kodierender DNA-Sequenzen oder von Fragmenten davon kann auch folgendermaßen erreicht werden: 1) Isolierung doppelsträngiger DNA-Sequenzen aus der genomischen DNA; 2) chemische Synthese einer DNA-Sequenz zur Bereitstellung der erforderlichen Codons für das Polypeptid von Interesse; und 3) In-vitro-Synthese einer doppelsträngigen DNA-Sequenz durch reverse Transkription von mRNA, die aus einer eukaryotischen Donorzelle isoliert wurde. Im letzteren Fall ein doppelsträngiges (cDNA-) Komplement von mRNA.

[0043] Eine cDNA-Bibliothek, von der angenommen wird, dass sie ein Polynucleotid von Interesse enthält, kann durch Injektion verschiedener von cDNA herrührender mRNA in die Oocyten gescreent werden, womit ausreichend Zeit für die Expression der cDNA-Genprodukte und das Überprüfen der Gegenwart des gewünschten cDNA-Expressionsprodukts bleibt, indem beispielsweise ein Antikörper verwendet wird, der für ein Peptid spezifisch ist, für welches das Polynucleotid von Interesse kodiert, oder durch Verwendung von Sonden für die Wiederholungsmotive und einer Gewebeexpressionsstruktur, die für ein Peptid charakteristisch ist, für welches das Polynucleotid von Interesse kodiert. Alternativ dazu kann eine cDNA-Bibliothek zur Expression von therapeutischen und/oder immunogenen Peptiden mit zumindest einem Epitop unter Verwendung von peptidspezifischen Antikörpern indirekt gescreent werden. Solche Antikörper können entweder polyklonale oder monoklonale Antikörper sein und zur Detektion von Expressionsprodukten, die auf die Gegenwart von cDNA von Interesse hinweisen, verwendet werden.

[0044] Screening-Verfahren, die auf Nucleinsäurehybridisierung basieren, ermöglichen die Isolierung jeder beliebigen Gensequenz aus jedem beliebigen Organismus, mit der Maßgabe, dass die geeignete Probe verfügbar ist. Oligonucleotidsonden, die einem Abschnitt der Sequenz entsprechen, der für das besagte Protein kodiert, können chemisch synthetisiert werden. Dies erfordert, dass kurze Oligopeptidabschnitte von Aminosäuresequenzen bekannt sein müssen. Die für das Protein kodierende DNA-Sequenz kann aus dem genetischen Code hergeleitet werden, wobei jedoch die Degeneration des genetischen Codes berücksichtigt werden muss. Wenn die Sequenz degeneriert ist, kann eine gemischte Additionsreaktion durchgeführt werden. Dies

umfasst ein heterogenes Gemisch aus denaturierter doppelsträngiger DNA. Für ein solches Screening-Verfahren wird die Hybridisierung vorzugsweise entweder an einzelsträngiger DNA oder denaturierter doppelsträngiger DNA durchgeführt.

[0045] Das Polynucleotid, das für jedes Asthma-initiiierende Antigen kodiert, kann konjugiert an oder gemeinsam mit anderen Polynucleotiden verwendet werden, die für Regulatorproteine kodieren, welche die Expression dieser Polypeptide steuern oder Erkennungs-, Promotor- und Sekretionssequenzen umfassen. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung sind in der Lage, Regulatorproteine auszuwählen und diese ohne aufwändiges Experimentieren in erfindungsgemäße Polynucleotidzusammensetzungen miteinbeziehen (falls diese nicht bereits darin vorliegen). Geeignete Promotoren zur Verwendung in Mäusesystemen oder menschlichen Systemen und deren Verwendung sind beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, siehe oben, in Kap. 1, beschrieben.

[0046] Gemeinsam mit geeigneten Regulatorsequenzen werden die in der Erfindung verwendeten Polynucleotide in einen rekombinanten Expressionsvektor eingebaut, der vorzugsweise ein nichtviraler Plasmid- oder Cosmidvektor ist. Die Verwendung eines nichtviralen Vektors, insbesondere eines einen Replikator umfassenden Vektors, verlängert die Expression des Gens im Zielgewebe. Bestimmte Plasmidvektoren sind ebenfalls gute Vermittler von Immunantworten auf immunogene Peptide, da hohe Expressionswerte erzielt werden, wenn das Peptid-kodierende Gen im Vektor inkorporiert ist.

[0047] Die zur Verwendung in der Erfindung besonders bevorzugten rekombinanten Expressionsvektoren (sowohl virale als auch nichtvirale) sind detailliert in der gemeinsam übertragenen Parallelanmeldung WO 97/28259 beschrieben, um für die Erfindung geeignete Vektoren zu veranschaulichen. Kurz gefasst umfassen die für die Verwendung in der Erfindung bevorzugten Expressionsvektoren zumindest eine nichtkodierende Palindrom-Region (d.h. eine Region, in der die Nucleotidsequenz eines Strangs das reverse Komplement einer entsprechenden Region des Komplementärstrangs darstellt) mit einer Länge von zumindest 6 Nucleotiden. Jede dieser Palindrom-Regionen umfasst eine nichtmethylierte CG-Dinucleotidsequenz, d.h. zumindest zwei benachbarte Nucleotide, wobei eines dieser Nucleotide Cytosin und das andere Nucleotid Guanin ist.

[0048] Bei doppelsträngigen Molekülen ist jede in der Palindrom-Region vorliegende CG-Dinucleotidsequenz an sich palindromisch, d.h. Cytosin der CG-Sequenz auf einem Strang ist mit Guanin der CG-Sequenz auf dem Komplementärstrang gepaart. Bei einzelsträngigen Molekülen ist die relative Position jeder CG-Sequenz im Palindrom-Dinucleotid vorzugsweise 5'-CG-3'. Insbesondere ist jede in der Palindrom-Region der bevorzugten Expressionsvektoren vorliegende CG-Dinucleotidsequenz von zumindest zwei Purinnucleotiden (z.B. GA oder AA) und zumindest zwei Pyrimidinnucleotiden (z.B. TC oder TT) flankiert. Beispiele für spezifische Expressionsvektorkonstrukte, die sich zur Immunisierung eines Wirts eignen, sind in der Parallelanmeldung WO 97/28259 beschrieben.

[0049] Solche Expressionsvektorenkonstrukte haben den Vorteil, die cytotoxische T-Lymphozyten- (CTL-) Aktivität in einem höheren Ausmaß zu stimulieren, als dies bei der Einführung von Kontrollvektoren, denen die oben beschriebenen Palindrom-Sequenzen fehlen, in einen Wirt auftritt. Zudem verstärken solche Expressionsvektoren, die die flankierenden Purin- und Pyrimidinnucleotide wie oben beschrieben enthalten, die Stimulierung der B-Lymphozyten-Aktivität als Antwort auf das exprimierte initiiierende Antigen. Somit werden die oben beschriebenen Expressionsvektoren für ihre Aktivität als immunstimulierende Hilfsmittel bevorzugt, welche die Immunantwort eines Wirts auf das initiiierende Antigen verstärken, das exprimiert wird, um den Wirt gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren zu immunisieren.

[0050] Andere besonders geeignete rekombinante Expressionsvektoren zur erfindungsgemäßen Verwendung sind jene, die einen Promotor enthalten, der, nachdem der Vektor dem Patienten verabreicht worden ist, "ein"- oder "aus"-geschaltet werden kann. Die Verwendung eines solchen Expressionsvektors in der Erfindung unterstützt die Minimierung, wenn nicht sogar die Vermeidung einer extrazellulären Stimulierung von IgE-Antikörperbildung gegen exprimierte Asthma-initiiierende Antigene.

[0051] Besonders wirksame Beispiele für solche Promotoren umfassen mittels Liganden induzierbare Kernrezeptorpromotoren. Kernrezeptoren stellen eine Familie von Transkriptionsverstärkerfaktoren dar, die durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen wirken, die in als Antwortelemente bekannten Zielpromotoren vorliegen. Spezifische Elemente der Kernrezeptorfamilie umfassen primäre intrazelluläre Targets für kleine, lipidlösliche Liganden, wie etwa Vitamin D₃ und Retinoide, sowie Steroid- und Schilddrüsenhormone ("aktivierende Liganden").

[0052] Kernrezeptoren, die durch spezifische aktivierende Liganden aktiviert werden, eignen sich sehr gut zur Verwendung als Promotor für eukaryotische Expressionsvektoren, da die Expression der Gene durch einfache Steuerung der Konzentration der für den Rezeptor verfügbaren Liganden geregelt werden kann. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Glucocorticoid-induzierbare Promotoren, wie jener der langen terminalen Wiederholung des Mammatumorvirus der Maus (MMTV) weit verbreitet gewesen, da die Glucocorticoid-Antwortelemente in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert werden. Ein Expressionssystem, das sich Glucocorticoid-Antwortelemente, die auf eine Vielzahl verschiedener Steroidhormone (z.B. Dexamethason und Progesteron) ansprechen, zunutze macht, ist ein pGREtk-Plasmid (das ein oder mehrere Ratten-Tyrosinaminotransferase-Glucocorticoid-Antwortelemente) stromauf vom Promotor für die Thymidinkinase (tk) des Herpes-simplex-Virus in pBLCAT8+ aufweist), transfiziert in HeLa-Zellen (siehe Mader und White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5603–5607 (1993) [pGRE2tk]; und Klein-Hitpass et al., Cell 46, 1053–1061 (1986) [pBLCAT8+], deren Offenbarungen hierin durch diesen Verweis aufgenommen sind, um den Wissensstand auf dem Gebiet der Erfindung hinsichtlich der Konstruktion von geeigneten Promotoren, die aus Kernrezeptorantwortelementen stammen ("NRRE-Promotoren"), zu veranschaulichen). Der pGREtk-Promotor (siehe Abbildung in [Fig. 11](#)) ist insbesondere bei der Stimulierung gesteuerter Überexpression von geklonten Genen in eukaryotischen Zellen wirksam (Mader und White, siehe oben, S. 5607).

[0053] Ein anderer besonders geeigneter NRRE-Promotor zur Verwendung in der Erfindung ist einer, der durch die Vitamin-D₃-Verbindung 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ und nicht-hyperkalzämische Analoge davon (kollektiv "Vitamin D₃ aktivierende Liganden") induzierbar ist. Durch Vitamin D₃ aktivierende Liganden induzierbare NRRE-Promotoren enthalten die Vitamin-D₃-Rezeptor- (VDR-) Antwortelemente PurG(G/T)TCA, die direkte, durch 3 Basenpaare getrennte Wiederholungen erkennen. Vitamin-D₃-Rezeptor-Antwortelemente liegen stromauf von menschlichem Osteocalcin- und vom Mäuse-Osteopontin-Gen, wobei die Transkription dieser Gene bei der Bindung des VDR aktiviert wird (siehe beispielsweise Morrison und Eisman, J. Bone Miner. Res. 6, 893–899 (1991); und Ferrara et al., J. Biol. Chem. 269, 2971–2981 (1994), deren Offenbarungen hierin durch diesen Verweis aufgenommen sind, um den Wissensstand auf dem Gebiet der Erfindung hinsichtlich Vitamin-D₃-Rezeptor-Antwortelementen zu veranschaulichen). In jüngsten Ergebnissen von Experimenten, bei denen ein rekombinanter Expressionsvektor getestet wurde, der den Mäuse-Osteopontin-VDR stromauf vom trunktierten Thymidinkinase- (tk-) Promotor von Herpes-simplex-Virus enthält, wurde vorgeschlagen, dass 9-cis-Retinoesäure die Antwort von VDR auf 1,25-Hydroxyvitamin D₃ verstärken kann (siehe Carlberg et al., Nature 361, 657–660 (1993)).

[0054] Ferrara et al. haben ebenfalls Vitamin D₃ induzierbare Promotoren in rekombinanten Expressionsvektoren beschrieben, die unter Verwendung mehrerer Kopien eines starken VDR konstruiert wurden; insbesondere Maus-Osteopontin-VDR (bestehend aus einer direkten Wiederholung von durch 3 Basenpaare getrennten PurGG/TTCA-Motiven). Diese VDR entsprechen den PurGG/TTCA-Consensusmotiven, bei denen sich bereits zuvor herausgestellt hat, dass diese nicht nur auf Vitamin D₃, sondern auch auf Schilddrüsenhormone und/oder Retinoesäure ansprechen. Es wurden insgesamt drei Kopien des Maus-VDR in pBLCAT8+ eingeführt, unmittelbar stromauf vom Thymidinkinase- (tk-) Promotor von Herpes-simplex-Virus (siehe z.B. [Fig. 12](#) [Abbildung von pVDREtk]). Die Transfektion des resultierenden VDREtk-Vektors in COS-Zellen (zur Herstellung eines "VDR-Expressionssystems") stellte sich als besonders nützlich dahingehend heraus, dass COS-Zellen den Kern-Retinoid-X-Rezeptor (RXR) enthalten, der sich als Hilfsfaktor zur Bindung von VDR an sein Antwortelement als wirkungsvoll erwiesen hatte.

[0055] Das VDR-Expressionssystem (und funktionell äquivalente Expressionssysteme, beispielsweise unter der Kontrolle des menschlichen Osteocalcin-Genpromotors) eignet sich einzigartig zur Verwendung in der Erfindung. Insbesondere kann die Expression eines initiiierenden Antigens, das einem Säugetier gemäß der Erfindung auf epidermale oder dermale Weg (insbesondere ersterem) in einem Expressionssystem verabreicht wird, das auf Vitamin D₃ anspricht, durch topische Verabreichung eines 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃-Präparats an der Eintrittsstelle eingeschaltet werden (wobei das Ausschalten durch Entzug des Vitamin-D₃-Präparats erfolgen kann und/oder durch Anwendung oder Entzug einer Quelle von Retinoesäure an der oder von der Eintrittsstelle moduliert werden kann). Günstigerweise sind 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ und nicht-hyperkalzämische Analoge davon zur Verwendung in topischen Präparaten durch die US-Behörde für Lebensmittel und Pharmazeutika United States Food and Drug Administration zur Behandlung von Psoriasis zugelassen worden und sind im Handel erhältlich.

