(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 469 T2** 2006.06.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 681 483 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 469.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/00899**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 909 492.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/016737**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.01.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.08.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.11.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.08.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/87*** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/48 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

8342	**26.01.1993**	**US**
29336	**11.03.1993**	**US**
93235	**15.07.1993**	**US**
124962	**21.09.1993**	**US**
125012	**21.09.1993**	**US**

(73) Patentinhaber:
The Trustees of the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., US; The Wistar Institute, Philadelphia, Pa., US; Wyeth, Madison, N.J., US

(74) Vertreter:
Flügel Preissner Kastel Schober, 80335 München

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

(72) Erfinder:
Weiner, Davi B., Merion, US; Williams, William V., Havertown, US; Wang, Bin, Havertown, US; Coney, Leslie R., Rosemont, US; Merva, Michael J., Philadelphia, US; Zurawski, Vincent R. Jr., Westtown, US

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG VON GENETISCHEM MATERIAL**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und ihre Verwendung bei der Einschleusung genetischen Materials in die Zellen eines Individuums. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können zur Abgabe von protektiven und/oder therapeutischen Mitteln, einschließlich genetischen Materials, das Protein-Ziele zur Immunisierung und therapeutische Proteine codiert, verwendet werden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das direkte Einbringen eines normalen funktionsfähigen Gens in ein lebendes Tier wurde bereits als Mittel zum Ersatz einer fehlerhaften genetischen Information studiert. Bei einigen Studien wird DNA direkt in Zellen eines lebenden Tiers ohne die Verwendung eines Viruspartikels oder eines anderen infektiösen Vektors eingeschleust. Nabel, E.G., et al., (1990) Science 249:1285–1288, offenbaren die ortsspezifische Genexpression in vivo eines β-Galactosidase-Gens, das direkt in die Arterienwand in Mäusen transferiert wurde. Wolfe, J.A. et al., (1990) Science 247:1465–1468 offenbaren die Expression von verschiedenen Reportergenen, die direkt in Maus-Muskel in vivo transferiert wurden. Acsadi G., et al., (1991) Nature 352:815–818 offenbaren die Expression des menschlichen Dystrophin-Gens in Mäusen nach intramuskulärer Injektion von DNA-Konstrukten. Wolfe, J.A., et al., 1991, BioTechniques 11(4):474–485, hier durch Bezugnahme eingeschlossen, beschreiben Zustände, die den direkten Gentransfer auf Nagermuskel in vivo beeinflussen. Felgner, P.L. und G. Rhodes, (1991) Nature 349:351–352 offenbaren die direkte Abgabe von gereinigten Genen in vivo als Arzneimittel ohne die Verwendung von Retroviren.

[0003] Die Anwendung des direkten Gentransfers als alternatives antipathogenes Impfverfahren wurde bereits vorgeschlagen. Die Anwendung des direkten Gentransfers durch eine einzige Injektion wird als mögliche Impfstrategie gegen HIV nahe gelegt. Es wird berichtet, dass eine zelluläre Immunantwort auf HIV-gp120 als Ergebnis des Einschleusens von Plasmid-DNA, die dieses codiert, in Zellen, festgestellt wird. Die internationale PCT-Anmeldung mit der Nummer PCT/US90/01515, veröffentlicht am 4. Oktober 1990, offenbart Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen eine Pathogen-Infektion durch direkte Injektion nackter Polynucleotide in die Zellen des Individuums in einem Einschrittverfahren. Die Verwendung von transfizierenden Mitteln, die anders sind als Lipofectine, ist bei den offenbarten Verfahren ausdrücklich ausgeschlossen. Die Stimulierung von beimpften Zellen wird weder offenbart noch vorgeschlagen. Offenbart wird ein HIV-Impfstoff, der darin besteht, Polynucleotide einzuschleusen, die das Virusprotein gp120 codieren. Die Funktionsfähigkeit dieses Impfstoffs wird nicht bewiesen.

[0004] Thomason, D.B. et al., (1990) Cell Physiol. 27:C589–581 und die PCT-Patentanmeldung, Seriennr. WO 91/12329, offenbaren die Verabreichung von Bupivacain an Muskelzellen, um die Satellitenzellen-Proliferation als Teil eines retroviral-vermittelten Gen-Abgabeprotokolls auszulösen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zum Einschleusen genetischen Materials in Zellen eines Individuums. Das Verfahren umfasst die Schritte des Kontaktierens von Zellen des Individuums mit einem Polynucleotidfunktionsenhancer-Mittel, das vorzugsweise ein Mittel ist, das die Aufnahme von DNA durch die Zellen erleichtert oder eine Entzündungsreaktion verstärkt, und des Verabreichens an die Zellen eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die entweder ein gewünschtes Peptid oder Protein codiert oder als Templat für funktionelle Nucleinsäuremoleküle dient. Das Nucleinsäuremolekül wird frei von Retrovirusteilchen verabreicht. Das gewünschte Protein kann entweder ein Protein sein, das in dem Individuum funktioniert oder als Ziel einer Immunantwort dient.

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei einem Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen ein Pathogen. Das Verfahren umfasst die Schritte des Kontaktierens von Zellen des Individuums mit einem Polynucleotidfunktionsenhancer-Mittel, das vorzugsweise ein Mittel ist, das die Aufnahme von DNA durch die Zellen erleichtert oder die Immunantwort verstärkt, und des Verabreichens an die Zellen eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop, das auf einem pathogenen Antigen zu sehen ist, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist und mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist. Das Nucleinsäuremolekül ist in der Lage, in den Zellen des Individuums exprimiert zu werden.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei einem Verfahren zur Immunisierung eines Menschen gegen HIV. Das Verfahren umfasst die Schritte des Verabreichens an einen Menschen eines menschlichen Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die mindestens ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, das auf einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei einem Verfahren zur Immunisierung eines Menschen gegen HIV. Das Verfahren umfasst die Schritte des Verabreichens zweier verschiedener Nucleinsäuremoleküle an verschiedene Zellen des Menschen. Jedes Nucleinsäuremolekül umfasst eine Nucleotidsequenz, die mindestens ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, das auf einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist. Die verschiedenen Nucleinsäuremoleküle umfassen jeweils verschiedene Nucleotidsequenzen, die mindestens ein von den anderen verschiedenes Peptid codieren und jeweils in der Lage sind, in menschlichen Zellen exprimiert zu werden.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen eine hyperproliferative Erkrankung oder eine Autoimmunerkrankung. Die Verfahren umfassen die Schritte des Verabreichens an Zellen eines Individuums eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop identisch ist oder im Wesentlichen ähnlich ist, das auf einem mit einer hyperproliferativen Krankheit assoziierten Protein bzw. auf einem mit einer Autoimmunerkrankung assoziierten Protein zu sehen ist und das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist; wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in den Zellen exprimiert zu werden.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das an einer Krankheit leidet, die die Schritte des Kontaktierens von Zellen des Individuums mit einem Polynucleotidfunktionsenhancer-Mittel, das vorzugsweise ein Mittel ist, das die Aufnahme von DNA durch die Zellen erleichtert oder eine Entzündungsreaktion verstärkt, und des Verabreichens an die Zellen eines Individuums eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz aufweist, die an Stelle eines fehlerhaften Gens funktioniert oder die ein Molekül codiert, das in dem Individuum eine therapeutische Wirkung hervorruft und mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, umfasst, wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in den Zellen exprimiert zu werden.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein Nucleinsäuremolekül und einen Polynucleotidfunktionsenhancer umfassen.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft prophylaktische und therapeutische HIV-Impfstoffe, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel und ein Nucleinsäuremolekül umfassen, das ein oder mehrere Peptide codiert, die jeweils mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, das auf mindestens einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in menschlichen Zellen exprimiert zu werden.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen eine hyperproliferative Krankheit oder eine Autoimmunerkrankung. Die Verfahren umfassen die Schritte des Verabreichens an Zellen eines Individuums eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das identisch oder im Wesentlichen identisch ist zu einem Epitop das auf einem hyperproliferativen Krankheits-assoziierten Protein bzw. einem Krankheits-assoziierten Autoimmunprotein zu sehen ist und mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in den Zellen exprimiert zu werden.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das an einer Krankheit leidet, umfassend die Schritte des Kontaktierens von Zellen des Individuums mit einem Polynucleotidfunktionsenhancermittels, das vorzugsweise ein Mittel ist, das die Aufnahme von DNA durch die Zellen erleichtert oder eine Entzündungsreaktion verstärkt, und Verabreichen an die Zellen eines Individuums eines Nucleinsäuremoleküls, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die an Stelle eines fehlerhaften Gens funktioniert oder die ein Molekül codiert, das in dem Individuum eine therapeutische Wirkung hervorruft und mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäure-

molekül in der Lage ist, in den Zellen exprimiert zu werden.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein Nucleinsäuremolekül und einen Polynucleotidfunktionsenhancer umfassen.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft prophylaktische und therapeutische HIV-Impfstoffe, die einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel und ein Nucleinsäuremolekül umfassen, das ein oder mehrere Peptide codiert, die jeweils mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop identisch oder im wesentlichen ähnlich ist, das auf mindestens einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in menschlichen Zellen exprimiert zu werden.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft prophylaktische und therapeutische HIV-Impfstoffe, die zwei Impfstoffe umfassen. Der erste Impfstoff umfasst einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel und ein erstes Nucleinsäuremolekül. Das erste Nucleinsäuremolekül umfasst eine Nucleotidsequenz, die ein oder mehrere Peptide codiert, die jeweils mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop identisch oder im wesentlichen ähnlich ist, das auf mindestens einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist; wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in menschlichen Zellen exprimiert zu werden. Der zweite Impfstoff umfasst einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel und ein zweites Nucleinsäuremolekül. Das zweite Nucleinsäuremolekül umfasst eine Nucleotidsequenz, die ein oder mehrere Peptide codiert, die jeweils mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop identisch oder im wesentlichen ähnlich ist, das auf mindestens einem HIV-Protein zu sehen ist, das mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist; wobei das Nucleinsäuremolekül in der Lage ist, in menschlichen Zellen exprimiert zu werden. Das erste und zweite Nucleinsäuremolekül sind von einander verschieden und codieren verschiedene Peptide.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0018] Fig. 1A ist ein Diagramm, das den Aufbau des Plasmids pM160 zeigt, das durch Inserieren eines PCR-generierten Fragments, das das HIV-HXB2-Glycoprotein gp160 codiert, in das Plasmid pMAMneoBlue (Clonetech) erzeugt wurde.

[0019] Fig. 1B ist eine Fotografie eines Autoradiogramms eines Western-Blots ganzer Zelllysate von Zellen, die mit dem Plasmid pM160 (3G7 Zellen) transfiziert wurden, gegenüber Zellen, die nur Vektor-transfiziert wurden, die die Produktion von gp120 und gp41 in 3G7-Zellen und nicht in TE671-Zellen aufweisen.

[0020] Fig. 2 ist eine Fotografie eines Autoradiogramms und zeigt Immunfällungen von Serum-Antikörpern, die an ^{125}I-gp160 binden.

[0021] Die Fig. 3A – Fig. 3E sind Graphen, die die ELISA-Ergebnisse zeigen, die verschiedene Seren an verschiedene, auf Mikrotiterplatten immobilisierte Proteine binden.

[0022] Die Fig. 4A und Fig. 4B sind Fotografien von MT-2 Zellen die mit dem zellfreien Virus $TCID_{50}$HIV-1/III_B infiziert sind, das mit seriellen Verdünnungen von Antiserien vorinkubiert wurde.

[0023] Fig. 4C ist ein Graph, der die Neutralisationswerte (V_n/V_0) gegenüber den Verdünnungsfaktoren aus den Ergebnissen unter Verwendung von Kontrollserum (x = pMAMneoBlue-Vektor-immunisierte Mäuse) und Testseren (0 = pM160-immunisierte Mäuse), erläutert.

[0024] Die Fig. 4D – Fig. 4G sind Fotografien von H9/III_B-Zellen, die in Experimenten zur Überprüfung der synzytialen Hemmung unter Verwendung von Seren aus immunisierten Tieren und Kontrolltieren verwendet werden.

[0025] Fig. 5 ist ein Schaubild, das das Überleben von immunisierten und nicht immunisierten Mäusen zeigt, die mit HIV-gp160-markierten und unmarkierten Tumorzellen provoziert wurden. Die Mäuse wurden mit rekombinantem gp160-Protein, nur mit Vektor-DNA oder mit rekombinantem Vektor, der DNA, die gp160 codiert, umfasst, immunisiert. SP2/0-Tumorzellen oder SP2/0-gp160 (SP2/0 Zellen, transfiziert mit DNA, die gp160 codiert und gp160 exprimiert)-Tumorzellen wurden in die Mäuse eingeschleust.

[0026] Fig. 6 ist eine Plasmidkarte von pGAGPOL.rev.

[0027] Fig. 7 ist eine Plasmidkarte von pENV.

[0028] **Fig.** 8 zeigt die vier Hauptketten A, B, C und D, die zur Herstellung eines genetischen Konstrukts verwendet werden.

[0029] Fig. 9 zeigt vier Inserts, 1, 2, 3 und 4, die zur Erzeugung von genetischen Konstrukten in Hauptketten inseriert wurden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen zur Verwendung bei einem Verfahren zum Einschleusen von Nucleinsäuremolekülen in die Zellen eines Tiers, das das hohe Aufnahme- und Funktionsniveau der Nucleinsäuremoleküle liefert. Das Verfahren umfasst die Schritte des Verabreichens von Nucleinsäuremolekülen, die frei sind von viralen Partikeln, insbesondere von retroviralen Partikeln, an die Zellen eines Individuums in Verbindung mit der Verabreichung eines Co-Agens, das die Entzündungsreaktion und/oder die Expression des Nucleinsäuremoleküls in dem Gewebe verstärkt und/oder die Aufnahme des Nucleinsäuremoleküls durch die Zelle erleichtert. Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen Verfahren der Abgabe von Nucleinsäuremolekülen an Zellen eines Individuums ohne die Verwendung von infektiösen Mitteln bereit.

[0031] Nucleinsäuremoleküle, die erfindungsgemäß an Zellen abgegeben werden, können dienen als: 1) genetische Template für Proteine, die als prophylaktische und/oder therapeutische Immunisierungsmittel dienen; 2) Ersatzkopien für fehlerhafte, fehlende oder nicht funktionierende Gene; 3) genetische Template für therapeutische Proteine; 4) genetische Template für Antisense-Moleküle; oder 5) genetische Template für Ribozyme. Im Falle von Nucleinsäuremolekülen, die Proteine codieren, umfassen die Nucleinsäuremoleküle vorzugsweise die notwendigen regulatorischen Sequenzen zur Transcription oder Translation in den Zellen eines Tieres. Im Falle von Nucleinsäuremolekülen, die als Template für Antisense-Moleküle und Ribozyme dienen, sind solche Nucleinsäuremoleküle vorzugsweise mit regulatorischen Elementen verknüpft, die zur Produktion von genug Kopien der Antisense- bzw. Ribozym-Moleküle, die dadurch codiert werden, notwendig sind. Die Nucleinsäuremoleküle sind frei von retroviralen Partikeln und werden vorzugsweise als DNA in Form von Plasmiden bereitgestellt.

[0032] Das Co-Agens wird ebenfalls hier als "Polynucleotidfunktionsenhancer" oder "PFE" bezeichnet. Ein PFE ist eine Verbindung oder eine Zusammensetzung, die die Entzündungsreaktion und/oder die Expression des Nucleinsäuremoleküls in dem Gewebe verstärkt und/oder die Aufnahme des Nucleinsäuremoleküls durch die Zelle erleichtert und besitzt vorzugsweise mehr als eine dieser Eigenschaften. Polynucleotidfunktionsenhancer, die die DNA- und RNA-Aufnahme durch die Zellen erleichtern und die Zellteilung und Zellreplikation stimulieren, werden ebenfalls als zellstimulierende Mittel bezeichnet. Bevorzugte erfindungsgemäße Co-Agentien sind aus der Gruppe ausgewählt, die aus Benzoesäureestern und Aniliden besteht. Bei bevorzugten Ausführungsformen ist der PFE Bupivacain.

[0033] Nach einigen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Zusammensetzungen und Verfahren bereitgestellt, die prophylaktisch und/oder therapeutisch ein Individuum gegen ein Pathogen oder eine abnorme, mit Krankheit zusammenhängende Zelle immunisieren. Das genetische Material codiert ein Peptid oder Protein, das sich mit einem immunogenen Protein, das auf dem Pathogen oder auf den Ziel-Zellen, festgestellt wird, mindestens ein Epitop teilt. Das genetische Material wird durch die Zellen des Individuums exprimiert und dient als immunogenes Ziel, gegen das eine Immunantwort hervorgerufen wird. Die resultierende Immunantwort hat eine breite Basis: Zusätzlich zu einer humoralen Immunantwort werden beide Arme der zellulären Immunantwort ausgelöst. Die Verfahren sind zur Übertragung von prophylaktischer und therapeutischer Immunität geeignet. Somit umfasst ein Verfahren zur Immunisierung sowohl Verfahren zum Schutz eines Individuums vor einer Pathogen-Provokation oder vor dem Auftreten oder der Proliferation von spezifischen Zellen als auch Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das an einer Pathogen-Infektion, einer hyperproliferativen Erkrankung oder einer Autoimmunerkrankung leidet.

[0034] Die vorliegende Erfindung ist zur Auslösung von breiten Immunantworten gegen ein Zielprotein, d.h. Proteine, die spezifisch mit Pathogenen oder den Individuum-eigenen "abnormen" Zellen assoziiert sind, geeignet. Die vorliegende Erfindung ist zur Immunisierung von Individuen gegen pathogene Mittel und Organismen geeignet, derart, dass eine Immunantwort gegen ein pathogenes Protein eine protektive Immunität gegen das Pathogen bereitstellt. Die vorliegende Erfindung ist zur Bekämpfung von hyperproliferativen Krankheiten und Störungen, wie Krebs, durch Auslösen einer Immunantwort gegen ein Zielprotein, das mit den hyperproli-

ferativen Zellen spezifisch assoziiert ist, geeignet. Die vorliegende Erfindung ist zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen und Störungen durch Auslösen einer Immunantwort gegen ein Zielprotein, das mit Zellen, die an dem autoimmunen Zustand beteiligt sind, spezifisch assoziiert ist, geeignet.

[0035] Einige Aspekte der vorliegenden Erfindung betreffen die Gentherapie; d.h. Zusammensetzungen zur Verwendung bei Verfahren zum Einschleusen von Nucleinsäuremolekülen in die Zellen einer individuellen exogenen Kopie von Genen, die entweder fehlerhaften, fehlenden, nicht funktionierenden oder teilweise funktionierenden Genen in dem Individuum entspricht oder die therapeutische Proteine codiert, d.h. Proteine, deren Gegenwart in dem Individuum einen Defekt in dem Individuum beseitigt und/oder deren Gegenwart eine therapeutische Wirkung an dem Individuum bereitstellt und dadurch ein Mittel zur Abgabe des Proteins durch ein zu der Proteinverabreichung alternatives Mittel bereitstellt.

[0036] Wie hier verwendet, soll sich der Begriff "gewünschtes Protein" auf Peptide und Proteine beziehen, die von erfindungsgemäßen Genkonstrukten codiert werden, die entweder als Zielproteine für eine Immunantwort oder als therapeutische oder kompensatorische Proteine bei gentherapeutischen Vorschriften dienen.

[0037] Erfindungsgemäß wird DNA oder RNA, die ein gewünschtes Protein codiert, in die Zellen eines Individuums eingeschleust, wo sie exprimiert wird und so das gewünschte Protein erzeugt. Die DNA oder RNA, die das gewünschte Protein codiert, ist mit regulatorischen Elementen verknüpft, die zur Expression in den Zellen des Individuums notwendig sind. Die regulatorischen Elemente für die DNA-Expression umfassen einen Promotor und ein Polyadenylierungssignal. Zusätzlich können auch andere Elemente, wie eine Kozak-Region, in das genetische Konstrukt eingeschlossen sein.

[0038] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "genetisches Konstrukt" auf das DNA- oder RNA-Molekül, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die das gewünschte Protein codiert und die Initiations- und Terminationssignale einschließt, die mit den regulatorischen Elementen, einschließlich Promotor und Polyadenylierungssignal, die in der Lage sind, die Expression in den Zellen des geimpften Individuums zu steuern, zweckorientiert verknüpft sind.

[0039] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "exprimierbare Form" auf Genkonstrukte, die die notwendigen regulatorischen Elemente enthalten, die mit einer codierenden Sequenz zweckorientiert verknüpft sind, die ein Zielprotein codiert, derart, dass bei Gegenwart in der Zelle des Individuums die codierende Sequenz exprimiert wird.

[0040] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "genetischer Impfstoff" auf eine pharmazeutische Formulierung, die ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Zielprotein codiert, einschließlich von pharmazeutischen Formulierungen, die zur Auslösung einer therapeutischen Immunantwort geeignet sind.

[0041] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "genetisches Therapeutikum" auf eine pharmazeutische Formulierung, die ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein therapeutisches oder ein kompensatorisches Protein codiert.

[0042] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "Zielprotein" auf ein Protein, gegen das eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Das Zielprotein ist ein immunogenes Protein, das sich mindestens ein Epitop mit einem Protein aus dem Pathogen oder dem unerwünschten Zelltyp, wie eine Krebszelle oder eine Zelle, die an einer Autoimmunerkrankung beteiligt ist, gegen die die Immunisierung erforderlich ist, teilt. Die Immunantwort, die gegen das Zielprotein gerichtet ist, schützt das Individuum gegen die spezielle Infektion oder Krankheit, mit der das Zielprotein assoziiert ist, und behandelt es dagegen.

