



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 085 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 129/2000
(22) Anmeldetag: 28.01.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.2001
(45) Ausgabetag: 27.05.2002

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 39/39**
A61K 31/7088, 38/00

(56) Entgegenhaltungen:
WO 9602555A1 WO 9816247A1 WO 9852962A1

(73) Patentinhaber:
CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH
A-1030 WIEN (AT).

(54) PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR IMMUNMODULATION UND HERSTELLUNG VON VAKZINEN

(57) Die Erfindung offenbart eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Antigen, ein immunogenes ODN und ein polykationisches Polymer umfasst.

AT 409 085 B

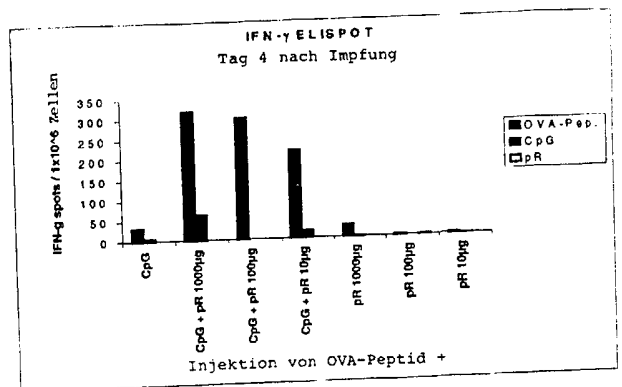


Fig. 1A

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, beispielsweise zur Verwendung zur Immunmodulation, insbesondere als Vakzine.

Impfstoffe können mehr Leben retten (bzw. Geld sparen) als irgendeine andere medizinische Intervention (Nossal, 1998). Auf Grund weltweiter Impfprogramme wurde das Auftreten vieler tödlicher Erkrankungen drastisch reduziert. Obwohl dies für eine ganze Reihe von Krankheiten gilt, einschließlich Tuberkulose, Diphtherie, Keuchhusten, Masern und Tetanus, gibt es für viele infektiöse Erkrankungen, einschließlich der meisten Virusinfektionen, wie AIDS, keine wirksamen Impfstoffe. Auch für andere infektiöse oder nicht-infektiöse Erkrankungen, die jährlich Millionen von Patienten das Leben kosten, einschließlich Malaria oder Krebs, gibt es keine wirksamen Impfstoffe. Außerdem verlangt die rapide Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien und Mikroorganismen nach alternativen Behandlungen, wobei Impfstoffe eine logische Wahl darstellen. Schließlich wird der große Bedarf an Vakzinen auch durch die Tatsache veranschaulicht, dass Infektionskrankheiten und nicht Herz-Kreislauf-Störungen, Krebs oder Verletzungen die Hauptursache für Tod und Behinderung auf der Welt bleiben (Bloom und Widdus, 1998).

Vom immunologischen Standpunkt aus besteht ein Hauptproblem auf dem Gebiet der Vakzine darin, dass traditionelle Impfstoffe (und/oder die immunmodulierenden Verbindungen, die in diesen Präparaten enthalten sind) darauf ausgelegt sind, hohe Antikörperwerte hervorzurufen (Harlow und Lane, 1988). Leider sind Antikörper alleine nicht dahingehend wirksam, viele Krankheiten zu verhindern, einschließlich der meisten Krankheiten, die von Viren, intrazellulären Bakterien, gewissen Parasiten und Krebs verursacht werden. Beispiele für solche Krankheiten sind das oben genannte HIV-Virus oder Plasmodium spec. im Fall von Malaria. In zahlreichen experimentellen Systemen ist gezeigt worden, dass für diese Indikationen der zelluläre Arm des Immunsystems, einschließlich T-Zellen, eher wichtig ist als der humorale Arm. Daher werden neue, innovative Technologien benötigt, um diese Einschränkungen herkömmlicher Impfstoffe zu überwinden. Das Hauptaugenmerk muss dabei auf Technologien liegen, die verlässlich das zelluläre Immunsystem anregen, einschließlich antigenspezifische T-Zellen, die auf pathogeninfizierten Zellen exprimierte Moleküle erkennen. Idealerweise werden Impfstoffe entwickelt, die sowohl T-Zellen, die erkrankte und/oder infizierte Zellen von normalen Zellen unterscheiden, als auch gleichzeitig Antikörper induzieren, die von B-Zellen sekretiert werden, die Pathogene in extrazellulären Bereichen erkennen.

Mehrere etablierte Impfstoffe bestehen aus lebenden, abgeschwächten Organismen, wobei das Risiko einer Reversion in den virulenten Wildtyp-Stamm besteht. Dies kann insbesondere bei immunkompromittierten Wirten eine lebensbedrohliche Situation darstellen. Alternativ werden Vakzine als eine Kombination von Pathogen-derivierten Antigenen zusammen mit Verbindungen verabreicht, die Immunantworten gegen diese Antigene auslösen oder verstärken (diese Verbindungen werden üblicherweise als Adjuvans bezeichnet), da diese Untereinheits-Vakzine selbständig im Allgemeinen nicht wirksam sind.

Obwohl kein Zweifel daran besteht, dass die obigen Vakzine eine wertvolle medizinische Behandlung darstellen, haben sie den Nachteil, dass sie infolge ihrer Komplexität schwere Nebenwirkungen hervorrufen können, beispielsweise infolge von in der Vakzine enthaltenen Antigenen, die eine Kreuzreaktivität mit Molekülen, welche von Zellen geimpfter Individuen exprimiert werden, aufweisen. Außerdem ist es schwierig, bestehenden Anforderungen seitens regulierender Behörden, z.B. der Weltgesundheitsorganisation (WHO), der Food and Drug Administration (FDA) und ihren europäischen Gegenstücken zur genauen Spezifizierung der Vakzine-Zusammensetzung und der Mechanismen zur Herbeiführung der Immunität zu entsprechen.

Einige Vakzine, die in weitverbreiteter Verwendung sind, sind in Tabelle 1 klassifiziert:

Vakzine-Kategorie	Beispiel
Ganze Zelle Abgeschwächte Bakterien oder Viren	Bacille Calmette-Guerin (BCG) (Tuberkulose) Masern Mumps Röteln Orales Polio-Vakzin (Sabin)

Vakzine-Kategorie	Beispiel
Abgetötete Bakterien oder Viren	Keuchhusten Inaktiviertes Polio-Vakzin (Salk)
Untereinheit Toxoid	Diphtherie Tetanus
Kapselförmiges Polysaccharid Hefe-rekombinante Untereinheit	H. influenzae Typ B Hepatitis B Surface-Protein

Aus (Liljeqvist und Stahl, 1999), mit Modifikationen.

Ein Vakzin kann eine ganze Vielfalt verschiedener Antigene enthalten. Beispiele für Antigene sind im ganzen abgetötete Organismen, wie inaktivierte Viren oder Bakterien, Pilze, Protozoen oder sogar Krebszellen. Antigene können auch aus Subfraktionen dieser Organismen/Gewebe, Proteinen oder in ihrer einfachsten Form Peptiden bestehen. Antigene können vom Immunsystem auch in Form von glykosylierten Proteinen oder Peptiden erkannt werden und können auch Polysaccharide oder Lipide sein oder diese enthalten. Kurze Peptide können verwendet werden, da zum Beispiel zytotoxische T-Zellen (CTL) Antigene in Form von kurzen, üblicherweise 8-11 Aminosäuren langen Peptiden in Verbindung mit dem Major Histocompatibility Complex (MHC) erkennen (Rammensee et al., Immunogenetics 41 (1995), 178-228). B-Zellen erkennen längere Peptide, beginnend bei etwa 15 Aminosäuren (Harlow et al., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Im Gegensatz zu den T-Zellen-Epitopen kann die dreidimensionale Struktur der B-Zellen-Antigene auch für das Erkennen durch Antikörper wichtig sein. Um länger anhaltende, antigenspezifische Immunantworten zu erhalten, müssen Adjuvantien Immunkaskaden steuern, um alle notwendigen Zellen des Immunsystems einzubinden. Primär wirken Adjuvantien auf sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs), sind jedoch in ihrem Wirkungsmodus nicht darauf beschränkt. Diese Zellen treffen üblicherweise zuerst auf das (die) Antigen(e), wonach Immuneffektorzellen prozessiertes oder nicht modifiziertes Antigen präsentiert wird. Intermediärzelltypen können ebenfalls beteiligt sein. Bei einer produktiven Immunantwort werden nur Effektorzellen mit der passenden Spezifität aktiviert. Das Adjuvans kann auch Antigene und andere gemeinsam injizierte Faktoren lokal zurückhalten. Außerdem kann das Adjuvans als chemischer Anziehungspunkt für andere Immunzellen fungieren oder lokal und/oder systemisch als Stimulans für das Immunsystem wirken.