[0056] In-vivo-Tests von NRRE-Promotoren in der menschlichen Haut weisen darauf hin, dass, wenn diese ihren entsprechenden Antwortelementen systemisch ausgesetzt sind (siehe Tsou et al., Exp. Cell Res. 214, 27–34 (1994) [Retinoesäureaktivierung des Retinoesäure-Antwortelements, das an ein Lac-Z-Reportermolekül in der Epidermis von transgenen Mäusen gebunden ist]), diese induzierbar werden. Angesichts der erwar-

teten Retention von Polynucleotiden, die an der Eintrittsstelle dermal oder epidermal verabreicht werden (wo-durch diese für die Aussetzung gegenüber topisch absorbierten Antwoortelementen zugänglich werden; siehe z.B. die Diskussion auf den Seiten 15 bis 16 und die Daten in Beispiel IV), kann einigermäßen vorausgesagt werden, dass die Verwendung von NRRE-Promotoren zur Expression solcher Polynucleotide auch deren In-vi-vo-Steuerung durch topische Verabreichung von geeigneten NRRE-Promotoren aktivierenden Liganden zu-lässt (z.B. 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃-Transkriptionsaktivatoren mit einem VDR-Expressionsvektor zur Expres-sion des Polynucleotids von Interesse).

[0057] Somit ermöglicht die Verwendung eines rekombinanten NRRE-Promotor-Expressionsvektors zur Ver-abreichung und Expression von initiiierenden Antigenen gemäß der Erfindung die Steuerung der Expression für beispielsweise das Einschalten der Expression, wenn eine Dosis erforderlich ist, oder zum Ausschalten der Expression, falls es zu einer Gegenreaktion auf das exprimierte Protein oder Peptid kommt.

2. Pharmazeutisch wirksame Polynucleotidzusammensetzungen zur Verwendung im erfindungsgemäßen Ver-fahren

[0058] Wie oben beschrieben hergestellte Polynucleotidzusammensetzungen können in einen pharmazeu-tisch annehmbaren Träger aufgenommen werden, um einem Wirt zugeführt zu werden. Der gewählte Träger sollte die Antigenerkennung der Polynucleotidzusammensetzung nicht beeinträchtigen. Deshalb sind auf Lipo-som- und Kolloidteilchen basierende Träger für die erfindungsgemäße Verwendung nicht erwünscht. Somit be-stehen die zur erfindungsgemäßen Verwendung geeigneten Polynucleotidzusammensetzungen insbesondere aus "nackten" Polynucleotiden in einem pharmazeutisch sicheren Träger.

[0059] Pharmazeutisch annehmbare Träger können sterile wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspen-sionen und Emulsionen umfassen. Beispiele für nichtwässrige Lösungsmittel umfassen Propylenglykol, Poly-ethylenglykol, pflanzliche Öle, wie z.B. Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie z.B. Ethyloleat. Wäss-rige Träger umfassen Wasser, alkoholisch-wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, einschließ-lich salzhaltiger und gepufferter Medien. Parenterale Träger umfassen Natriumchloridlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Lactat oder Fettöle. Intravenöse Träger umfassen Flüssigkeits- und Nah-rungsergänzungen, Elektrolytergänzungen (wie z.B. jene, die auf Ringer-Dextrose basieren) und dergleichen. Konservierungsstoffe und andere Additive können auch vorhanden sein, wie z.B. antimikrobielle Stoffe, Antio-xidanzien, Chelatbildner, Inertgase und dergleichen. Zudem kann sie von auf dem Gebiet der Erfindung allge-mein bekannten Mitteln gefriergetrocknet werden, um danach wieder in der ursprünglichen Konzentration ge-löst und gemäß der Erfindung verwendet zu werden.

[0060] Absorptionspromotoren, Detergenzien, chemische oder mechanische Reizmittel können die Durchläs-sigkeit der Polynucleotidzusammensetzung an der Eintrittsstelle fördern. Hinsichtlich der allgemeinen Prinzipi-en in Bezug auf Absorptionspromotoren und Detergenzien, die mit Erfolg bei der Schleimhautverabreichung von organischen und auf Peptiden basierenden Arzneimitteln verwendet wurden, siehe Chien, Novel Drug De-livery Systems, Kap. 4, Marcel Dekker (1992)). Detaillierte Informationen bezüglich bekannter Mittel und Prin-zipien hinsichtlich nasaler Arzneimittelverabreichung sind in Chien, s.o., Kap. 5 beschrieben. Beispiele für ge-eignete nasale Absorptionspromotoren sind in Chien, s.o., Kap. 5, Tabellen 2 und 3 angeführt, wobei schonen-dere Stoffe bevorzugt werden. Zudem sind bekannte Mittel und Prinzipien der transdermalen Arzneimittelver-abreichung auch in Chien, s.o., in Kap. 7 beschrieben. Geeignete Mittel zur Verwendung beim erfindungsge-mäßen Verfahren zur Verabreichung über die Schleimhaut oder die Nase sind auch in Chang et al., Nasal Drug Delivery, "Treatise on Controlled Drug Delivery", Kap. 9, Marcel Dekker (1992) und in den dortigen Tabellen 3-4B beschrieben. Geeignete Mittel, die bekannterweise die Absorption von Arzneimitteln über die Haut för-dern, sind in Sloan, Use of Solubility Parameters from Regular Solution Theory to Describe Partitioning-Driven Processes, Kap. 5, "Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery", Marcel Dekker (1992) und an anderen Stel-len des Texts zu finden.

[0061] Erwartungsgemäß können diese Verfahren (und andere, die herkömmlicherweise zur Vereinfachung der Arzneimittelverabreichung verwendet werden) von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung an die Her-stellung von Polynucleotidzusammensetzungen zur erfindungsgemäßen Verwendung ohne aufwändiges Ex-perimentieren angepasst werden. Obwohl die in den vorangegangenen Absätzen beschriebenen Herange-hensweisen nach Wissen der Erfinder zuvor nicht für Polynucleotidverabreichungen verwendet worden sind, wird angenommen, dass sich diese für diesem Verwendungszweck eignen.

C) Verfahren und Wege zur Verabreichung von Polynucleotid-Zusammensetzungen

[0062] Obwohl nicht beabsichtigt wird, dass die Erfindung vollständig auf eine bestimmte Theorie bezüglich des beteiligten Expressionsmechanismus eingeschränkt wird, wird angenommen, dass eine biologische Antwort in diesen Geweben nach einer Verabreichung von erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen über die Haut oder Schleimhaut erzielt wird, weil das Polynucleotid intrazellulär im Cytoplasma von mononukleären Zellen, die sehr wahrscheinlich die antigenpräsentierenden Zellen des Wirts darstellen, exprimiert wird.

[0063] Insbesondere scheinen Polynucleotidzusammensetzungen nicht direkt durch Fibroblasten oder andere Gewebezellen in signifikanten Mengen aufgenommen zu werden (siehe histologische Studien in Beispiel IV und [Fig. 4](#)). Diese Schlussfolgerung geht auf Studien zurück, die zeigen, dass (1) intradermale Verabreichungen von sogar winzigen Mengen an Polynucleotidzusammensetzungen an Mäuse eine starke Th1-Antwort (als Hinweis auf Antigenpräsentation durch Makrophagen und dendritische Zellen, siehe Beispiele V und VII) induzierte; (2) intradermale Verabreichungen von Polynucleotidzusammensetzungen an Mäuse die Bildung von cytotoxischen T-Zellen induzierten, ohne die Produktion von detektierbaren Antikörpermengen zu stimulieren (siehe Beispiel VIII); und (3) dem Polynucleotidexpressionsprodukt als Antigen ein verlängertes immunologisches Gedächtnis induziert wurde (Beispiel X). Deshalb scheint es, als ob die Immunogenität der Polynucleotidzusammensetzungen nicht nur von der dadurch exprimierten Proteinmenge, sondern stattdessen teilweise von dem transfizierten Zelltyp abhängt (z.B. antigenpräsentierende Zellen verglichen mit Gewebezellen).

[0064] Deshalb ist das ideale Zielgewebe ein solches, worin etwa 1 bis 2% der Zellpopulation aus antigenpräsentierenden Zellen bestehen, wie z.B. Schleimhaut oder Haut. Die Atemwegsschleimhaut ist das primäre Zielgewebe zur Immunisierung gegen Asthma-initiiierende Antigene für die Behandlung von allergischem Asthma, wobei die Haut jedoch auch ein Zielgewebe zur Immunisierung gegen Kontaktallergene sowie für die Verabreichung von z.B. Präimmunisierungs- und Boosterdosen von Antigenen sowie anderen therapeutisch signifikanten Peptiden darstellt. Da die IgE-Moleküle hauptsächlich in Haut und Schleimhaut vorliegen, kann darüber hinaus erwartet werden, dass die Verwendung dieser Wege als Eintrittsstellen gemäß der Erfindung für die Abschwächung der allergischen Antwort auf ein Antigen besonders wirksam ist.

[0065] Für primäre Immunisierungen gegen Asthma-initiiierende Antigene werden intranasale Verabreichungswege besonders bevorzugt. Diese Verabreichungswege umfassen das Einatmen aerosolischer Suspensionen oder die Insufflation der erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen. Zerstäuber, die sich zur Verabreichung von Polynucleotidzusammensetzungen über die Nasenschleimhaut eignen, sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt und werden deshalb hierin nicht näher beschrieben.

[0066] Um die Absorption der erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen zu verbessern, können die Zusammensetzungen, wie in Kapitel 2-B, s.o., beschrieben, Absorptionspromotoren und/oder Detergenzien umfassen. Um die Population der APCs an der Eintrittsstelle zu vergrößern, kann auch ein chemisches Reizmittel angewandt werden.

[0067] Insbesondere können die Polynucleotide eine Chemikalie umfassen, die die äußersten Epithelzellen der Schleimhaut reizt, womit eine Immunantwort provoziert wird, die ausreicht, um zusätzliche APCs in diesen Bereich zu locken. Als Beispiel dient ein keratinolytischer Hilfsstoff, wie etwa Salicylsäure, die für handelsübliche topische Enthaarungscremes, unter der Handelsmarke NAIR der Noxema Corporation, verwendet wird.

[0068] Dermale Verabreichungswege sowie subkutane Injektionen sind bei der gemeinsamen Verabreichung mit anderen therapeutisch signifikanten Peptiden sowie für Immunisierungen und Antigenbooster nützlich. Als Einführungsmöglichkeiten für dermale Verabreichungswege werden jene insbesondere bevorzugt, die die geringste Invasivität aufweisen, wobei die transdermale Übertragung und epidermale Verabreichung bevorzugt werden.

[0069] Für transdermale Übertragungen eignet sich die Iontophorese als Verfahren. Iontophoreseübertragungen können unter Verwendung handelsüblicher "Pflaster" erfolgen, die ihr Produkt mehrere Tage lang oder länger kontinuierlich über die unversehrte Haut verabreichen. Die Verwendung dieses Verfahrens ermöglicht die gesteuerte Übertragung von pharmazeutischen Zusammensetzungen in relativ hohen Konzentrationen, lässt die Infusion von Kombinationsarzneimitteln zu und ermöglicht die gleichzeitige Verwendung eines Absorptionspromotors.

[0070] Als Beispiel für ein Pflasterprodukt zur Verwendung in diesem Verfahren dient LECTRO PATCH, ein

als Warenzeichen eingetragenes Produkt der Firma General Medical Company of Los Angeles, CA, USA. Dieses Produkt hält Speicherelektroden elektronisch auf neutralem pH und kann so angepasst werden, dass Dosen mit unterschiedlichen Konzentrationen bereitgestellt werden, um so kontinuierlich und/oder periodisch zu dosieren. Die Herstellung und Verwendung des Pflasters sollte gemäß den schriftlichen Anleitungen des Herstellers durchgeführt werden, die dem LECTRO PATCH beiliegen.

[0071] Die epidermale Verabreichung umfasst im Wesentlichen eine mechanische oder chemische Irritation der äußersten Epidermisschicht, die ausreicht, um eine Immunantwort auf das Reizmittel zu erzeugen. Insbesondere sollte die Reizung ausreichen, um APCs in den Reizungsbereich zu locken. Wie bereits erläutert wird angenommen, dass die APCs die verabreichte Polynucleotidzusammensetzung anschließend aufnehmen und exprimieren.

[0072] Alternativ dazu können zusätzliche APCs mittels mechanischer Reizung zur Eintrittsstelle gezogen werden. Ein Beispiel für eine Möglichkeit zur mechanischen Reizung umfasst mehrere kurze Zinken mit äußerst geringem Durchmesser, die verwendet werden können, um die Haut zu reizen und APCs zur Reizstelle zu ziehen und um die von den Enden der Zinken übertragenen Polynucleotidzusammensetzungen aufzunehmen. Der MONO-VACC-Alt tuberculintest von Pasteur Merieux, Lyon, Frankreich, umfasst beispielsweise eine Vorrichtung, die sich zur Einführung von Polynucleotidzusammensetzungen eignet.

[0073] Die Vorrichtung (welche in den USA durch Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA, vertrieben wird) besteht aus einem Plastikgefäß, das an einem Ende einen Spritzenkolben und am anderen Ende eine mit Zinken versehene Scheibe aufweist. Die Zinkenscheibe verfügt über mehrere kurze Zinken mit äußerst geringem Durchmesser, die die äußerste Schicht von Epidermiszellen aufritzen. Die Zinken im MONO-VACC-Kit sind jeweils mit Alt tuberculin beschichtet, wobei in der vorliegenden Erfindung jede Nadel mit einer pharmazeutisch wirksamen Polynucleotidzusammensetzung oder Gemischen davon beschichtet ist. Die Verwendung der Vorrichtung erfolgt gemäß den schriftlichen Anleitungen des Herstellers, die dem Produkt beiliegen; diese Anleitungen bezüglich Verwendung und Verabreichung veranschaulichen die herkömmliche Verwendung dieser Vorrichtung. Ähnliche Vorrichtungen, die ebenfalls in dieser Ausführungsform der Erfindung verwendet werden können, umfassen jene, die derzeit zur Durchführung von Allergietests eingesetzt werden.

D) Dosierungsparameter für die erfindungsgemäßen Polynucleotid-Zusammensetzungen

[0074] Wie oben bemerkt ist es wahrscheinlich, dass die Einführung relativ geringer Dosen des Asthma-initiiierenden Antigen-kodierenden Polynucleotids in APCs unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens das Asthma-initiiierende Antigen dabei unterstützt, exprimiert und intrazellulär zurückgehalten zu werden, womit die extrazelluläre Verfügbarkeit des Asthma-initiiierenden Antigens zur Stimulierung von IgE-Antikörperproduktion und Bildung von Komplexen aus Asthma-initiiierendem Antigen und IgE-Antikörper eingeschränkt wird. Im Gegensatz dazu scheint es, dass die Einführung relativ "hoher" Dosen des für Asthma-initiiierendes Antigen kodierenden Polynucleotids (z.B. deutlich mehr als etwa 50 µg bei Mäusen) die Produktion von IgE-Antikörpern in Mengen stimulieren können, die eher mit jenen vergleichbar sind, die bei Mäusen produziert werden, denen ein Asthma-initiiierendes Antigen subkutan injiziert worden ist, was möglicherweise auf die extrazelluläre Freisetzung des Antigens zurückzuführen ist.