[0043] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "sich ein Epitop teilen" auf Proteine, die mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop eines anderen Proteins identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist.

[0044] Wie hier verwendet, soll sich der Begriff "im wesentlichen ähnliches Epitop" auf ein Epitop beziehen, das eine Struktur aufweist, die nicht identisch ist zu einem Epitop eines Proteins, aber dennoch eine zelluläre oder humorale Immunantwort auslöst, die mit diesem Protein kreuzreagiert.

[0045] Wie hier verwendet, soll der Begriff "therapeutisches Protein" Proteine bezeichnen, deren Gegenwart dem Individuum einen therapeutischen Vorteil verschafft.

[0046] Wie hier verwendet, soll der Begriff "kompensatorisches Protein" Proteine bezeichnen, deren Gegenwart die Abwesenheit eines vollständig funktionierenden endogen erzeugten Proteins auf Grund eines fehlenden, fehlerhaften, nicht funktionierenden oder teilweise funktionierenden endogenen Gens ausgleicht.

[0047] Genetische Konstrukte umfassen eine Nucleotidsequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, das mit für die Genexpression benötigten regulatorischen Elementen zweckorientiert verknüpft. Demnach führt das Einschleusen des DNA- oder RNA-Moleküls in eine lebende Zelle zur Expression der DNA oder RNA, die das gewünschte Protein codiert, und somit zur Produktion des gewünschten Proteins.

[0048] Bei der Aufnahme durch eine Zelle kann das genetische Konstrukt, das die Nucleotidsequenz umfasst, die das gewünschte Protein codiert, das mit den regulatorischen Elementen zweckorientiert verknüpft ist, in der Zelle als funktionierendes extrachromosomales Molekül verbleiben, oder es kann in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut werden. DNA kann in Zellen eingeschleust werden, wo sie in Form eines Plasmids als getrenntes genetisches Material verbleibt. Alternativ kann lineare DNA, die sich in das Chromosom integrieren kann, in die Zelle eingeschleust werden. Beim Einschleusen von DNA in die Zellen können Reagentien, die den DNA-Einbau in Chromosomen beschleunigen, zugesetzt werden. DNA-Sequenzen, die zur Beschleunigung des Einbaus geeignet sind, können auch in dem DNA-Molekül eingeschlossen sein. Alternativ kann an die Zelle RNA verabreicht werden. Betrachtet wird auch die Bereitstellung des genetischen Konstrukts als lineares Minichromosom, einschließlich von einem Centromer, von Telomeren und einem Replikationsursprung.

[0049] Das Molekül, das ein gewünschtes Protein codiert, kann DNA oder RNA sein, die eine Nucleotidsequenz umfasst, die das gewünschte Protein codiert. Diese Moleküle können cDNA, genomische DNA, synthetisierte DNA oder ein Hybrid davon oder ein RNA-Molekül, wie mRNA, sein. Demnach sollen, wie hier verwendet, die Begriffe "DNA-Konstrukt", "genetisches Konstrukt" und "Nucleotidsequenz" sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle bezeichnen.

[0050] Die regulatorischen Elemente, die für die Genexpression eines DNA-Moleküls notwendig sind, umfassen: einen Promotor, ein Startcodon, ein Stoppcodon und ein Polyadenylierungssignal. Zusätzlich sind für die Genexpression oft Enhancer erforderlich. Es ist notwendig, dass diese Elemente mit der Sequenz zweckorientiert verknüpft sind, die die gewünschten Proteine codiert, und dass die regulatorischen Elemente in dem Individuum, dem sie verabreicht werden, funktionsfähig sind.

[0051] Startcodons und Stoppcodon werden im Allgemeinen als Teil einer Nucleotidsequenz betrachtet, die das gewünschte Protein codiert. Allerdings ist es notwendig, dass diese Elemente in dem Individuum, an das das Genkonstrukt verabreicht wird, funktionsfähig sind. Start- und Stoppcodon müssen mit der codierenden Sequenz im Raster sein.

[0052] Die verwendeten Promotoren und Polyadenylierungssignale müssen in den Zellen des Individuums funktionsfähig sein.

[0053] Beispiele für Promotoren, die bei der Praxis der vorliegenden Erfindung geeignet sind, insbesondere bei der Herstellung eines genetischen Impfstoffs für Menschen, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Promotoren aus dem Simianvirus 40 (SV40), Maus-Mammary Tumorvirus (MMTV)-Promotor, Human Immunodificiency Virus (HIV), wie HIV Long Terminal Repeat (LTR)-Promotor, Moloney-Virus, ALV, Zytomegalie-Virus (CMV), wie der unmittelbare frühe CMV-Promotor, Epstein-Barr-Virus (EBV), Rous-Sarcom-Virus (RSV) sowie Promotoren aus menschlichen Genen, wie menschliches Actin, menschliches Myosin, menschliches Hämoglobin, menschliches Muskelcreatin und menschliches Metallothionein.

[0054] Beispiele für Polyadenylierungssignale, die in der Praxis der vorliegenden Erfindung, insbesondere bei der Herstellung eines genetischen Impfstoffs für Menschen geeignet sind, umfassen die SV40-Polyadenylierungssignale und LTR-Polyadenylierungssignale, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Insbesondere das SV40-Polyadenylierungssignal, das sich in dem Plasmid pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) befindet und das als SV40-Polyadenylierungssignal bezeichnet wird, wird verwendet.

[0055] Zusätzlich zu den für die DNA-Expression erforderlichen regulatorischen Elementen können in dem DNA-Molekül auch andere Elemente eingeschlossen sein. Solche zusätzlichen Elemente umfassen Enhancer. Der Enhancer kann aus der Gruppe ausgewählt werden, einschließlich von: menschlichem Actin, menschlichem Myocin, menschlichem Hämoglobin, menschlichem Muskelcreatin und viralen Enhancern, wie diejenigen aus CMV, RSV und EBV, ist jedoch nicht darauf beschränkt.

[0056] Die genetischen Konstrukte können mit einem Säuger-Replikationsursprung bereitgestellt werden, um das Konstrukt extrachromosomal aufrecht zu erhalten und um mehrere Kopien des Konstrukts in der Zelle zu erzeugen. Die Plasmide pCEP4 und pREP4 von Invitrogen (San Diego, CA) enthalten den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung und die nukleäre Antigen- codierenden Region EBNA-1, die episomale Replikation in hoher Kopienzahl ohne Integration erzeugt.

[0057] Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen wird der verwendete Vektor aus denjenigen ausgewählt, die in Beispiel 46 beschrieben sind. Bei den Aspekten der Erfindung, die die Gentherapie betreffen, sind Konstrukte mit Replikationsursprüngen, die das zur Aktivierung notwendige Antigen einschließen, bevorzugt.

[0058] Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen, die die Immunisierungsanwendungen betreffen, enthält das genetische Konstrukt Nucleotidsequenzen, die ein Zielprotein codieren und außerdem Gene für Proteine umfassen, die die Immunantwort gegen solche Zielproteine verstärken. Beispiele für solche Gene sind diejenigen, die Cytokine und Lymphokine codieren, wie α-Interferon, γ-Interferon, platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass das Gen für GM-CSF in genetischen Konstrukten eingeschlossen ist, die bei Immunisierungszusammensetzungen verwendet werden.

[0059] Es kann ein zusätzliches Element hinzugefügt werden, das als Ziel für die Zellzerstörung dient, wenn die Beseitigung von Zellen erwünscht ist, die aus irgendeinem Grund das genetische Konstrukt aufnehmen. Ein Herpes-Thymidin-Kinase (TK)-Gen in einer exprimierbaren Form kann in das genetische Konstrukt eingeschlossen sein. Dem Individuum kann das Arzneimittel Gangcyclovir verabreicht werden, und dieses Arzneimittel verursacht die selektive Abtötung einer Zelle, die tk produziert, und stellt somit das Mittel zur selektiven Zerstörung von Zellen mit dem genetischen Konstrukt bereit.

[0060] Zur Maximierung der Proteinproduktion können regulatorische Sequenzen gewählt werden, die für die Genexpression in den Zellen gut geeignet sind, in die das Konstrukt verabreicht wird. Ferner können Codons gewählt werden, die in der Zelle besonders effizient transcribiert werden. Ein Fachmann kann DNA-Konstrukte herstellen, die in den Zellen funktionsfähig sind.

[0061] Zum Testen der Expression können genetische Konstrukte in vitro unter Verwendung von Gewebekultur von Zellen des gleichen Typs wie diejenigen, die zu verabreichen sind, auf die Expressionsniveaus getestet werden. Wenn der genetische Impfstoff beispielsweise in menschliche Muskelzellen verabreicht werden soll, können in Kultur gezüchtete Muskelzellen, wie solide Muskeltumorzellen von Rhabdomyosarcom, als in vitro Modell zum Messen des Expressionsniveaus verwendet werden.

[0062] Die bei der vorliegenden Erfindung eingesetzten genetischen Konstrukte sind nicht in retrovirale Partikel eingearbeitet. Die genetischen Konstrukte werden von der Zelle ohne Retroviruspartikel-vermittelte Insertion aufgenommen, wie diejenige, die auftritt, wenn retrovirale Partikel eine Zelle mit in die retroviralen Partikel eingebauter retroviraler RNA infizieren. Wie hier verwendet, soll sich der Begriff "frei von retroviralen Partikeln" auf genetische Konstrukte beziehen, die nicht in retrovirale Partikel eingebaut sind. Wie hier verwendet, soll "dissoziiert aus einem infektiösen Mittel" genetisches Material bezeichnen, das nicht Teil eines viralen, bakteriellen oder eukariotischen Vektors ist, entweder aktiv, inaktiviert, lebend oder tot, der in der Lage ist, eine Zelle zu infizieren.

[0063] Bei einigen Ausführungsformen bauen die genetischen Konstrukte weniger als ein komplettes replizierbares virales Genom auf, derart, dass das genetische Konstrukt beim Einbau in die Zelle eine unzureichende genetische Information besitzt, um die Produktion von infektiösen viralen Partikeln zu steuern. Wie hier verwendet, soll der Begriff "unvollständiges virales Genom" ein genetisches Konstrukt bezeichnen, das weniger als ein komplettes Genom enthält, derart, dass der Einbau eines solchen genetischen Konstrukts in eine Zelle keine Einschleusung von genug genetischer Information zur Produktion eines infektiösen Virus bedeutet.

[0064] Bei einigen Ausführungsformen kann ein abgeschwächter viraler Impfstoff als genetisches Konstrukt abgegeben werden, das genügend genetisches Material enthält, damit die Produktion von viralen Partikeln möglich ist. Die Abgabe des abgeschwächten Impfstoffs als genetisches Konstrukt ermöglicht einen leichteren Weg zur Herstellung großer Mengen von sicherem reinem aktivem Immunisierungsprodukt.

[0065] Das genetische Konstrukt kann mit oder ohne Verwendung von Mikroprojektilen verabreicht werden. Es ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen genetischen Konstrukte an Zellen eines Individuums frei von soliden Partikeln verabreicht werden. Wie hier verwendet, soll der Begriff "frei von soliden Partikeln" eine Flüs-

sigkeit bezeichnen, die kein festes Mikroprojektil enthält, das als Mittel zur Perforierung, Punktierung oder zum anderweitigen Durchstechen der Zellmembran einer Zelle verwendet wird, um dem genetischen Material eine Eintrittsöffnung in die Zelle zu verschaffen.

[0066] Die vorliegende Erfindung kann zur Immunisierung eines Individuums gegen sämtliche Pathogene, wie Viren, prokariotische und eukariotische pathogene Organismen, wie einzellige pathogene Organismen und mehrzellige Parasiten verwendet werden. Die vorliegende Erfindung ist besonders geeignet zur Immunisierung eines Individuums gegen diejenigen Pathogene, die Zellen infizieren und die nicht eingekapselt sind, wie Viren, und Prokarioten, wie Gonorrhoe, Listeria und Shigellen. Zusätzlich ist die Erfindung auch zur Immunisierung eines Individuums gegen protozoische Pathogene geeignet, die ein Stadium im Lebenscyclus einschließen, während sie intrazelluläre Pathogene sind. Wie hier verwendet, soll der Begriff "intrazelluläres Pathogen" ein Virus oder einen pathogenen Organismus bezeichnen, der für mindestens einen Teil seines Reproduktions- oder Lebenscyclus in einer Wirtszelle existiert und darin die Erzeugung pathogener Proteine veranlasst. Tabelle 1 stellt eine Auflistung von einigen der Virusfamilien und Gattungen bereit, für die erfindungsgemäße Impfstoffe hergestellt werden können. DNA-Konstrukte, die DNA-Sequenzen umfassen, die die Peptide codieren, die mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, das auf einem pathogenen Antigen zu sehen ist, wie diejenigen Antigene, die in den Tabellen aufgeführt sind, sind in Impfstoffen geeignet. Ferner ist die vorliegende Erfindung auch zur Immunisierung eines Individuums gegen andere Pathogene geeignet, einschließlich von prokariotischen und eukariotischen protozoischen Pathogenen sowie mehrzelligen Parasiten, wie diejenigen, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

[0067] Zur Herstellung eines genetischen Impfstoffs zum Schutz gegen eine Pathogen-Infektion muss genetisches Material, das immunogene Proteine codiert, gegen die eine protektive Immunantwort herbeigeführt werden kann, in dem genetischen Konstrukt eingeschlossen sein. Gleich ob das Pathogen intrazellulär infiziert, wofür die vorliegende Erfindung besonders geeignet ist, oder ob es extrazellulär infiziert, ist es unwahrscheinlich, dass sämtliche pathogenen Antigene eine protektive Reaktion hervorrufen. Da sowohl DNA als auch RNA relativ klein sind und relativ leicht hergestellt werden können, stellt die vorliegende Erfindung den zusätzlichen Vorteil bereit, dass die Impfung mit mehreren pathogenen Antigenen möglich ist. Das genetische Konstrukt, das in dem genetischen Impfstoff verwendet wird, kann genetisches Material umfassen, das viele pathogene Antigene codiert. Beispielsweise können mehrere virale Gene in einem einzigen Konstrukt eingeschlossen sein und stellen dadurch mehrere Ziele bereit. Zusätzlich können mehrere Impfstoffe, die an verschiedene Zellen in einem Individuum abgegeben werden können, hergestellt werden, um in einigen Fällen kollektiv eine vollständige oder stärker bevorzugt eine unvollständige, wie eine nahezu vollständige, Serie von Genen in dem Impfstoff einzuschließen. Beispielsweise kann eine vollständige Serie von Virusgenen unter Verwendung von zwei Konstrukten verabreicht werden, die jeweils eine unterschiedliche Hälfte des Genoms enthalten, die an verschiedenen Stellen verabreicht werden. Somit kann eine Immunantwort gegen jedes Antigen ohne das Risiko hervorgerufen werden, dass ein infektiöses Virus zusammengebaut wird. Dies ermöglicht das Einbringen von mehr als einem einzigen Antigenziel und kann die Anforderung beseitigen, dass die protektiven Antigene festgelegt werden.

[0068] Die leichte Handhabung und kostengünstige Natur von DNA und RNA ermöglicht ferner ein wirksameres Mittel zum Screening auf protektive Gene. Gene können viel leichter als Proteine sortiert und systematisch getestet werden. Die pathogenen Mittel und Organismen, für die der Impfstoff hergestellt wird, um dagegen zu schützen, werden gewählt, und ein immunogenes Protein wird festgelegt. Die Tabellen 1 und 2 umfassen Listen für einige der pathogenen Mittel und Organismen, für die die genetischen Impfstoffe hergestellt werden können, um ein Individuum vor einer Infektion durch sie zu schützen. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen sind die Verfahren der Immunisierung eines Individuums gegen ein Pathogen auf HIV, HTLV oder HBV gerichtet.

[0069] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zum Verleihen einer protektiven breitbasigen Immunantwort gegen hyperproliferierende Zellen, die bei hyperproliferativen Krankheiten charakteristisch sind, und ein Verfahren zur Behandlung von Individuen, die an hyperproliferativen Krankheiten leiden, bereit. Wie hier verwendet, soll der Begriff "hyperproliferative Krankheiten" diejenigen Krankheiten und Störungen bezeichnen, die durch Hyperproliferation von Zellen gekennzeichnet sind. Beispiele für hyperproliferative Krankheiten umfassen sämtliche Formen von Krebs und Psoriasis.

[0070] Es wurde festgestellt, dass das Einschleusen eines genetischen Konstrukts, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein immunogenes, mit "hyperproliferierenden Zellen" assoziiertes Protein codiert, in die Zellen eines Individuums zur Produktion dieser Proteine in den geimpften Zellen eines Individuums führt. Wie hier verwendet, soll der Begriff "Hyperproliferations-assoziiertes Protein" Proteine bezeichnen, die mit einer hyper-

proliferativen Krankheit zusammenhängen. Zur Immunisierung gegen hyperproliferative Krankheiten wird ein genetisches Konstrukt, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein codiert, das mit einer hyperproliferativen Krankheit zusammenhängt, an ein Individuum verabreicht.

[0071] Damit das Hyperproliferations-assoziierte Protein ein wirksames immunogenes Ziel darstellt, muss es ein Protein sein, das im Vergleich zu normalen Zellen in den hyperproliferativen Zellen ausschließlich oder auf höheren Niveaus produziert wird. Die Ziel-Antigene umfassen solche Proteine, Fragmente davon und Peptide, die mindestens ein Epitop umfassen, das auf solchen Proteinen festgestellt wird. In einigen Zellen ist ein Hyperproliferations-assoziiertes Protein das Produkt einer Mutation eines Gens, das ein Protein codiert. Das mutierte Gen codiert ein Protein, das zu dem normalen Protein nahezu identisch ist, mit der Ausnahme, dass es eine leicht verschiedene Aminosäuresequenz aufweist, die ein unterschiedliches nicht in dem normalen Protein festgestelltes Epitop ergibt. Solche Zielproteine umfassen diejenigen, die von Onkogenen codierte Proteine sind, wie myb, myc, fyn, und das Translocationsgen bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk und EGRF. Zusätzlich zu den Onkogenprodukten als Zielantigene umfassen die Zielproteine für Antikrebsbehandlungen und für protektive Behandlungsvorschriften variable Regionen von Antikörpern, die von T-Zellen-Lymphomen produziert werden, und variable Regionen von T-Zellen-Rezeptoren von T-Zellen-Lymphomen, die, bei einigen Ausführungsformen, ebenfalls als Zielantigene für Autoimmunerkrankungen verwendet werden. Weitere Tumor-assoziierte Proteine können als Zielproteine verwendet werden, wie Proteine, die in höheren Konzentrationen in Tumorzellen festgestellt werden, einschließlich des Proteins, das von dem monoklonalen Antikörper 17-1A erkannt wird, und der Folat-Bindungsproteine.

[0072] Obgleich die vorliegende Erfindung zur Immunisierung eines Individuums gegen eine oder mehrere von verschiedenen Formen von Krebs verwendet werden kann, ist die vorliegende Erfindung besonders zur prophylaktischen Immunisierung eines Individuums geeignet, das zur Entwicklung eines bestimmten Krebses prädisponiert ist oder das bereits Krebs hatte und darum für einen Rückfall empfindlich ist. Die Entwicklungen in der Gentechnologie sowie in der Epidemiologie gestatten die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit und die Risikobewertung zur Entwicklung von Krebs bei einem Individuum. Unter Anwendung des genetischen Screenings und/oder der familiären Gesundheitshistorien ist die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit möglich, die bei einem bestimmten Individuum zur Entwicklung von mehreren Typen von Krebs besteht.

[0073] Gleichermaßen sind diejenigen Individuen, die bereits Krebs entwickelt haben und die bereits zur Entfernung des Krebses behandelt worden sind oder die sich anderweitig in Remission befinden, gegenüber einem Rückfall und einem Wiederauftreten besonders empfindlich. Als Teil einer Behandlungsvorschrift können solche Individuen gegen den Krebs immunisiert werden, der bei ihnen bereits früher diagnostiziert wurde, um ein Wiederauftreten zu bekämpfen. Somit können sie, nachdem bekannt ist, dass ein Individuum einen Typ von Krebs gehabt hat und bei ihm das Risiko eines Rückfalls besteht, immunisiert werden, um sein Immunsystem auf die Bekämpfung eines zukünftigen Auftretens des Krebses vorzubereiten.

[0074] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen zur Behandlung von Individuen bereit, die an hyperproliferativen Krankheiten leiden. Die Einschleusung von genetischen Konstrukten dient als eine Immuntherapie, die das Immunsystem des Individuums steuert und beschleunigt, um hyperproliferative Zellen zu bekämpfen, die das Zielprotein produzieren.

[0075] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen zur Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung von Individuen, die an Autoimmunkrankheiten und Störungen leiden, durch Übertragen einer breitbasigen protektiven Immunantwort gegen Ziele, die mit Autoimmunität zusammenhängen, einschließlich von Zellrezeptoren und Zellen, die "gegen sich selbst"-gerichtete Antikörper produzieren, bereit.

[0076] Die T-Zellen-vermittelten Autoimmunkrankheiten umfassen rheumatoide Arthritis (RA), Multiple Sklerose (MS), Sjogren Syndrom, Sarkoidose, Insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM), autoimmune Thyroiditis, reaktive Arthritis, Spondylarthritis, Sklerodermie, Polymyositis, Dermatomyositis, Psoriasis, Vaskulitis, Wegener-Granulomatose, Morbus Crohn und ulzerative Colitis. Jede dieser Krankheiten ist durch T-Zellen-Rezeptoren gekennzeichnet, die an endogene Antigene binden und die mit Autoimmunkrankheiten zusammenhängende Entzündungskaskade auslösen. Die Impfung gegen die variable Region der T-Zellen würde eine Immunantwort, einschließlich CTLs, auslösen, um diese T-Zellen zu beseitigen.