Antigen-präsentierende Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem, das sich als erste Wirts-Verteidigungslinie entwickelt hat, die die Infektion schon bald nach der Einwirkung von Mikroorganismen begrenzt (Hoffmann et al., 1999). Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Muster oder relativ unspezifische Strukturen, die auf ihren Zielen exprimiert sind, eher als höher entwickelte spezifische Strukturen, die durch das adaptive Immunsystem erkannt werden (Hoffmann et al., 1999). Beispiele für Zellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen und Dendritenzellen, aber auch Granulozyten (z.B. Neutrophile), natürliche Killerzellen und andere. Im Gegensatz dazu erkennen Zellen des adaptiven Immunsystems spezifische Antigen-Strukturen, einschließlich Peptide, im Falle der T-Zellen und Peptide sowie dreidimensionale Strukturen im Falle der B-Zellen. Das adaptive Immunsystem ist viel spezifischer und höher entwickelt als das angeborene Immunsystem und verbessert sich nach wiederholter Einwirkung eines bestimmten Pathogens/Antigens. Vom phylogenetischen Standpunkt aus ist das angeborene Immunsystem viel älter und ist bereits bei sehr primitiven Organismen auffindbar. Trotzdem ist das angeborene Immunsystem während der Anfangsphase der Antigen-Einwirkung von kritischer Bedeutung, da Zellen des angeborenen Immunsystems (d.h. APC), außer, dass sie Pathogene enthalten, die Zellen des adaptiven Immunsystems initiieren, und daher eine spezifische Immunantwort auslösen, die zur Beseitigung der Eindringlinge führt. Insgesamt spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems und insbesondere die APCs eine kritische Rolle während der Einleitungsphase der Immunantwort, indem sie a) Infektionen mittels eines primitiven Mustererkennungssystems in Schach halten und b) Zellen des adaptiven Immunsystems "primen", was zu spezifischen Immunantworten und einem Immungedächtnis führt und in der Beseitigung eindringender Pathogene oder anderer

Ziele resultiert (Roitt et al., 1998). Diese Mechanismen können auch zur Beseitigung oder zum Immerschach-Halten von Tumorzellen wichtig sein.

Wie zuvor erwähnt, erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems Muster, die auf ihren jeweiligen Zielen exprimiert sind. Beispiele sind Lipopolysaccharide (LPS) im Falle von Gram-negativen Bakterien, mycobakterielle Glykolipide, Lipoteichoinsäuren von Gram-positiven Bakterien, Mannane von Hefe und doppelsträngige RNAs von Viren (Hoffmann et al., 1999). Außerdem können sie Muster, wie die veränderten Glykosylierungen von Proteinen auf Tumorzellen, erkennen.

Jüngste Erkenntnisse beschreiben die DNAs von Protozoen oder niedrigen Eukaryonten als ein weiteres Muster, das vom angeborenen (aber möglicherweise auch vom adaptiven) Immunsystem der Säuger (und vermutlich der meisten, wenn nicht allen Vertebraten) erkannt wird (Krieg, 1996; Lipford et al., 1998).

Das Immunsystem erkennt DNA niedriger Organismen, einschließlich Bakterien, vermutlich infolge von strukturellen und Sequenz-Verwendungs-Unterschieden zwischen dem Pathogen und der Wirts-DNA. Insbesondere kurze Stücke der DNA, die von nicht-Vertebraten stammen oder in Form von kurzen Oligodesoxynukleotiden (ODNs), die nicht-methylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG) in einem bestimmten Basen-Kontext enthalten, werden angepeilt (Krieg et al., 1995). CpG-Motive findet man mit der erwarteten Häufigkeit in Bakterien-DNA, jedoch viel weniger häufig in Vertebraten-DNA (Lipford et al., 1998; Pisetsky, 1999). Außerdem sind Nicht-Vertebraten- (d.h. Bakterien)-CpG-Motive nicht methyliert, wogegen Vertebraten-CpG-Sequenzen dies sehr wohl sind. Diese Unterschiede zwischen Bakterien-DNA und Vertebraten-DNA ermöglichen es den Vertebraten, Nicht-Vertebraten-DNA zu erkennen.

Natürliche CpG-enthaltende DNA, ODNs, sowie Thiophosphat-substituierte (Austausch des Phosphats gegen Thiophosphat-Reste) ODNs, die CpG-Motive enthalten (CpG-ODN), sind nicht nur starke Aktivatoren der Immunzellproliferation und humoraler Immunantworten (Krieg et al., 1995), sondern stimulieren auch starke Immunantworten der Zellen (zusammengefasst in (Lipford et al., 1998)). DNA/ODNs, die nicht-methylierte CpG-Motive enthalten, können monozytische Zellen (Dendriten-Zellen, Makrophagen) und B-Zellen direkt aktivieren. Vermutlich werden natürliche Killer-(NK)-Zellen nicht direkt aktiviert, sondern antworten auf von Monozyten stammendes IL-12 (Interleukin 12) mit einer deutlichen Steigerung ihrer IFN- γ -Produktion (Chace et al., 1997). In der Folge fördert die Induktion von Monozyten und NK-Zellen durch CpG-DNA die Induktion von Antworten des Th1-Typs und die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen.

Dendriten-Zellen, die während der primären Immunantworten wichtige Antigen-präsentierende Zellen darstellen, reifen *in vitro* unter dem Einfluss von CpG-ODN (Hartmann et al., 1999; Sparwasser et al., 1998) und bilden große Mengen an IL-12, TNF- α , IL-6 und in geringerem Ausmaß IL-10 (Klinman et al., 1996; Sparwasser et al., 1998), wenn sie diesen Verbindungen ausgesetzt werden. Somit ist eine charakteristische Wirkung von Bakterien-DNA und CpG-ODNs die Induktion von humoralen und zellvermittelten Antworten vom Th1-Typ auf Protein-Antigene, welche durch das spezifische Cytokin-Muster gekennzeichnet ist (Mosmann et al., 1986). ODNs, die CpG-Motive enthalten, wurden als Vakzin-Adjuvantien bei Mäusen verwendet, um beispielsweise die Antikörper-Reaktion auf ein Tetanus-Vakzin (Krieg et al., 1998) zu verbessern oder um eine starke, antigenspezifische Th1-Cytokin-Antwort in einem Versuchsmodell der Virus-Infektion zu fördern (Oxenius et al., 1999). CpG-DNA wird auch als starkes Adjuvans für Antikörper und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)-Antworten gegen Hepatitis B-Virus-Antigene beschrieben (Davis et al., 1998). Die Induktion starker Th1-Cytokin- und CTL-Reaktionen weist darauf hin, dass CpG-ODN auch für Krebs-Vakzine unter Verwendung von Tumor-Antigenen nützlich sein kann. Erste veröffentlichte Daten zeigen, dass Mäuse, die mit dem Idiotyp aus einem B-Lymphom in Kombination mit einem CpG-ODN als Adjuvans immunisiert wurden, längere Überlebenszeiten aufwiesen (Weiner et al., 1997).

Obwohl CpG ODNs oder nicht-methylierte DNA, die CpG-Motive enthält, potentiell sehr starke Adjuvantien sind, hat diese Technologie jedoch auch eine negativere Seite (Pisetsky, 1997). Beispielsweise wurde berichtet, dass hohe Dosen von Bakterien-DNA, die nicht-methylierte CpG-Motive enthält, unter bestimmten Umständen septischen Schock auslösen können (Sparwasser et al., 1997). Dies ist wahrscheinlich auf übermäßige Mengen an Cytokinen, insbesondere TNF- α , aber auch andere, die nach Einwirkung von CpG-ODN oder von Bakterien-DNA von Zellen sekretiert

werden, zurückzuführen (Sparwasser et al., 1997). Bakterien-DNA und ODN können auch die Ursache für entzündliche Prozesse sein, die eine häufige Komplikation bei Infektionen der Lunge sind (Schwartz et al., 1997). Weiters wird vermutet, dass frühe Gentherapie-Versuche, bei welchen formulierte oder nicht-formulierte Plasmid-DNA, die nicht-methylierte CpG-Motive enthielt, an die Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose verabreicht wurde, infolge starker entzündlicher Prozesse fehlschlugen, von welchen es sich zeigte, dass sie durch CpG-Motive verursacht worden waren (Paillard, 1999; Yew et al., 1999). CpG-Sequenzen, die in Plasmid-DNA enthalten sind, scheinen auch für den Tod von Tieren nach intravenöser Injektion von Plasmid-DNA, die mit Liposomen formuliert war, verantwortlich zu sein (Paillard, 1999). Schließlich entwickeln Tiere, die hohen Konzentrationen von CpG ODN ausgesetzt sind, Arthritis-Symptome, die vermutlich auf entzündliche Prozesse zurückzuführen sind, welche durch ODN verursacht wurden (Deng et al., 1999).

Insgesamt streichen diese Berichte Nachteile von ODN-Adjuvantien hervor, die umgangen werden können, wenn die Menge der für ein Vakzin zu verwendenden ODNs wesentlich verringert werden kann.