[0075] Somit umfasst die bevorzugte Ausführungsform eines Verfahrens zur Behandlung von Allergien gemäß der Erfindung ein Verfahren, worin das für Asthma-initiiierendes Antigen kodierende Polynucleotid in "geringen" Dosen (z.B. vorzugsweise weniger als etwa 50 µg Polynucleotid bei Mäusen) verabreicht wird. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können den entsprechenden Dosierungswert zur Verwendung bei Menschen ohne weiteres bestimmen. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung sind mit dem Dosierungsverlauf bei Asthma-initiiierender Antigen-Immuntherapie vertraut (z.B. Priming-, Booster- und Erhaltungsdosierung), wobei der Verlauf sich zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren eignet. Im Allgemeinen kann erwartet werden, dass die Mäusen entsprechenden Dosen von weniger als etwa 50 µg, und sogar weniger als etwa 10 µg, für Priming-, Booster- und Erhaltungsdosen bei Menschen geeignet sind.

[0076] Alternativ dazu kann die Primingdosis des für Asthma-initiiierendes Antigen kodierenden Polynucleotids auf Booster- und/oder Erhaltungsdosen des Asthma-initiiierenden Antigens folgen. Sobald ein immunologisches Gedächtnis bezüglich des Asthma-initiiierenden Antigens durch Einführung eines für Asthma-initiiierendes Antigen kodierenden Polynucleotids induziert worden ist, wird dieses Gedächtnis erhalten, ungeachtet der anschließenden Aussetzung gegenüber Asthma-initiiierendem Antigen.

[0077] Da vorteilhafterweise an Stelle des Antigens selbst ein Polynucleotid verabreicht wird, das für ein An-

tigen operativ kodiert, ist die Menge an in den Wirt eingeführtem Fremdmaterial relativ gering. Darüber hinaus ist bei Verabreichungswegen von Polynucleotidzusammensetzungen über die Haut oder Schleimhaut eine geringere DNA-Konzentration erforderlich, um eine gleich starke Immunantwort zu erzielen, als dies beispielsweise bei einem intramuskulären Verabreichungsweg für die gleichen Zusammensetzungen der Fall ist (z.B. etwa 10- bis 50fach geringer; siehe Beispiel X). Daraus ergibt sich, dass sich die Erfindung gut zur Verabreichung von Polynucleotidzusammensetzungen eignet, die für mehrere hundert verschiedene Antigene zur Verwendung bei der Immunisierung eines Wirts gegen jeweils mehr als ein Asthmainitiiierendes Antigen kodieren. Somit umfasst die Erfindung auch die Verabreichung eines Peptid-Cocktails (d.h. eines Gemischs aus Polynucleotiden) über die Expression von Genstrukturen, die beispielsweise bis zu 200 für Asthma-initiiierende Antigene kodierende Polynucleotidsequenzen aufweisen, die unter der Kontrolle eines einzigen Promotors stehen.

[0078] Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung sind mit den Möglichkeiten zur Bestätigung des Vorhandenseins und der Menge an exprimierten Peptiden gut vertraut, weshalb hierin nicht näher darauf eingegangen wird. Bestimmte Möglichkeiten sind in den nachstehend bereitgestellten Beispielen veranschaulicht. Im Allgemeinen umfassen diese Immuntests (wie z.B. Enzymimmuntests), PCR-Verfahren und immunhistologische Analysen, die gemäß auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren durchgeführt werden. Die Dosierungen der verabreichten Polynucleotide können zur Erreichung des gewünschten Expressionsniveaus, basierend auf Informationen, die von diesen Detektions- und Quantifizierungsmöglichkeiten bereitgestellt werden, sowie durch klinische In-vivo-Symptome eingestellt werden, die Fachleuten auf dem Gebiet der klinischen Medizin bekannt sind.

[0079] Nachstehend werden Beispiele angeführt, die Aspekte jeweiliger Ausführungsformen der Erfindung veranschaulichen. Diese sollten als der Veranschaulichung, nicht als Einschränkung dienend angesehen werden.

BEISPIEL I

MÄUSEMODELL FÜR DIE ATEMWEGSHYPERREAKTIVITÄT BEI ALLERGISCHEM ASTHMA

[0080] Mit Aeoroasthma-initiiierendem Antigen provozierte Mäuse verschiedener Stämme modellieren die bei allergischem Asthma auftretende Atemwegshyperreaktivität. Geeignete Mäusestämme zur Verwendung beim Modellieren der Krankheit umfassen Balb/c-Mäuse (die IL-5⁺ sind und erhöhte Konzentrationen von IL-4 als Antwort auf CD4⁺-Lymphozytenpriming produzieren), C57BL/6-Mäuse (die IL-5-arm sind, für eine detaillierte Studie von IL-5-verursachten Gewebeschäden bei Asthma) und W/W^v Mäuse (die arm an Mastzellen sind, für eine detaillierte Studie der Mastzellenaktivierung bei Asthma).

[0081] Mäuse zur Modellierung der Krankheit werden durch eine intraperitoneale oder subkutane Injektion von Ovalbumin ("OVA") im Träger (z.B. sterile Salzlösung), gefolgt von einer Antigen-Provokation mit aerosolisiertem Antigen hergestellt. Beispielsweise können die Mäuse mit 25 µg wöchentlich 4 bis 6 Wochen lang subkutan injiziertem OVA (mit oder ohne Hilfsmittel) immunisiert werden und anschließend mit 2- oder 3-wöchigen, in 20-Minuten-Intervallen verabreichten Aerosolierungen von OVA in einer Konzentration von 50 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder täglich etwa eine Woche lang (in drei 30-Minuten-Intervallen täglich) in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,9%iger Salzlösung provoziert werden. Zerstäuber zur Verwendung bei der Aerosolierung sind von Aerotech II, CIS-US, Bedford, MA, USA, erhältlich, die über eine Nasenkammer verfügen, die an die Nasengänge von Mäusen angepasst ist (z.B. eine ausschließlich für die Nase gefertigte Kammer von Intox Products, Albuquerque, NM, USA). Wenn die beschriebenen Vorrichtungen mittels Druckluft mit einer Rate von 10 l/min betrieben werden, produzieren sie Aerosolteilchen mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von 1,4 µm.

[0082] Die Kontrollmäuse sind vorzugsweise Wurfgeschwister, die ohne vorherige Immunisierung mit Protein-Antigen provoziert werden. Für weitere Details dieses Tiermodells seien Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung auf Foster et al., J. Exp. Med. 1995, 195–201; und Corry et al., J. Exp. Med. 1996, 109–117 verwiesen.

BEISPIEL II

REDUKTION DER EOSINOPHIL-ANHÄUFUNG IM LUNGENGeweBE IN EINEM MÄUSEMODELL FÜR ASTHMA

[0083] Drei Gruppen aus 3 bis 4 C57BL/6-Mäusen (6 bis 10 Wochen alt) wurden wie in Beispiel 1 beschrieben (subkutane OVA-Injektion, gefolgt von einer Antigen-Provokation mit 50 mg OVA/ml PBS) als Modelle für all-

ergisches Asthma vorbereitet. Vor der Immunisierung gemäß diesem Schema wurden zwei Gruppen von Mäusen mit Plasmidexpressionsvektoren präimmunisiert, die Gene für lösliches OVA und Ampicillin-Resistenz (AmpR) umfassten. Eine der Gruppen von präimmunisierten Mäusen erhielt Plasmide, die für ein chimäres Antigen kodierten, das als Fusionsprodukt zwischen dem für OVA kodierenden Gen und dem Gen für den Transferrinrezeptor exprimiert wurde. Dieses "Fusions"-Plasmid steuert die Produktion eines nichtsekretierenden Transmembran-Proteins an der Immunisierungsstelle. Die Präimmunisierung erfolgte, wie in Beispiel VII beschrieben, durch subkutane Injektion.

[0084] An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden zwei Gruppen von präimmunisierten Mäusen und der Gruppe der Kontrollmäuse subkutan 25 µm OVA in 0,2 ml PBS injiziert. An den Tagen 26 und 31 wurde jede Maus mit 10 ml von 50 mg-OVA/ml PBS unter Verwendung eines in Beispiel 1 beschriebenen Zerstäubers benebelt.

[0085] Am Tag 32 wurde jeder Maus durch Schwanzschnitt Blut in eine 0,1 mM Lösung von PBS und EDTA abgenommen (etwa 50 µl Volumen). Die roten Blutkörperchen der Lösung wurden mit 150 mM NH₄Cl und 10 mM KHCO₃ in dH₂O lysiert und anschließend gefärbt (Färbung nach Wright-Giesma). Nach Tötung der Mäuse wurde von jeder Maus durch Kanalisierung der Luftröhre und Spülung mit 800 µl PBS eine Lungenspülung erhalten, wonach das Spülprodukt gefärbt wurde. Von jeder Maus wurden Knochenmarksproben erhalten, indem extrahiertes Femurknochenmark mit PBS gespült wurde. Histologische Proben von Lungen- und Luftröhren-gewebe wurden dem rechten unteren Lungenflügel und der Luftröhre entnommen. Die Proben wurden eingefroren, auf 5 µm Breite zugeschnitten und mittels DAB-Peroxidase gefärbt.

[0086] In jeder Probe wurden von jeder Maus Eosinophil-Zählungen erhalten (wobei für die einzelnen Zählungen zumindest 300 Zellen herangezogen wurden). Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle als Prozentsatz an Eosinophilen im Vergleich mit der Gesamtleukozytenanzahl in jeder Probe angegeben. Zusammenfassend wiesen die Kontrollmäuse (Nr. 1 bis 4) einen Mittelwert von 41,3% an Eosinophilen in den Lungen/Luftröhren-Gewebeproben auf. Im Gegensatz dazu wiesen die mit dem löslichen, für OVA kodierenden Plasmid präimmunisierten Mäuse (Nr. 53 bis 56 und 57 bis 60) im Vergleich mit den Kontrollmäusen eine um 50% geringere Eosinophil-Anhäufung in diesen Geweben auf. Interessanterweise wiesen die mit dem chimären für Antigen kodierenden Plasmid präimmunisierten Mäuse (Nr. 65 bis 68) im Vergleich mit den Kontrollmäusen eine zumindest 90%ige Reduktion der Eosinophil-Anhäufung in diesen Geweben auf. Diese Daten deuten darauf hin, dass die durch IL-4 und IL-5 stimulierte Eosinophil-Anhäufung im Lungengewebe, die für das Spätstadium bei allergischem Asthma charakteristisch ist, gemäß dem erfindungsgemäßen Immunisierungsschema durch Polynucleotidimmunisierungen verhindert wird.

TABELLE I

Maus Nr.	Knochenmark	Peripherblut	bronchoalveolare Spülung
1	9,3	2,0	47,4
2	6,0 > mittl. 10,3	4,4 > mittl. 5,0	65,0 > mittl. 43,1
3	14,3	12,1	24,2
4	11,4	1,4	35,7
53	0,3	3,6	45,0
54	4,2 > mittl. 3,9	5,8 > mittl. 4,2	20,4 > mittl. 25,4
55	0,8	2,5	10,9
56	10,2	4,8	(Luftröhrenschädigung)
57	1,5	1,3	2,7
58	1,5 > mittl. 1,4	5,2 > mittl. 2,3	2,2 > mittl. 3,5
59	1,9	1,2	1,3
60	0,6	1,5	7,8
65	3,2	1,2	14,2
66	4,4 > mittl. 3,8	3,5 > mittl. 1,9	31,0 > mittl. 21,3
67	4,9	1,7	34,1
68	2,7	1,2	5,8

BEISPIEL III

GENEXPRESSION NACH INTRANASALER EINFÜHRUNG EINER POLYNUCLEOTIDZUSAMMENSETZUNG

[0087] Um das Proteinexpressionsniveau nach intranasaler Einführung einer Polynucleotidzusammensetzung zu testen (hierbei zur Expression eines Influenzaribonucleoproteins aus einem Plasmid unter der Kontrolle eines CMV-Promotors) wurde die Zusammensetzung in 3 Gruppen aus 6 Balb/c-Mäusegruppen intranasal eingeführt. Die Anti-NP-IgG-Werte im Peripherblut vor und nach der Einführung des Plasmids wurden, wie in Beispiel II beschrieben, mittels ELISA bei verschiedenen Serumverdünnungen gemessen. Jeder Maus wurde 6 Wochen nach der intranasalen Einführung Blut abgenommen.

[0088] In den [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) werden die Ergebnisse der ELISA-Tests vor und nach der intranasalen Einführung des Plasmids grafisch dargestellt. In den Diagrammen ist der ELISA-Titer über der Serumverdünnung aufgetragen. In [Fig. 1](#) werden die Werte jeder einzelnen Maus aus jeder Gruppe (Nr. 1 bis 3) und ein Mittelwert für alle Mäuse in jeder Gruppe (Nr. G1 bis G3) angeführt.

[0089] In einer zweiten Gruppe, die $3 \times 7,5 \mu\text{g}$ des Plasmids ohne Anästhesie erhielt, wiesen die Mäuse im Vergleich mit dem Hintergrund ([Fig. 1](#)) erhöhte Antikörpertiter auf. Diese Werte sind in [Fig. 2](#) angeführt.

[0090] Eine dritte Mäusegruppe erhielt dieselbe Menge an Plasmid unter Anästhesie. Die Expression von RNP, die durch Anti-NP-IgG-Titer angezeigt wurde, war bei diesen Mäusen im Wesentlichen gleich der mit nichtanästhesierten Mäusen erzielten Expression. Die Werte für die nichtanästhesierten Mäuse sind in [Fig. 3](#) angeführt.

[0091] Die Expression kann durch zusätzliche Verwendung eines Absorptionspromotors erhöht und durch zeitverzögert freigesetzte Promotoren verlängert werden, deren Identität und Verwendung auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie etwa die in Chien, s.o., in Kapitel 5 vorgeschlagenen.

BEISPIEL IV

HISTOLOGISCHE STUDIEN ZUR DARSTELLUNG DER ZELLAUFNAHME VON POLYNUCLEOTIDZUSAMMENSETZUNGEN DURCH MONONUKLEÄRE ZELLEN AN DER EINTRITTSSTELLE IN DIE HAUT

[0092] Drei Tage nach intradermaler Injektion von nacktem pCMV-Lac-Z (für β -Galactosidase kodierend) in die Schwänze von Balb/c-Mäusen wurden die Mäuse getötet. An der Eintrittsstelle für das Plasmid wurden Gewebekulturen entnommen und auf E. coli- β -Galactosidase-Aktivität gefärbt. Eine Dia-Aufnahme (40fache Vergrößerung) der histologischen Untersuchung dieser Kulturen ist in [Fig. 4](#) enthalten.