[0077] Bei RA wurden mehrere spezifische variable Regionen von T-Zellen-Rezeptoren (TCRs), die an der Krankheit beteiligt sind, charakterisiert. Diese TCRs umfassen Vβ-3, Vβ-14, Vβ-17 und Vα-17. Somit löst eine Impfung mit einem DNA-Konstrukt, das mindestens eines dieser Proteine codiert, eine Immunantwort aus, die auf T-Zellen gerichtet ist, die an RA beteiligt sind. Siehe: Howell, M.D., et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA

88:10921–10925; Paliard, X., et al., 1991 Science 253:325–329; Williams, W.V., et al., 1992 J. Clin. Invest. 90:326–333, die jeweils hier durch Bezugnahme eingeschlossen sind.

[0078] Bei MS wurden mehrere spezifische variable Regionen von an der Krankheit beteiligten TCRs charakterisiert. Diese TCRs umfassen Vβ-7 und Vα-10. Somit löst eine Impfung mit einem DNA-Konstrukt, das mindestens eines dieser Proteine codiert, eine Immunantwort aus, die gegen T-Zellen gerichtet ist, die an MS beteiligt sind. Siehe: Wucherpfennig, K.W., et al., 1990 Science 248:1016–1019; Oksenberg, J.R., et al., 1990 Nature 345:344–346; die jeweils durch Bezugnahme eingeschlossen sind.

[0079] Bei Sklerodermie wurden mehrere spezifische variable Regionen von an der Krankheit beteiligten TCRs charakterisiert. Diese TCRs umfassen Vβ-6, Vβ-8, Vβ-14 und Vα-16, Vα-3C, Vα-7, Vα-14, Vα-15, Vα-16, Vα-28 und Vα-12. Somit löst die Impfung mit einem DNA-Konstrukt, das mindestens eines dieser Proteine codiert, eine Immunantwort aus, die gegen T-Zellen gerichtet ist, die an Sklerodermie beteiligt sind.

[0080] Um Patienten zu behandeln, die an einer T-Zellen-vermittelten Autoimmunerkrankung leiden, insbesondere diejenigen, für die die variable Region des TCR noch nicht charakterisiert wurde, kann eine Synovialbiopsie durchgeführt werden. Es können Proben der vorhandenen T-Zellen genommen und die variable Region dieser TCRs unter Anwendung von Standardtechnik identifiziert werden. Unter Anwendung dieser Information können genetische Impfstoffe hergestellt werden.

[0081] B-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheiten umfassen Lupus (SLE), Basedow-Krankheit, Myasthenia gravis, autoimmune hämolytische Anämie, autoimmune Thrombozytopenie, Asthma, Kryoglobulinämie, primäre Gallensklerose und perniziöse Anämie. Jede von diesen Krankheiten ist durch Antikörper gekennzeichnet, die an endogene Antigene binden und die Entzündungskaskade auslösen, die mit den Autoimmunkrankheiten assoziiert ist. Die Impfung gegen die variable Region der Antikörper löst eine Immunantwort, einschließlich CTLs, aus, um diejenigen B-Zellen zu beseitigen, die den Antikörper produzieren.

[0082] Um Patienten zu behandeln, die an einer B-Zellen vermittelten Autoimmunerkrankung leiden, muss die variable Region der Antikörper, die an der Autoimmunaktivität beteiligt sind, identifiziert werden. Es kann eine Biopsie durchgeführt werden, und Proben der an der Entzündungsstelle vorhandenen Antikörper können genommen werden. Die variable Region dieser Antikörper kann unter Anwendung von Standardtechniken identifiziert werden. Unter Anwendung dieser Information können genetische Impfstoffe hergestellt werden.

[0083] Im Falle von SLE wird angenommen, dass ein Antigen DNA ist. Somit können bei Patienten, die gegen SLE immunisiert werden sollen, ihre Seren auf Anti-DNA-Antikörper durchmustert werden, und es kann ein Impfstoff hergestellt werden, der DNA-Konstrukte umfasst, die die variable Region solcher in den Seren festgestellter Anti-DNA-Antikörper codieren.

[0084] Die üblichen Strukturmerkmale der variablen Regionen von sowohl TCRs als auch Antikörpern sind gut bekannt. Die DNA-Sequenz, die einen bestimmten TCR oder Antikörper codiert, kann im Allgemeinen unter Befolgung gut bekannter Verfahren, wie diejenigen, die bei Kabat, et al., 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda MD, durch Bezugnahme eingeschlossen, beschrieben sind, herausgefunden werden. Zusätzlich kann ein allgemeines Verfahren zum Klonieren funktioneller funktionsfähiger variabler Regionen aus Antikörpern bei Chaudhary, V.K. et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066, durch Bezugnahme eingeschlossen, gefunden werden.

[0085] Bei einigen der Ausführungsformen der Erfindung, die die Gentherapie betreffen, enthalten die Genkonstrukte entweder kompensatorische Gene oder Gene, die therapeutische Proteine codieren. Beispiele für kompensatorische Gene umfassen ein Gen, das Dystrophin codiert, oder ein funktionelles Fragment, ein Gen zur Kompensation des fehlerhaften Gens in Patienten, die an zystischer Fibrose leiden, ein Insulin, ein Gen zur Kompensation des fehlerhaften Gens bei Patienten, die an ADA leiden, und ein Gen, das den Faktor VIII codiert. Beispiele für Gene, die therapeutische Proteine codieren, umfassen Gene, die Erythropoietin, Interferon, den LDL-Rezeptor, GM-CSF, IL-2, IL-4 und TNF codieren. Zusätzlich können genetische Konstrukte, die einkettige Antikörperkomponenten codieren, die spezifisch an toxische Substanzen binden, verabreicht werden.

[0086] Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das Dystrophin-Gen als Teil eines Mini-Gens vorgesehen und wird zur Behandlung von Individuen verwendet, die an Muskeldystrophie leiden. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen ist ein Mini-Gen vorgesehen, das die codierende Sequenz für ein partielles Dystrophin-Protein enthält. Dystrophin-Abnormitäten sind sowohl für die mildere Becker-Muskeldystrophie (BMD)

als auch für die schwere Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) verantwortlich. Bei der BMD wird Dystrophin hergestellt, allerdings ist es entweder in der Größe und/oder Menge anormal. Der Patient ist wenig bis mäßig schwach. Bei DMD wird kein Protein hergestellt, und der Patient ist im Alter von 13 Jahren an den Rollstuhl gefesselt und stirbt üblicherweise im Alter von 20 Jahren. Bei einigen Patienten, insbesondere bei denjenigen, die an BMD leiden, kann partielles Dystrophin-Protein, das durch Expression eines erfindungsgemäß abgegebenen Mini-Gens produziert werden, eine verbesserte Muskelfunktion bereitstellen.

[0087] Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen werden Gene, die IL-2, IL-4, Interferon oder TNF codieren, an Tumorzellen abgegeben, die entweder vorliegen oder entnommen und dann wieder in ein Individuum eingebracht werden. Bei einigen Ausführungsformen wird ein Gen, das γ-Interferon codiert, an ein Individuum verabreicht, das an multipler Sklerose leidet.

[0088] Auch Antisense-Moleküle und Ribozyme können durch Einschleusen genetischen Materials, das als Templat für Kopien solcher aktiver Mittel wirkt, an die Zellen eines Individuums abgegeben werden. Diese Mittel inaktivieren oder beeinflussen anderweitig die Expression von Genen, die Proteine codieren, deren Gegenwart unerwünscht ist. Konstrukte, die Sequenzen enthalten, die Antisense-Moleküle codieren, können zur Hemmung oder Verhinderung der Produktion von Proteinen in Zellen eingesetzt werden. Somit kann die Produktion von Proteinen, wie Onkogenprodukte, ausgeschaltet oder herabgesetzt werden. Gleichermaßen können Ribozyme die Genexpression durch selektives Zerstören von Messenger-RNA vor ihrer Translation zu Protein unterbinden. Bei einigen Ausführungsformen werden Zellen erfindungsgemäß unter Verwendung von Konstrukten, die Antisense-Moleküle oder Ribozyme codieren, als Teil einer Therapievorgabe, die die Verabreichung von anderen Therapeutika und Verfahrensweisen umfasst, behandelt. Genkonstrukte, die Antisense-Moleküle und Ribozyme codieren, verwenden ähnliche Vektoren wie diejenigen, die verwendet werden, wenn eine Proteinproduktion erwünscht ist, mit der Ausnahme, dass die codierende Sequenz kein Startcodon zur Initiation der Translation von RNA in Protein enthält. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass die in Beispiel 46 beschriebenen Vektoren, insbesondere diejenigen, die einen Replikationsursprung und eine exprimierbare Form des entsprechenden nukleären Antigens enthalten, verwendet werden.

[0089] Ribozyme sind katalytische RNAs, die zur Selbstspaltung oder zur Spaltung von einem anderen RNA-Molekül in der Lage sind. Mehrere verschiedene Typen von Ribozymen wie Hammerkopf, Haarnadel, Tetrahymena-Gruppe I-Intron, Axtkopf und RNase P, sind aus der Technik bekannt. (S. Edgington, Biotechnology 1992 10, 256–262). Hammerkopf-Ribozyme besitzen eine katalytische Stelle, die auf einen Kern von weniger als 40 Nucleotiden kartiert wurde. Mehrere Ribozyme in Pflanzenviroiden und Satelliten-RNAs teilen sich eine gemeinsame Sekundärstruktur und bestimmte konservierte Nucleotide. Obwohl diese Ribozyme natürlicherweise als ihr eigenes Substrat dienen, kann die Enzymdomäne auf ein anderes RNA-Substrat durch Basenpaarung mit Sequenzen, die die konservierte Spaltstelle flankieren, ausgerichtet werden. Durch diese Fähigkeit zur Maßanfertigung von Ribozymen ließen sie sich zur sequenzspezifischen RNA-Spaltung einsetzen. (G. Paolella et al., EMBO 1992, 1913–1919). Ein Fachmann besitzt darum das Können, verschiedene katalytische Sequenzen aus verschiedenen Typen von Ribozymen, wie die Hammerkopf-katalytische Sequenz, zu verwenden und sie auf die hier beschriebene Weise zu konstruieren. Ribozyme können für eine Vielzahl von Zielen konstruiert werden, einschließlich von pathogenen Nucleotidsequenzen und onkogenen Sequenzen. Bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung umfassen eine ausreichende Komplementarität zur spezifischen Ausrichtung auf das abl-bcr-Fusionstranscript, während die Wirksamkeit der Spaltungsreaktion beibehalten wird.

[0090] Erfindungsgemäß werden Zellen mit Verbindungen behandelt, die die Aufnahme genetischer Konstrukte durch die Zellen erleichtert. Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden die Zellen mit Verbindungen behandelt, die die Zellteilung stimulieren und die Aufnahme genetischer Konstrukte erleichtern. Die Verabreichung von Verbindungen, die die Aufnahme genetischer Konstrukte durch Zellen, einschließlich zellstimulierender Verbindungen, erleichtern, bewirkt eine wirksamere Immunantwort gegen das von dem genetischen Konstrukt codierten Zielprotein.

[0091] Nach einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das genetische Konstrukt an ein Individuum unter Verwendung einer nadellosen Injektionsvorrichtung verabreicht. Gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das genetische Konstrukt gleichzeitig an ein Individuum intradermal, subkutan und intramuskulär unter Verwendung einer nadellosen Injektionsvorrichtung verabreicht. Nadellose Injektionsvorrichtungen sind gut bekannt und weithin verfügbar. Ein Fachmann kann unter Befolgung der Lehren hierin nadellose Injektionsvorrichtungen verwenden, um genetisches Material an Zellen eines Individuums abzugeben. Nadellose Injektionsvorrichtungen sind zur Abgabe genetischen Materials an sämtliche Gewebe gut geeignet. Sie sind besonders zur Abgabe genetischen Materials an Haut- und Muskelzellen geeignet. Bei

einigen Ausführungsformen kann eine nadellose Injektionsvorrichtung zum Treiben einer Flüssigkeit, die DNA-Moleküle enthält, zur Oberfläche der Haut des Individuums verwendet werden. Die Flüssigkeit wird mit einer ausreichenden Geschwindigkeit vorwärts getrieben, derart, dass die Flüssigkeit beim Auftreffen auf die Haut die Oberfläche der Haut durchdringt und in das darunter liegende Haut- und Muskelgewebe eindringt. Somit wird das genetische Material gleichzeitig intradermal, subkutan und intramuskulär verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen kann eine nadellose Injektionsvorrichtung zur Abgabe genetischen Materials an Gewebe von anderen Organen eingesetzt werden, um ein Nucleinsäuremolekül in Zellen dieses Organs einzuschleusen.

[0092] Erfindungsgemäß kann der genetische Impfstoff direkt an das zu immunisierende Individuum oder ex vivo an dem Individuum entnommene Zellen, die nach Verabreichung reimplantiert werden, verabreicht werden. Durch beide Wege wird das genetische Material in Zellen eingeschleust, die im Körper des Individuums vorhanden sind. Die Verabreichungswege umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, intramuskulär, intraperitoneal, intradermal, subkutan, intravenös, interarteriell, intraoccular und oral sowie transdermal oder durch Inhalation oder Suppositorien. Bevorzugte Verabreichungswege umfassen die intramuskuläre, intraperitoneale, intradermale und subkutane Injektion. Die Abgabe von Genkonstrukten, die Zielproteine codieren, kann eine Schleimhautimmunität auf die Individuen übertragen, die durch eine Verabreichungsweise immunisiert wurden, wobei das Material in Geweben präsentiert wird, die mit der Schleimhautimmunität zusammenhängen. Somit wird bei einigen Beispielen das Genkonstrukt durch Verabreichung in die Mundhöhle innerhalb des Mundes eines Individuums verabreicht.

[0093] Die genetischen Konstrukte können durch Mittel verabreicht werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, traditionelle Spritzen, nadellose Injektionsvorrichtungen oder "Mikroprojektil-Gen-Bombardierpistolen". Alternativ kann der genetische Impfstoff durch verschiedene Mittel in Zellen, die dem Individuum entnommen wurden, eingeschleust werden. Solche Mittel umfassen beispielsweise die ex vivo Transfection, Elektroporation, Mikroinjektion und Mikroprojektilbombardierung. Nach Aufnahme des genetischen Konstrukts durch die Zellen können sie wieder in das Individuum implantiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass ansonsten nicht immunogene Zellen, in denen sich eingeschleuste genetische Konstrukte befinden, in das Individuum implantiert werden können, auch wenn die beimpften Zellen ursprünglich einem anderen Individuum entnommen wurden.

[0094] Die erfindungsgemäßen genetischen Impfstoffe umfassen etwa 1 Nanogramm bis etwa 1000 Mikrogramm DNA. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Impfstoffe etwa 10 Nanogramm bis etwa 800 Mikrogramm DNA. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Impfstoffe etwa 0,1 bis etwa 500 Mikrogramm DNA. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Impfstoffe etwa 1 bis etwa 350 Mikrogramm DNA. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Impfstoffe etwa 25 bis etwa 250 Mikrogramm DNA. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Impfstoffe etwa 100 Mikrogramm DNA.

[0095] Die erfindungsgemäßen genetischen Impfstoffe werden je nach der zu verwendenden Verabreichungsweise formuliert. Ein Fachmann kann leicht einen genetischen Impfstoff formulieren, der ein genetisches Konstrukt umfasst. In Fällen, wobei die intramuskuläre Injektion die gewählte Verabreichungsweise ist, wird vorzugsweise eine isotonische Formulierung eingesetzt. Im Allgemeinen können Hilfsstoffe zur Isotonie Natriumchlorid, Dextrose, Mannit, Sorbit und Lactose umfassen. Bei einigen Fällen sind isotonische Lösungen, wie Phosphat-gepufferte Salzlösung bevorzugt. Stabilisatoren umfassen Gelatine und Albumin. Bei einigen Ausführungsformen wird der Formulierung ein vasokonstriktorisches Mittel zugesetzt. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen werden steril und pyrogenfrei bereitgestellt.

[0096] Die erfindungsgemäßen genetischen Konstrukte werden in Verbindung mit einem Polynucleotidfunktionsenhancer formuliert oder damit verabreicht. Bevorzugte erfindungsgemäße Co-Agentien sind aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Benzoesäureestern, Aniliden, Amidinen, Urethanen und den Hydrochloridsalzen davon, wie diejenigen aus der Familie der Lokalanästhetika.

[0097] Der PFE kann eine Verbindung mit einer der folgenden Formeln sein:

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

R^4-N-R^5-R^6

oder

R^4-O-R^1-N-R^7

wobei:
Ar Benzol-, p-Aminobenzol-, m-Aminobenzol-, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin sein können, und die Substitutionen in den substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist;
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich verzweigter Alkyle, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus, und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus ist;
Beispiele für Ester umfassen Benzoesäureester, wie Piperocain, Meprylcain und Isobucain; para-Aminobenzoesäureester, wie Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain und Chloroprocain; meta-Aminobenzoesäureester, einschließlich von Metabuthamin und Primacain; und para-Ethoxybenzoesäureester, wie Paraethoxycain. Beispiele für Anilide umfassen Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain und Prilocain. Weitere Beispiele für solche Verbindungen umfassen Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin und die botanisch-abgeleiteten Bicyclen, wie Kokain, Cinnamoylkokain, Truxillin und Cocaethylen und alle derartigen Verbindungen, die mit Hydrochlorid komplexiert sind.

[0098] Bei bevorzugten Ausführungsformen ist der PFE Bupivacain. Der Unterschiede zwischen Bupivacain und Mepivacain besteht darin, dass Bupivacain eine N-Butylgruppe anstelle einer N-Methylgruppe von Mepivacain besitzt. Die Verbindungen können an diesem N C_1-C_{10} aufweisen. Die Verbindungen können durch Halogen substituiert sein, wie Procain und Chloroprocain. Die Anilide sind bevorzugt.

[0099] Bupivacain wird gleichzeitig mit dem genetischen Konstrukt verabreicht. Bupivacain und das genetische Konstrukt können in der gleichen Formulierung formuliert werden. Bupivacain ist insbesondere als Zell-stimulierendes Mittel hinsichtlich seiner vielen Eigenschaften und Aktivitäten bei Verabreichung an Gewebe geeignet. Bupivacain beschleunigt und erleichtert die Aufnahme genetischen Materials durch die Zelle. Als solches ist es ein Transfektionsmittel. Die Verabreichung von genetischen Konstrukten in Verbindung mit Bupivacain erleichtert den Eintritt der genetischen Konstrukte in Zellen. Es wird angenommen, dass Bupivacain die Zellmembran aufbricht oder sie anderweitig durchlässiger macht. Zellteilung und -replikation werden durch Bupivacain stimuliert. Demnach wirkt Bupivacain als Replikationsmittel. Die Verabreichung von Bupivacain reizt und beschädigt auch das Gewebe. Als solches wirkt es als Entzündungsmittel, das Migration und Chemotaxis von Immunzellen an die Verabreichungsstelle auslöst. Zusätzlich zu den normalerweise an der Verabreichungsstelle vorhandenen Zellen können die Zellen des Immunsystems, die als Antwort auf das Entzündungsmittel an die Stelle wandern, mit dem verabreichten genetischen Material und dem Bupivacain in Kontakt treten. Bupivacain, das als Transfektionsmittel wirkt, steht auch zur Beschleunigung der Aufnahme genetischen Materials durch solche Zellen des Immunsystems zur Verfügung.

[0100] Bupivacain ist chemisch und pharmakologisch mit den Aminoacyl-Lokalanästhetika verwandt. Es ist ein Homolog von Mepivacain und mit Lidocain verwandt. Bupivacain macht die Muskelgewebsspannung gegenüber einer Natriumprovokation empfindlich und wirkt auf die Ionenkonzentration in der Zelle. Eine vollständige Beschreibung der pharmakologischen Aktivitäten von Bupivacain kann bei Ritchie, J.M. und N.M. Greene, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hrsg: Gilman, A.G. et al., 8. Ausgabe, Kapitel 15:3111, durch Bezugnahme eingeschlossen, gefunden werden. Bupivacain und die Verbindungen, die eine funktionelle Ähnlichkeit mit Bupivacain zeigen, sind bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt.

[0101] Bupivacain-HCl wird chemisch als 2-Piperidincarboxamid-1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-monohydrochloridmonohydrat bezeichnet und ist im Handel weithin für pharmazeutische Anwendungen aus vielen Quellen, einschließlich Astra Pharmaceutical Products Inc. (Westboro, MA) und Sanofi Winthrop Pharmaceuticals (New York, NY), Eastman Kodak (Rochester, NY) erhältlich. Bupivacain ist kommerziell mit und ohne Methylparaben und mit oder ohne Epinephrin formuliert. Jede derartige Formulierung kann verwendet werden. Sie ist zur pharmazeutischen Verwendung in der Konzentration von 0,25, 0,5 und 0,75 %, die erfindungsgemäß verwendet werden können, im Handel erhältlich. Alternative Konzentrationen, insbesondere diejenigen zwischen 0,05 bis 1,0 %, die die erwünschten Wirkungen hervorrufen, können, falls gewünscht, hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden etwa 250 µg bis etwa 10 mg Bupivacain verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen werden etwa 250 µg bis etwa 7,5 mg verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen werden etwa 0,05 mg bis etwa 5,0 mg verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen werden etwa 0,5 mg bis etwa 3,0 mg verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen werden etwa 5 bis 50 µg verabreicht. Beispielsweise werden bei einigen Ausführungsformen etwa 50 µl bis etwa 2 ml, vorzugsweise 50 µl bis etwa 1500 µl und stärker bevorzugt etwa 1 ml 0,5 % Bupivacain-HCl und 0,1 Methylparaben in einem isotonischen pharmazeutischen Träger an der gleichen Stelle wie der Impfstoff, zuvor, gleichzeitig mit oder nachdem der Impfstoff verabreicht wurde, verabreicht. Gleichermaßen werden bei einigen Ausführungsformen etwa 50 µl bis etwa 2 ml, vorzugsweise 50 µl bis etwa 1500 µl und stärker bevorzugt etwa 1 ml 0,5 % Bupivacain-HCl in einem isotonischen pharmazeutischen Träger an der gleichen Stelle wie der Impfstoff, zuvor, gleichzeitig mit oder nachdem der Impfstoff verabreicht wurde, verabreicht. Bupivacain und alle anderen ähnlich wirkenden Verbindungen, insbesondere diejenigen der verwandten Familie der Lokalanästhetika, können in Konzentrationen verabreicht werden, die die gewünschte leichtere Aufnahme genetischer Konstrukte durch Zellen bereitstellt.