Es hat sich gezeigt, dass polykationische Polymere, zum Beispiel die polykationischen Aminosäurepolymere Poly-L-arginin und Poly-L-lysin, *in vitro* und *in vivo* eine sehr effiziente Beladung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) mit Antigenen gestatten (Buschle et al., Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998), 309-321; Buschle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3256-3261; Schmidt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3262-3267). Es wird angenommen, dass dies das Schlüsselereignis für das Auslösen von Immunkaskaden ist, die schließlich zur Induktion antigenspezifischer Immuneffektorzellen führen, die in der Lage sind, Ziele zu zerstören oder zu neutralisieren (Fig. 1). Es zeigte sich schon früher, dass eine Reihe von polykationischen Verbindungen Wirkungen auf Immunzellen ausüben (Buschle et al., Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998), 309-321; Buschle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3256-3261).

Die Koinjektion einer Mischung von Poly-L-arginin oder Poly-L-lysin zusammen mit einem passenden Antigen als Vakzin schützt die Tiere in mehreren Tiermodellen vor Tumorwachstum (Buschle et al., Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998), 309-321; Schmidt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3262-3267). Ein Vakzin bestehend aus polykationischen Verbindungen und Antigen(en) wird daher auf diesem Fachgebiet als sehr wirkungsvolle Form der Behandlung akzeptiert.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die eine wirksame Abgabe an eine Zielzelle, insbesondere an das zelluläre Immunsystem, jedoch auch an andere Zelltypen gestattet, um starke Immunantworten zu induzieren. Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, Mittel zur Verringerung oder sogar Ablation von Immunreaktionen zur Verfügung zu stellen.

Dieses Ziel wird mittels einer pharmazeutischen Zusammensetzung erreicht, die umfasst:

- ein Antigen,
- immunogene Oligodesoxynukleotide (ODNs), welche CpG-Motive enthalten, und
- polykationische Polymere.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Kombination des immunogenen ODN, das auch einen chemotaktischen oder die Differenzierung auslösenden Faktor als immunstimulierende Substanz inkludieren kann, und des polykationischen Polymers mit einem Antigen gemäß der vorliegenden Erfindung zu einem synergistischen, immunmodulierenden Effekt für ein bestimmtes Antigenpräparat führt. Die Kombination des Antigens, immunogenen ODN und polykationischen Polymers ermöglichte die Erzeugung von Vakzinen, die im Vergleich zu Vakzinen bestehend aus immunogenem ODN und Antigen oder Antigen und polykationischem Polymer, überlegen sind. In der Tat wurde dies sogar bei suboptimalen Mengen der immunogenen ODNs beobachtet. Obwohl bekannt war, dass solche ODNs sowie die polykationischen Polymere auf dem Gebiet (sowie viele andere Substanzen, für welche ein Adjuvans-Effekt berichtet wurde) starke Faktoren bei Antigen-Präparationen darstellen, zeigt die Kombination dieser Substanzen eine Wirkung, die weit besser ist als nur die Kombination der einzelnen, isolierten Wirkungen der Verbindungen. Im Gegensatz zu anderen Kombinationen verschiedener Klassen von Adjuvantien, wo - zumindest - nur additive Wirkungen (sofern überhaupt) festgestellt werden, zeigte die Selektion der polykationischen Polymere und der immunogenen ODNs bei einer kombinierten Anwendung zusammen mit einem Antigen eine unvorhersehbare Steigerung der Wirksamkeit bei der Immunantwort auf ein ausge-

wähltes Antigen. Auf synergistische Weise ermöglichen die immunogenen ODNs und die polykationischen Polymere eine sehr effiziente zelluläre Immunantwort sowie eine immunmodulierende Wirkung, die eine überlegene Impfperspektive ermöglicht. Erfindungsgemäße polykationische Polymere sind Verbindungen, die als Endprodukt die Aktivierung (oder Nieder-Regulierung) des adaptiven Immunsystems ermöglichen. Bei einer bevorzugten Form wird die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch APCs (einschließlich Dendriten-Zellen) vermittelt. Zu diesen Verbindungen zählen polykationische Polymere oder Wirts-Verteidigungspeptide oder Defensine, die bei einer bevorzugten Form positiv geladen sind.

Die in den vorliegenden Zusammensetzungen zu verwendenden Antigene sind nicht kritisch. Vorzugsweise werden als solche Antigene Proteine oder Peptide, abgeleitet von einem viralen oder bakteriellen Pathogen oder von Pilzen oder Parasiten, verwendet (einschließlich derivatisierte Antigene oder glykosylierte oder lipidierte Antigene oder Polysaccharide oder Lipide). Eine weitere bevorzugte Quelle für Antigene sind Tumor-Antigene. Bevorzugte Pathogene sind ausgewählt aus Human-Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis A- und B-Viren, Hepatitis-C-virus (HCV), Rous-Sarkoma-Virus (RSV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Influenzavirus, Rotavirus, Staphylococcus aureus, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Vibrio cholerae, Plasmodium sp. (Pl. falciparum, Pl. vivax etc.), Aspergillus sp. oder Candida albicans. Antigene können auch Moleküle sein, die von Krebszellen exprimiert werden (Tumor-Antigene). Das Derivationsverfahren kann die Reinigung eines spezifischen Proteins vom (von) Pathogen/Krebszellen, die Inaktivierung des Pathogens sowie die proteolytische oder chemische Derivatisierung oder Stabilisierung eines solchen Proteins beinhalten. Ebenso können auch Tumorantigene (Krebsvakzine) oder Autoimmunantigene in der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Mit solchen Zusammensetzungen kann eine Tumorrückbildung oder eine Behandlung für Autoimmunerkrankungen durchgeführt werden.

Im Falle von Peptid-Antigenen ist die Verwendung von Peptid-Mimetopen/Agonisten/Superagonisten/Antagonisten oder Peptiden, die in bestimmten Positionen verändert sind, ohne die immunologischen Eigenschaften oder Nicht-Peptid-Mimotope/Agonisten/Superagonisten/Antagonisten zu beeinflussen (Sparbier und Walden, 1999) in der vorliegenden Erfindung mit einbezogen. Peptid-Antigene können auch Verlängerungen entweder am Carboxy- oder am Amino-Terminus des Peptid-Antigens enthalten, die die Wechselwirkung mit der (den) polykationischen Verbindung(en) oder der (den) immunstimulierenden Verbindung(en) erleichtern. Zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen können Peptid-Antagonisten angewendet werden.

Antigene können auch derivatisiert werden, um Moleküle zu umfassen, die die Antigenpräsentation und das Targeting von Antigenen auf Antigen-präsentierende Zellen verstärken.

Bei einer Ausführungsform der Erfindung dient die pharmazeutische Zusammensetzung dazu, eine Verträglichkeit gegenüber Proteinen oder Proteinfragmenten und Peptiden, die bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen, zu verleihen. Antigene, die in diesen Ausführungsformen verwendet werden, dienen dazu, das Immunsystem tolerant zu machen oder die Immunantworten gegen Epitope, die bei Autoimmunprozessen eine Rolle spielen, abzuschwächen.

Das immunogene ODN kann prokaryontischen und eukaryontischen Ursprungs sein. Im Falle eines eukaryontischen Ursprungs sollte die DNA - bezogen auf den phylogenetischen Stammbaum - von einer weniger entwickelten Spezies (z.B. Insekten, aber auch anderen) stammen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das immunogene ODN ein synthetisch erzeugtes DNA-Molekül oder Mischungen solcher Moleküle. Derivate oder Modifikationen von ODNs, wie Thiophosphat-substituierte Analoga (Thiophosphatreste substituieren das Phosphat), wie beispielsweise in den US-Patenten US 5,723,335 und US 5,663,153 beschrieben, und andere Derivate und Modifikationen, die vorzugsweise die immunstimulatorische(n) Zusammensetzung(en) stabilisieren, jedoch nicht ihre immunologischen Eigenschaften ändern (z.B. Sparbier und Walden, 1999), sind ebenfalls mit umfasst. Ein bevorzugtes Sequenz-Motiv ist ein Sechs-Basen-DNA-Motiv, das ein (unmethyliertes) CpG-Dinukleotid, flankiert von zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen (5'-Pur-Pur-CG-Pyr-Pyr-3') enthält (Pisetsky, 1999). Diese sogenannten CpG-Motive sind in Mikrobend-DNA üblicher als in der DNA höherer Vertebraten und weisen Unterschiede im Methylierungsmuster auf (Bird, A. P., Nature 1986, 321:209; Pisetsky, D.S., Immunol. Res. 1999, 19 (1):35-46). (Lipford et al., 1998). Überraschenderweise sind Sequenzen, die Mäuse-APCs stimulieren, für

Human-Zellen nicht sehr effizient (Hartmann et al., 1999; Krieg, 1999). Nützliche ODN-Sequenzen zur Anwendung am Menschen werden derzeit bestimmt (Hartmann et al., 1999; Krieg, 1999). Diese und zukünftige ODNs sind in der vorliegenden Erfindung mit umfasst. Abgesehen von der Stimulierung des Immunsystems, neutralisieren bestimmte ODNs Immunantworten (Krieg, 1999; Lipford et al., 1998). Diese Sequenzen sind auch in der vorliegenden Erfindung mit umfasst, beispielsweise zur Anwendung für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen. ODNs/DNAs können chemisch oder rekombinant hergestellt werden oder aus natürlichen Quellen stammen. Bevorzugte natürliche Quellen sind Insekten.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende(n) polykationische(n) Verbindung(en) kann (können) jede polykationische Verbindung sein, die die charakteristische Wirkung gemäß WO 97/30721 zeigt. Bevorzugte polykationische Verbindungen sind ausgewählt aus basischen Polypeptiden, organischen Polykationen, basischen Polyaminosäuren oder Mischungen davon. Diese Polyaminosäuren sollten eine Kettenlänge von mindestens 4 Aminosäureresten haben (siehe Tufts, wie beschrieben in Goldman et al. (1983)). Besonders bevorzugt sind Substanzen wie Polylysin, Polyarginin und Polypeptide, die mehr als 20%, insbesondere mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten aufweisen, oder Mischungen davon. Andere bevorzugte Polykationen und ihre pharmazeutischen Zusammensetzungen sind in WO 97/30721 (z.B. Polyethylenimin) und WO 99/38528 beschrieben.