[0093] Wie in [Fig. 4](#) dargestellt zeigt sich, dass die Plasmidaufnahme (in blau) durch mononukleäre Zellen erfolgt war. Die Fibroblasten der Gewebeproben sind nicht gefärbt, womit gezeigt wird, dass das Plasmid von diesen Zellen nicht aufgenommen worden war. Die gerundeten mononukleären Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, scheinen Makrophagen und/oder andere antigenpräsentierende Zellen zu sein, was darauf hinweisen würde, dass die Aufnahme des Plasmids über Phagozytose erfolgt war.

BEISPIEL V

SELEKTIVE INDUKTION EINER Th1-ANTWORT NACH VERABREICHUNG VON POLYNUCLEOTIDZUSAMMENSETZUNGEN GEMÄSS DER ERFINDUNG

[0094] Bei Mäusen stellen IgG-2A-Antikörper serologische Marker für eine Immunantwort vom Th1-Typ dar, während IgG-1-Antikörper auf eine Immunantwort vom Th2-Typ hinweisen. Th2-Antworten umfassen die mit Allergien assoziierte IgE-Antikörper-Klasse; lösliche Proteinantigene neigen dazu, relativ starke Th2-Antworten zu stimulieren. Im Gegensatz dazu werden Th1-Antworten durch Antigene induziert, die sich an Makrophagen und dendritische Zellen binden. Th1-Antworten sind bei der Behandlung von Allergien und AIDS von besonderer Bedeutung.

[0095] Zur Bestimmung, welche Antwort (sofern sie erfolgt) Mäuse produzieren, die Polynucleotidzusammensetzungen gemäß der Erfindung erhalten haben, wurden Mäuse, wie im vorherigen Beispiel beschrieben, mit pCMV-Lac-Z oder Protein geimpft. In 2-Wochen-Intervallen wurden jegliche IgG-2A und IgG-1 gegen β -Galac-

tosidase mittels eines Enzymimmuntests (unter Verwendung von Antikörpern, die für die IgG-1- und IgG-2A-Subklassen spezifisch sind) auf mit dem Enzym beschichteten Mikrotiterplatten gemessen.

[0096] Wie in [Fig. 5](#) angeführt produzierten nur jene Mäuse, die das Plasmid durch ID-Injektion (intradermale Injektion) erhalten hatten, höhere Titer an IgG-2A-Antikörpern. Wie in [Fig. 6](#) angeführt induzierte die Immunisierung der Mäuse mit dem Enzym selbst ("PR") die Produktion relativ hoher Titer an IgG-1-Antikörpern. Bei den IM-injizierten Mäusen wurden geringe Titer an sowohl IgG-2A- als auch IgG-1-Antikörpern ohne offensichtliche Selektivität produziert. Die in den Figuren angeführten Angaben umfassen das Mittel der von jeder aus 4 Mäusen bestehenden Gruppe erhaltenen Werte.

[0097] Zur Bestimmung der zeitlichen Stabilität der Antikörperantwort wurde dieselbe Gruppe von Tieren mit 0,5 µg intradermal injiziertem Enzym aufgefrischt. Wie in den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) angeführt induzierte das Boosten von mittels ID-Injektion geprimten Tieren mit dem Enzym einen fast 10fachen Anstieg der IgG-2A-Antikörperantworten (d.h. der Antikörpertiter stieg von 1:640 auf 1:5120), wobei es jedoch zu keiner Stimulierung einer IgG-1-Antwort kam. Diese Angaben weisen darauf hin, dass die mittels ID-Verabreichung von Polynucleotidzusammensetzungen induzierte selektive Th1-Antwort im Wirt trotz der anschließenden Antigenexposition erhalten bleibt.

BEISPIEL VI

Th1-ANTWORTEN BEI MÄUSEN NACH VERABREICHUNG VON POLYNUCLEOTIDZUSAMMENSETZUNGEN MIT EINEM MECHANISCHEN REIZMITTEL

[0098] Die im Beispiel V beschriebenen Experimente wurden mit getrennten Gruppen von Mäusen wiederholt, mit der Ausnahme, dass (1) nur eine Primingdosis getestet wurde und (2) das pCMV-Lac-Z-Plasmid einer aus 4 Mäusen bestehenden Gruppe unter Verwendung der in der Offenbarung beschriebenen MONO-VACC®-Zinkenvorrichtung verabreicht wurde, während das β-Galactosidase-Protein (10 µg) einer anderen aus 4 Mäusen bestehenden Gruppe durch intradermale Injektion verabreicht wurde.

[0099] Wie in [Fig. 9](#) angeführt produzierten jene Mäuse, die das Plasmid erhalten hatten, im Vergleich mit den Mäusen, die das Protein erhalten hatten, relativ niedrige Titer an IgG-1-Antikörpern. Im Gegensatz dazu produzierten, wie in [Fig. 10](#) dargestellt, jene Mäuse, die das Plasmid erhalten hatten, verglichen mit den Mäusen, die das Protein erhalten hatten, wesentlich höhere Titer an IgG-2A-Antikörpern.

[0100] Interessanterweise produzierten jene Mäuse, die das Plasmid durch Aufkratzen der Haut mit der Zinkenvorrichtung erhalten hatten, sogar höhere Titer an IgG-2A-Antikörpern als jene Mäuse, die dasselbe Plasmid durch ID-Injektion erhalten hatten (wobei beide dieser Gruppen höhere Titer an IgG-2A-Antikörpern produzierten als jene Mäuse, die das Plasmid mittels einer IM-Injektion erhalten hatten). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Aufkratzen der Haut mit der Zinkenvorrichtung eine höhere Anzahl an APCs zu den "verletzten" Eintrittsstellen für die Polynucleotidzusammensetzungen zieht, was eine Übereinstimmung mit der Theorie bedeutet, die besagt, dass APCs effizientere Ziele zur Verabreichung und Expression von Genen darstellen als Muskelzellen oder andere Somazellen.

[0101] Die in den Figuren angeführten Angaben umfassen Mittelwerte der von jeder aus 4 Mäusen bestehenden Gruppe erhaltenen Werte.

BEISPIEL VII

UNTERDRÜCKUNG DER IgE-ANTIKÖRPERANTWORT AUF ANTIGENE DURCH IMMUNISIERUNG MIT ANTIGEN-KODIERENDEN POLYNUCLEOTIDEN

[0102] Fünf- bis achtwöchige Balb/c-Mäuse wurden mit einem von zwei rekombinanten Expressionsvektoren immunisiert: pCMV-Lac-Z oder einem Kontrollplasmid, pCMV-BL (das für keine Insert-Peptide kodiert). Eine dritte Gruppe von Mäusen erhielt Antigeninjektionen (β-Galactosidase). Die Plasmid-DNA wurde gereinigt und deren Endotoxingehalt durch Extrahieren mit TRITON™ X-114 (Sigma, St. Louis, MI, USA) auf 0,5 bis 5 ng/1 mg DNA reduziert. Vor der Inokulation wurde die pDNA in Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in pyrogenfreier normaler Salzlösung gelöst.

[0103] Die Immunisierung erfolgte mittels intradermaler Injektion der Plasmid-DNA, die auf zwei getrennten Zinken einer MONO-VACC®-Mehrfachzinken-Vorrichtung (Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA, USA)

aufgebracht war. Kurz gefasst wurden die Zinkenvorrichtungen hergestellt, indem sie ausgiebig mit DDW gewaschen, über Nacht in 0,5%iger SDS (Dodecylsulfatsalzlösung) eingetaucht, erneut in DDW gewaschen, über Nacht in 0,1 N NaOH eingetaucht, erneut in DDW gewaschen und 8 Stunden lang bei 37°C getrocknet wurden. Sechs µl an in normaler Salzlösung gelöster Plasmid-DNA wurden auf die Zinken der Zinkenvorrichtung unmittelbar vor jeder nachstehend beschriebenen Inokulation pipettiert. Die Gesamtmenge an auf der Vorrichtung pro Inokulation angebrachter pDNA betrug 25 µg von jeweils pCMV-Lac-Z und pCMV-BL. Zum Zwecke der Abschätzung der tatsächlichen Dosen wurde angenommen, dass weniger als 10% der auf der Zinkenvorrichtung aufgetragenen pDNA-Lösung bei der Injektion der Zinken tatsächlich in das intradermale Gewebe eingeführt wurde.

[0104] Jeder Maus wurden am Schwanzansatz 3 Mal 2 Inokulationen jedes Plasmids in Intervallen von 1 Woche intradermal injiziert. Eine andere Gruppe von Mäusen erhielt statt der pDNA eine einzelne intradermale Injektion von 10 µg β-Galactosidase-Protein (in 50 µl normaler Salzlösung gelöst) am Schwanzansatz.

[0105] Zum Zeitpunkt der Induktion einer IgE-Antikörperantwort auf die anschließende Provokation mit Asthma-initiierendem Antigen wurde jeder Mäusegruppe einmal intraperitoneal 0,1 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), die 1 µg Antigen β-Galactosidase; Calbiochem, San Diego, CA, USA) enthielt, und 3 mg ALUM-Aluminiumhydroxid als Hilfsmittel (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) 14 Wochen nach der Erstimmunisierung injiziert. Der Gesamtgehalt an IgE wurde in Seren der Mäuse über einen Zeitraum der 4 anschließend aufeinanderfolgenden Wochen 4-mal getestet.

[0106] Der IgE-Gehalt wurde unter Verwendung eines Festphasenradioimmuntests (RAST) in einer mit 96 Wells ausgeführten Polyvinylplatte (eine Radioisotop-Modifizierung des ELISA-Verfahrens von Coligan, "Current Protocols in Immunology", Kapitel 7.12.4, Bd. 1, Wiley & Sons (1994)) detektiert, mit der Ausnahme, dass statt der für menschliches Fab spezifischen Antikörper gereinigte polyklonale Ziegenantikörper, die für Mäuse-ε-Ketten spezifisch sind, verwendet wurden. Zur Detektion von Anti-Lac-Z-IgE wurden die Platten mit β-Galactosidase (10 µg/ml) beschichtet. Die durch den angewandten Test geringste messbare IgE-Konzentration betrug 0,4 ng IgE/ml.

[0107] Wie in [Fig. 13](#) dargestellt, produzierten Mäuse, denen pCMV-Lac-Z injiziert worden war, verglichen mit den Mäusen, denen β-Galactosidase (Mittelwert von etwa 1.000 CPM in RAST) injiziert worden war, nur geringe Mengen an Gesamt-IgE-Antikörpern (Mittelwert von etwa 250 CPM in RAST). Zudem blieben die IgE-Werte bei den Mäusen mit injiziertem Plasmid trotz Boosten mit Protein durchwegs gering (Mittelwert von etwa 250 bis 450 CPM; was auf einen Toleranzerwerb bei diesen Mäusen nach der Erstimmunisierung hindeutet), während die IgE-Werte bei den Mäusen mit injiziertem Protein nach dem Boosten deutlich anstieg (Mittelwert von etwa 1.500 bis 2.000 CPM), wonach es schließlich in Woche 4 zu einer langsamen Abnahme auf die Kontrollwerte kam, als bei Mäusen, denen das Protein injiziert worden war, durch wiederholte Proteinantigenexposition Toleranz erworben wurde.

[0108] Bei spezifischen Messungen der Anti-Antigenantwort jeder Mäusegruppe, wie in [Fig. 14](#) dargestellt, stellte sich heraus, dass die Anti-Lac-Z-IgE-Werte bei Mäusen mit injiziertem Plasmid sowohl vor und nach dem Boosten erneut durchwegs gering waren (Mittelwert von etwa 250 CPM in RAST), während die Mäuse mit injiziertem Protein höhere Anti-Lac-Z-Niveaus, insbesondere nach der ersten Antigen-Booster-Injektion entwickelten, als die Anti-Lac-Z-Werte bei den Mäusen auf einen Mittelwert von etwa 3.000 CPM anstiegen. Im Einklang mit dem Toleranzerwerb nahmen die Anti-Lac-Z-IgE-Werte bei den Mäusen mit injiziertem Protein mit der Zeit ab, während diese bei den Kontrollmäusen, die keine β-Galactosidase-Immunisierung erhalten hatten, weiterhin anstiegen.

[0109] Diese Daten zeigen, dass die Mäuse mit injiziertem Plasmid eine antigenspezifische Th1-Antwort auf das Plasmidexpressionsprodukt bei gleichzeitiger Unterdrückung der IgE-Produktion entwickelten, während es bei den Mäusen mit injiziertem Protein nur nach Entwicklung wesentlich höherer Spiegel an Gesamt- und antigenspezifischen IgE-Antikörpern zu einem Toleranzerwerb kam.

BEISPIEL VIII

IL-4- UND INF γ -SPIEGEL BEI MÄUSEN NACH IMMUNISIERUNG MIT ANTIGEN ODER FÜR ANTIGEN KODIERENDEN POLYNUCLEOTIDEN

[0110] Um zu bestätigen, dass die Ergebnisse, die durch die in den Beispielen V bis VII dargestellten Angaben gezeigt werden, auf die selektive Induktion von Th1-Antworten (z.B. INF γ -Ausscheidung) bei Mäusen mit

injiziertem Plasmid übertragen werden können (deren Antworten darauf schließen lassen, dass sie negative Auswirkungen auf die IgE-stimulierenden Th2-Antworten haben; z.B. Ausscheidung von IL-2), wurden die IL-2- und INF γ -Werte in den Seren von Mäusen mit injiziertem Plasmid und Protein der Beispiele VII in Woche 1 nach einer Boosterinjektion von Antigen getestet. Die IL-2-Werte wurden mittels eines handelsüblichen Sets, die INF γ -Werte unter Verwendung eines Anti-INF γ -Mäuseantikörper-Tests (siehe z.B. Coligan, "Current Protocols in Immunology", Kapitel 6.9.5, Bd. 1, Wiley & Sons (1994)) getestet.

[0111] Wie in [Fig. 15](#) dargestellt waren die Werte an IgE-stimulierendem IL-4 bei Mäusen mit injiziertem Protein wesentlich höher als bei Mäusen mit injiziertem Plasmid (bei einem Verhältnis von etwa 9:1). Im Gegensatz dazu waren die INF γ -Werte bei Mäusen mit injiziertem Plasmid wesentlich höher als bei Mäusen mit injiziertem Protein (bei einem Verhältnis von etwa 11:1).