[0102] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung erfährt das Individuum vor der genetischen Impfung durch intramuskuläre Injektion zuerst eine Bupivacain-Injektion. D.h. beispielsweise, dem Individuum wird bis zu etwa 1 Woche bis 10 Tage vor der Impfung zuerst Bupivacain injiziert. Bei einigen Ausführungsformen wird dem Individuum vor der Impfung Bupivacain etwa 1 bis 5 Tage vor Verabreichung des genetischen Konstrukts injiziert. Bei einigen Ausführungsformen wird dem Individuum vor der Impfung Bupivacain etwa 24 h vor der Verabreichung des genetischen Konstrukts injiziert. Alternativ kann Bupivacain gleichzeitig, Minuten vor oder nach der Impfung verabreicht werden. Demnach können Bupivacain und das genetische Konstrukt kombiniert und gleichzeitig als Gemisch injiziert werden. Bei einigen Ausführungsformen wird das Bupivacain nach Verabreichung des genetischen Konstrukts verabreicht. Beispielsweise wird dem Individuum bis zu etwa einer Woche bis 10 Tage nach Verabreichung des genetischen Konstrukts Bupivacain injiziert. Bei einigen Ausführungsformen wird dem Individuum Bupivacain etwa 24 h nach der Impfung injiziert. Bei einigen Ausführungsformen wird dem Individuum etwa 1 bis 5 Tage nach der Impfung Bupivacain injiziert. Bei einigen Ausführungsformen wird dem Individuum Bupivacain bis zu etwa einer Woche bis 10 Tage nach der Impfung verabreicht.

[0103] Weitere Mittel, die als Transfektionsmittel und/oder als Replikationsmittel und/oder Entzündungsmittel funktionieren können, und die mit Bupivacain und ähnlich wirkenden Verbindungen co-verabreicht werden können, umfassen Lectine, Wachstumsfaktoren, Cytokine und Lymphokine, wie α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 sowie Collagenase, den Fibroblasten-Wachstumsfaktor, Östrogen, Dexamethason, Saponine, Oberflächen-aktive Mittel, wie Immun-stimulierende Komplexe (ISCOMS), inkomplettes Freund-Adjuvans, LPS-Analoge, einschließlich Monophosphoryllipid A (MPL), Muramylpeptide, Chinon-Analoge und Vesikel, wie Squalen und Squalen, Hyaluronsäure und Hyaluronidase können ebenfalls in Verbindung mit dem genetischen Konstrukt verabreicht werden. Bei einigen Ausführungsformen werden Kombinationen dieser Mittel in Verbindung mit Bupivacain und dem genetischen Konstrukt verabreicht.

[0104] Beispielsweise werden Bupivacain und entweder Hyaluronsäure oder Hyaluronidase mit einem genetischen Konstrukt co-verabreicht.

[0105] Das genetische Konstrukt kann mit Collagen als Emulsion kombiniert und parenteral abgegeben werden. Die Collagenemulsion stellt ein Mittel zur verzögerten Freisetzung von DNA bereit. Es werden 50 µl bis 2

ml Collagen verwendet. Bei einer bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung dieser Formulierung werden etwa 100 µg DNA mit 100 ml Collagen kombiniert. Weitere verzögert freisetzende Formulierungen, wie diejenigen, die in Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ein Standard-Nachschlagewerk auf diesem Gebiet, das durch Bezugnahme eingeschlossen ist, beschrieben sind. Solche Formulierungen umfassen wässrige Suspensionen, Öl-Lösungen und Öl-Suspensionen, Emulsionen und Implantate sowie Reservoire und Transdermalvorrichtungen. Bei einigen Ausführungsformen sind für die genetischen Konstrukte zeitlich freisetzende Formulierungen bevorzugt. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass das genetische Produkt zwischen 6 bis 144 h, vorzugsweise zwischen 12 bis 96 h, stärker bevorzugt zwischen 18 bis 72 h zeitlich freigesetzt wird.

[0106] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das genetische Konstrukt mit einer nadellosen Injektionsvorrichtung injiziert. Die nadellosen Injektionsvorrichtungen sind besonders zur gleichzeitigen Verabreichung des Materials intramuskulär, intradermal und subkutan geeignet.

[0107] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das genetische Konstrukt mit einem PFE mittels eines Mikroprojektil-Teilchenbombardierungsverfahrens, wie gelehrt von Sanford et al. in der U.S. Patentschrift. 4,945,050, ausgegeben am 31. Juli 1990, durch Bezugnahme eingeschlossen, verabreicht.

[0108] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das genetische Konstrukt als Teil eines Liposomen-Komplexes mit einem Polynucleotidfunktionsverstärkungsmittel verabreicht.

[0109] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das Individuum einer einzigen Impfung unterzogen, um eine volle, breite Immunantwort hervorzurufen. Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das Individuum einer Serie von Impfungen unterzogen, um eine volle, breite Immunantwort hervorzurufen. Gemäß einigen Ausführungsformen der Erfindung werden mindestens 2 und vorzugsweise 4 bis 5 Injektionen während eines Zeitraums verabreicht. Der Zeitraum zwischen den Injektionen kann 24 h Abstand bis 2 Wochen oder länger zwischen den Injektionen, vorzugsweise eine Woche Abstand betragen. Alternativ können mindestens 2 und bis zu 4 getrennte Injektionen gleichzeitig an verschiedenen Stellen verabreicht werden.

[0110] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung umfasst eine vollständige Impfung die Injektion eines einzigen Impfstoffs, der ein genetisches Konstrukt, einschließlich Sequenzen, die ein oder mehrere Ziel-Epitope codieren, enthält. Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung umfasst eine vollständige Impfung die Injektion von 2 oder mehreren verschiedenen Impfstoffen an verschiedenen Stellen. Beispielsweise umfasst bei einem erfindungsgemäßen HIV-Impfstoff der Impfstoff 2 Impfmaterialien, in denen jeweils eines genetisches Material, das verschiedene Virusproteine codiert, umfasst. Dieses Impfverfahren gestattet das Einschleusen von bis zu soviel wie einer vollständigen Serie von viralen Genen in das Individuum ohne das Risiko, dass ein infektiöses virales Partikel zusammengefügt wird. Somit kann bei dem geimpften Individuum eine Immunantwort gegen die meisten oder alle Viren hervorgerufen werden. Die Injektion von jedem Impfstoff wird an verschiedenen Stellen, vorzugsweise beabstandet, vorgenommen, um zu gewährleisten, dass keine Zellen beide genetischen Konstrukte erhalten. Als weitere Sicherheitsvorkehrung können einige Gene deletiert oder verändert sein, um die Möglichkeit des infektiösen Viruszusammenbaus weiter zu verhindern.

[0111] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Anwendungen sind auf den Gebieten sowohl der Human- als auch der Veterinärmedizin geeignet.

[0112] Demnach betrifft die vorliegende Erfindung die genetische Immunisierung von Säugern, Vögeln und Fischen. Die erfindungsgemäßen Verfahren können besonders für Säugerspezies geeignet sein, einschließlich der Spezies von Mensch, Rind, Schaf, Schwein, Pferd, Hund und Katze.

[0113] Die nachstehend aufgeführten Beispiele umfassen repräsentative Beispiele für die Aspekte der vorliegenden Erfindung. Die Beispiele sollen den Umfang der Erfindung nicht einschränken, sondern dienen stattdessen beispielhaften Erläuterungszwecken. Zusätzlich können verschiedene Aspekte der Erfindung durch die folgende Beschreibung zusammengefasst werden. Allerdings soll diese Beschreibung den Umfang der Erfindung nicht einschränken, sondern stattdessen verschiedene Aspekte der Erfindung hervorheben. Einem Fachmann fallen leicht zusätzliche Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung ein.

Beispiele

Beispiel 1

[0114] Die vorliegende Erfindung stellt einen HIV-Impfstoff unter Verwendung einer direkten genetischen Immunisierung bereit. Es werden genetische Konstrukte bereitgestellt, die bei Abgabe an die Zellen eines Individuums exprimiert werden, um HIV-Proteine zu produzieren. Bei einigen Ausführungsformen löst die Produktion von sämtlichen viralen Strukturproteinen in den Zellen des Individuums eine protektive Immunantwort aus, die gegen die HIV-Infektion schützt. Der erfindungsgemäße HIV-Impfstoff kann zur Immunisierung nicht infizierter Individuen vor einer HIV-Injektion eingesetzt werden oder dient als Immuntherapeutikum für diejenigen Individuen, die bereits infiziert wurden. Der erfindungsgemäße HIV-Impfstoff ruft eine Immunantwort einschließlich von CTLs hervor, die HIV-infizierte Zellen erkennen und angreifen und das breiteste Kontingent ans HIV-Protein erkennen. Somit sind uninfizierte Individuen vor einer HIV-Infektion geschützt.

[0115] Bei einigen Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung die Immunisierung eines Individuums gegen HIV durch Verabreichung von 2 Impfstoffen. Diese beiden Impfstoffe umfassen mindestens 2 und vorzugsweise mehr als 2, eine Vielzahl oder sämtliche der Gene des HIV-Virus. Allerdings werden die Impfstoffe nicht zusammen abgegeben. Demnach wird einer beimpften Zelle kein vollständiges Komplement an Genen verabreicht. Die geimpften Individuen erhalten mindestens zwei verschiedene und vorzugsweise mehr als 2, stärker bevorzugt eine Vielzahl oder sämtliche der viralen Gene. Die Immunantworten können dann gegen das gesamte Komplement des HIV-Proteinziels gerichtet sein.

[0116] Diese Strategie erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass genetisches Material das das besonders wirksame Zielprotein codiert, in dem Impfstoff eingeschlossen ist, und vermindert die Wahrscheinlichkeit, dass ein Viruspartikel trotz struktureller Änderungen in einem oder mehreren Virusproteinen, die auftreten, wenn das Virus einer Mutation unterliegt, dem Nachweis durch die Immunantwort entgeht. Demnach ist es wünschenswert, ein Individuum mit mehreren und vorzugsweise einem nahezu vollständigen oder vollständigen Komplement von Genen, die Virusproteine codieren, zu impfen.

[0117] Wenn eine einzelne Zelle mit einem vollständigen Komplement von Virusgenen bereitgestellt wird, ist es möglich, dass ein komplettes infektiöses Virus in der Zelle zusammengefügt werden kann. Demnach wird ein erfindungsgemäßes genetisches Konstrukt nicht mit einem solchen vollständigen Komplement an Genen bereitgestellt. Außerdem werden zwei oder mehrere Impfstoffe mit jeweils einem unvollständigen Satz an Genen und kombiniert mit bis zu einem vollständigen Komplement an Virusgenen an verschiedene Zellen vorzugsweise an einer voneinander beabstandete Stelle verabreicht, um sicherzustellen, dass keine geimpfte Zelle versehentlich einem vollständigen Satz von Genen ausgesetzt wird. Beispielsweise kann ein Teil des HIV-Genoms in ein erstes Konstrukt inseriert werden, und der verbleibende Teil des HIV-Genoms wird in ein zweites Konstrukt inseriert. Das erste Konstrukt wird an ein Individuum als genetischer Impfstoff in das Muskelgewebe eines Arms verabreicht, während das zweite Konstrukt an ein Individuum als genetischer Impfstoff in das Muskelgewebe des anderen Arms des Individuums verabreicht wird. Das Individuum kann einem vollständigen Satz von Virusgenen ausgesetzt werden; somit wird im Wesentlichen gegen das gesamte Virus geimpft, allerdings ohne das Risiko, dass ein infektiöses Viruspartikel zusammengefügt wird.

[0118] Als zusätzliche Sicherheitsvorkehrung, auch wenn genetisches Material durch zwei oder mehrere Impfstoffe an beabstandeten Teilen des individuellen Körpers verabreicht wird, können ein oder mehrere essentielle Gene deletiert oder absichtlich verändert werden, um weiterhin zu gewährleisten, dass kein infektiöses Viruspartikel gebildet werden kann. Bei solchen Ausführungsformen wird dem Individuum kein vollständiger funktionsfähiger Satz von Virusgenen verabreicht.

[0119] Eine weitere Sicherheitsvorkehrung sieht nicht überlappende Teile des Virusgenoms auf den getrennten genetischen Konstrukten vor, aus denen jeweils die getrennten Impfstoffe bestehen. Demnach wird die Rekombination zwischen den beiden genetischen Konstrukten verhindert.

[0120] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist ein vollständiges Komplement von Strukturgenen vorgesehen. Die Strukturgene von HIV bestehen aus gag, pol und env. Diese drei Gene sind auf zwei verschiedenen DNA- oder RNA-Konstrukten vorgesehen. Demnach befinden sich bei einer bevorzugten Ausführungsform gag und pol auf einem DNA- oder RNA-Konstrukt, und env befindet sich auf dem anderen. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform befindet sich gag auf einem DNA- oder RNA-Konstrukt, und pol und env befinden sich auf dem anderen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform befinden sich gag und env auf einem DNA- oder RNA-Konstrukt, und pol befindet sich auf dem anderen. Bei einigen

bevorzugten Ausführungsformen besitzen Konstrukte, die rev enthalten, einen Spleiß-Akzeptor stromaufwärts von dem Startcodon für rev. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen besitzen Konstrukte, die gag enthalten einen Spleiß-Donor stromaufwärts von dem gag-Translationsstartcodon. Gegebenenfalls können bei jeder dieser Kombinationen auch HIV-Regulatorgene vorhanden sein. Die HIV-Regulatorgene sind: vpr, vif, vpu, nef, tat und rev.

[0121] Das DNA-Konstrukt bei einer bevorzugten Ausführungsform besteht aus einem Promotor, einem Enhancer und einem Polyadenylierungssignal. Der Promotor kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die besteht aus: HIV-LTR, menschlichem Actin, menschlichem Myosin, CMV, RSV, Moloney, MMTV, menschlichem Hämoglobin, menschlichem Muskelcreatin und EBV. Der Enhancer kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die besteht aus: menschlichem Actin, menschlichem Myosin, CMV, RSV, menschlichem Hämoglobin, menschlichem Muskelcreatin und EBV. Das Polyadenylierungssignal kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die besteht aus: LTR-Polyadenylierungssignal und SV40-Polyadenylierungssignal, unter anderem insbesondere aus dem kleineren SV40-Polyadenylierungssignal.

[0122] Bei einigen Ausführungsformen wird das Zwei-Impfstoff-Vakzin intramuskulär an räumlich getrenntes Gewebe des Individuums, vorzugsweise in verschiedene Extremitäten, wie beispielsweise in den rechten und linken Arm, verabreicht. Jeder erfindungsgemäße Impfstoff kann etwa 0,1 bis etwa 1000 µg DNA enthalten. Vorzugsweise enthält jeder Impfstoff etwa 1 bis etwa 500 µg DNA. Stärker bevorzugt enthält jeder Impfstoff etwa 25 bis etwa 250 µg DNA. Besonders bevorzugt enthält jeder Impfstoff etwa 1000 µg DNA.

[0123] Der Impfstoff ist bei einigen Ausführungsformen ein steriler isotonischer Träger, vorzugsweise Phosphat-gepufferte Salzlösung oder Salzlösung.

[0124] Ein Zell-Proliferationsmittel vorzugsweise Bupivacain, wird in die Formulierung zusammen mit dem genetischen Konstrukt eingeschlossen. Etwa 50 µl bis etwa 2 ml von 0,5 % Bupivacain-HCl und 0,1 % Methylparaben in isotonischem NaCl werden an der Stelle verabreicht, wo das Vakzin zu verabreichen ist, vorzugsweise 50 µl bis etwa 1500 µl, stärker bevorzugt etwa 1 ml.

[0125] Demnach umfassen einige Ausführungsformen ein Zwei-Impfstoff-Vakzin, einen Impfstoff, der ein DNA- oder RNA-Konstrukt mit zwei HIV-Strukturgenen umfasst, und den anderen Impfstoff, der ein DNA- oder RNA-Konstrukt mit dem dritten verbleibenden HIV-Strukturgen umfasst, derart, dass die kombinierten Impfstoffe ein vollständiges Komplement von HIV-Strukturgenen enthalten. Die Strukturgene auf jedem DNA-Konstrukt sind mit einem Promotor, einem Enhancer und einem Polyadenylierungssignal zweckorientiert verknüpft. Die gleichen oder verschiedene regulatorische Elemente können die Expression der Virusgene kontrollieren. Bei der Impfung eines Individuums werden die beiden Impfstoffe an verschiedenen Stellen, vorzugsweise an verschiedenen Armen, intramuskulär verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung ist in den Formulierungen zusammen mit den genetischen Konstrukten Bupivacain eingeschlossen.

[0126] Bei einigen Ausführungsformen wird der Impfvorgang mindestens einmal und vorzugsweise zwei- oder dreimal wiederholt. Jeder Impfvorgang wird im Abstand von 24 h bis 2 Monaten durchgeführt.

[0127] Bei einigen Ausführungsformen wird der Impfstoff unter Verwendung einer nadellosen Injektionsvorrichtung verabreicht. Bei einigen Ausführungsformen wird der Impfstoff hypodermatisch unter Verwendung einer nadellosen Injektionsvorrichtung verabreicht und stellt somit die intramuskuläre, intradermale, subkutane Verabreichung gleichzeitig bereit, während das Material auch interstitiell verabreicht wird.

[0128] Bevorzugte genetische Konstrukte umfassen folgende:
Plasmide und Klonierungsstrategien:
Zwei Plasmide wurden konstruiert: eines, das HIV-gag/pol enthält, und das andere, das HIV-env enthält.

[0129] Der HIV-1-Genklon pNL43 wurde vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (ARRRP), Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. Malcolm Martin erhalten und kann als Ausgangsmaterial für die HIV-1-Virusgene für genetische Konstrukte verwendet werden. Alternativ kann jeder HIV-Molekülklon einer infizierten Zelle durch die Verwendung der Polymerasekettenreaktionstechnik ausreichend für die Konstruktion modifiziert werden, einschließlich des HXB2-Klons, des MN-Klons sowie des SF- oder BAL-1-Klons. Der Klon pNL43 ist ein Konstrukt, das aus proviraler HIV-1-DNA plus 3 kb Wirtssequenz aus der in pUC18 klonierten Integrationsstelle besteht.

[0130] Konstruktion des Plasmids pNL-puro-env:

Dieses Plasmid wurde zur Expression von gag und pol konstruiert. Die StuI-Stelle in der 5'-flankierenden menschlichen Nicht-HIV-DNA von pNL43 wurde durch teilweisen Abbau mit StuI und anschließenden Abbau der freien Enden mit E. coli-Polymerase 1 zerstört. Das lineare Plasmid wurde aufgefüllt und sodann mit sich selbst ligiert, wobei eine einzigartige StuI-Stelle in dem HIV-Genom zurückblieb. Dieses Plasmid, pNLDstu, wurde sodann mit den Blunting-Enzymen StuI und BsaBI abgebaut, die einen großen Abschnitt der codierenden Sequenz für gp120 beseitigten. Der SV40-Promotor und die Puromycinresistenz-codierende Region (Puromycinacetyltransferase (PAC)) wurden aus pBABE-puro (Morgenstern und Land, 1990 Nucl. Acids Res. 18(12):3587–3596, durch Bezugnahme eingeschlossen, freundlicherweise von Dr. Hartmut Land vom Imperial Cancer Research Fund zur Verfügung gestellt) unter Verwendung von EcoRI und ClaI isoliert. Dieses Fragment wurde an den Enden abgestumpft, anschließend in das StuI/BsaBI-abgebaute pNLDstu kloniert. Ein Klon mit dem Fragment SV40-puro in der korrekten Orientierung wurde ausgewählt, so dass 3'-LTR von HIV Poly-A-Funktionen für die PAC-Botschaft bereitstellen konnte. Dieses Plasmid wurde als pNLpuro bezeichnet.

[0131] Die Klonierungsstrategie zur Deletion des vpr-Regulatorgens von dem HIV-gag-pol-Vektor:
Eine Region unmittelbar stromaufwärts von der einzigartigen PfIMI-Stelle bis unmittelbar nach dem vif-Stoppcodon wurde über PCR unter Verwendung von Primern amplifiziert, die eine nicht konservative Aminosäureänderung (glu->val) an der Aminosäure 22 von vpr, ein Stoppcodon in das vpr-Leseraster unmittelbar nach Aminosäure 22 und eine EcoR I-Stelle unmittelbar im Anschluss an das neue Stoppcodon einbauten. Dieses PCR-Fragment wurde für das PfIMI-EcoR I-Fragment von pNLpuro oder pNL43 substituiert. Diese Substitution führte zur Deletion von 122 Nucleotiden des offenen Leserasters von vpr und beseitigte somit die Möglichkeit der Reversion, die eine Punktmutationsstrategie mit sich bringt. Die resultierenden Plasmide, pNLpuroΔvpr, codieren die ersten 21 natürlichen Aminosäuren von vpr plus ein Valin plus sämtliche anderen verbleibenden HIV-1-Gene und Spleißstellen in ihrer nativen Form. Eine solche Deletionsstrategie wäre auch auf nef, vif, und vpu anwendbar und ermöglicht die Strukturgenexpression, schützt allerdings vor der Generierung eines rekombinanten Lebendvirus.