Diese polykationischen Verbindungen können chemisch oder rekombinant hergestellt werden oder aus natürlichen Quellen stammen.

Kationische (Poly)peptide können auch antibakteriell (mikrobiell) sein mit Eigenschaften, wie in Ganz und Lehrer, 1999; und Hancock, 1999, zusammengefasst. Antimikrobielle Peptide, die kationisch oder nicht kationisch sind, können Teil der Erfindung sein (Andreu und Rivas, 1998; Simmaco et al., 1998). Diese (Poly)peptide können prokaryontischen oder tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sein oder chemisch oder rekombinant erzeugt sein (Andreu und Rivas, 1998; Ganz und Lehrer, 1999; Simmaco et al., 1998). Peptide können auch zur Klasse der Defensine gehören (Ganz, 1999; Ganz und Lehrer, 1999). Sequenzen solcher Peptide können beispielsweise im Antimicrobial Sequences Database unter der folgenden Internet-Adresse gefunden werden:

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.html>

Solche Wirts-Verteidigungspeptide oder Defensive sind auch eine bevorzugte Form des polykationischen Polymers gemäß der vorliegenden Erfindung. Im Allgemeinen wird eine Verbindung, die als Endprodukt eine Aktivierung (oder Schwächung) des adaptiven Immunsystems ermöglicht, vorzugsweise vermittelt durch APCs (einschließlich Dendriten-Zellen) als polykationisches Polymer verwendet.

Polykationische Verbindungen, die von natürlichen Quellen stammen, schließen HIV-REV oder HIV-TAT (abgeleitete kationische Peptide, Antennapedia-Peptide, Chitosan oder andere Derivate von Chitin) oder andere Peptide ein, die von diesen Peptiden oder Proteinen durch biochemische oder rekombinante Herstellung abgeleitet sind. Andere bevorzugte polykationische Verbindungen sind Cathelin oder mit Cathelin verwandte oder von diesen abgeleitete Substanzen. Beispielsweise ist Mäuse-Cathelin ein Peptid, das die Aminosäuresequenz

NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLKKIGOKIKNFFQKLVPQPE-COOH aufweist. Cathelin-verwandte oder von diesem abgeleitete Substanzen enthalten die ganze oder Teile der Cathelin-Sequenz mit mindestens 15-20 Aminosäureresten. Diese Ableitungen können die Substitution oder Modifikation der natürlichen Aminosäuren durch Aminosäuren, die nicht zu den 20 Standard-Aminosäuren zählen, mit umfassen. Außerdem können in solche Cathelinmoleküle weitere kationische Reste eingeführt werden. Bevorzugt sind diese Cathelinmoleküle mit dem Antigen und dem immunogenen ODN gemäß der vorliegenden Erfindung vereinigt. Überraschenderweise zeigte es sich jedoch, dass diese Cathelinmoleküle auch als Adjuvans für ein Antigen ohne Zugabe weiterer Adjuvantien wirksam sind. Es ist daher möglich, solche Cathelinmoleküle als wirksame Adjuvantien in Vakzinformulierungen mit oder ohne weitere immunaktivierende Substanzen zu verwenden.

Es war äußerst überraschend, dass mit der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung die immunstimulierende Wirkung signifikant höher war als von der Addition der Wirkungen jeder einzelnen Komponente oder auch der Addition der Wirkungen des Polykations mit dem Antigen und des immunogenen ODN mit dem Antigen zu erwarten gewesen wäre. Weiters stellte sich heraus, dass die Wirkung des immunogenen ODN alleine nicht sehr groß ist, wenn ein

Antigen direkt mit dieser Substanz angewendet wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Verbindungen nicht wiederholt verabreicht werden. Es ist sehr wichtig, dass eine Kombination der Verbindungen es ermöglicht, weniger des immunogenen ODN zu verwenden, was dazu beitragen kann, Nebenwirkungen zu vermeiden (siehe oben).

5 Gemäß einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Vakzine, die eine Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Vakzins.

10 Die relativen Mengen der Inhaltsstoffe der vorliegenden Zusammensetzung hängen sehr stark von den Erfordernissen der einzelnen Zusammensetzung ab, z.B. dem zu verwendenden polykationischen Polymer. Bei Poly-L-arginin und Poly-L-lysin liegen die bevorzugten Mengen von Antigen/immunogenem ODN/immunsuppressiver Verbindung Polykation im Bereich von 1-10000 µg Antigen pro Impfung, 1pM - 1 mM immunogenem ODN pro Dosis, und 0,1 bis 1000 µg Polykation pro Impfung.

15 Die vorliegenden Zusammensetzungen können einem Patienten, z.B. einem Impfkandidaten, in wirksamen Mengen z.B. in wöchentlichen, 2-wöchigen oder monatlichen Intervallen verabreicht werden. Mit den vorliegenden Zusammensetzungen zu behandelnde Patienten können auch wiederholt oder nur einmal geimpft werden. Eine bevorzugte Verwendung der vorliegenden Erfindung ist die aktive Immunisierung, insbesondere von Menschen oder Tieren ohne Schutz gegen das spezifische Antigen.

20 Der Verabreichungsweg für die vorliegende Zusammensetzung ist nicht kritisch; subcutane, intramuskuläre, intradermale oder transdermale Injektion z.B. ist genauso geeignet wie die orale Einnahme. Die Adaption der vorliegenden Erfindung an einen solchen Weg der Anwendung wird vom Fachmann leicht vorgenommen.

25 Es ist auch möglich, die vorliegende Zusammensetzung separat zu verabreichen, z.B. durch Injektion der immunogenen ODN getrennt von der Antigen/Polykation-Zusammensetzung. Die vorliegende Erfindung ist daher auch auf ein Set gerichtet, das eine Zusammensetzung, die das Antigen und das polykationische Polymer enthält, als eine Komponente und eine Zusammensetzung, die die immunogene ODN-Substanz enthält, als zweite Komponente umfasst.

30 Die Komponenten können an der selben Stelle oder zur selben Zeit verabreicht werden, eine Verabreichung an verschiedene Stellen, zu verschiedenen Zeiten oder für unterschiedliche Zeitspannen ist jedoch ebenfalls möglich. Es ist weiters auch möglich, die systemischen oder lokalen Verabreichungen der Zusammensetzung bzw. der Komponenten zu variieren.

35 Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Set zur Bereitstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend eine ein immunogenes ODN enthaltende Komponente, eine ein polykationisches Polymer enthaltende Komponente, und eine ein Antigen enthaltende Komponente. Vorzugsweise ist das Antigen bereits mit dem polykationischen Polymer gemischt vorgesehen.

40 Genauere Details der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Beispielen und der Zeichnung beschrieben, die Erfindung ist jedoch nicht auf diese besonderen Ausführungsformen beschränkt.

Fig. 1A und 1B: IFN- γ -ELISPOT der Immunantwort gegen das OVA-Peptid SIINFEKL;

45 Fig. 2: IFN- γ -ELISPOT der Immunantwort gegen das vom Mäuse-Mastozytom P815 stammende Peptid P1A (Fig. 2A), das SCP-Peptid SYVPSAEQI (Fig. 2B), das LLO-Peptid GYKDGNEYI (Fig. 2C) und das OVA-Peptid ISQAVHAAHAEINE (Fig. 2D);

Fig. 3: IFN- γ -ELISPOT der Immunantwort gegen das MC1R-Peptid WGPFFLHL; und

Fig. 4: IFN- γ -ELISPOT der Immunantwort gegen das OVA-Peptid SIINFEKL.

50 Fig. 5: Tumor-Nekrose Faktor α (TNF- α) im Serum (1 h nach Injektion) (A); Interleukin-6 (IL-6) im Serum (1 h nach Injektion) (B)

BEISPIELE

Bei allen Versuchen wurden Thiophosphat-substituierte ODNs (wobei Thiophosphatreste das Phosphat substituieren, nachstehend "Thiophosphat-substituierte Oligodesoxynukleotide" genannt) verwendet, da solche ODNs eine höhere Nuklease-Resistenz zeigen (Ballas et al., 1996; Krieg et

al., 1995; Parronchi et al., 1999).