BEISPIEL IX

PRODUKTION UND ERHALTUNG VON CYTOTOXISCHEN T-LYMPHOZYTEN NACH IMMUNISIERUNG MIT ANTIGEN ODER MIT FÜR ANTIGEN KODIERENDEN POLYNUCLEOTIDEN

[0112] Wie oben an anderer Stelle dargelegt wird angenommen, dass cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) die Th2-Zellaktivität unterdrücken, was wiederum die Fähigkeit solcher Zellen zur Stimulierung der Entwicklung von IgE-Antikörpern unterdrücken würde. Um zu bestätigen, ob die Mäuse mit injiziertem Plasmid CTLs entwickelt und den dadurch ermöglichten Anti-Antigenschutz beibehalten hatten, wurden die CTL-Werte bei Mäusen mit injiziertem Plasmid und bei Kontrollmäusen gemessen.

[0113] Die Mäuse mit injiziertem Plasmid wurden mit einem Plasmid-kodierenden Influenzaribonucleoprotein immunisiert. Die Kontrollmäuse erhielten ein Plasmid, das nicht für ein Insert-Peptid kodierte (pCMV-BL). Die Gesamtmenge an auf der Zinkenvorrichtung pro Inokulation aufgebrachter pDNA betrug 50 μ g pCMV-NP und 25 μ g pCMV-BL.

[0114] 36 Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Splenozyten zur Verwendung in Standard-Lymphozytenmischkulturen entfernt. Die Kulturen wurden in Gegenwart eines bekannten synthetischen Peptids gezüchtet, welches das H-2^d-eingeschränkte Haupt-CTL-Epitop des NP-Proteins darstellt. Die Kulturen wurden 5 bis 6 Tage später unter Verwendung von NP-Peptid-gepulsten syngenetischen P815-Tumorzellen als Targets (ATCC Nr. TIB64, Rockville, MD, USA) auf Anti-NP-CTL-Aktivität getestet.

[0115] Wie in [Fig. 16](#) dargestellt wiesen Lymphozytenmischkulturen, die aus mit pCMV-NP injizierten Tieren hergestellt worden waren, hohe Werte an spezifischer cytolytischer Anti-NP-Aktivität auf, wobei es zu 10%iger, 30%iger und 80%iger spezifischer Lyse bei einem Effektor/Target-Verhältnis (E/T) von 5:1 bzw. 15:1 oder 45:1 kam. Die Kontrollmäuse wiesen unter den gleichen Bedingungen lediglich 1%, 1% und 9% auf. Zudem ergaben sich bei Nichtvorhandensein von H-2^d-Epitop-Peptid-Exposition keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CTL-Aktivität bei Mäusen mit injiziertem pCMV-NP und Kontrollmäusen ([Fig. 17](#)). Diese Angaben lassen auf selektive Aktivierung von Th1-Zellen bei Mäusen mit injiziertem pCMV-NP schließen.

BEISPIEL X

VERLÄNGERTES IMMUNOLOGISCHES GEDÄCHTNIS, INDUZIERT DURCH ANTIGENSTIMULIERUNG VON T-ZELLEN NACH VERABREICHUNG VON POLYNUCLEOTIDZUSAMMENSETZUNGEN

[0116] 0,1, 1, 10 und 100 μ g an Polynucleotidzusammensetzungen, welche für die E. coli-Enzym- β -Galactosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors ("pCMV-Lac-Z") kodieren, wurden in Plasmidform (0,5 bis 5 ng/1 mg DNA-Endotoxingehalt) an Gruppen von 4 Mäusen entweder intramuskulär ("IM") oder intradermal ("ID") verabreicht. Zum Vergleich erhielt eine andere aus 4 Mäusen bestehende Gruppe intradermal 100 μ g β -Galactosidase-Protein ("PR"). Alle Injektionen wurden unter Verwendung von 50 μ l normaler Salzlösung als Träger vorgenommen. IM- und ID-Injektionen wurden mit einer 0,5-ml-Spritze und einer Kanüle mit Kaliber 28,5 durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörper mittels Enzymimmuntests in 2-Wochen-Intervallen getestet.

[0117] Kurz gefasst wurde die Gesamtanzahl an Antikörpern unter Verwendung von β -Galactosidase (Calbiochem, CA, USA) als Festphasenantigen gemessen. Mikrotiterplatten (Costar, Cambridge, MA, USA) wurden mit 5 μ g Antigen, gelöst in 90 mM Borat (pH 8,3) und 89 mM NaCl (d.h. boratgepufferte Salzlösung; BBS), über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet und über Nacht mit 10 mg/ml Rinderserumalbumin in BBS blockiert.

[0118] Die Serumproben wurden BBS reihenverdünnt, ausgehend von einem Verdünnungsverhältnis von 1:40 in den ersten 8 Wochen und einer anschließenden Verdünnung von 1:320. Diese Proben wurden den Platten zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die Platten wurden in BBS und 0,05%igem Polysorbat 20 gewaschen, dann 1 Stunden lang bei Raumtemperatur mit einer 1:2.000-Verdünnung von mit alkalischer Phosphatase markierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern (Jackson ImmunoResearch Labs., West Grove, PA, USA) oder mit einer 1:2.000-Verdünnung von mit alkalischer Phosphatase markierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-1-Antikörpern (Southern Biotech aus AL) umgesetzt, oder mit einer 1:500-Verdünnung von mit alkalischer Phosphatase markierten Ratten-Anti-Maus-IgG-2A-Antikörpern (Pharmingen aus CA) unter den gleichen Bedingungen umgesetzt. Die Platten wurden erneut gewaschen, wonach eine Lösung aus 1 mg/ml p-Nitrophenolphosphat (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA) in 0,05 M Carbonatpuffer (pH 9,8), die 1 mM MgCl₂ enthielt, zugesetzt wurde. Die Extinktion bei 405 nm wurde 1 Stunde nach der Substratzugabe zu den Platten abgelesen.

[0119] Wie in [Fig. 18](#) dargestellt kam es bei Tieren, die die pCMV-Lac-Z-Plasmide durch ID-Injektion und jenen, die das PR erhalten hatten, zu einer Induktion von Antikörperantworten von gleichem Ausmaß, während bei Tieren, die die pCMV-Lac-Z-Plasmide durch IM-Injektion erhalten hatten, weniger Antikörperantworten gemessen wurden.

[0120] Zur Beurteilung des T-Zellengedächtnisses wurden die Tiere an einer gesonderten Stelle durch ID-Injektion mit 0,5 µg PR geboostet. Falls diese Tiere zur Kontrolle der Produktion von Antikörpern gegen die β-Galactosidase Gedächtnis-T-Zellen entwickelt hatten, würde angenommen werden, dass diese nach dem Boosten mit löslichen Proteinantigenen eine stärkere Immunantwort zeigen würden, als dies bei der Antwort auf die Primingdosis des Antigens gezeigt werden konnte.

[0121] Wie in [Fig. 19](#) dargestellt ist es klar, dass jene Tiere, die ID-Injektionen von pCMV-Lac-Z-Plasmiden erhalten hatten, ein wesentlich besseres immunologisches Gedächtnis entwickelt hatten als Tiere, die entweder IM-Injektionen von Plasmid oder PR erhalten hatten. Zudem hielt das von den ID injizierten Tieren entwickelte Gedächtnis für einen Zeitraum von mindestens etwa 12 Wochen an.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Polynucleotidzusammensetzung, die einen rekombinanten Expressionsvektor umfasst, der für ein Asthma-initiiierendes Antigen kodiert, bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von allergischem Asthma eines Wirts in einem Verfahren, das die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an die Haut oder ein Schleimhautgewebe eines Säugetiers umfasst, worin der Vektor eine Nucleotidsequenz umfasst, die für ein Asthma-initiiierendes Antigen kodiert, und eine immunstimulierende Nucleotidsequenz, die eine nichtkodierende Palindrom-Region mit einer Länge von zumindest 6 Nucleotiden umfasst und eine unmethylierte 5'-CG-3'-Dinucleotidsequenz miteinschließt, worin eine Th1-Immunantwort auf das Asthma-initiiierende Antigen stimuliert wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin Eosinophil-Infiltration in Lungengewebe reduziert wird.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin die pharmazeutische Zusammensetzung für eine Verabreichung in den Atemweg des Wirts angepasst ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, worin die pharmazeutische Zusammensetzung für eine intranasale Verabreichung angepasst ist.

5. Verwendung nach Anspruch 3, worin die pharmazeutische Zusammensetzung aerosolisiert wird.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die Polynucleotidzusammensetzung oder pharmazeutische Zusammensetzung weiters ein immunstimulierendes Peptid umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 6, worin das immunstimulierende Peptid TGF-β, TNF-β, IL-2 oder IFN-γ ist.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin das kodierte Asthma-initiiierende Antigen das IgE-reaktive Haupt-Hausstaubmilben-Der-pI- oder -Der-pII-Antigen; Antigen-E-Ambrosiapollen-Antigen, ein T-Zell-Epitop von Der-pII, Phospholipase-A2- (Bienengift-) Antigen; Betv1-Weißbirkenpollen-Antigen oder Fel-d1-Haupt-Hauskatzen-Antigen ist.

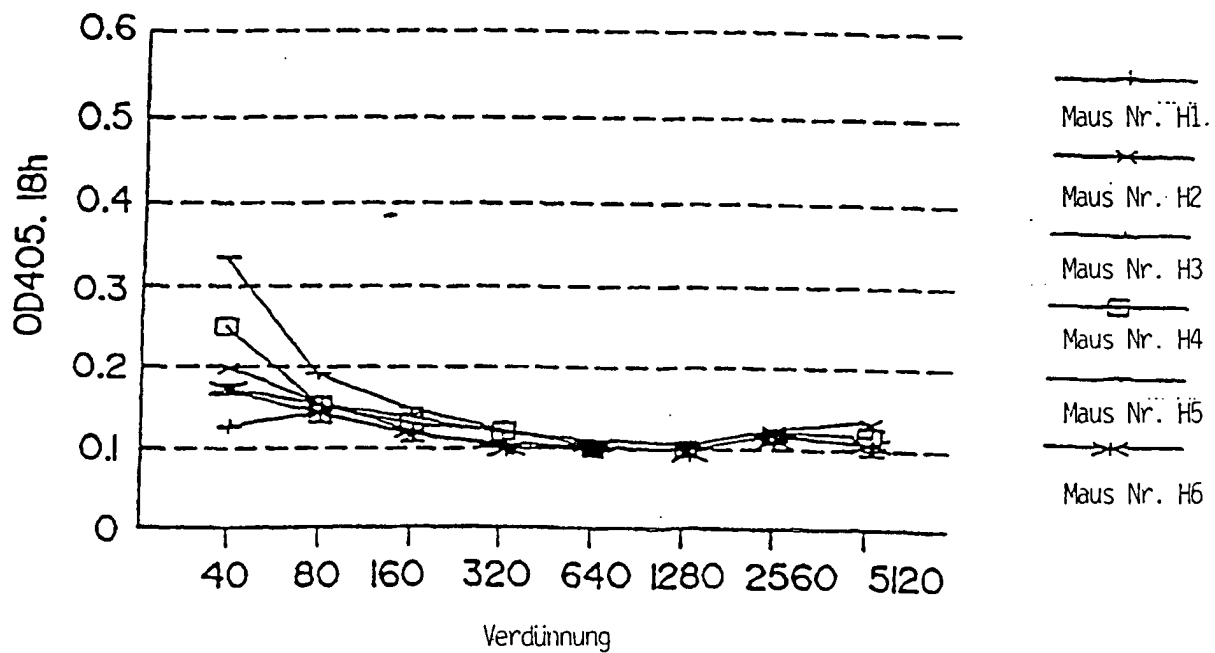
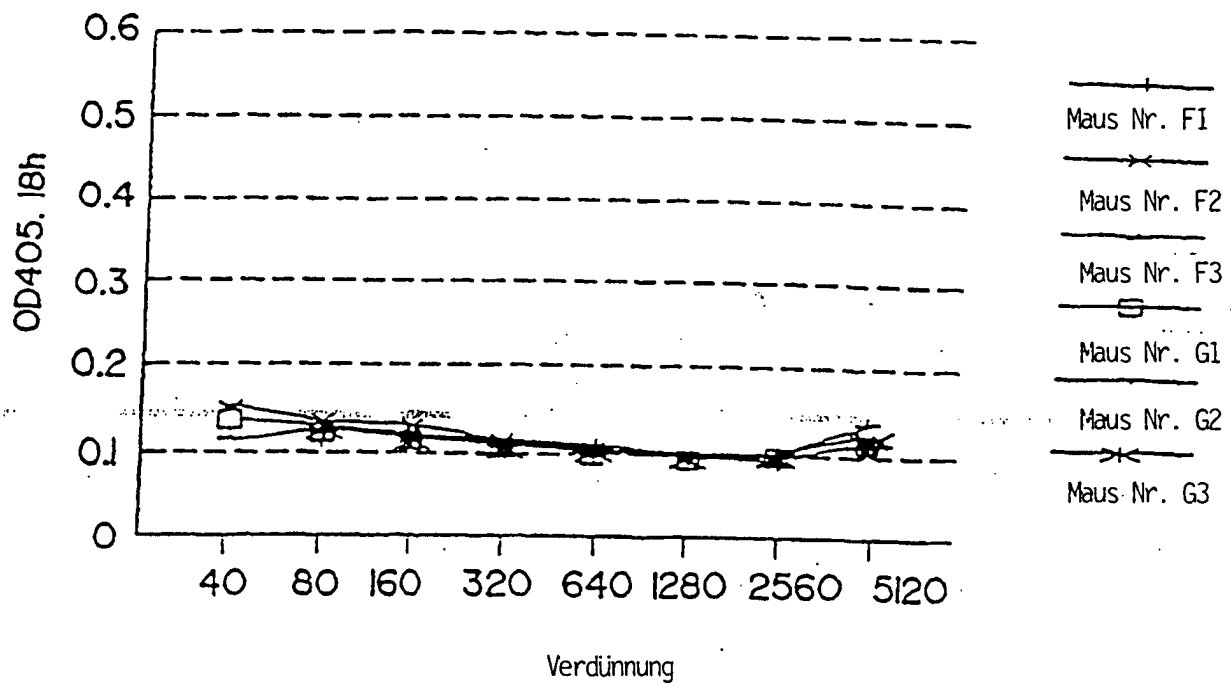
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin die CG-Sequenz von zumindest zwei Purinnucleotiden und zumindest zwei Pyrimidinnucleotiden flankiert ist.