[0132] Plasmidkonstruktion für die Hüllprotein-Expression:
Das DNA-Segment, das das Hüllprotein-Gen von HIV-1 HXB2 codiert, wurde durch die Polymerasekettenreaktions (PCR)-Amplifikationstechnik unter Verwendung der klonierten Lambda-DNA, erhalten aus dem AIDS Research and Reference Reagent Programm, kloniert. Die Sequenzen der 5'- und 3'-Primer sind 5'-AGGCGTCTCGAGACAGAGGAGAGCAAGAAATG-3' (SEQ-ID. NR. 1) mit Einarbeitung der XhoI-Stelle bzw. 5'-TTTCCCTCTAGATAAGCCATCCAATCACAC-3' (SEQ-ID. NR. 2), mit Einarbeitung der XbaI-Stelle, die die gp160-, tat- und rev-codierende Region umfasst. Die Gen-spezifische Amplifikation wurde unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase nach den Anweisungen des Herstellers (Perkin-Elmer Cetus Corp.) durchgeführt. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden mit 0,5 µg/ml Proteinase K bei 37 °C 30 min und anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung behandelt. Die gewonnene DNA wurde anschließend mit Xho1 und Xba1 2 h bei 37 °C abgebaut und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Das isolierte und gereinigte Xho1-Xba1-PCR-Fragment wurde in Bluescript-Plasmid (Stratagene Inc., La Jolla, CA) kloniert und anschließend in den eukariotischen Expressionsvektor pMAMneoBlue (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) subkloniert. Das resultierende Konstrukt wurde als pM160 bezeichnet (**Fig. 1A**). Die Plasmid-DNA wurde mit CsCl-Gradienten-Ultrazentrifugation gereinigt. Das DNA-Konstrukt pM160 codiert das HIV-1/GXB2 (Fisher, A.G., et al., (1985) Nature 316:262–265) gp160-Membran-gebundene Glycoprotein unter der Kontrolle eines RSV-Enhancerelements mit dem MMTV-LTR als Promotor.

[0133] Eine alternative Hüllprotein-Expressionsplasmidkonstruktion, genannt HIV-1-env-rev-Plasmid:
Die Region, die die beiden Exons von rev und die offenen vpu- und Hüllprotein-Leseraster von HIV-1-HXB2 codiert, wurde über PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pCNDA/neo (Invitrogen) kloniert. Dieses Plasmid treibt die Hüllprotein-Produktion durch den CMV-Promotor an.

[0134] Produktion und Reinigung:
Das Plasmid in E. coli (DH5 alpha) wird wie folgt gezüchtet: Eine LB-plus-Ampicillin-Agar-Platte wird mit der gewünschten Plasmidkultur aus einem eingefrorenen Vorrat bestrichen. Die Platte wird über Nacht (14–15 h) bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wird von der Platte genommen und in 15 ml LB-Medium mit einer Peptonpräparation und 50 µg/ml Ampicillin überimpft. Diese Kultur wird bei 37 °C unter Schütteln (175 U/min) für 8–10 h wachsen gelassen. Die OD_{600}-Ablesungen sollten mindestens 1,0 betragen. 1 l LB-Medium mit Pepton und 50 µg/ml Ampicillin wird mit 1,0 OD Kultur angeimpft. Diese 1–2 l Kultur werden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (175 U/min) wachsen gelassen.

[0135] Plasmid, das in E. coli wachsen gelassen wurde (Stamm DH5 alpha), wird geerntet und durch die folgenden Verfahren gereinigt. Die allgemeinen Vorgehensweisen für die Lyse von Zellen und für die Reinigung

von Plasmid können gefunden werden in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Ausg., J. Sambrook, E.F. Fritsch, und T. Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 1989. Die Zellen werden konzentriert und mit Glucose-tris-EDTA-Puffer, pH 8,0, gewaschen. Die konzentrierten Zellen werden durch Behandlung mit Lysozym lysiert und kurz mit 0,2 N KOH behandelt. Der pH-Wert wird anschließend mit Kaliumacetat/Essigsäurepuffer auf 5,5 eingestellt. Unlösliches Material wird durch Zentrifugation entfernt. Dem Überstand wird 2-Propanol zur Ausfällung des Plasmids zugesetzt. Das Plasmid wird wieder in Tris-EDTA-Puffer aufgelöst und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und zusätzliches Ausfällen mit 2-Propanol weiter aufgereinigt.

[0136] Endotoxin kann gegebenenfalls durch eine Vielzahl von Verfahren, einschließlich der folgenden, entfernt werden: spezifische Adsorption durch immobilisierte Materialien, wie Polymyxin (Tani et al., Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol. 20(2–4):457–62 (1992); Issekutz, J. Immunol. Methods 61(3):275–81 (1983)); monoclonale Anti-Endotoxin-Antikörper, wie 8A1 un dHA-1A™ (Centocor, Malvern, PA; Bogard et al., J. Immunol. 150(10):4438–4449 (1993); Rietschel et al., Infect. Immunity Seite 3863 (1993)); positiv geladene Tiefenfilter (Hou et al., J. Parenter. Sci. Technol. 44(4):204–9 (Juli–August 1990)); Polygamma-methyl-L-glutamat), Hirayama et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 40(8):2106–9 (1992); Histidin (Matsumae et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 12:(2):129–40 (1990)); hydrophobe Wechselwirkungssäulen und – membranen (Aida et al., J. Immunol. Methods 132(2):191–5 (1990); Umeda et al., Biomater Artif Cells Artif Organs 18(4):491–7 (1990); Hou et al., Biochem. Biophys. Acta 1073(1):149–54 (1991); Sawada et al., J. Hyg. (London) 97(1):103–14 (1986)); spezielle hydrophobe Harze, die zur Entfernung von Endotoxin geeignet sind, einschließlich von hydrophoben Polystyrol/Divinylbenzol- oder Divinylbenzolharzen, wie Brownlee Polypore Resin (Applied Biosystems, Palo Alto, CA); XUS 40323.00 (Dow Chemical, Midland, MI); HP20, CHP20P (Mitsubishi Kasei, U.S.); Hamilton PRP-1, PRP-Infinität (Hamilton, Reno, NV); Jordi-Reversphasen-DVB, Jordi-Gel-DVB, Polymer Labs Plgel™ (Alltech, Deerfield, IL); Vydac PLx™ (Separations Group, Hesperia, CA); andere Endotoxin-Entfernungsmaterialien und -verfahren umfassen Detoxi-Gel™-Endotoxin-Entfernungsgel (Pierce Chemical, Rockford, IL); Anwendungsnotiz 206 (Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). Siehe allgemein auch Sharma, Biotech. App. Biochem. 8:5–22 (1986). Die bevorzugten monoclonalen Anti-Endotoxin-Antikörper binden an die konservierten Domänen von Endotoxin, vorzugsweise Antikörper an Lipid A, der strukturell am stärksten konservierte Teil des Endotoxinmoleküls. Solche monoclonalen Anti-Lipid A-Antikörper umfassen den hochaffinen murinen monoclonalen IgG-Antikörper 8A1 und den menschlichen monoclonalen Anti-Lipid A-IgM(k)-Antikörper HA-1A™. HA-1A™ wurde aus einem menschlichen B-E. coli-J5-Impfstoff abgeleitet. HA-1A™. HA-1A™ wird als breit kreuzreaktiv, mit verschiedenen Bakterien-Endotoxinen (Lipopolysacchariden) beschrieben.

Beispiel 2

[0137] In den Experimenten, die dazu ausgelegt sind, die immunogene Reaktion zu vergleichen, die durch genetische Impfung und Proteinimpfung ausgelöst wird, wurden Tiermodelle unter Verwendung von Tumorzellen erstellt, die ein fremdes Zielprotein spezifisch exprimieren. Es wurden bereits drei immunkompetente Mausmodelle entwickelt, die Fremdantigene exprimieren. Drei clonale Tumorzelllinien, die dem Mausstamm Balb/c entstammen, werden verwendet. Die Zelllinien sind: 1) eine lymphoide Zelllinie, die nicht wesentlich in andere Gewebe metastasiert, sondern große tastbare Tumore bildet, die anscheinend das Tier innerhalb eines Zeitraums von 8 bis 12 Wochen töten; 2) eine murine Melanomzelllinie, mit einiger Fähigkeit zur Metastasierung, meistens in die Lunge, und die nach ber Impfung mit 1 Million Zellen in den Mäusen zur Entwicklung von großen tastbaren Tumoren führt, die das Tier gleichermaßen innerhalb von 10 bis 12 Wochen töten; und 3) eine murine Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie, die in mehrere Gewebe metastasiert und das Tier innerhalb von 12 oder mehr Wochen tötet. Subklone wurden ausgewählt, die Fremdantigene in einer unerkannten Form aufzeigen können. Bei Implantation von transfizierten Tumoren in einen elterlichen Mausstamm produzieren die Tiere im Gegensatz zu der Mehrheit von ähnlichen murinen Tumorzelllinien keine protektive Immunantwort auf die aufgezeigten Fremdantigene, und die Tumore werden akzeptiert. Diese Tumore töten dann die Tiere mit dem gleichen Phänotyp in dem gleichen zeitlichen Rahmen wie der ursprüngliche untransfizierte Tumor. Unter Anwendung dieser Modelle kann die Immunantwort, die durch die genetische Impfung gegen ein Antigen hervorgerufen wurde, gemessen werden.

[0138] Es wurde festgestellt, dass Mäuse, die mit einem genetischen Impfstoff geimpft wurden, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das zur Produktion des Zielproteins durch die Zellen der Maus führte, eine Immunantwort einschließlich einer starken cytotoxischen Reaktion hervorrief, die die Tumore, bei denen das Zielprotein zu sehen war, vollständig beseitigten, allerdings ohne Wirkung auf die Tumore, bei denen dies nicht der Fall war. In Mäusen, die mit dem Zielprotein selbst geimpft wurden, war die dadurch ausgelöste Immunantwort viel weniger wirksam. Die Tumoren waren in der Größe vermindert, allerdings wurden sie auf Grund einer fehlenden zytotoxischen Reaktion nicht beseitigt. Als Kontrollen wurden untransfizierte Tumore in Experimenten verwendet, die die Immunantwort von Tieren, die mit dem genetischen Impfstoff, Subunit-Impfstoff geimpft wur-

den, und von nicht geimpften Tieren verglichen. Diese Experimente zeigen eindeutig, dass der genetische Impfstoff eine breitere wirksamere Immunantwort hervorrief, die in der Lage war, auf Grund der CTL's die Tumore vollständig zu beiseitigen. Im Gegensatz dazu erzeugte die Immunisierung unter Verwendung von intaktem Zielprotein eine begrenztere, weniger wirksame Immunantwort.

Beispiel 3

[0139] Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wurde ein genetischer Impfstoff gegen HIV konzipiert. Das Virusprotein gp160, das in gp120 und gp41 verarbeitet wird, ist das Zielprotein, gegen das ein genetischer Impfstoff erzeugt wird. Der genetische Impfstoff enthält ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz umfasst, die gp160 codiert, das mit regulatorischen Elementen zweckorientiert verknüpft ist. Bei Verabreichung an ein Individuum wird das DNA-Konstrukt des genetischen Impfstoffs in die Zellen des Individuums eingeschleust, und gp160 wird produziert. Die von dem Protein ausgelöste Immunantwort ist breit angelegt und umfasst die humoralen und beide Arme der zellulären Immunantwort. Die breite biologische Antwort stellt einen besseren Schutz gegenüber demjenigen bereit, der erreicht wird, wenn das Protein selbst verabreicht wird.

[0140] Den Mäusen wurde intramuskulär pM160 injiziert, beschrieben in Beispiel 1, und anschließend wurden die Anti-HIV-Immunantworten ausgewertet. Die Antiseren von auf diese Weise immunisierten Tieren produzieren Anti-HIV-Hüll-Glycoprotein-Immunantworten, wie gemessen durch Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Immunfällungstests. Das Antiserum neutralisiert die HIV-1-Infektion und hemmt die HIV-1-induzierte Synzytium-Bildung.

[0141] Die festgestellte Neutralisation und Anti-Synzytium-Aktivität können das Ergebnis einer Reaktivität der ausgelösten Antikörper auf funktionell wichtige Regionen des HIV-1-Hüllproteins, wie unter anderem die V3-Schleife von gp120, die CD4-Bindungsstelle und die N-terminale "immundominante" Region von fp41, sein.

[0142] Bei dem hier beschriebenen genetischen Immunisierungsvorgang wurden in die Quadrizepsmuskeln von BALB/c-Mäusen 100 µl 0,5 % Bupivacain-HCl und 0,1 Methylparaben in isotonischem NaCl unter Verwendung einer 27er Nadel zur Stimulierung der Muskelzellenregenerierung und zur Erleichterung der Aufnahme des genetischen Konstrukts injiziert. 24 h später wurden in die gleichen Injektionsstellen dann entweder 100 µg pM160 oder mit 100 µg pMAMneoBlue als Kontrollplasmid injiziert (**Fig. 1A**). Die Mäuse wurden durch Injektion der gleichen Menge von DNA-Konstrukt dreimal in 2-wöchigen Intervallen auf die gleiche Weise, allerdings ohne Vorbehandlung mit Bupivacain-HCl, geboostet.

[0143] Zur rekombinanten gp160-Immunisierung wurden die BALB/c-Mäuse zuerst mit 1 µg glycosiliertem rekombinanten (HIV-1/III_B) gp160 (MicroGeneSys Inc.) in komplettem Freund-Adjuvans immunisiert, worauf 3 Boosterinjektionen von jeweils 1 µg gp160 in inkomplettem Freund-Adjuvans in 2-wöchigen Intervallen folgten. Die Produktion von Antikörper gegen HIV-1-gp160 wurde durch Testen der Mausseren auf ihre Fähigkeit zur Immunfällung von gp160 bestimmt. Die Immunfällung wurde unter Verwendung von 1×10^6 cpm ^{125}I-markiertem rgp160, Mausseren und Protein-G-Agaroseperlen (GIBCO, Inc.) wie bereits von Osther, K., et al., (1991) Hybridoma 10:673–683 beschrieben, durch Bezugnahme eingeschlossen, durchgeführt. Die spezifischen Fällungen wurden durch 10 % SDS-PAGE ausgewertet. Spur 1 ist 1 µl präimmunes Mausserum, umgesetzt mit dem ^{125}I-gp160. Spur 2 ist 1 µl immunisiertes Mausserum aus den pM160-immunisierten Mäusen. Spur 3 ist 1 µl einer 1:100-Verdünnung von monoclonalem ID6 Anti-gp120-Antikörper (Ugen, K.E., et al., (1992) Generation of Monoclonal Antibodies Against the Amino Region of gp120 Which Elicits Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, Cold Spring Harbor Laboratory) als positive Kontrolle. Der Pfeil zeigt auf das spezifisch immungefällte ^{125}I-gp160-Hüll-Glycoprotein.

[0144] ^{125}I-markiertes gp160 wurde mit Antiseren, die aus den pM160-immunisierten Tieren stammen, spezifisch immungefällt (**Fig. 2**, Spur 2), sowie als positive Kontrolle der monoclonale Anti-gp120-Antikörper ID6 (**Fig. 2**, Spur 3). Im Gegensatz dazu zeigte das Präimmunserum (**Fig. 2**, Spur 1) in dem gleichen Test nur eine minimale Aktivität.

[0145] 8 von 10 Mäusen, die mit dem pM160-Konstrukt immunisiert wurden, waren in der Reaktivität gegen gp160 positiv, wie bestimmt durch ELISA, und die Immunantworten von dem Tier mit dem höchsten Anti-gp160-Titer wurden ausführlich ausgewertet. 4 Mäuse, die mit dem Kontrollvektor immunisiert waren, zeigten alle eine ähnliche negative Reaktivität gegenüber gp160 in ELISA, und eines dieser Seren wurde als Kontrolle für die späteren Experimente verwendet.

[0146] Es wurde gezeigt, dass HIV-neutralisierende Antikörper spezifisch auf mehrere Epitope in gp120 und

gp41 ausgerichtet sind, die die V3-Schleife in gp120 (Goudsmit, J. et al., (1988), AIDS 2:157–164; und Putney, S.D., et al., (1989) Development Of An HIV Subunit Vaccine, Montreal), die CD4-Bindungsstelle in der Nähe des Carboxy-Terminus von gp120 (Lasky, L.A., et al., (1987) Cell 50;975–985) sowie die immun-dominante Schleife von gp41 unmittelbar stromabwärts von der N-terminalen Fusionsregion (Schrier, R.D., et al., (1988) J. Virol. 62:2531–2536) umfassen.

[0147] Um zu bestimmen, ob die Anti-gp160-Antikörper, die in diesen Mäusen ausgelöst wurden, auf diese wichtigen Regionen der Hüll-Glycoproteine reaktiv sind, wurden Peptide für die BRU/V3-Schleife, Peptide für die MN/V3-Schleife, Peptide für den HXB2/gp41 N-Terminus oder Peptide für die HXB2/CD4-Bindungsstelle auf Miktrotiterplatten absorbiert und die spezifischen Reaktivitäten der Maus-Antiseren in ELISA-Tests bestimmt. 1 µg/ml gp160 oder 10 µg/ml von jedem Peptid wurden auf die Mikrotiterplatten in 0,1 M Bicarbonatpuffer (pH9,5) über Nacht bei 4 °C aufgebracht, mit 2 % Rinderserum Albumin in PBS blockiert und mit Ziegen-Anti-Maus-IgG, konjugiert mit HRPO (Fisher), einen Tag bei 37 °C umgesetzt und mit TMB-Substrat (Sigma) 10–30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln entwickelt. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 3 angegeben. Die Antiseren waren wie folgt: (-+-) ist prärimmunes Serum, (-x-) ist das pMAMneoBlue-Vektor-immunisierte Serum, (-O-) ist das pM160-immunisierte Serum, (-Δ-) stammt aus Mäusen, die mit dem rgp160-Protein immunisiert wurden. Fig. 3A zeigt die Ergebnisse unter Verwendung einer rgp160-Protein-beschichteten Platte. Fig. 3B zeigt die Ergebnisse unter Verwendung einer BRU/V3-Schleifenpeptide (CNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGK (SEQ-ID. NR. 11))-beschichteten Platte. Fig. 3C zeigt die Ergebnisse unter Verwendung einer Platte, die mit MN/V-Schleifenpeptiden (YNKRKRIHIQRGPGRAFYTTKNIIC (SEQ-ID. NR. 12)) beschichtet war, wobei die QR-Sequenz aus HIV-1/III_B fettgedruckt dargestellt ist. Fig. 3D zeigt die Ergebnisse unter Verwendung einer mit HXB2/CD4-Bindungsstellenpeptid (CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGIRC (SEQ-ID. NR. 13)) beschichteten Platte. Fig. 3E zeigt die Ergebnisse unter Verwendung einer mit immundominantem BRU/gp41 Region-Peptid (RILAVERYIKDQQLLGIWGCSGKLIC (SEQ-ID. NR. 14)) beschichteten Platte.

[0148] **Fig.** 3 zeigt, dass Antiserum aus der pM160-Konstrukt-immunisierten Maus eine wesentlich höhere Reaktivität gegenüber den BRU- und MN/V3-Schleifenpeptiden, dem CD4-Bindungsstellenpeptid und dem immundominanten gp41-Peptid als das rekombinante gp160-Protein (rgp160)-immunisierte Serum aufweist. Das Antiserum aus der rgp160-immunisierten Maus wies einen höheren Titer gegen das rgp160 auf als das pM160-immunisierte Antiserum, allerdings eine geringere Aktivität gegen die 3 getesteten spezifischen Neutralisationsepitope von gp160.

[0149] Um zu bestimmen, ob die durch DNA-Immunisierung erzeugten Antiseren eine antivirale Aktivität besaßen, wurde die Fähigkeit der Antiseren zur Neutralisation einer HIV-1-Infektion überprüft. Zellfreies HIV-1/III_B-Virus bei 100 $TCID_{50}$ wurde mit seriellen Verdünnungen der Antiseren vor der Verwendung zur Infektion von MT-2-Zielzellen (Montefiori, D.C., (1988) J. Clin. Microbio. 26:231–235) inkubiert.

[0150] Auch zellfreies 100 $TCID_{50}$HIV-1/III_B Virus wurde mit seriellen Verdünnungen von Antiseren 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Nach der Inkubation wurde das vorbehandelte Virus dann auf 4 × 10^4 der Zielzelllinie MT-2 1 h bei 37 °C ausplattiert, nach der Infektion wurden die MT-2-Zellen dreimal gewaschen und sodann bei 37 °C bei 5 % CO_2 inkubiert. Die Fusion wurde 3 Tage später quantitativ bewertet, indem die Anzahl der Synzytia pro Vertiefung in Dreifachexperimenten unter einem Phasenkontrastmikroskop visuell gezählt wurde.