Lymphknoten wurden durch ein 70 µm Zellsieb durchgeleitet und zwei Mal mit DMEM-Medium (GIBCO BRL), das 5% fötales Kälberserum (FCS, SIGMA Chemicals) enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden auf 10^7 Zellen/ml in DMEM/5%FCS eingestellt. IFN- γ -ELISPOT-Tests wurden im Duplikat, wie beschrieben (Miyahira et al., 1995), durchgeführt. Diese Methode ist eine weitverbreitete Vorgangsweise, die die Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ermöglicht. Die Lymphozyten wurden *ex vivo* im Duplikat mit Medium (Hintergrund) pR60, CpG-ODN und Concanavalin A (Con A), stimuliert. Spots, die einzelne, IFN- γ -produzierende T-Zellen darstellen, wurden gezählt, und die Anzahl der Hintergrund-Spots wurde von allen Proben abgezogen. Nach der Stimulation mit Con A wurden viele Spots nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), was auf einen guten Zustand der verwendeten Lymphozyten hinweist.

Beispiel 1: Die kombinierte Anwendung von CpG-ODN und Poly-L-arginin (pR 60) verstärkt sehr die Induzierung von Ovalbumin-Peptid-spezifischen T-Zellen in konzentrations(pR 60)-abhängiger Weise.

Mäuse Peptid	C57B1/6 (Harlan/Olac) OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Peptid (SIINFEKL), ein MHC-Klasse I- (H-2Kb)-eingeschränktes Epitop von Hühner-Ovalbumin (Rotzschke et al., 1991), wurde unter Verwendung von Standard-Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, HPLC-gereinigt und mittels Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert. Dosis: 300 µg/Maus
Poly-L-arginin 60 (pR60)	Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals Dosis: 1000, 100 oder 10 µg/Maus
CpG-ODN 1668	Thiophosphat-substituierte ODNs, die ein CpG-Motiv enthielten: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT, von NAPS GmbH, Göttingen, synthetisiert. Dosis: 5 nMol/Maus
Non-CPG-ODN 1911	Mit Phosphothioaten modifizierte Oligodinukleotide, die kein CpG-Motiv enthielten: TCC AGG ACT TTC CTC AGG TT, von NAPS GmbH, Göttingen, synthetisiert. Dosis: 5 nMol/Maus

Versuchsgruppen (5 Mäuse pro Gruppe)

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + CpG-ODN
2. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + CpG-ODN + pR 60 1000 µg
3. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + CpG-ODN + pR 60 100 µg
4. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + CpG-ODN + pR 60 10 µg
5. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + Non-CpG-ODN
6. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 1000 µg
7. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 100 µg
8. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 10 µg
9. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + pR 60 1000 µg
10. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + pR 60 100 µg
11. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid + pR 60 10 µg

Am Tag 0 wurde den Mäusen in jeden Hinterpfotenballen eine Injektion gegeben, mit einem Gesamtvolumen von 100 µl (50 µl pro Pfotenballen), die die oben genannten Verbindungen enthielten. Die Tiere wurden 4 Tage nach der Injektion getötet, und die poplitealen Lymphknoten wurden gesammelt. Die Lymphknoten wurden durch ein 70 µm-Zellsieb durchgeleitet und zweimal mit DMEM-Medium (GIBCO BRL), das 5% fötales Kälberserum (FCS, SIGMA Chemicals) enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden in DMEM/5%FCS auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. Der IFN- γ -

ELISPOT-Test wurde im Duplikat, wie beschrieben (Miyahira et al., 1995), durchgeführt. Dieses Verfahren ist eine weitverbreitet verwendete Vorgangsweise, die die Quantifizierung der antigenspezifischen T-Zellen ermöglicht. Die Lymphozyten wurden *ex vivo* in Duplikaten mit Medium (Hintergrund), pR 60, CpG-ODN und Concanavalin A (Con A) stimuliert. Es wurden die Spots gezählt, die einzelne IFN- γ -erzeugende T-Zellen repräsentierten, und die Anzahl der Hintergrundspots wurde von allen Proben abgezogen. Nach der Stimulation mit Con A wurden viele Spots nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), was auf einen guten Zustand der verwendeten Lymphozyten hinweist. Für jede Versuchsgruppe von Mäusen ist die Anzahl von Spots/ 1×10^6 Zellen in den Fig. 1A und 1B veranschaulicht.

Beispiel 2: Die gemeinsame Anwendung von CpG-ODN und Poly-L-arginin verbessert sehr die Induktion von T-Zellen, die spezifisch sind für ein von einem Mastocytom stammendes Peptid, ein von einem Circumsporozoit-stammendes Peptid, ein von einem Listeriolysin stammendes Peptid und ein Peptid, das von einem Ovalbumin mit eingeschränkter MHC-Klasse II stammt.

Mäuse	DBA/2 (Harlan/Olac)
Peptide	a. Von Mäuse-Mastocytom P815 stammendes Peptid P1A (LPYLGWLVF), eingeschränkt auf MHC-Klasse I (H2-Ld) (Lethe et al., 1992). b. CSP-Peptid (SYVPSAEQI), das vom Circumsporozoit-Protein von Plasmodium Yoelii (Rodrigues et al., 1992) stammt, eingeschränkt auf MHC Klasse I (H2-Kd). c. LLO-Peptid (GYKDGNEYI), das von Listeriolysin 0 91-99 von Listeria monocytogenes stammt (Pamer et al., 1991), eingeschränkt auf MHC-Klasse I (H2-Kd). d. OVA ₃₂₃₋₃₃₆ -Peptid (ISQAVHAAHAEINE), das von Hühner-Ovalbumin stammt, eingeschränkt auf MHC-Klasse II (I-Ad) (Shimonkevitz et al., 1984). Alle Peptide wurden mittels Standard-Festphasen-Fmoc-Synthese synthetisiert, HPLC-gereinigt und mittels Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert. Dosis: 300 μ g/Maus.
Poly-L-arginin 60 (pR60)	Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals Dosis: 100 μ g/Maus
CpG-ODN 1668	Thiophosphat-substituierte ODNs, die ein CpG-Motiv enthielten: TCC ATG <u>ACG TTC</u> CTG ATG CT, synthetisiert von NAPS GmbH, Göttingen. Dosis: 5 nMol/Maus
Non-CpG-ODN 1911	Thiophosphat-substituierte ODNs, die kein CpG-Motiv enthielten: TCC AGG ACT TTC CTC AGG TT, synthetisiert von NAPS Göttingen GmbH. Dosis: 5 nMol/Maus

Versuchsgruppen (5 Mäuse pro Gruppe)

1. P1A-Peptid + CpG-ODN+ pR 60 100 μ g
2. P1A-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 100 μ g
3. P1A-Peptid + CpG-ODN
4. P1A-Peptid + pR 60 100 μ g
5. CSP-Peptid + CpG-ODN + pR 60 100 μ g
6. CSP-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 100 μ g
7. CSP-Peptid + CpG-ODN
8. CSP-Peptid + pR 60 100 μ g

9. LLO-Peptid + CpG-ODN + pR 60 100 µg
10. LLO-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 100 µg
11. LLO-Peptid + CpG-ODN
12. LLO-Peptid + pR 60 100 µg

5

13. OVA-Peptid + CpG-ODN + pR 60 100 µg
14. OVA-Peptid + Non-CpG-ODN + pR 60 100 µg
15. OVA-Peptid + CpG-ODN
12. OVA-Peptid + pR 60 100 µg

10

15

Am Tag 0 wurde den Mäusen in jeden Hinterpfotenballen eine Injektion gegeben, mit einem Gesamtvolumen von 100 µl (50 µl pro Pfotenballen), die die oben genannten Verbindungen enthielten. Die Tiere wurden 4 Tage nach der Injektion getötet, und die poplitealen Lymphknoten wurden gesammelt. Die Lymphknoten (Shimonkevitz et al., 1984) wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, und IFN-γ-ELISPOTS wurden hergestellt. Für jede Versuchsgruppe von Mäusen ist die Anzahl von Spots/1x10⁶-Zellen in Fig. 2A-D veranschaulicht.

20

Beispiel 3: Die gemeinsame Anwendung von CpG-ODN und Poly-L-arginin (pR 60) verbessert auf synergistische Weise die Immunantwort gegen MC1R (Melanozyten-stimulierender Hormonrezeptor)

25

Mäuse C57B1/6 (Harlan/Olac)
 Peptid MC1R-Peptid (WGPFFLHL, F. Mattner, nicht veröffentlicht), ein MHC-Klasse I (H-2Kb)-eingeschränktes Epitop von Melanozyten-stimulierendem Hormonrezeptor (MC1R), mittels Standard-Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, HPLC-gereinigt und mittels Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert.
 Dosis: 300 µg/Maus

30

Poly-L-arginin 60 (pR60) Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals
 Dosis: 1000, 100 oder 10 µg/Maus

35

CpG-ODN 1668 Thiophosphat-substituiert, enthaltend ein CpG-Motiv: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT, von NAPS Göttingen GmbH synthetisiert.
 Dosis: 5 nmol/Maus

Versuchsgruppen (3 Mäuse pro Gruppe)

40

1. MC1R + CpG-ODN + pR
2. MC1R + CpG-ODN
3. MC1R + pR

45

Am Tag 0 wurde den Mäusen in jeden Hinterpfotenballen eine Injektion gegeben, mit einem Gesamtvolumen von 100 µl (50 µl pro Pfotenballen), die die oben genannten Verbindungen enthielten. Die Tiere wurden 4 Tage nach der Injektion getötet, und die poplitealen Lymphknoten wurden gesammelt. Die Lymphknoten und IFN-γ-ELISPOTS wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Für jede Versuchsgruppe von Mäusen ist die Anzahl von Spots/1x10⁶ Zellen in Fig. 3 veranschaulicht, Standardabweichungen von *ex vivo*-stimulierten Triplikaten wurden angegeben.