10. Verwendung nach Anspruch 9, worin die immunstimulierende Nucleotidsequenz die Sequenz 5'-AACGTT-3' umfasst.

11. Verwendung nach Anspruch 9, worin die immunstimulierende Nucleotidsequenz eine aus GACGTC, GGCGCC und AGCGCT ausgewählte Nucleotidsequenz ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



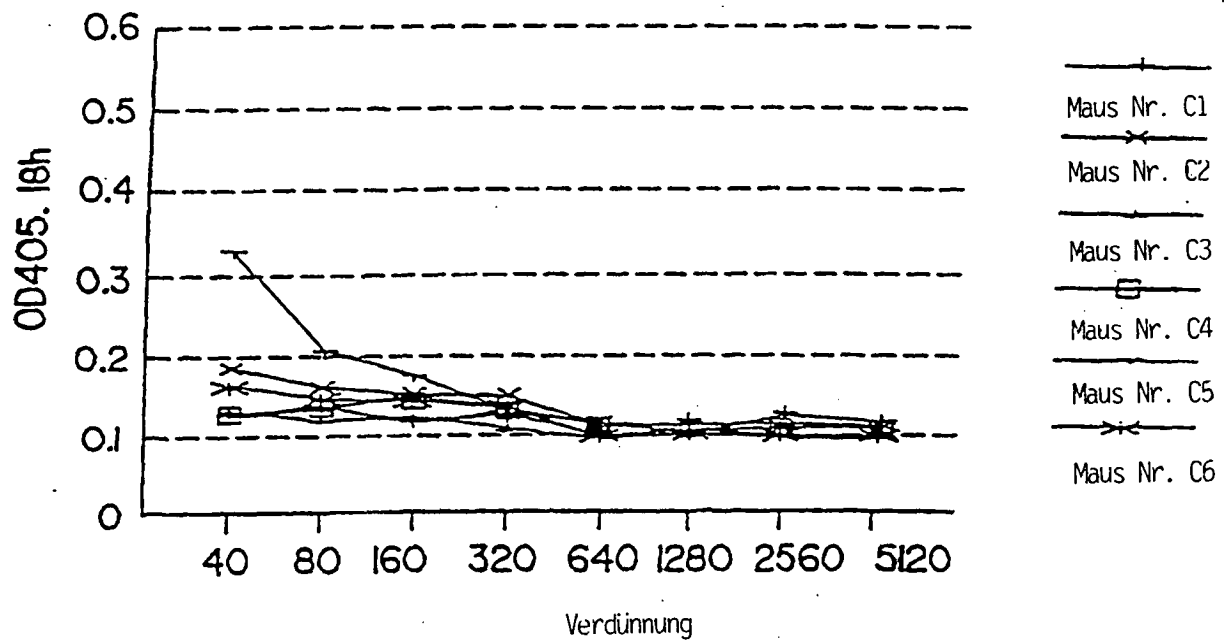


FIG. 3



FIG. 4

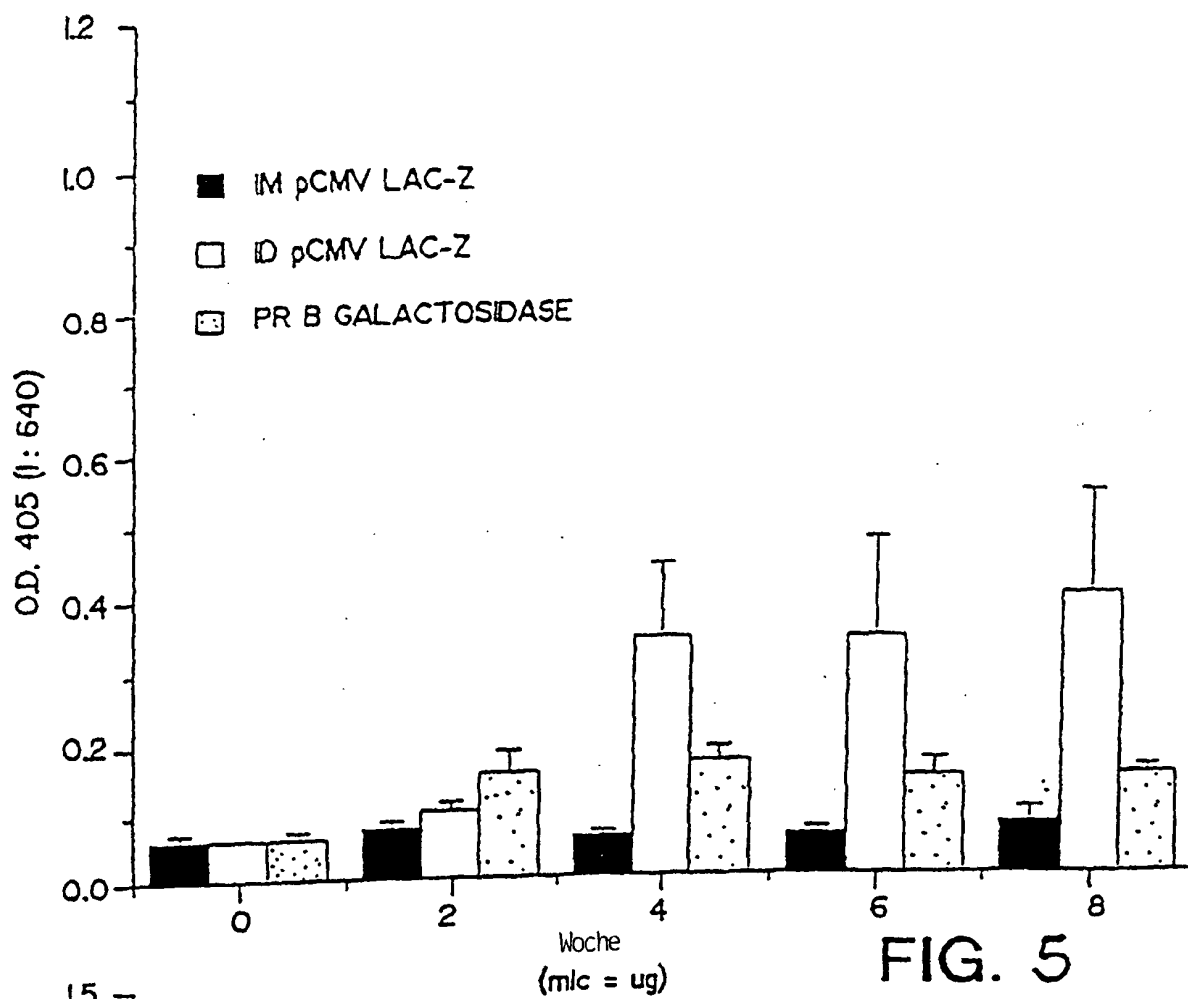


FIG. 5

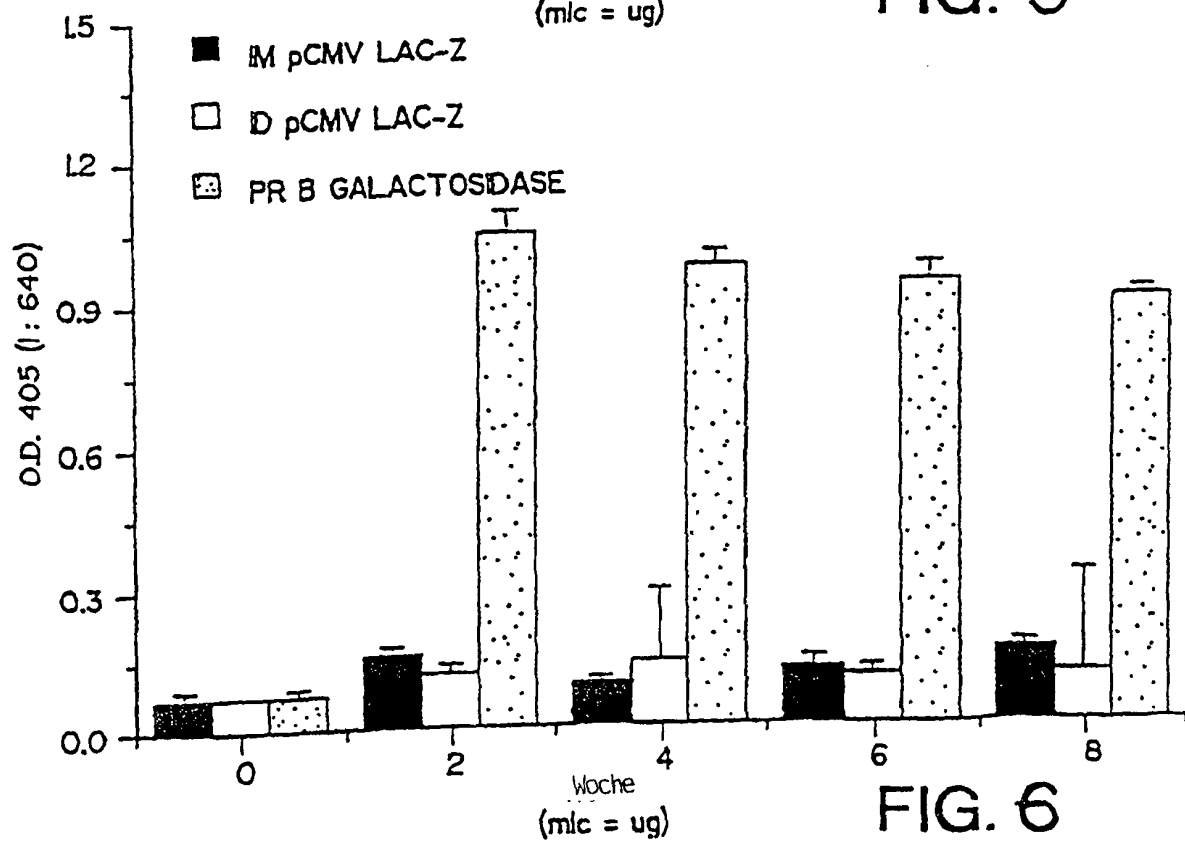
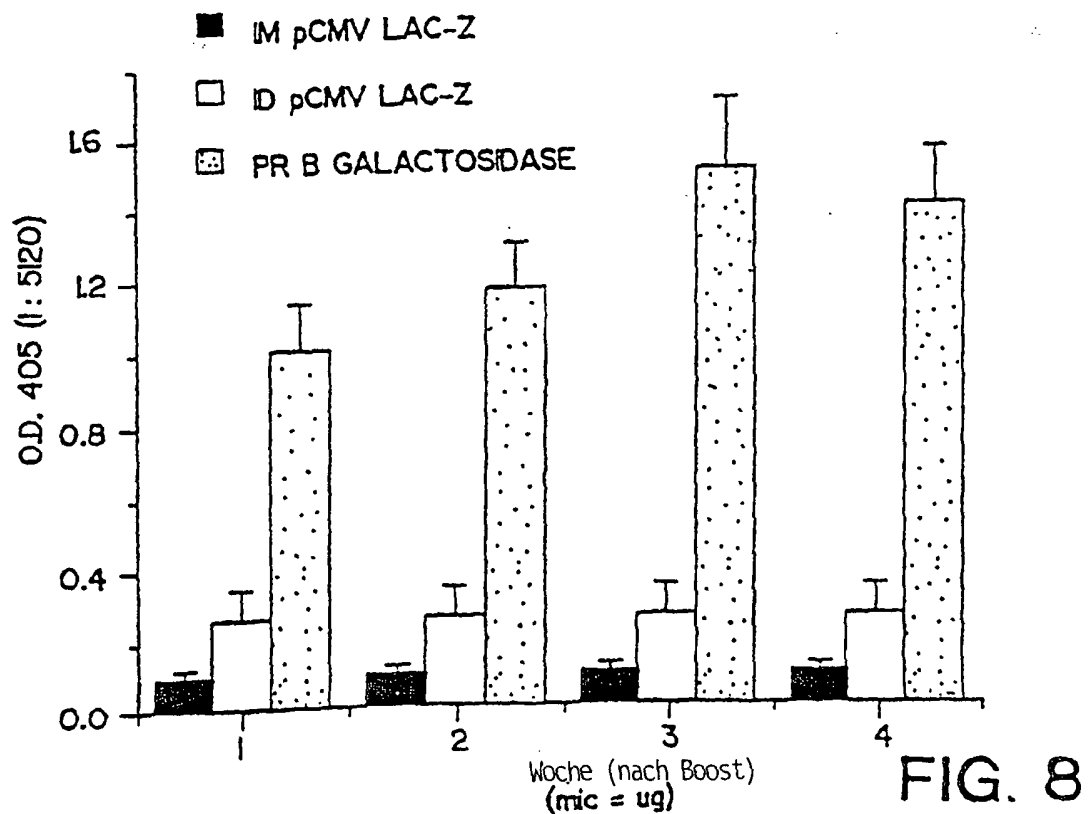
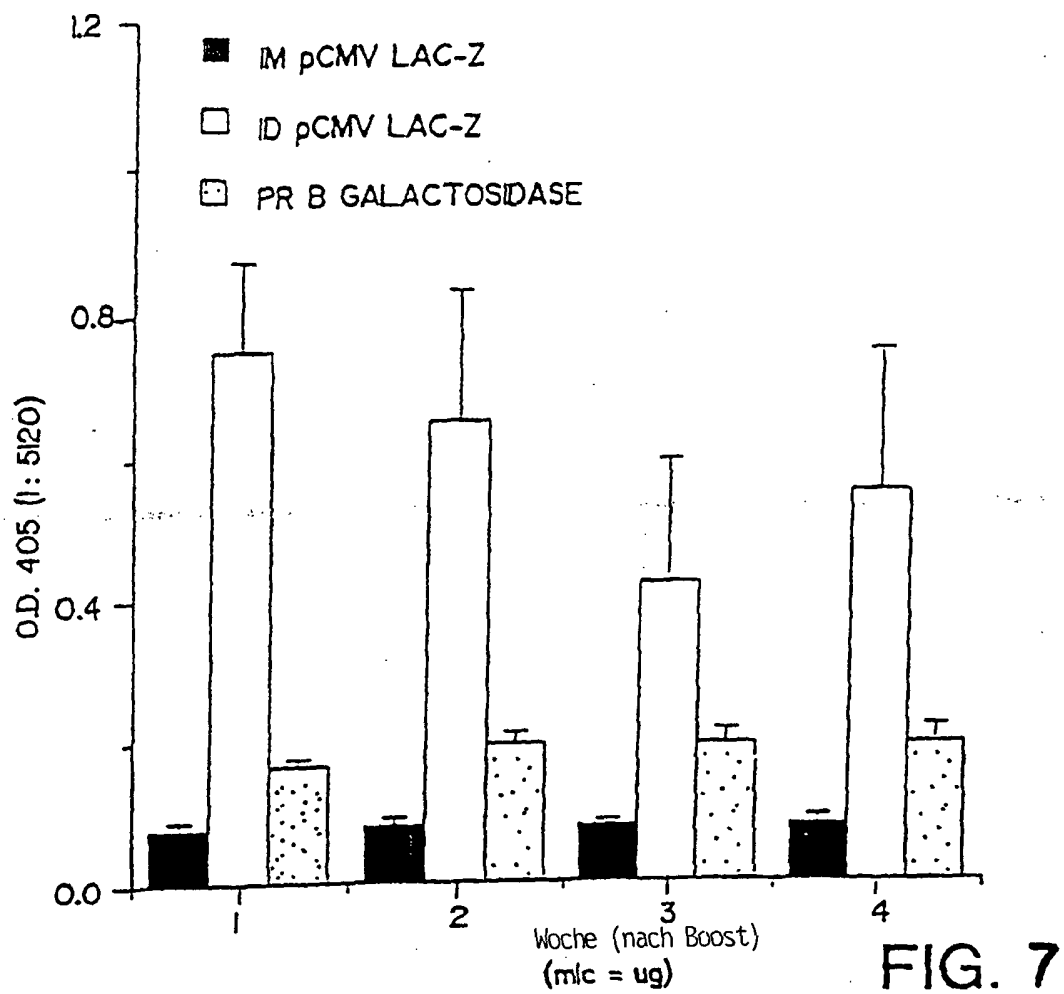
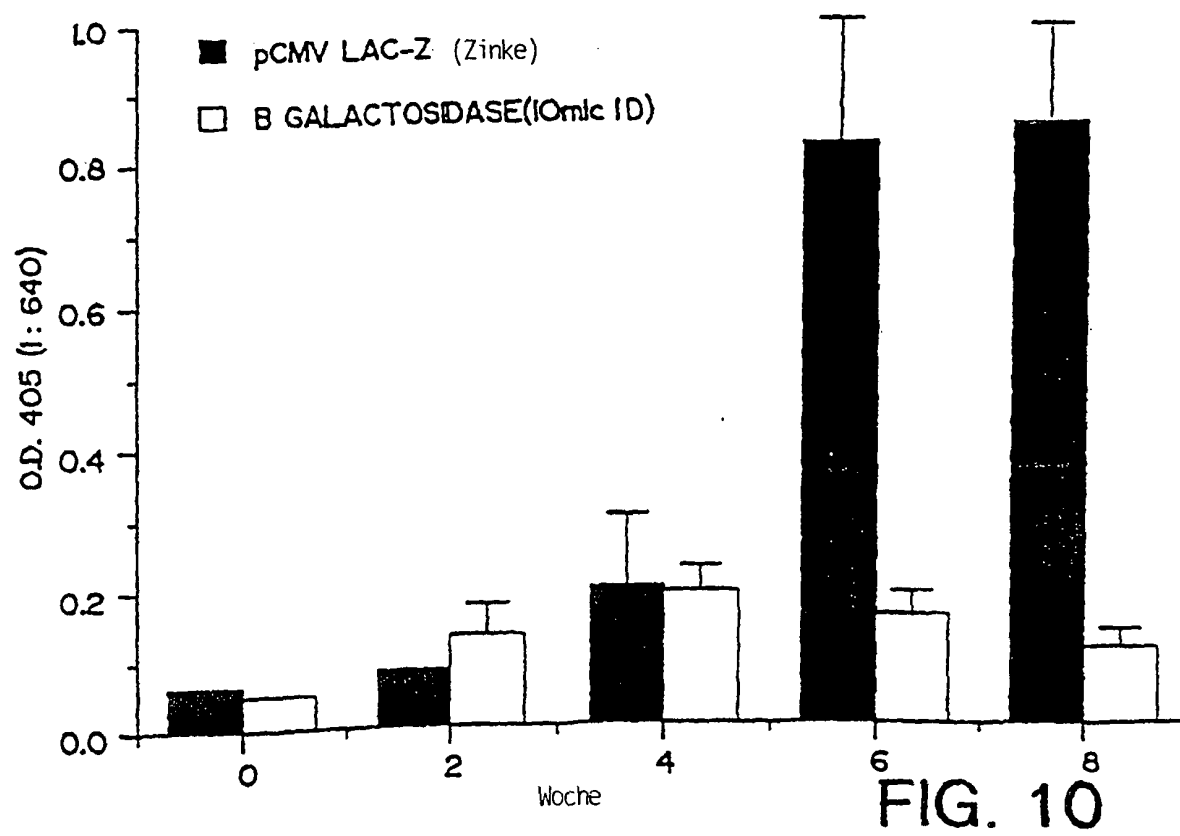
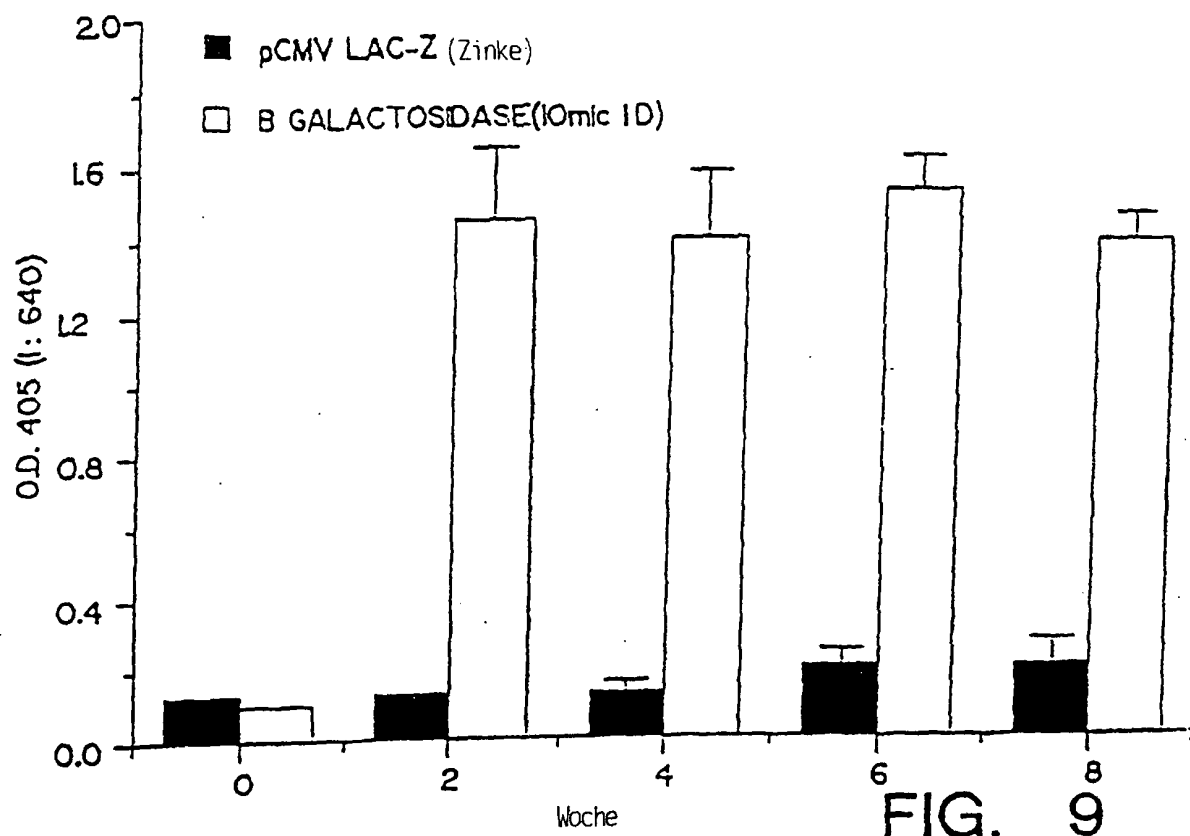