[0151] Die Ergebnisse sind in **Fig.** 4 angegeben. Fig. 4A zeigt die Ergebnisse unter Verwendung von Vektor-immunisierten Mausseren im Vergleich mit Fig. 4B, die die Ergebnisse unter Verwendung von pM160-immunisierten Seren zeigt. Die Neutralisationswerte (V_n/V_0) gegen die Verdünnungsfaktoren (Nara, P., (1989) Techniques In HIV Research Hrsg. Aldovini, A. & Walkter, B.D., 77–86 M Stockton Press) sind in Fig. 4C erläutert. Das Kontrollserum (–x) stammte aus pMAMneoBlue-Vektor-immunisierten Mäusen. Die Testseren (0) stammten aus pM160-immunisierten Mäusen.

[0152] Die Synzytia-Hemmung wurde wie von Osther, K., et al., (1991) Hybridoma 10:673–683 beschrieben, durchgeführt. Die H9/III_B-Zelllinie wurde mit seriellen Verdünnungen (1:100, 1:200 und 1:400) der Antiseren in Platten mit 96 Vertiefungen in einem Gesamtvolumen von 50 µl 30 min bei 37 °C bei 5 % CO_2 vorinkubiert. Die Fusion wurde 3 Tage später quantitativ durch visuelles Zählen der Anzahl der Synzytia pro Vertiefung unter einem Phasenkonstruktmikroskop bewertet. Fig. 4D stellt die Zielzellen dar, cokultiviert mit der HIV-1/III_B-Zelllinie, behandelt mit Präimmunserum. Fig. 4E ist das Gleiche wie Fig. 4D, allerdings behandelt mit Vektorkontrolle-immunisiertem Serum. Fig. 4F ist das Gleiche wie Fig. 4D, allerdings behandelt mit rgp160-immunisiertem Serum. Fig. 4G ist das Gleiche wie Fig. 4D, allerdings behandelt mit pM160-immunisiertem Serum. Die Fig. 4D bis Fig. 4G zeigen, dass die Synzytia-Hemmung in diesen Tests bei einer Verdünnung von 1:200 eindeutig war. Die MT-2-Zellen waren mit zellfreiem HIV-1/III_B infiziert, welches mit Vektor-immunisiertem Antise-

rum vorinkubiert wurde, das leicht Synzytia bildete (Fig. 4A). Im Vergleich verhinderte die Vorinkubation mit pM160-immunisiertem Mausserum die Synzytium-Bildung (Fig. 4B). Die Neutralisationskinetik wurde durch V_n/V_0 gegen serielle Verdünnungen von Antiseren bestimmt (Nara, P., (1989) Techniques In HIV Research, Hrsg. Aldovini, A. & Walker, B.D., 77–86, M Stockton Press) (Fig. 4C). Das Serum aus der pM160-immunisierten Maus besaß eine biologisch aktive neutralisierende Aktivität bei Verdünnungen von bis zu 1:320, während die Kontroll-Antiseren keine vergleichbare Aktivität zeigten.

[0153] Um zu bestimmen, ob das Antiserum aus der pM160-immunisierten Maus das Hüllprotein-vermittelte Virus hemmen konnte, das sich durch direkte Zell-zu-Zell-Fusion ausbreitet, wurden Synzytium-Hemmtests durchgeführt. Antiserum aus der pM160-immunisierten Maus hemmt die HIV-1-induzierte Synzytiumbildung bei Verdünnungen von 1:200 (Fig. 4G). Im Gegensatz dazu vermochten das Präimmunserum (Fig. 4D), die Antiseren aus den rgp160-immunisierten Mäusen (Fig. 4F) und die Antiseren aus den Kontrollvektor-immunisierten Tieren (Fig. 4E) die Synzytiumbildung bei den gleichen Verdünnungen nicht zu hemmen.

[0154] Die Beobachtungen aus den Neutralisations- (Fig. 4A–C) und Synzytium-Hemmtests (Figuren D–G) dieser Seren korrelieren mit den festgestellten ELISA-Reaktivitäten (**Fig.** 3). Die Antiseren aus der pM160-immunisierten Maus, die einen hohen Grad der Bindung an neutralisierende Epitope zeigten, zeigten auch hohe antivirale Aktivitätsniveaus; umgekehrt besitzen Seren mit wenig Bindung an diese Epitope, einschließlich des Antiserums aus rgp160-immunisierten Mäusen, eine niedrige antivirale Aktivität.

[0155] Um zu testen, ob die Antiseren aus pM160-immunisierten Mäusen das gp120-Binden an CD4-befrachtete T-Zellen hemmen können, wurde ein direkter Hemmtest, aufgezeichnet durch Fluorocytometrie (Chen, Y.H., et al., (1992) AIDS 6:533–539), eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass Serum aus der pM160-Konstrukt-immunisierten Maus in der Lage war, das Binden von gp120 an CD4-befrachtete T-Zellen zu blockieren; eine 1:15-Verdünnung des Immunserums hemmte das FITC-gp120-Binden an $CD4^+$SupT1-Zellen um 22 ± 2 % in Wiederholungsexperimenten, wie durch Flusscytometrie bewertet. Dies zeigt an, dass diese Region für den HIV-Eintritt in die Zielzellen durch dieses Antiserum auch funktionelle gehemmt werden kann. Diese Daten stehen im Einklang mit der festgestellten ELISA-Reaktivität des Antiserums gegen die CD4-Bindungsstellenpeptide (Fig. 3C).

[0156] Immunglobulin-Isotypierungsstudien wurden unter Verwendung eines handelsüblichen murinen monoclonalen Antikörper-Isotypierungskits (Sigma) durchgeführt. Von den Anti-gp160-spezifischen Antikörpern, die durch die pM160-Immunisierung ausgelöst wurden, sind 19 % IgG1, 51 % sind IgG2, 16 % sind IgG3, 10 % sind IgM, und 5 % sind IgA. Die Vorherrschaft von IgG-Isotypen zeigt an, dass eine sekundäre Immunantwort stattgefunden hat, und legt weiter nahe, dass T-Helferzellen durch genetische Immunisierung ausgelöst werden können.

[0157] pM160- und pMAMneoBlue-DNAs wurden auf Miktotiterplatten aufgetragen, und das spezifische Binden wurde unter Verwendung von Seren sämtlicher immunisierter Tiere durch ELISA bestimmt. Es wurde kein signifikantes Binden an Plasmid-DNA festgestellt. Somit erscheint es unter Verwendung genetischen Materials zur Beimpfung von Muskelgewebe unwahrscheinlich, dass eine Anti-Plasmid-DNA-Antwort hervorgerufen wird.

[0158] Die Einschleusung von Konstrukt-DNA in den Mausmuskel durch Nadelinjektion kann zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen, da diese Technik kein Mittel zur Kontrolle der DNA-Aufnahme durch die Muskelzellen vorsieht. Die Injektion von Konstrukt-DNA allein (n ca. 4) mit Bupivacain-vorbehandelten Tieren (n ca. 4) wurde verglichen. Die Immunantworten, die in den beiden Gruppen festgestellt wurden, waren unähnlich, wobei 25 bzw. 75 % der Tiere in den ELISA-Test ansprachen. Die erhöhte Wirksamkeit kann durch die Verwendung eines direkten DNA-Abgabesystems, wie Teilchenbombardierung (Klein, T.M., et al., (1992) Bio/technology 10:286–291), erreicht werden.

[0159] Der Beweis für die Neutralisation, die Synzytiahemmung, die Hemmung des CD4-gp120-Bindens und das spezifische Binden an mehrere bedeutende Regionen des gp160 zeigt, dass das Einschleusen eines DNA-Konstrukts, das HIV-gp160-Membran-gebundenes Glycoprotein codiert, direkt in Muskelzellen lebender Tiere spezifische humorale Antworten auslösen und biologisch relevante antivirale Antikörper erzeugen kann.

[0160] Um zu testen, ob der Impfstoff in der Lage ist, eine protektive Immunantwort auszulösen, wurde das vorstehend beschriebene Tiermodell eingesetzt. Tumorzellen wurden mit DNA, die gp160 codiert, transfiziert, die Expression des Proteins wurde bestätigt, und sie wurden in die Tiere implantiert. Die Kontrollen umfassten nicht transfizierte Tumorlinien.

[0161] Die genetisch immunisierten Tiere wurden mit dem Plasmid pM160 geimpft. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere, Tiere, die mit Vektor-DNA allein geimpft wurden, und Tiere, denen das gp160-Protein verabreicht wurde.

[0162] Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunantwort der genetisch geimpften Mäusen ausreichte, um die transfizierten Tumore vollständig zu beiseitigen, während keine Wirkung auf untranslatierte Tumore vorhanden war. Die gp160-Protein-Impfung führte zu einer gewissen Reduktion der Tumorgröße in transfizierten Tumoren im Vergleich zu untransfizierten Tumoren, allerdings war keine Wirkung auf die Mortalität vorhanden. Ungeimpfte Tiere zeigten eine ähnliche Mortalität sowohl für transfizierte als auch untransfizierte Tumore.

Beispiel 4

[0163] Das Folgende ist eine Liste von Konstrukten, die bei den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Der Vektor pBabe.puro, der als Ausgangsmaterial zur Herstellung von vielen der nachstehend aufgelisteten Konstrukte verwendet wird, wurde ursprünglich konstruiert und beschrieben von Morgenstern, J.P. und H. Land, 1990 Nucl. Acids Res. 18(12):3587–3596, durch Bezugnahme eingeschlossen. Das pBabe.puro-Plasmid ist besonders zur Expression von exogenen Genen in Säugerzellen geeignet. Die DNA-Sequenzen, die zu exprimieren sind, werden an den Klonierungsstellen unter der Kontrolle des murinen Moloney-Leukämie-Virus(MoMuLV)-Long-Terminal-Repeat(LTR)-Promotors inseriert. Das Plasmid enthält den selektierbaren Marker für die Puromycin-Resistenz.

Beispiel 5

[0164] Das Plasmid pBa.Vα3 ist ein 7,8-kb-Plasmid, das ein 2,7-kb-EcoRI-Genomfragment enthält, das die T-Zellen-Rezeptor-Va3-Region codiert, die die L, V und J-Segmente enthält, die in die EcoRI-Stelle von pBabe.puro kloniert sind. Das T-Zellen-Rezeptor-abgeleitete Zielprotein ist bei der Immunisierung gegen und zur Behandlung von T-Zellen-vermittelter Autoimmunerkrankung und clonotypischem T-Zellen-Lymphom und Leukämie geeignet.

Beispiel 6

[0165] Das Plasmid pBa.gagpol-vpr ist ein 9,88-kb-Plasmid, das die Gene gag/pol und vif aus HIV/MN, kloniert in pBabe.puro, enthält. Das vpr-Gen ist deletiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Die HIV-DNA-Sequenz ist bei Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen, veröffentlicht. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr. M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 7

[0166] Das Plasmid pM160 ist ein 11,0-kb-Plasmid, das das 2,3-kb-PCR-Fragment enthält, das das HIV-1/3B-Hüllprotein und rev/tat-Gene, die in pMAMneoBlue kloniert sind, enthält. Die nef-Region ist deletiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Die DNA-Sequenz von HIV-1/3B ist bei Fisher, A., 1985 Nature 316:262, durch Bezugnahme eingeschlossen, veröffentlicht. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr. K03455, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 8

[0167] Das Plasmid pBa.VL ist ein 5,4-kb-Plasmid, das das PCR-Fragment enthält, das die VL-Region eines Anti-DNA-Antikörpers, der an den XbaI- und EcoRI-Stellen in pBabe.puro kloniert ist, codiert. Das Antikörper-abgeleitete Zielprotein ist ein Beispiel für ein Zielprotein, das bei der Immunisierung gegen und bei der Behandlung von B-Zellen-vermittelter Autoimmunerkrankung und klonotypischem B-Zellen-Lymphom und Leukämie geeignet ist. Ein allgemeines Verfahren zur Klonierung funktioneller variabler Regionen aus den Antikörpern kann bei Chaudhary, V.K., et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066, durch Bezugnahme eingeschlossen, gefunden werden.

Beispiel 9

[0168] Das Plasmid pOspA.B ist ein 6,84-kb-Plasmid, das die codierenden Regionen enthält, die die OspA-

und OspB-Antigene der Borrelia burgdorferi, die Spirochäte, die für Lyme-Krankheit verantwortlich ist, kloniert in pBabe.puro an den BamHI- und SalI-Stellen, codiert. Die PCR-Primer, die zur Erzeugung der OspA- und OspB-Fragmente verwendet werden, sind 5'-GAAGGATCCATGAAAAAATATTTATTGGG-3' (SEQ-ID. NR. 3) und 5'-ACTGTCGACTTATTTTAAAGCGTTTTTAAG-3' (SEQ-ID. NR. 4). Siehe: Williams, W.V., et al. 1992 DNA and Cell. Biol. 11(3):207, durch Bezugnahme eingeschlossen. Das Plasmid, das diese pathogenen Gene, die Zielproteine codieren, enthält, ist zur Immunisierung gegen Lyme-Krankheit geeignet.

Beispiel 10

[0169] Das Plasmid pBa.Rb-G ist ein 7,10-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das das Tollwut-Protein G codiert, das an der BamHI-Stelle in pBabe.puro kloniert ist. Das Plasmid, das dieses pathogene Gen enthält, das das Tollwut-Protein G codiert, ist bei der Immunisierung gegen Tollwut geeignet. Die DNA-Sequenz ist unter der Genbank-Nr. M32751, durch Bezugnahme eingeschlossen, offenbart. Siehe auch: Anilionis, A., et al., 1981 Nature 294:275, durch Bezugnahme eingeschlossen.

Beispiel 11

[0170] Das Plasmid pBa.HPV-L1 ist ein 6,80-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das das L1-Capsidprotein des menschlichen Papillomavirus (HPV), einschließlich der HPV-Stämme 16, 18, 31 und 33, kloniert in pBabe.puro an der BamHI- und EcoRI-Stelle, codiert. Das Plasmid ist bei der Immunisierung gegen eine HPV-Infektion und den dadurch ausgelösten Krebs geeignet. Die DNA-Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M15781, durch Bezugnahme eingeschlossen, offenbart. Siehe auch: Howley, P., 1990 Fields Virology, Band 2, Hrsg.:Channock, R.M. et al., Kapitel 58:1625; und Shah, K. und P. Howley, 1990 Fields Virology, Band 2, Hrsg.: Channock, R.M. et al., Kapitel 59, beide durch Bezugnahme eingeschlossen.

Beispiel 12

[0171] Das Plasmid pBa.HPV-L2 ist ein 6,80-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das das L2-Capsidprotein des menschlichen Papillomavirus (HPV), einschließlich der HPV-Stämme 16, 18, 31 und 33, kloniert in pBabe.puro an den Stellen BamHI- und EcoRI, codiert. Das Plasmid ist bei der Immunisierung gegen eine HPV-Infektion und den dadurch verursachten Krebs geeignet. Die DNA-Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M15781, durch Bezugnahme eingeschlossen, offenbart. Siehe auch: Howley, P., 1990 Fields Virology, Band 2, Hrsg.: Channock, R.M. et al. Kapitel 58:1625; und Shah, K. und P. Howley, 1990 Fields Virology, Band 2, Hrsg.: Channock, R.M. et al. Kapitel 59; beide durch Bezugnahme eingeschlossen.

Beispiel 13

[0172] Das Plasmid pBa.MNp7 ist ein 5,24-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das die p7-codierende Region, einschließlich der HIV-MN-gag(Kernprotein)-Sequenz, kloniert in pBabe.puro an der Stelle BamHI, codiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, zugänglich.

Beispiel 14

[0173] Das PlasmidpGA733-2 ist ein 6,3-kb-Plasmid, das das GA733-2-Tumor-Oberflächenantigen, kloniert aus der kolorektalen Karzinomzelllinie SW948 in den Vektor pCDM8 (Seed, B. und A. Aruffo, 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3365, durch Bezugnahme eingeschlossen) an der Stelle BstXI, enthält. Das Tumor-assoziierte Zielprotein ist ein Beispiel für ein Zielprotein, das bei der Immunisierung gegen und Behandlung von hyperproliferativer Krankheit, wie Krebs, geeignet ist. Das GA733-2-Antigen ist ein geeignetes Zielantigen gegen Darmkrebs. Das GA733-Antigen wird bei Szala, S. et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3542–3546, durch Bezugnahme eingeschlossen, beschrieben.

Beispiel 15

[0174] Das Plasmid pT4-pMV7 ist ein 11,15-kb-Plasmid, das cDNA enthält, die den menschlichen CD4-Rezeptor, kloniert an der Stelle EcoRI in den Vektor pMV7, codiert. Das CD4-Zielprotein ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung des T-Zellen-Lymphoms geeignet. Das Plasmid pT4-pMV7 ist erhältlich von AIDS Repository, Katalog Nr. 158.

Beispiel 16

[0175] Das Plasmid pDJGA733 ist ein 5,1-kb-Plasmid, das das Tumoroberflächenantigen GA733, kloniert an der Stelle BamHI in pBabe.puro, enthält. Das Tumor-assoziierte Zielprotein ist ein Beispiel für ein Zielprotein, das bei der Immunisierung gegen und Behandlung von hyperproliferativer Erkrankung, wie Krebs, geeignet ist. Das Antigen GA733 ist ein gegen Dickdarmkrebs geeignetes Zielantigen.

Beispiel 17

[0176] Das Plasmid pBa.RAS ist ein 6,8-kb-Plasmid, das die ras-Codierungsregion enthält, die zuerst aus pZIPneoRAS subkloniert und an der Stelle BamHI in pBabe.puro kloniert wurde. Das ras-Zielprotein ist ein Beispiel für ein cytoplasmatisches Signalisierungsmolekül. Das Verfahren der Klonierung von ras ist bei Weinberg, 1984 Mol. Cell. Biol. 4:1577 beschrieben, durch Bezugnahme eingeschlossen. Das ras-codierende Plasmid ist zur Immunisierung gegen und Behandlung von hyperproliferativer Krankheit, wie Krebs, insbesondere von ras-verwandtem Krebs, wie Blasenkrebs, Muskelkrebs, Lungenkrebs, Gehirntumor und Knochenkrebs, geeignet.

Beispiel 18

[0177] Das Plasmid pBa.MNp55 ist ein 6,38-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das die pb55-codierende Region, einschließlich des HIV-MN-gag-Vorläufers (Kernproteinsequenz), kloniert an der Stelle BamHI in pBaba.puro, codiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 19

[0178] Das Plasmid pBa.MNp24 ist ein 5,78-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment aus dem pMN-SF1-Templat enthält, das die p24-codierende Region, einschließlich der gesamten HIV-MN-gag-codierenden Region, kloniert in pBabe.puro an den Stellen BamHI und EcoRI, codiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 20

[0179] Das Plasmid pBa.MNp17 ist ein 5,5-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das die p17-codierende Region, einschließlich der HIV-MN-gag(Kernprotein)-Sequenz, kloniert an den Stellen BamHI und EcoRI in pBabe.puro, codiert. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 21

[0180] Das Plasmid pBa.SIVenv ist ein 7,8-kb-Plasmid, das ein 2,71 kb, PCR-generiertes Fragment, amplifiziert aus einem Konstrukt, das SIV 239 in pBR322 enthält, kloniert an den Stellen BamHI und EcoRI in pBabe.puro, enthält. Die verwendeten Primer sind 5'-GCCAGTTTTGGATCCTTAAAAAAGGCTTGG-3' (SEQ-ID. NR. 5) und 5'-TTGTGAGGGACAGAATTCCAATCAGGG-3' (SEQ-ID. NR. 6). Das Plasmid ist vom AIDS Research and Reference Reagent Programm; Katalog Nr. 210, erhältlich.

Beispiel 22

[0181] Das Plasmid pcTSP/ATK.env ist ein 8,92-kb-Plasmid, das ein PCR-generiertes Fragment enthält, das die vollständige HTLV-Hüllprotein-codierende Region aus HTLV-1/TSP und /ATK-Isolaten codiert, subkloniert in den Vektor pcDNA1/neo, enthält. Die verwendeten Primer sind 5'-CAGTGATATCCCGGGAGACTCCTC-3' (SEQ-ID. NR. 7) und 5'-GAATAGAAGAACTCCTCTAGAATTC-3' (SEQ-ID. NR. 8). Das Plasmid pcTSP/ATK.env wird in 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3599, durch Bezugnahme eingeschlossen, beschrieben. Das HTLV-env-Zielprotein ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von Infektion durch

HTLV und T-Zellen-Lymphom geeignet.

Beispiel 23

[0182] Das Plasmid pBa.MNgp160 ist ein 7,9-kb-Plasmid, das ein 2,8 kb PCR-generiertes Fragment enthält, amplifiziert aus einem Konstrukt, das Mnenv in pSP72 enthält, und kloniert an den Stellen BamHI und EcoRI in pBabe.puro. Die verwendeten Primer sind 5'-GCCTTAGGCGGATCCTATGGCAGGAAG-3' (SEQ-ID. NR. 9) und 5'-TAAGATGGGTGGCCATGGTGAATT-3' (SEQ-ID. NR. 10). Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet.

Beispiel 24

[0183] Das Plasmid pC.MNp55 ist ein 11,8-kb-Plasmid, das ein 1,4 kb PCR-generiertes Fragment enthält, amplifiziert aus der gag-Region von MN-Isolat und kloniert in den Vektor pCEP4. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektion und AIDS geeignet. Reiz, M.S., 1992 AIDS Res. Human Retro. 8:1549, durch Bezugnahme eingeschlossen. Die Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M17449, durch Bezugnahme eingeschlossen, verfügbar.

Beispiel 25

[0184] Das Plasmid pC.Neu ist ein 14,2-kb-Plasmid, das ein 3,8 kb DNA-Fragment enthält, das die menschliche neu-Onkogen-codierende Region enthält, die aus dem LTR-2/erbB-2-Konstrukt ausgeschnitten und in den Vektor pCEP4 subkloniert wurde. Das Plasmid pC.Neu ist bei DIFiore 1987 Science 237:178, durch Bezugnahme eingeschlossen, beschrieben. Das neu-Onkogen-Zielprotein ist ein Beispiel für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, der als Zielprotein zur Immunisierung gegen und Behandlung von hyperproliferativer Erkrankung, wie Krebs, insbesondere Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs und Gehirntumor, geeignet ist.