50

Beispiel 4: Die gemeinsame Anwendung von CpG-ODN und Poly-L-arginin (pR 60) induziert an verschiedenen Injektionsstellen eine starke Antigen-spezifische Immunantwort gegen Ovalbumin-Peptid.

55

Mäuse C57B1/6 (Harlan/Olac)
 Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL), ein MHC-Klasse I (H-2Kb)-eingeschränktes

Epitop von Hühner-Ovalbumin (Rotzschke et al., 1991), mittels Standard-Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, HPLC-gereinigt und durch Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert.

Dosis: 300 µg/Maus

- 5 Poly-L-arginin 60 (pR60) Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals
Dosis: 100 µg/Maus
- 10 CpG-ODN 1668 Thiophosphat-substituierte ODNs, enthaltend ein CpG-Motiv: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT, synthetisiert von NAPS Göttingen GmbH.
Dosis: 5 nMol/Maus

Versuchsgruppen-(5 Mäuse pro Gruppe)-Injektionsstellen:

- 15 1. Pfotenballen
2. s.c./Flanke
3. in die Ohrmuschel

20 Am Tag 0 wurde den Mäusen an den verschiedenen Injektionsstellen eine Injektion gegeben (Ovalbumin-Peptid + CpG-ODN + pR60), mit einem Gesamtvolumen von 100 µl (50 µl pro Pfotenballen), die die oben genannten Verbindungen enthielten. Die Tiere wurden 4 Tage nach der Injektion getötet, und die drainagierten Lymphknoten wurden gesammelt. Die Lymphknoten und IFN-γ-ELISPOTS wurden in Triplikaten (Standardabweichung ist angegeben), wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt. Für jede Versuchsgruppe von Mäusen ist die Anzahl von Spots/1x10⁶ Zellen in Fig. 4 veranschaulicht.

25

Tabelle 2

Peptid-Antigene, die für Impfversuche verwendet wurden

30

Peptid	Sequenz	Quelle	eingeschränkt auf	Veröffentlichung
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	SIINFEKL	Hühner-Ovalbumin	MHC-Klasse I H2Kb	(Rotzschke et al., 1991)
P1A	LPYLGWLVF	Mäuse-Mastozytom P815	MHC-Klasse I H-2Kd	(Lethe et al., 1992)
CSP	SYVPSAEQI	Circumsporozoit-Protein Plasmodium yoelii	MHC-Klasse I H-2Kd	(Rodrigues et al., 1992)
LLO	GYKDGNEYI	Listeriolysin Listeria monocytogenes	MHC-Klasse I H2-Kd	(Pamer et al., 1991)
OVA ₃₂₃₋₃₃₆	ISQAVHAA HAEINE	Hühner-Ovalbumin	MHC Klasse II, I-Ad	(Shimonkevitz et al., 1984)
MC1R	WGPFLLHL	Melanozyten-stimulierender Hormonrezeptor	MHC Klasse I, H-2Kb	F. Mattner unveröffentl.

50

55

Beispiel 5: Die gemeinsame Anwendung von CpG-ODN und Poly-L-arginin (pR 60) verhindert die Induktion von systemischer TNF- α und IL-6-Produktion.

- 5 Mäuse C57B1/6 (Harlan/Olac)
 Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL, ein MHC-Klasse I (H-2Kb)-eingeschränktes Epitop von Hühner-Ovalbumin (Rotzschke et al., 1991), mittels Standard-Festphasen-F-moc-Synthese synthetisiert, HPLC-gereinigt und durch Massenspektroskopie auf Reinheit analysiert
 Dosis: 300 μ g/Maus
- 10 Poly-L-Arginin 60 (pR60) Poly-L-arginin mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 60 Argininresten; SIGMA Chemicals
 Dosis: 100 μ g/Maus
- 15 CpG-ODN 1668 Thiophosphat-substituierte ODNs enthaltend ein CpG-Motiv: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT, synthetisiert von NAPS GmbH, Göttingen.
 Dosis: 5 nmol/Maus

Versuchsgruppen (4 Mäuse pro Gruppe)

- 20 1. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid
 2. pR60
 3. CpG 1668 + OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid
 4. CpG 1668 + pR60 + OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid

25 Mäusen wurde in jeden Hinterpfotenballen eine Injektion gegeben, mit einem Gesamtvolumen von 100 μ l (50 μ l pro Pfotenballen), die die oben genannten Verbindungen enthielt. Eine Stunde nach der Injektion wurde über die Schwanzvene Blut abgenommen und Serum hergestellt. Die Menge an proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α und IL-6) in den Seren war durch die Verwendung von Zytokin-spezifischen ELISAs festgelegt.

30

TNF- α /IL-6 in Seren / 1 h nach Injektion

Injektion 245+	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
-	0	0
+pR (100 μ g)	0	0
CpG 1668 (5nMol)	171,5	33,1
CpG 1668 (5nMol) + pR (100 μ g)	0	0

40

Literaturstellen:

- Andreu, D., und Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.
- 45 Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L., und Krieg, A.M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 1840-1845.
- Bloom, B.R., und Widdus, R. (1998). Vaccine visions and their global impact. *Nat. Med.* 4, 480-484.
- 50 Chace, J.H., Hooker, N.A., Mildenstein, K.L., Krieg, A.M., und Cowdery, J.S. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84, 185-193.
- Davis, H.L., Weeranta, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J., und Krieg, A.M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 160, 870-876.
- 55

- Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V., and Tarkowski, A. (1999). Intracellularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat. Med.* 5, 702-705.
- Ganz, T. (1999). Defensins and host defense [comment.] *Science* 286, 420-421.
- Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* 5, 292-297.
- Hancock, R.E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential *Drugs* 57, 469-473.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Hartmann, G., Weiner, G.J., and Krieg, A.M. (1999). CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9305-9310.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., and Krieg, A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2879-2883.
- Krieg, A.M. (1999). CpG DNA: a novel immunomodulator [letter]. *Trends Microbiol.* 7, 64-5.
- Krieg, A.M. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.* 128, 128-133.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Schorr, J., and Davis, H.L. (1998). The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.* 6, 23-27.
- Lethe, B., van den Eynde, B., van Pel, A., Corradin, G., and Boon, T. (1992). Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide. *Eur. J. Immunol.* 22, 2283-2288.
- Liljeqvist, S., and Stahl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* 73, 1-33.
- Lipford, G.B., Heeg, K., and Wagner H. (1998). Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 6, 496-500.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Gidlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
- Nossal, G. (1998). Living up to the legacy. *Nat. Med.* 4, 475-476.
- Oxenius, A., Martinic, M.M., Hengartner, H., and Klenerman, P. (1999). CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J. Virol.* 73, 4120-4126.
- Paillard, F. (1999). CpG: the double-edged sword [comment]. *Hum. Gene Ther.* 10, 2089-2090.
- Pamer, E.G., Harty, J.T., and Bevan, M.J. (1991). Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353, 852-855.
- Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S., and Maggi, E. (1999). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J. Immunol.* 163, 5946-5953.
- Pisetsky, D.S. (1997). Immunostimulatory DNA: a clear and present danger? *Nat. Med.* 3, 829-831.
- Pisetsky, D.S. (1999). The influence of base sequence on the immunostimulatory properties of DNA. *Immunol. Res.* 19, 35-46.
- Rodrigues, M., Nussenzweig, R.S., Romero, P., and Zavala, F. (1992). The in vivo cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. *J. Exp. Med.* 175, 895-905.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1998). *Immunology* (London: Mosby International Ltd).
- Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H.G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21, 2891-2894.

Schwartz, D.A., Quinn, T.J., Thorne, P.S., Sayeed, S., Yi, A.K., und Krieg, A.M. (1997). CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 100, 68-73.

Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J.W., Marrack, P., und Grey, H.M. (1984). Antigen recognition by H2-restricted T cells II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J. Immunol.* 133, 2067-2074.

Simmaco, M., Mignogna, G., und Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.

Sparbier, K., und Walden, P. (1999). T cell receptor specificity and mimotopes. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 214-218.

Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W., und Wagner H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 2045-2054.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K., und Wagner, H. (1997). Bacterial DNA causes septic shock [letter]. *Nature* 386, 336-337.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., und Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur. J. Immunol.* 27, 1671-1679.