FIG. 6





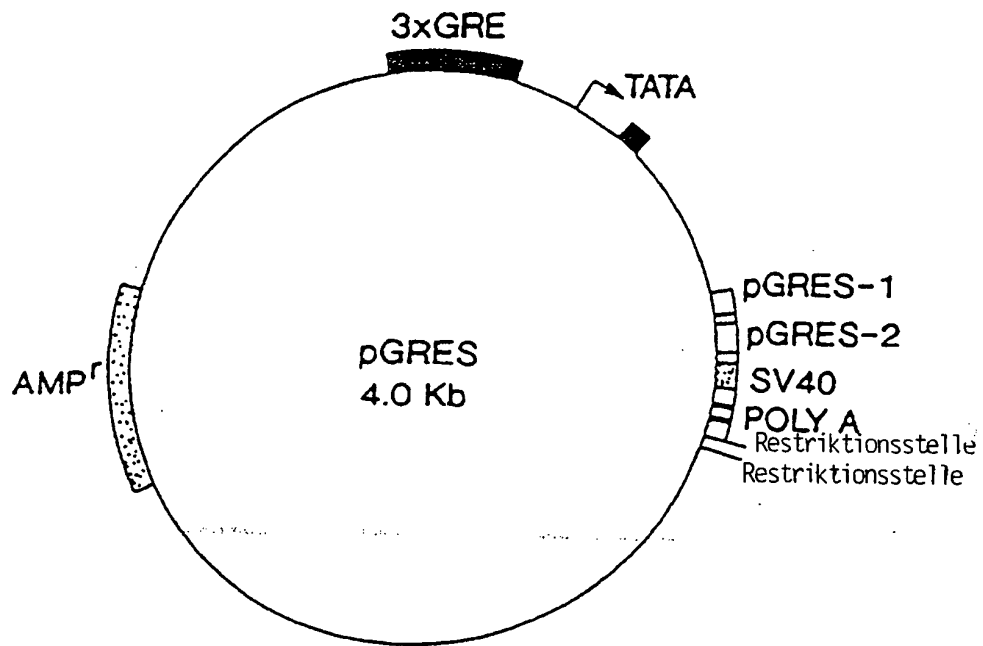


FIG. 11

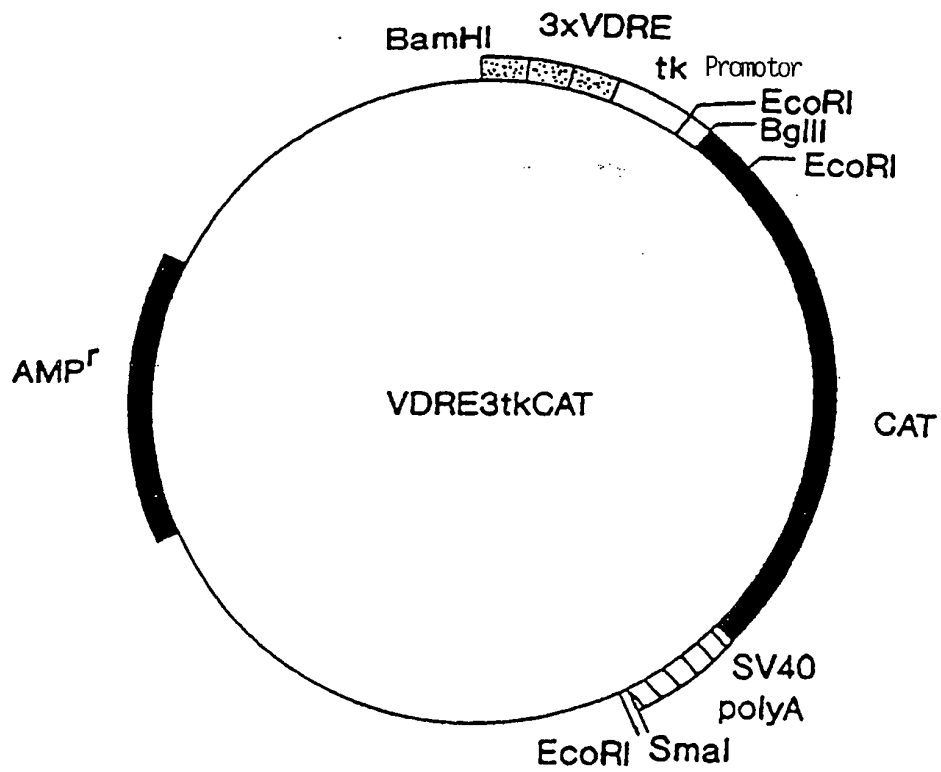


FIG. 12

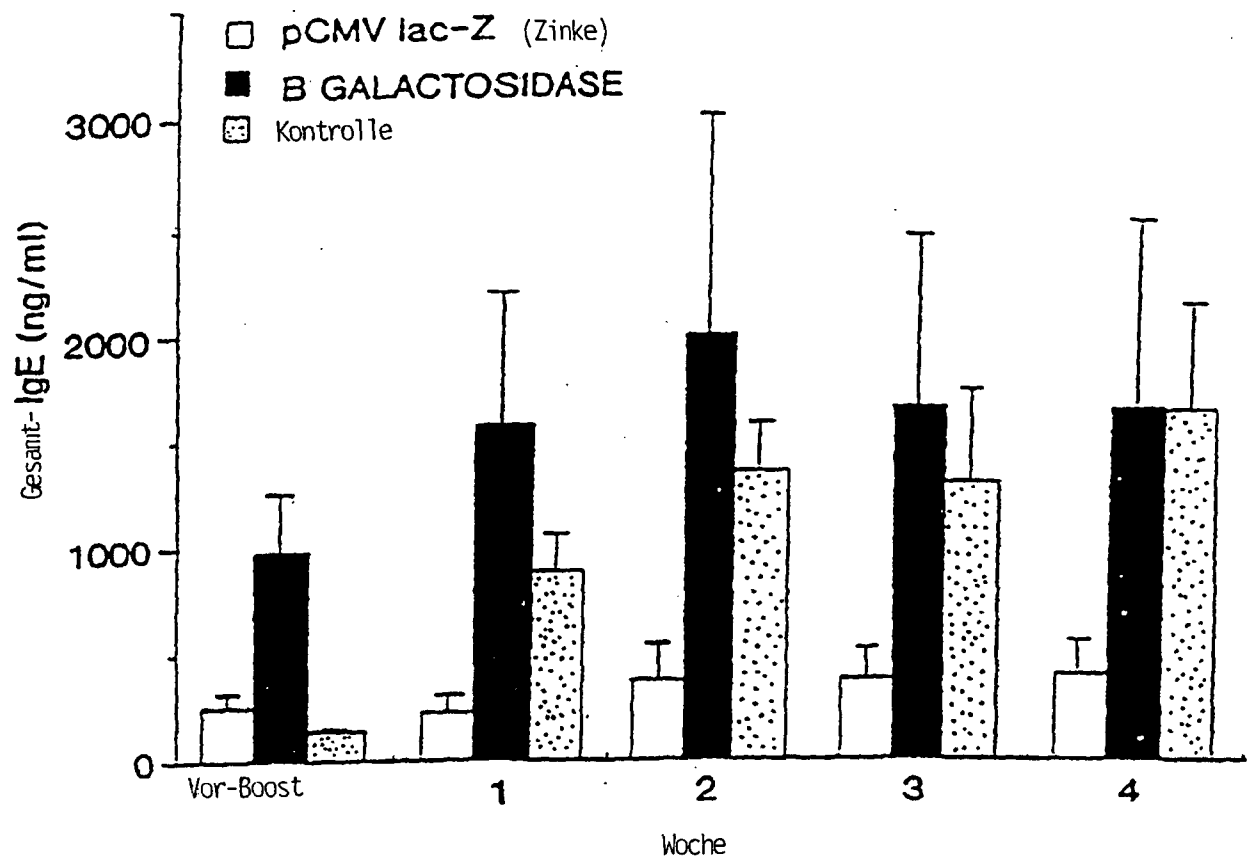


FIG. 13

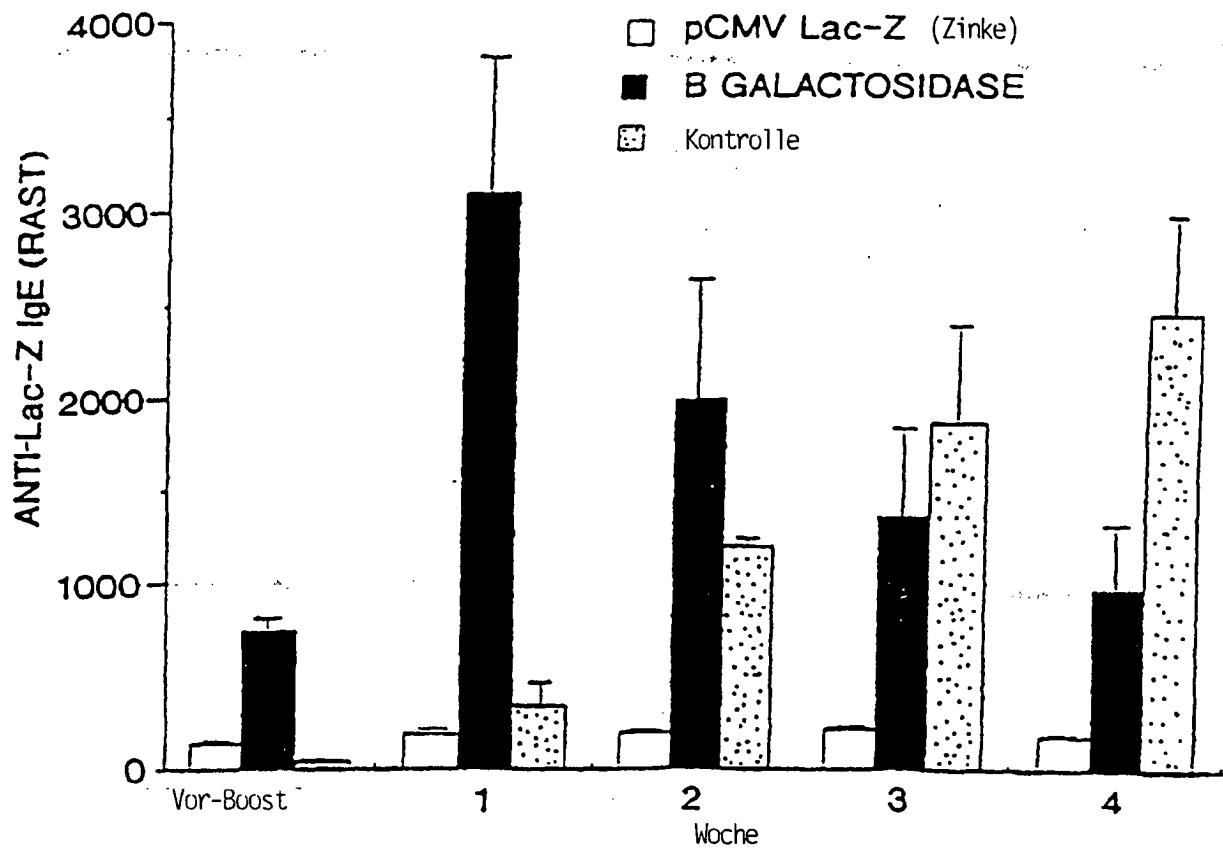


FIG. 14

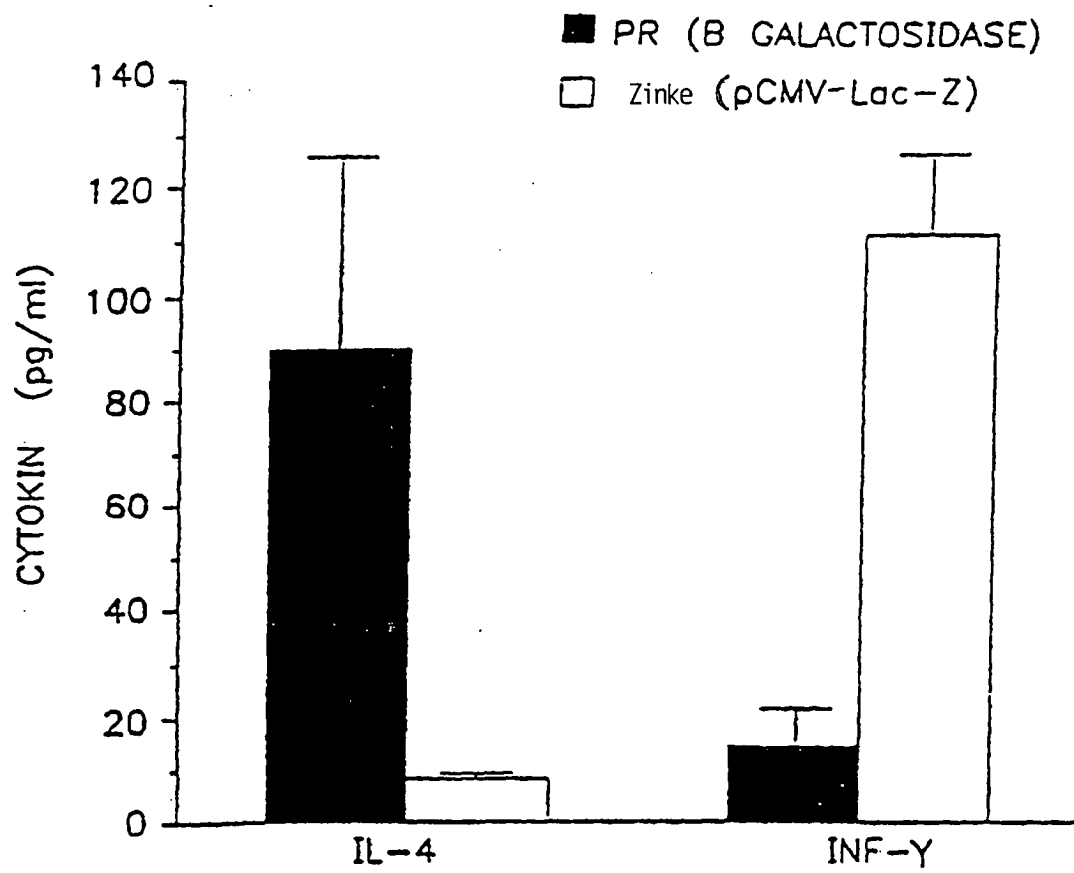


FIG. 15

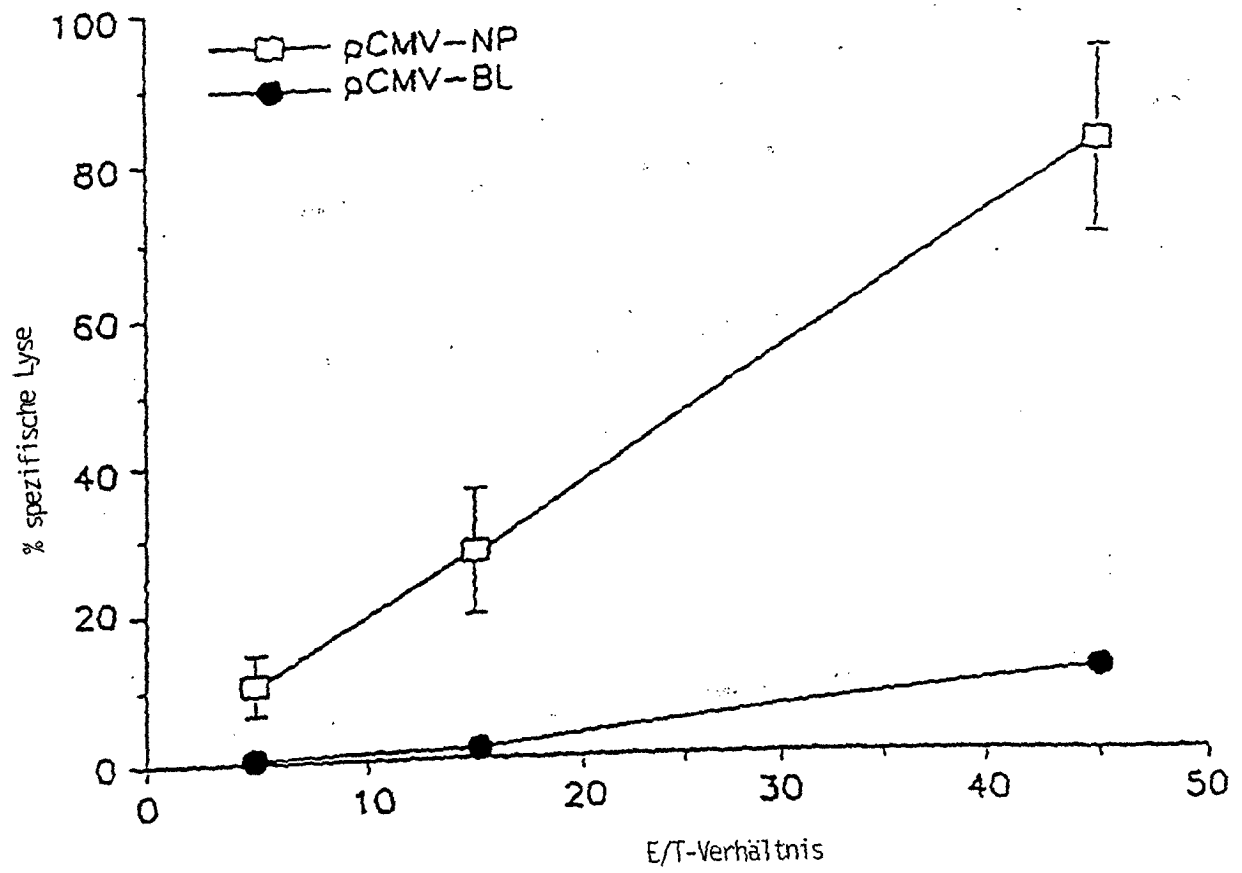


FIG. 16

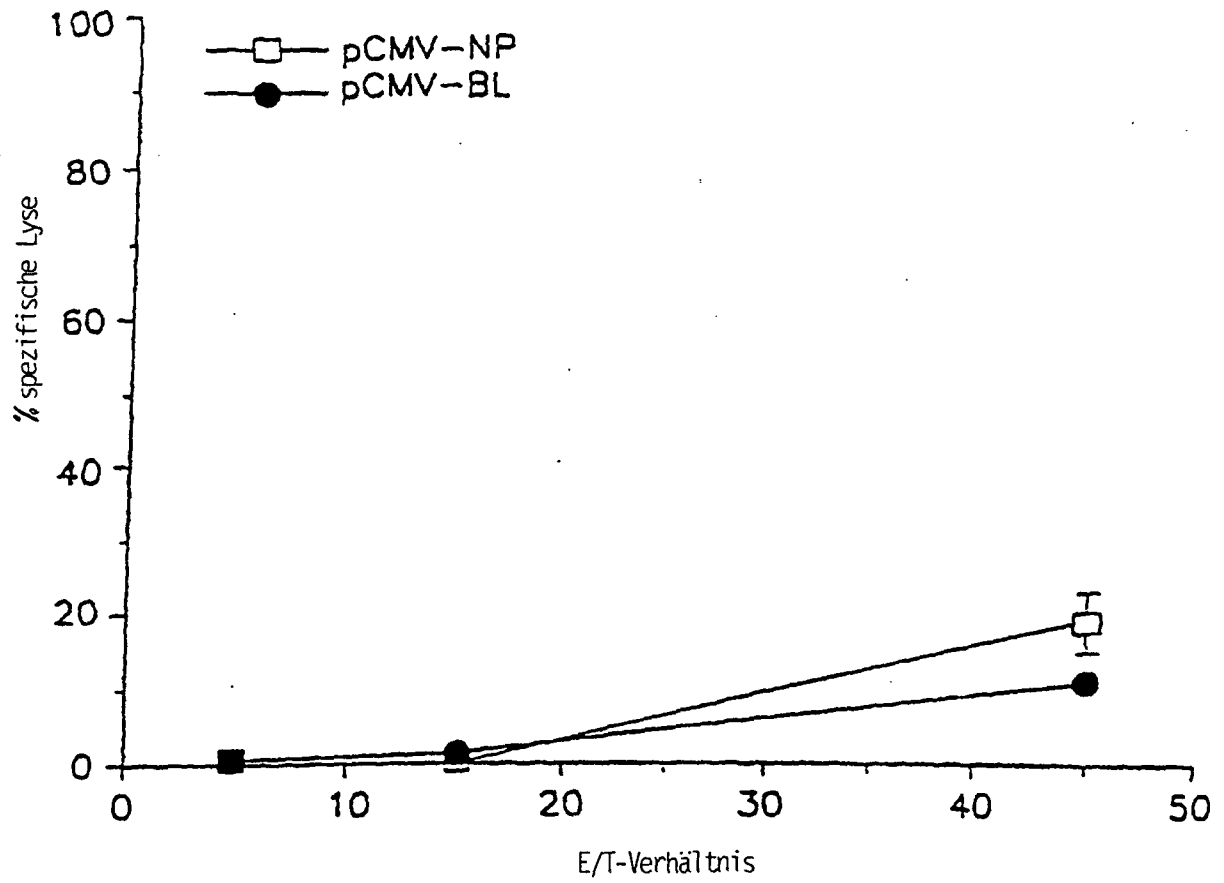


FIG. 17