Beispiel 26

[0185] Das Plasmid pC.RAS ist ein 11,7-kb-Plasmid, das ein 1,4-kb-DNA-Fragment enthält, das die ras-Onkogen-codierende Region enthält, die zuerst aus pZIPneoRAS subkloniert und an der Stelle BamHI in pCEP4 subkloniert wurde. Das pC.RAS-Plasmid wird bei Weinberg 1984 Mol. Cell. Biol. 4:1577 beschrieben, durch Bezugnahme eingeschlossen. Das ras-Zielprotein ist ein Beispiel für ein cytoplasmatisches Signalisierungsmolekül. Ras-Codierungsplasmide sind zur Immunisierung gegen und Behandlung von hyperproliferativer Krankheit, wie Krebs, insbesondere von ras-verwandtem Krebs, wie Blasenkrebs, Muskelkrebs, Lungenkrebs, Gehirntumor und Knochenkrebs, geeignet.

Beispiel 27

[0186] Das Plasmid pNLpuro ist ein 15-kb-Plasmid, das HIV-gag/pol und eine SV40 puro-Insertion enthält. Das Plasmid, das diese HIV-Virusgene enthält, die HIV-Zielproteine codieren, ist bei der Immunisierung gegen und Behandlung von HIV-Infektionen und AIDS geeignet.

Beispiel 28

[0187] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen menschliches CD4 in Mäusen konstruiert. Diese Experimente waren zum Testen der Fähigkeit eines Impfstoffs ausgelegt, gegen ein T4-Lymphom-Antigen zu schützen. In einem T4-Zellen-Lymphom ist CD4 ein Tumor-spezifisches Antigen. Demnach zeigt dieses Modell die Fähigkeit des genetischen Impfstoffs, gegen das T4-Lymphom zu schützen. Außerdem testeten diese Experimente die Wirksamkeit gegen ein Element der Immunglobulin-Superfamilie von Molekülen. CD4 ist zwischen menschlichen und murinen Spezies hoch konserviert.

[0188] Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Tumorzellen wurden mit DNA, die CD4 codiert, transfiziert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien. Obwohl die Tiere immunkompetent waren, wurde in den ungeimpften Tieren keine Immunantwort gegen die implantierten CD4-markierten Tumore gerichtet.

[0189] Genetisch immunisierte Tiere wurden mit dem Plasmid pT4-pMV7, beschrieben in Beispiel 15, ge-

impft. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere und Tiere, denen das CD4-Protein verabreicht wurde.

[0190] Bei dem genetischen Immunisierungsverfahren, das hier beschrieben ist, wurden 100 µl 0,5 % Bupivacain-HCl und 0,1 % Methylparaben in isotonischem NaCl unter Verwendung einer 27er Nadel zur Stimulierung der Muskelzellenregenerierung und zur Erleichterung der Aufnahme des genetischen Konstrukts in die Quadrizepsmuskeln von BALB/c-Mäusen injiziert. 24 h später wurde dann in die gleichen Injektionsstellen entweder 100 µg pT4-pMV7 oder 100 µg pMV7 als Kontrollplasmid injiziert. Die Mäuse wurden durch dreimalige Injektion der gleichen Menge von DNA-Konstrukt in 2-wöchigen Intervallen auf die gleiche Weise, allerdings ohne Vorbehandlung mit Bupivacain-HCl geboostet.

[0191] Die Tiere erhielten 1.000.000 CD4-markierte Tumorzellen. In den nicht geimpften Tieren bildeten sich große Tumore, und der Tod trat nach etwa 7 bis 10 Wochen ein. Die geimpften Tiere entwickelten keine vergleichbaren tödlichen Tumore.

[0192] Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunantwort von genetisch geimpften Mäusen ausreichte, um die transfizierten Tumore vollständig zu beseitigen, während keine Wirkung auf die untransfizierten Tumore vorhanden war. Die CD4-Proteinimpfung führt zu einer gewissen Herabsetzung in der Tumorgröße bei transfizierten Tumoren im Vergleich zu untransfizierten Tumoren, hatte allerdings keine Wirkung auf die Mortalität. Nicht geimpfte Tiere zeigten eine vergleichbare Mortalität sowohl für transfizierte als auch untransfizierte Tumore.

Beispiel 29

[0193] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen menschliches GA733 an Mäusen konstruiert. Diese Experimente waren zum Testen der Fähigkeit eines Impfstoffs, gegen GA733-assoziierten Krebs, wie Darmkrebs, zu schützen, ausgelegt. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzellen wurden mit DNA, die GA733 codiert, transfiziert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0194] Genetisch immunisierte Tiere wurden mit dem Plasmid pGA733-2, beschrieben in Beispiel 14, unter Befolgung des vorstehend beschriebenen Verfahrens, geimpft. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere und Tiere, denen das GA733-Protein verabreicht wurde.

[0195] Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunantwort von genetisch geimpften Mäusen ausreichte, um die transfizierten Tumore vollständig zu beseitigen, während keine Wirkung auf die untranslatierten Tumore vorlag. Die GA733-Proteinimpfung führte zu einer gewissen Reduktion in der Tumorgröße in transfizierten Tumoren im Vergleich zu nicht-transfizierten Tumoren, besaß allerdings keine Wirkung auf die Mortalität. Die ungeimpften Tiere zeigten eine vergleichbare Mortalität sowohl für transfizierte als auch untransfizierte Tumore.

Beispiel 30

[0196] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen menschliches p185neu an Mäusen konstruiert. Die Experimente waren zum Testen der Fähigkeit eines Impfstoffs zum Schutz gegen p185neu-assoziierten Krebs, wie Brust-, Lungenkrebs und Gehirntumor, ausgelegt. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzellen wurden mit DNA, die neu codiert, transfiziert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0197] Genetisch immunisierte Tiere wurden mit dem Plasmid pLTR-2/erbB-2, ein 14,3-kb-Plasmid, das die menschliche neu-Onkogen-Codierungsregion, kloniert in den LTR-2-Vektor an der XhoI-Stelle, enthält, unter Befolgung des vorstehend beschriebenen Verfahrens geimpft. 5'-LTR und 3'-LTR stammen aus Moloney-MuLV-LTR. Die Kontrollen umfassten umgeimpfte Tiere und Tiere, denen das p185neu-Protein verabreicht wurde.

[0198] Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunantwort von genetisch geimpften Mäusen ausreichte, um die transfizierten Tumore vollständig zu beseitigen, während sie keine Wirkung auf die untranslatierten Tumore besaß. Die p185-Proteinimpfung führte zu einer gewissen Reduktion in der Tumorgröße bei transfizierten Tumoren im Vergleich zu untransfizierten Tumoren, sie besaß allerdings keine Wirkung auf die Mortalität. Ungeimpfte Tiere zeigten eine ähnliche Mortalität sowohl für transfizierte als auch untransfizierte Tumore.

Beispiel 31

[0199] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen menschliches Ras an Mäusen konstruiert. Diese Experimente waren zum Testen der Fähigkeit eines Impfstoffs zum Schutze gegen Ras-assoziierten Krebs, wie Blasenkrebs, Muskelkrebs, Lungenkrebs, Gehirntumor und Knochenkrebs, ausgelegt. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzellen wurden mit DNA transfiziert, die Ras codiert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0200] Die genetisch immunisierte Tiere wurden mit dem Plasmid pBa.RAS, beschrieben in Beispiel 17, unter Befolgung des vorstehend beschriebenen Impfverfahrens geimpft. Das ras-Zielprotein ist ein Beispiel für ein cytoplasmatisches Signalisierungsmolekül. Das Verfahren der Klonierung von ras ist bei Weinberg 1984 Mol. Cell. Biol. 4:1577, durch Bezugnahme eingeschlossen, beschrieben. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere und Tiere, denen Ras-Protein verabreicht wurde.

Beispiel 32

[0201] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen menschliches Tollwut-G-Protein-Antigen an Mäusen konstruiert. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzelllinien wurden mit DNA transfiziert, die das Tollwut-G-Protein codiert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0202] Die genetisch immunisierten Tiere wurden mit dem Plasmid pBa.Rb-G, das in Beispiel 10 beschrieben ist, unter Befolgung des vorstehend beschriebenen Impfverfahrens geimpft. Das Tollwut-G-Zielprotein ist ein Beispiel für ein pathogenes Antigen. Die DNA-Sequenz ist unter der Genbank-Nr.: M32751 offenbart. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere und Tiere, denen das G-Protein verabreicht wurde.

Beispiel 33

[0203] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen das Lyme-Krankheitsantigen an Mäusen ausgelegt. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzellen wurden mit DNA transfiziert, die OspA und OspB codiert, die Expression des Proteins wurde bestätigt, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0204] Genetisch immunisierte Tiere wurden mit dem Plasmid pOspA.B, das in Beispiel 9 beschrieben ist, geimpft. Die Kontrollen umfassten ungeimpfte Tiere, und Tiere, denen OspA- und OspB-Protein verabreicht wurde.

Beispiel 34

[0205] Ein DNA-Konstrukt wurde zum Testen der Wirksamkeit eines genetischen Impfstoffs gegen eine menschliche T-Zellen-Rezeptor-variable Region in Mäusen ausgelegt. Diese Experimente wurden zum Testen der Fähigkeit eines Impfstoffs zum Schutze gegen einen T-Zellen-Rezeptor-stammenden Protein-assoziierten Krebs wie T-Zellen-Lymphom und T-Zellen-vermittelter Autoimmunkrankheit, ausgelegt. Das verwendete Tiermodell wurde vorstehend beschrieben. Die Tumorzellen wurden mit DNA transfiziert, die Ras codiert, es wurde sichergestellt, dass sie das Protein exprimieren, und sie wurden in das Tier implantiert. Die Kontrollen umfassten untransfizierte Tumorlinien.

[0206] Die genetisch immunisierten Tiere wurden mit dem Plasmid pBa.Vα3, das in Beispiel 5 beschrieben ist, unter Befolgung des vorstehend beschriebenen Impfverfahrens geimpft.

Beispiel 35

[0207] Das Plasmid pM160 kann als Ausgangsmaterial für mehrere Plasmide verwendet werden, die zur Expression von einem oder mehreren Genen aus dem env-Teil von HIV geeignet sind. Die Konstruktion von pM160 ist vorstehend beschrieben. Das Plasmid umfasst die gp160-, tat- und rev-Codierungsregion. Das nef-Gen fehlt.

[0208] Der Promotor, der die gp160/rev/tat-Genexpression kontrolliert, ist MMTV-LTR. Der Promotor kann de-

letiert und durch den Actinpromotor, Myosinpromotor, HIV-LTR-Promotor und den CMV-Promotor ersetzt sein.

[0209] Das Gen, das die Ampicillin-Resistenz verleiht, kann deletiert oder anderweitig inaktiviert sein. Das Gen, das die Neomycin-Resistenz verleiht, kann unter die Kontrolle eines bakteriellen Promotors gestellt werden.

[0210] Der Rous-Sarcom-Virus-Enhancer kann aus dem Plasmid deletiert sein. Der RSV-Enhancer kann durch den Muskelcreatin-Enhancer ersetzt sein.

[0211] Die gp160/rev/tat-Gene überlappen und teilen sich die gleichen Nucleotid-Sequenzen in verschiedenen Leserastern. Das rev-Gen kann durch Änderung seines Startcodons zu einem verschiedenen Startcodon deletiert werden. Gleichermaßen kann das tat-Gen durch die gleichen Mittel beseitigt werden. In jedem Plasmid, mit Ausnahme derjenigen unter Verwendung des HIV-LTR-Promotors zur Kontrolle von gp160/rev/tat, können entweder rev, tat oder sowohl rev als auch tat beseitigt sein. In den Plasmiden unter Verwendung des HIV-LTR-Promotors muss tat vorhanden sein.

[0212] Die folgende Tabelle listet die pM160-modifizierten Plasmide. Jedes Plasmid besitzt ein inaktiviertes Ampicillin-Gen. Der RSV-Enhancer ist jeweils deletiert. Einige besitzen keinen Enhancer (no); einige besitzen den Creatinmuskel-Enhancer (CME). Einige besitzen das HIV-rev-Gen (yes), während es in anderen deletiert ist (no). Einige besitzen das HIV-tat-Gen, (yes) während es in anderen deletiert ist (no).

Konstrukt	Promotor	Enhancer	rev	tat
RA-1	Actin	no	yes	yes
RA-2	Actin	no	yes	no
RA-3	Actin	no	no	yes
RA-4	Actin	CME	yes	yes
RA-5	Actin	CME	yes	no
RA-6	Actin	CME	no	yes
RA-7	CMV	no	yes	yes
RA-8	CMV	no	yes	no
RA-9	CMV	no	no	yes
RA-10	CMV	CME	yes	yes
RA-11	CMV	CME	yes	no
RA-12	CMV	CME	no	yes
RA-13	MMTV	no	yes	yes
RA-14	MMTV	no	yes	no
RA-15	MMTV	no	no	yes
RA-16	MMTV	CME	yes	yes
RA-17	MMTV	CME	yes	no
RA-18	MMTV	CME	no	yes
RA-19	Myosin	no	yes	yes
RA-20	Myosin	no	yes	no
RA-21	Myosin	no	no	yes
RA-22	Myosin	CME	yes	yes
RA-23	Myosin	CME	yes	no
RA-24	Myosin	CME	no	yes
RA-25	HIV-1 LTR	no	yes	yes
RA-26	HIV-1 LTR	no	no	yes
RA-27	HIV-1 LTR	CME	yes	yes
RA-28	HIV-1 LTR	CME	no	yes

[0213] Die Konstruktionen RA-29 bis RA-56 sind zu RA-1 bis RA-32 identisch bzw. in jedem Fall mit der Ausnahme identisch, dass der Promotor, der das Neomyin-Gen kontrolliert, ein bakterieller Promotor ist.

Beispiel 36

[0214] Das Plasmid pNLpuro kann als Startmaterial zur Herstellung mehrerer verschiedener Plasmide verwendet werden, die die HIV-Gene gag/pol exprimieren. Wie vortehend beschrieben, wurde pNLpuro zur Expression von gag pol konstruiert. Das Plasmid pNLpuroΔvpr, das vorstehend beschrieben ist, wurde konstruiert, um das Regulatorgen vpr aus dem HIV-Vektor gag pol zu deletieren, um ein notwendiges regulatorisches Protein aus der Serie der durch Impfung einzubringenden Genen zu beseitigen. Zusätzlich zu vpr können an-

dere Änderungen durch die Fachleute an dem Plasmid pNL43puro unter Anwendung von biologischen Molekülstandardtechniken und von weithin verfügbarem Ausgangsmaterial vorgenommen werden.

[0215] Die menschlichen flankierenden Sequenzen 5' und 3' der HIV-Sequenzen können durch mehrere Verfahren entfernt werden. Beispielsweise können unter Verwendung von PCR nur HIV-SV40-puro- und -pUC18-Sequenzen amplifiziert und rekonstruiert werden.

[0216] Die psi-Region von HIV, die beim Packen des Virus von Bedeutung ist, kann aus pNL43puro-basierenden Plasmiden deletiert werden. Zur Deletion der psi-Region wird das pNLpuro-Plasmid mit SacI und SpeI zerschnitten. Dieser Abbau entfernt die psi-Region sowie den 5'-LTR, der stromaufwärts liegt und Teil der gag/pol-Region ist, die stromaufwärts von psi liegt. Um die deletierten nicht-psi-Sequenzen zu reinserieren, wird die PCR-Amplifikation zur Regenerierung dieser Sequenzen durchgeführt. Es werden Primer konstruiert, die die Teile der HIV-Sequenz 5' und 3' zu psi ohne Regenerieren von psi regenerieren. Die Primer reformieren die SacI-Stelle auf dem Teil des Plasmids 5' zu dem 5'-LTR. Die Primer verlaufen stromabwärts von einer Stelle stromaufwärts der SacI-Stelle zu einer Stelle unmittelbar 3' zum 5'-Ende der psi-Region und erzeugen eine AatI-Stelle am 3'-Ende. Die Primer, die unmittelbar 5' zu der psi-Region beginnen, erzeugen ebenfalls eine AatI-Stelle und, beginnend 3' von der SpeI-Stelle, regenerieren sie diese Stelle. Die PCR-generierten Fragmente werden mit SacI, AatI und SpeI abgebaut und miteinander mit dem SacI/SpeI-abgebauten pNLpuro-psi-Fragment ligiert. Der HIV-5'-LTR-Promotor kann deletiert und durch den Moloney-Virus-Promotor, MMTV-LTR, den Actinpromotor, den Myosinpromotor und den CMV-Promotor ersetzt sein.

[0217] Die HIV-3'-LTR-Polyadenylierungsstelle kann deletiert und mit SV40-Polyadenylierungsstelle ersetzt sein.

[0218] Das Gen, das die Ampicillin-Resistenz verleiht, kann deletiert oder anderweitig inaktiviert sein.

[0219] Das Folgende ist eine Liste der pNLpuro-basierenden Konstruktionen, wobei die HIV-psi- und HIV-vpr-Regionen und die menschlichen flankierenden 5'- und 3'-Regionen der HIV-Sequenzen deletiert sind.

Konstrukt	Promotor	poly(A)	Amp^r
LA-1	Moloney	HIV 3'LTR	yes
LA-2	Moloney	SV40	yes
LA-3	Moloney	HIV 3'LTR	no
LA-4	Moloney	SV40	no
LA-5	CMV	HIV 3'LTR	yes
LA-6	CMV	SV40	yes
LA-7	CMV	HIV 3'LTR	no
LA-8	CMV	SV40	no
LA-9	MMTV	HIV 3'LTR	yes
LA-10	MMTV	SV40	yes
LA-11	MMTV	HIV 3'LTR	no
LA-12	MMTV	SV40	no
LA-13	HIV 5' LTR	HIV 3'LTR	yes
LA-14	HIV 5' LTR	SV40	yes
LA-15	HIV 5' LTR	HIV 3'LTR	no
LA-16	HIV 5' LTR	SV40	no

[0220] Die Konstruktionen LA-17 bis LA-22 sind identisch zu LA-1 bis LA-16 bzw. mit der Ausnahme, dass in jedem Fall mindestens eine der menschlichen flankierenden Sequenz verbleibt.

Beispiel 37

[0221] Bei einer weiteren Konstruktion zur Expression des env-Gens kann diese Region von HIV in das im Handel erhältliche Plasmid pCEP4 (Invitrogen) inseriert werden. Das pCEP4-Plasmid ist besonders geeignet, da es den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung und die nukleäre Antigen-EBNA-1-codierende Region enthält, die eine episomale Replikation in hoher Kopienzahl ohne Integration erzeugt. pCEP4 enthält auch den Hygromycinmarker unter der regulatorischen Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors und der Polyadenylierungsstelle. Die HIV-env-codierende Region wird unter die regulatorische Kontrolle des CMV-Promotors und der SV40-Polyadenylierungsstelle gestellt. Die HIV-env-codierende Region wurde als 2,3-kb-PCR-Fragment von HIV/3B, Genbanksequenz K03455, erhalten. Das resultierende pCEP4-basierende Plasmid pRA-100 wird extrachromosomal gehalten und erzeugt gp160-Protein.

Beispiel 38

[0222] Bei einer weiteren Konstruktion zur Expression des env-Gens kann diese Region von HIV in das im Handel erhältliche Plasmid pREP4 (Invitrogen) inseriert werden. Das pREP4-Plasmid ist besonders geeignet, da es den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung und die nukleäre Antigen-EBNA-1-codierende Region enthält, die eine episomale Replikation in hoher Kopienzahl ohne Integration erzeugt. pREP4 enthält auch den Hygromycinmarker unter der regulatorischen Kontrolle des Thymidin-Kinase-Promotors und der Polyadenylierungsstelle. Die HIV-env-codierende Region wird unter die regulatorische Kontrolle des RSV-Promotors und der SV40-Polyadenylierungsstelle gestellt. Die HIV-env-codierende Region wurde als 2,3-kb-PCR-Fragment von HIV/3B, Genbanksequenz K03455, erhalten. Das resultierende pCEP4-basierende Plasmid, pRA-100, wird extrachromosomal gehalten und erzeugt das gp160-Protein.

Beispiel 39

[0223] Bei einer weiteren Konstruktion zur Expression der gag/pol-Gene kann diese Region von HIV in das im Handel erhältliche Plasmid pCEP4 (Invitrogen) inseriert werden. Das pCEP4-Plasmid ist besonders geeignet, da es den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung und eine nukleäre Antigen-EBNA-1-codierende Region enthält, die eine episomale Replikation in hoher Kopienzahl ohne Integration erzeugt. pCEP4 enthält auch den Hygromycinmarker unter der regulatorischen Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors und der Polyadenylierungsstelle. Die HIV-gag/pol-codierende Region wird unter die regulatorische Kontrolle des CMV-Promotors und der SV40-Polyadenylierungsstelle gestellt. Die HIV-gag/pol-codierende Region wurde aus HIV-MN, Genbanksequenz MI7449, erhalten und umfasst das vif-Gen. Das vpr-Gen ist nicht eingeschlossen. Das resultierende pCEP4-basierende Plasmid pLA-100 wird extrachromosomal gehalten und erzeugt GAG55, reverse Transcriptase-, Protease- und Integrase-Proteine.