Weiner, G.J., Liu, H.M., Wooldridge, J.E., Dahle, C.E., und Krieg, A.M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10833-10837.

Yew, N.S., Wang, K.X., Przybylska, M., Bagley, R.G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R.K., und Cheng, S.H. (1999). Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 10, 223-234.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie
 - ein Antigen,
 - ein immunogenes, CpG-Motive enthaltendes Oligodesoxynukleotid (ODN) und
 - ein polykationisches Polymer umfasst.
2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Protein ist, das von einem viralen, parasitären oder bakteriellen Pathogen abgeleitet ist.
3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Tumorantigen ist.
4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Autoimmunantigen ist.
5. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung ein basisches Polypeptid, ein organisches Polykation, eine basische Polyaminosäure oder Mischungen davon sind.
6. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung Polylysin, Polyarginin, ein Polypeptid, das mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten enthält, oder Mischungen davon sind.
7. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die polykationische Verbindung vom REV-Protein oder dem TAT-Protein von HIV, Chitosan oder anderen Chitinderivaten abgeleitet ist.
8. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das immunogene ODN ausgewählt ist aus synthetisch hergestellten DNA-Molekülen, Thiophosphat-substituierten ODNs, immunogener Insekten-DNA, rekombinanten DNA-Molekülen, DNA-Molekülen, die ein CpC-Dinukleotid enthalten, das von zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen flankiert ist, oder Mischungen davon.
9. Vakzin, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 umfasst.
10. Verwendung einer Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstel-

lung eines Vakzins.

11. Set zur Bereitstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß es umfasst:

- 5
- eine Komponente, die ein immunogenes ODN enthält, und
 - eine Komponente, die ein polykationisches Polymer enthält, und
 - eine Komponente, die ein Antigen enthält umfasst.

10 **HIEZU 5 BLATT ZEICHNUNGEN**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

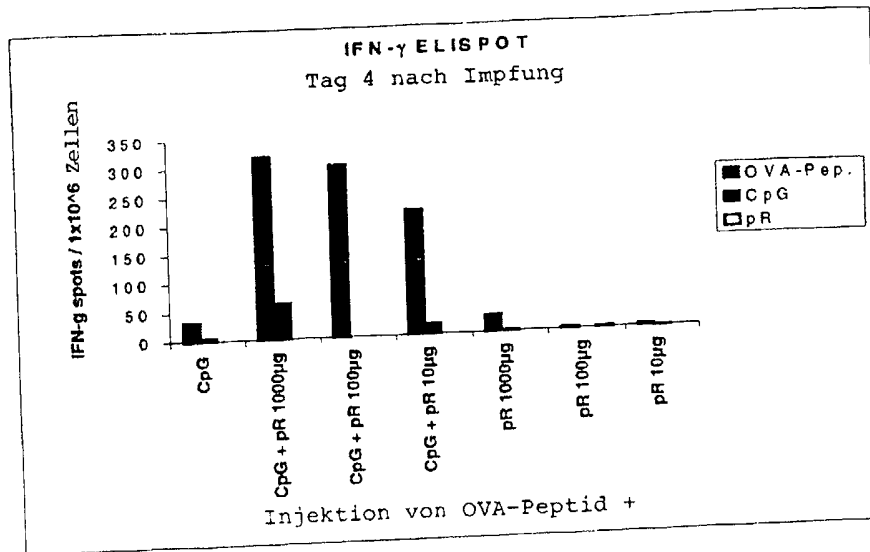


Fig. 1A

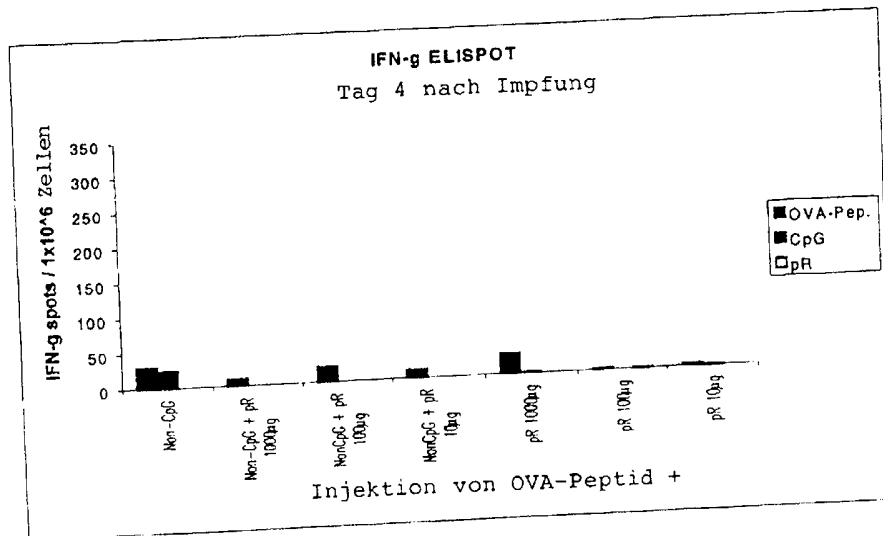


Fig. 1B

Fig. 2A

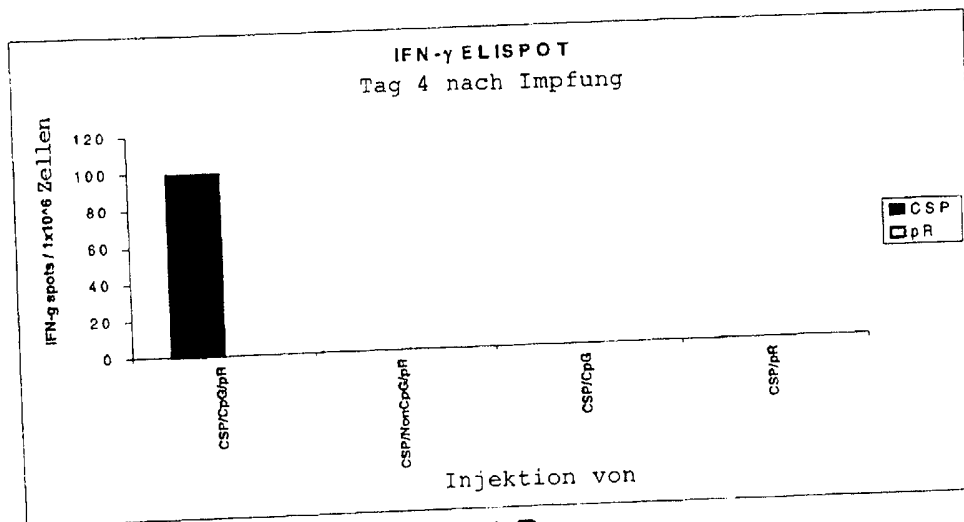
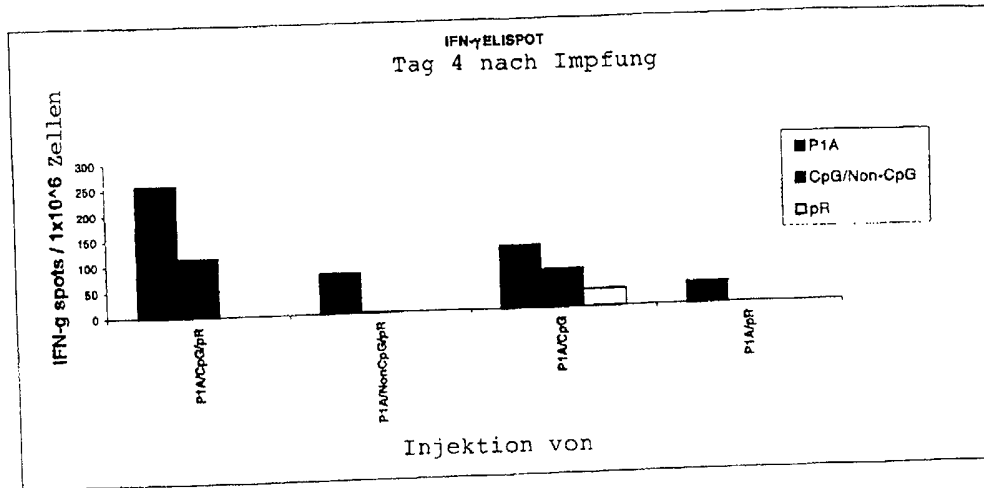


Fig. 2 B

Fig. 2C

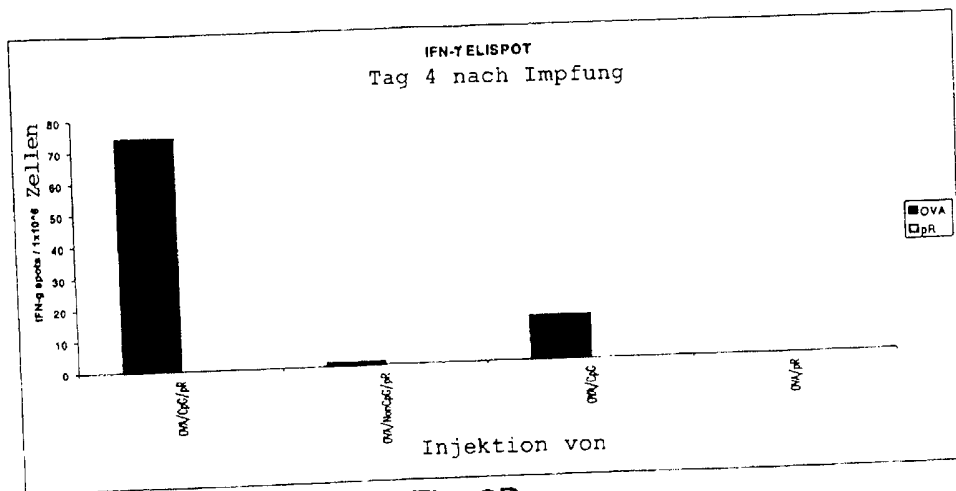
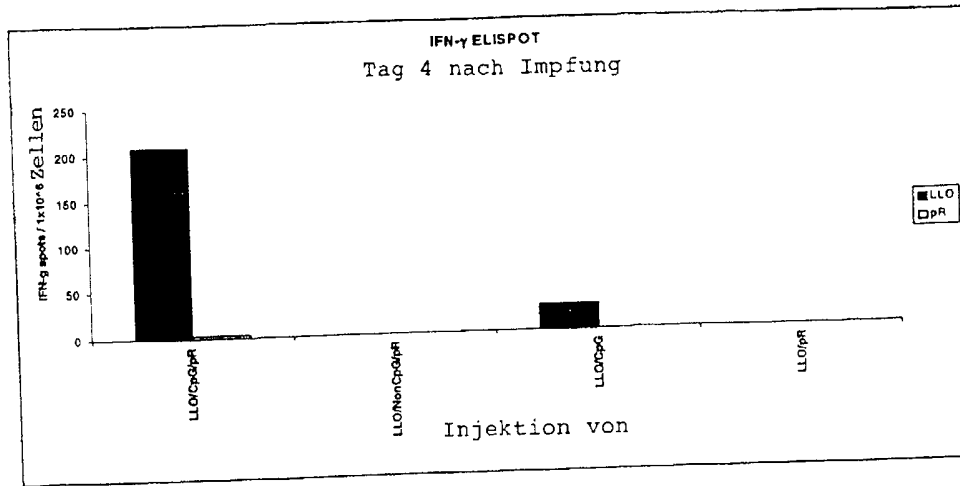


Fig. 2D

Fig. 3

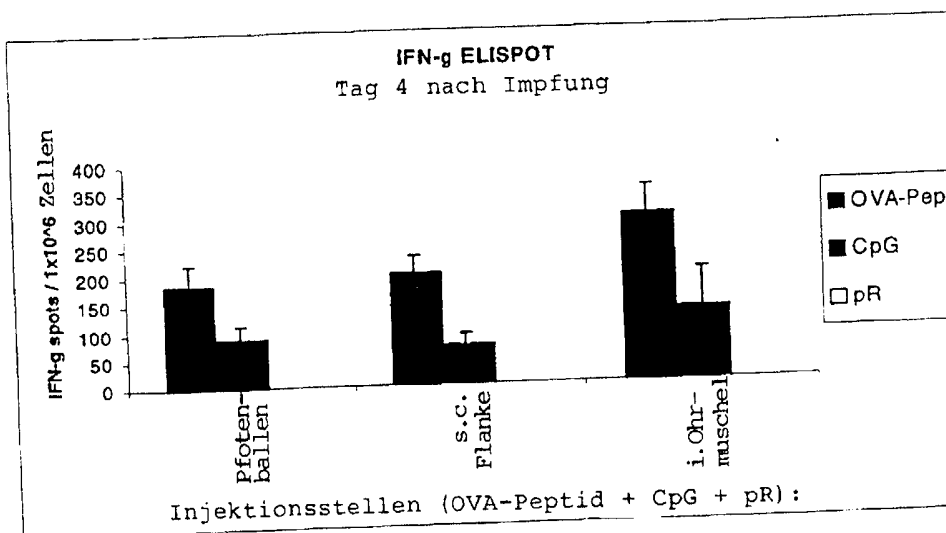
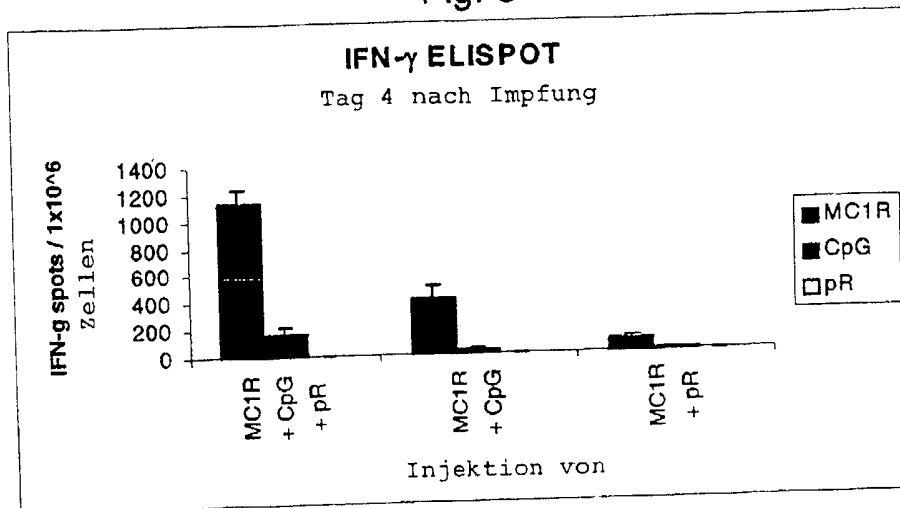


Fig. 4

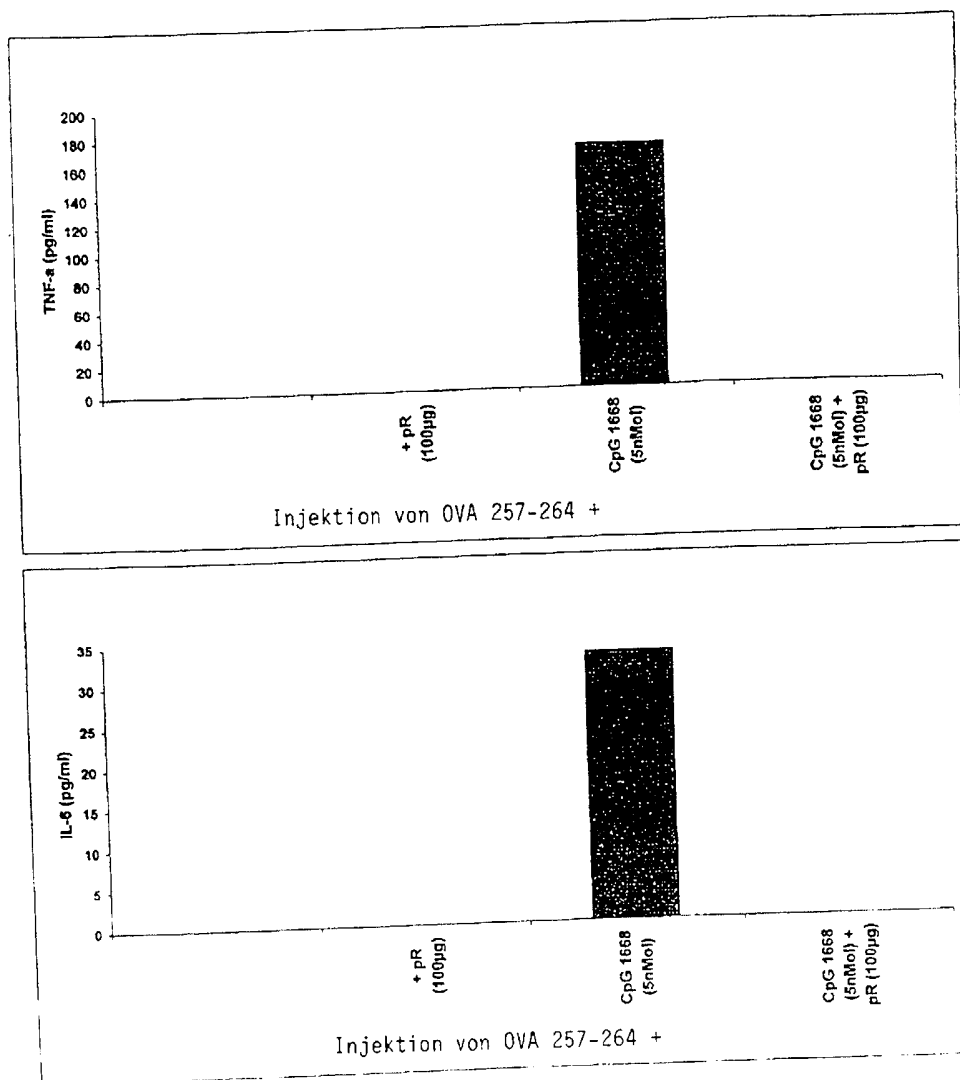


Fig.5