Beispiel 40

[0224] Bei einer weiteren Konstruktion zur Expression der gag/pol-Gene kann diese Region von HIV in das im Handel erhältliche Plasmid pCEP4 (Invitrogen) inseriert werden. Das pCEP4-Plasmid ist besonders geeignet, da es den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung und eine nukleäre Antigen-EBNA-1-codierende Region enthält, die eine episomale Replikation in hoher Kopienzahl ohne Integration erzeugt. pCEP4 enthält auch den Hygromycinmarker unter der regulatorischen Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors und der Polyadenylierungsstelle. Die HIV-gag/pol-codierende Region wird unter die regulatorische Kontrolle des CMV-Promotors und der SV40-Polyadenylierungsstelle gestellt. Die HIV-gag/pol-codierende Region wurde aus HIV-MN, Genbanksequenz MI7449, erhalten und umfasst das vif-Gen. Das vpr-Gen ist nicht eingeschlossen. Das resultierende pREP4-basierende Plasmid pLA-101 wird extrachromosomal gehalten und erzeugt GAG55-, reverse Transcriptase-, Protease- und Integrase-Proteine.

Beispiel 41

[0225] Die folgende Konstruktion, hier als pGAGPOL.rev bezeichnet, wird zur Expression von HIV-gag/pol-Genen verwendet.

[0226] Das Plasmid umfasst ein Kanamycinresistenz-Gen und einen pBR322-DNA-Replikationsursprung. Die zur Transcriptionsregulierung bereitgestellten Sequenzen umfassen: einen Cytamegalovirus-Promotor; einen Rous-Sacom-Virus-Enhancer; und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die HIV-1-Sequenzen, die in pGAGPOL.rev eingeschlossen sind, umfassen eine Sequenz, die p17, p24, und p15 des offenen gag-Leserasters codiert; eine Sequenz, die Protease codiert, eine Sequenz, die reverse Transcriptase codiert, die eine kleine Deletion enthält, und eine Sequenz, die den inaktiven Aminoterminus von Integrase des offenen pol-Leserasters codiert; und eine Sequenz die rev codiert. Die HIV-Sequenzen stammen jeweils von dem HIV-1-Stamm HXB2.

[0227] Mehrere Sicherheitsmerkmale sind in pGAGPOL.rev eingeschlossen. Diese umfassen die Verwendung eines CMV-Promotors und einer nicht retroviralen Poly(A)-Stelle. Außerdem begrenzt die Deletion der ψ-Sequenz die Fähigkeit zum Packen von Virus-RNA. Zusätzlich ergeben mehrere Mutationen der reversen Transcriptase ein enzymatisch inaktives Produkt. Außerdem ergibt eine große Deletion von Integrase ein inaktives Produkt, und ein Kanamycinresistenzmarker wird zur Stabilisierung von bakteriellen Transformanten verwendet.

[0228] Das Plasmid pGAGPOL.rev wird wie folgt konstruiert.

Schritt 1: Ein Subklon von einem Teil des HIV-1 (HXB2)-Genoms, das in Bluescript (Stratagene) kloniert ist, wird verwendet. Der Subklon von HIV-1 enthält den vollständigen 5'-LTR und den Rest des HIV-1-Genoms bis Nucleotid 5795 (Genbank-Nummerierung). Die HIV-1-Sequenzen werden aus dem HBX2D-Plasmid (AIDS Repository) erhalten.
Schritt 2: Der PCR-Teil von gag aus dem offenen Leseraster-HXB2D-Plasmid (AIDS Respository). Schneiden des PCR-Fragments mit NotI und SpeI und Ligation mit dem HIV-1-Subklon, der vorstehend beschrieben und mit NotI und SpeI begrenzt ist.
Schritt 3: Die gag/pol-PCR-Verbindungsstelle und Teil der pol-codierenden Sequenzen aus dem Plasmid HXB2D (AIDS Repository) mit den Primern SEQ-ID. NR. 15 und SEQ-ID. NR. 16. Schneiden des PCR-Produkts mit ClaI und gegenseitige Ligation. Schneiden der ligierten Fragmente mit BclI und SalI und Ligation mit Plasmid aus Schritt 2, abgebaut mit BclI und SalI.
Schritt 4: Schneiden von Plasmid aus Schritt 3 mit BspMI und EcoRI und Religation mit Adaptern, die durch Annelieren der Linker SEQ-ID. NR. 17 und SEQ-ID. NR. 18 gebildet werden.
Schritt 5: Schneiden von Plasmid aus Schritt 4 mit NotI und SalI und Ligation mit dem Plasmid von entweder 4a oder 4b in der für pENV aufgeschriebenen Beschreibung (nachstehend). Auch Schneiden mit NotI und SalI.
Schritt 6: Restriktion des Plasmids aus Schritt 5 mit SalI und MluI und Ligation mit dem PCR-Produkt, das durch PCR von rev mit den Primern SEQ-ID. NR. 19 und SEQ-ID. NR. 20 erhalten wurde.
Schritt 7: Schneiden von Plasmid aus Schritt 6 mit NotI und Ligation mit dem Produkt, das durch PCR des rev-responsiven Elements in dem Plasmid HXB2D (AIDS Repository) mit den Primern SEQ-ID. NR. 21 und SEQ-ID. NR. 22 erhalten wurde.

[0229] Die Schritte 6 und 7 sind optional.

Beispiel 42

[0230] Die folgende Konstruktion, hier als pENV bezeichnet, ist zur Expression von HIV-env-Genen geeignet.

[0231] Das Plasmid umfasst ein Kanamycinresistenzgen und einen pBR322-DNA-Replikationsursprung. Die zur Transcriptionsregulierung bereitgestellten Sequenzen umfassen: einen Cytomegalie-Viruspromotor; einen Rous-Sarcom-Virus-Enhancer und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die in pENV eingeschlossenen HIV-1-Sequenzen umfassen eine Sequenz, die vpu codiert; eine Sequenz, die rev codiert; eine Sequenz die gp160 codiert; eine Sequenz, die 50 % von nef codiert; eine Sequenz, die vif codiert; und eine Sequenz, die vpr codiert, mit einer 13-Aminosäure-Carboxy-Enddeletion. Die vpu-, rev-, gp160- und nef-Sequenzen stammen aus dem HIV-1-Stamm MN. Die vif- und vpr-Sequenzen stammen aus dem HIV-1-Stamm HXB2.

[0232] In pGAGPOL.rev sind mehrere Sicherheitsmerkmale eingeschlossen. Diese umfassen die Verwendung des CMV-Promotors und einer nicht-retroviralen Poly(A)-Stelle. Außerdem wurde tat deletiert, und eine 50%ige Deletion von nef ergibt ein "inaktives" nef-Produkt. Zusätzlich werden vif und vpr außerhalb der normalen Sequenz angeordnet, und eine partielle Deletion von vpr gewährleistet weiterhin ein inaktives vpr-Produkt.

[0233] Das Plasmid pENV wird wie folgt konstruiert.
Schritt 1: Beginn mit pUC18, abgebaut mit HindIII und EcoRI. Das resultierende Fragment, das den ColE1-Replikationsursprung und das laci-Gen enthält, sollte mit dem EcoRI/HindIII-Fragment aus pMAMneoBlue ligiert werden, das den Rous-Sarcom-Virus-Enhancer enthält. Sodann kann das resultierende Plasmid oder pMAMneo-Blue von Clontech (Palo Alto, CA) mit HindIII und BglI abgebaut werden. Ligation unter Anwendung von Standardtechniken mit einem Fragment, das das kan-Gen enthält, das durch PCR des Genblockplasmids (Pharmacia) erhalten.
Schritt 2: Wenn pMAMneo-Blue als Ausgangsplasmid verwendet wird, Abbau mit MluI und EcoRI, Auffüllen der Enden mit dem Klenow-Fragment von Polymerase I und Religation.
Schritt 3: Anschließend, entweder mit pMAMneo-Blue oder dem von pUC18 stammenden Plasmid, Abbau mit HindIII und Ligation mit der SV40-PolyA-Stelle und der frühen Spleiß-Region, erhalten durch PCR von pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) mit den Primern der SEQ-ID. NR. 23 und SEQ-ID. NR. 24.
Schritt 4a: Abbau mit BamHI und Ligation mit dem CMV-Promotor, erhalten durch PCR von pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) mit den Primern der SEQ-ID. NR. 25 und SEQ-ID. NR. 26.
Schritt 4b: Abbau mit BamHI und Ligation mit dem MoMLV-LTR, erhalten durch PCR mit den Primern der Sequenz SEQ-ID. NR. 27 und SEQ-ID. NR. 28.
Schritt 5: Abbau mit NotI und MluI und Ligation mit der GP160-codierende Region, erhalten durch PCR von pMN-ST1 mit den Primern der SEQ-ID. NR. 29 und SEQ-ID. NR. 30.
Schritt 6: Abbau mit MluI und Ligation mit den Sequenzen, die vif in seiner Gesamtheit und vpr codieren, mit

einer 13aa-Carboxy-Enddeletion, erhalten durch PCR von Plasmid HXB2D (AIDS Repository) mit den Primern der SEQ-ID. NR. 31 und SEQ-ID. NR. 32.

Beispiel 43

[0234] Es wird ein Immunisierungssystem bereitgestellt, das umfasst: eine pharmazeutische Zusammensetzung, die etwa 100 µg pGAGPOL.rev in einer isotonischen pharmazeutisch verträglichen Lösung umfasst; und eine pharmazeutische Formulierung, die 100 µg pENV in einer isotonischen pharmazeutisch verträglichen Lösung umfasst. Zusätzlich umfasst das Immunisierungssystem vorzugsweise eine pharmazeutische Zusammensetzung, die etwa 1 ml 0,5 % Bupivacain-HCl und 0,1 % Methylparaben in einem isotonischen pharmazeutischen Träger umfasst.

[0235] In einem solchen bevorzugten Immunisierungssystem wird eine erste Serie von Verabreichungen durchgeführt, wobei Bupivacain und eine der beiden pharmazeutischen Zusammensetzungen einem Individuum intramuskulär, vorzugsweise in einen Muskel eines Arms oder der Gesäßbacke verabreicht werden. Bupivacain und die andere der beiden pharmazeutischen Zusammensetzungen werden dem Individuum an einer unterschiedlichen Stelle, vorzugsweise entfernt von der Stelle der Verabreichung der einen pharmazeutischen Zusammensetzung, vorzugsweise in einen Muskel des anderen Arms oder der anderen Gesäßbacke, intramusukär verabreicht. Sich anschließende Serien von Verabreichungen können zu einem späteren Zeitpunkt, vorzugsweise 48 h oder 2 Wochen später, durchgeführt werden.

[0236] Das Immunisierungssystem kann zum Impfen eines Individuums eingesetzt werden, um dieses Individuum vor einer HIV-Infektion zu schützen oder um ein HIV-infiziertes Individuum mit einem Immuntherapeutikum zu behandeln.

Beispiel 44

[0237] Bei einigen Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren der Immmunisierung eines Individuums gegen HIV durch Verabreichung eines einzigen Impfstoffs. Dieser Impfstoff umfasst ein genetisches Konstrukt, das mindestens eines, vorzugsweise zwei, stärker bevorzugt mehr als zwei oder eine Vielzahl der Gene des HIV-Virus oder sämtliche Strukturgene umfasst. Allerdings enthält der Impfstoff kein vollständiges Komplement sämtlicher HIV-Gene. Wenn eine einzelne Zelle mit einem vollständigen Komplement von Virusgenen bereitgestellt wird, ist es möglich, dass in der Zelle ein komplettes infektiöses Virus zusammengebaut werden kann. Demnach wird erfindungsgemäß kein genetisches Konstrukt mit einem solchen vollständigen Komplement von Genen bereitgestellt. Als Sicherheitsvorkehrung kann ein oder mehrere essentielle Gene deletiert oder absichtlich verändert sein, um weiterhin zu gewährleisten, dass kein infektiöses Viruspartikel gebildet werden kann.

[0238] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind mindestens Teile von einem, zwei oder von allen HIV-Strukturgenen vorgesehen. Die Strukturgene von HIV bestehen aus gag, pol und env. Teile von mindestens einem dieser drei Gene werden auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt. Demnach wird bei einigen Ausführungsformen mindestens ein Teil jeweils von gag und pol auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt; bei einigen Ausführungsformen wird mindestens ein Teil von env auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt; bei einigen Ausführungsformen wird mindestens ein Teil von gag auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt; bei einigen Ausführungsformen wird mindestens ein Teil jeweils von pol und env auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt; bei einigen Ausführungsformen wird mindestens ein Teil jeweils von gag und env auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt; bei einigen Ausführungsformen wird mindestens ein Teil von pol auf einem genetischen Konstrukt bereitgestellt. Gegebenenfalls wird das gesamte Gen bereitgestellt. Gegebenenfalls können bei jedem dieser Konstrukte auch HIV-regulatorische Gene vorhanden sein. Die HIV-regulatorischen Gene sind: vpr, vif, vpu, nef, tat und rev.

Beispiel 45

[0239] Wie hier verwendet, soll der Begriff "Expressionseinheit" eine Nucleinsäuresequenz bezeichnen, die einen Promotor umfasst, der mit einer codierenden Sequenz zweckorientiert verknüpft ist, die mit einem Polyadenylierungssignal zweckorientiert verknüpft ist. Die codierende Sequenz kann ein oder mehrere Proteine oder Fragmente davon codieren. Bei bevorzugten Ausführungsformen befindet sich eine Expressionseinheit innerhalb eines Plasmids.

[0240] Wie hier verwendet, soll der Begriff "HIV-Expressionseinheit" eine Nucleinsäuresequenz bezeichnen,

die einen Promotor umfasst, der mit einer codierenden Sequenz zweckorientiert verknüpft ist, die mit einem Polyadenylierungssignal zweckorientiert verknüpft ist, in der die codierenden Sequenz ein Peptid codiert, das ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop, das auf einem HIV-Protein festgestellt wird, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist. "Im Wesentlichen ähnliches Epitop" soll ein Epitop bezeichnen, das eine Struktur aufweist, die nicht mit einem Epitop eines HIV-Proteins identisch ist, allerdings dennoch eine zelluläre oder humorale Immunantwort auslöst, die mit einem HIV-Protein kreuzreagiert. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die HIV-Expressionseinheit eine codierende Sequenz, die ein oder mehrere HIV-Proteine oder Fragmente davon codiert. Bei bevorzugten Ausführungsformen befindet sich eine HIV-Expressionseinheit innerhalb eines Plasmids.

[0241] Bei einigen Ausführungsformen der Erfindung wird ein einzelnes genetisches Konstrukt bereitgestellt, das eine einzelne HIV-Expressionseinheit aufweist, die DNA-Sequenzen enthält, die ein oder mehrere HIV-Proteine oder Fragmente davon codieren. Wie hier verwendet, soll der Begriff "einzelnes HIV-Expressionseinheiten-Konstrukt" ein einzelnes genetisches Konstrukt bezeichnen, das eine einzelne HIV-Expressionseinheit enthält. Bei bevorzugten Ausführungsformen liegt ein einzelnes HIV-Expressionseinheiten-Konstrukt in Form eines Plasmids vor.

[0242] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein einzelnes genetisches Konstrukt bereitgestellt, das mehr als eine HIV-Expressionseinheit aufweist, die jeweils DNA-Sequenzen enthalten, die ein oder mehrere HIV-Proteine oder Fragmente davon codieren. Wie hier verwendet, soll der Begriff "multiples HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt" ein einzelnes Plasmid bezeichnen, das mehr als eine HIV-Expressionseinheit enthält. Bei bevorzugten Ausführungsformen liegt ein multiples HIV-Expressionseinheiten-Konstrukt in Form eines Plasmids vor.

[0243] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein einzelnes genetisches Konstrukt bereitgestellt, das zwei HIV-Expressionseinheiten aufweist, die jeweils DNA-Sequenzen enthält, die ein oder mehrere HIV-Proteine oder Fragmente davon codieren. Wie hier verwendet soll der Begriff "Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt" ein einzelnes Plasmid bezeichnen, das zwei HIV-Expressionseinheiten enthält, d.h. ein multiples HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt, das zwei HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukte enthält. Bei einem Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt ist es bevorzugt, dass eine HIV-Expressionseinheit in der entgegengesetzten Richtung der anderen HIV-Expressionseinheit arbeitet. Bei bevorzugen Ausführungsformen liegt das Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Konstrukt in Form eines Plasmid vor.

[0244] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein genetischer HIV-Impfstoff bereitgestellt, der ein einzelnes genetisches Konstrukt enthält. Das einzelne Genkonstrukt kann ein Ein-HIV-Eexpressionseinheit-Genkonstrukt, ein Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt oder ein multiples HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt sein, das mehr als zwei HIV-Expressionseinheiten enthält.

[0245] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein genetischer HIV-Impfstoff bereitgestellt, der mehr als ein genetisches Konstrukt in einem einzigen Impfstoff enthält.

[0246] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein genetischer HIV-Impfstoff bereitgestellt, der mehr als ein genetisches Konstrukt in mehr als einem Impfstoff enthält. Wie hier verwendet, soll der Begriff "multipler Impfstoff' einen genetischen Impfstoff bezeichnen, der mehr als ein genetisches Konstrukt enthält, die jeweils separat verabreicht werden. Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein genetischer HIV-Impfstoff bereitgestellt, der zwei genetische Konstrukte enthält. Jedes genetische Konstrukt kann unabhängig ein Ein-HIV-Expressionseinheit-Genkonstrukt, ein Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt oder ein multiples HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt sein, das mehr als zwei HIV-Expressionseinheiten enthält. Bei einigen Ausführungsformen sind beide genetischen Konstrukte Ein-HIV-Expressionseinheit-Genkonstrukte. Bei einigen Ausführungsformen sind beide genetischen Konstrukte Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukte. Bei einigen Ausführungsformen sind beide genetischen Konstrukte multiple HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukte. Bei einigen Ausführungsformen ist ein einzelnes genetisches Konstrukt ein Ein-HIV-Expressionseinheit-Genkonstrukt, und das andere ist ein Zwei-HIV-Expressionseinheiten-Genkonstrukt. Ein Fachmann kann die vielen Variationen in Abhängigkeit von der Anzahl der in einem genetischen Impfstoff verwendeten Genkonstrukte und von der Anzahl der HIV-Expressionseinheiten, die auf jedem genetischen Konstrukt vorhanden sein können, leicht erkennen und begreifen.

[0247] Es ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen genetischen Konstrukte bestimmte HIV-Sequenzen nicht enthalten, insbesondere diejenigen, die bei der HIV-Genomintegration in das chromosomale Material der Zelle, in die es eingeschleust wird, eine Rolle spielen. Es ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen geneti-

schen Konstrukte keine LTRs aus HIV enthalten. Gleichermaßen ist es bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen genetischen Konstrukte keine psi-Stelle aus HIV enthalten. Außerdem ist es bevorzugt, dass das reverse Transcriptase-Gen deletiert ist und das Integrase-Gen deletiert ist. Die Deletionen umfassen die Deletion nur von einigen der Codons oder den Ersatz von einigen der Codons, um das Gen im Wesentlichen zu deletieren. Beispielsweise kann das Startcodon deletiert oder verändert sein oder aus dem Raster verschoben sein, um eine Nucleotidsequenz zu ergeben, die ein unvollständiges und nicht funktionierendes Gen codiert.

[0248] Es ist auch bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen genetischen Konstrukte kein transcribierbares tat-Gen aus HIV enthalten. Das tat-Gen, das mit dem rev-Gen überlappt, kann durch Ersatz der Codons, die rev codieren, durch andere Codons, die die gleiche Aminosäure für rev allerdings nicht die erforderliche tat-Aminosäure in dem Leseraster, in dem tat codiert wird, codieren, vollständig deletiert werden. Alternativ werden nur einige der Codons geschaltet, um entweder das Startcodon für tat zu verändern, d.h. im Wesentlichen zu deletieren, und/oder genügend Codons zu verändern, d. h. im Wesentlichen zu deletieren, um eine Nucleotidsequenz zu ergeben, die ein unvollständiges und nicht funktionierendes tat ergibt.

[0249] Es ist bevorzugt, dass ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen umfasst, die Peptide codieren, die mindestens ein Epitop aufweisen, das zu einem Epitop aus HIV-gag-, -pol-, -env-, oder -rev-Proteinen identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist. Es ist stärker bevorzugt, dass ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen umfasst, die mindestens eines von HIV-gag-, -pol-, -env- oder -rev-Proteinen oder Fragmenten davon codieren. Es ist bevorzugt, dass ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen umfasst, die Peptide codieren, die mehr als ein Epitop aufweisen, das zu einem Epitop aus HIV-gag-, -pol-, -env- oder -rev-Proteinen identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist. Es ist stärker bevorzugt, dass ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen umfasst, die mehr als eines von HIV-gag-, -pol-, -env- oder -rev-Proteinen oder Fragmente davon codieren.

[0250] Bei einigen Ausführungsformen umfasst ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen, die Peptide codieren, die mindestens ein Epitop aufweisen, das zu einem Epitop aus HIV-vif-, vpr-, vpu- oder nef-Proteinen identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist. Bei einigen Ausführungsformen umfasst ein genetisches Konstrukt codierende Sequenzen, die mindestens eines von HIV-vif-, -vpr-, -vpu- oder nef-Proteinen oder Fragmente davon codieren.

[0251] Ein Ein-HIV-Expressionseinheit-Genkonstrukt kann codierende Regionen für ein oder mehrere Peptide umfassen, denen mindestens ein Epitop mit einem HIV-Protein oder einem Fragment davon in einer einzigen Expressionseinheit unter der regulatorischen Kontrolle von einem einzigen Promotor und einem einzigen Polyadenylierungssignal gemeinsam ist. Es ist bevorzugt, dass die genetischen Konstrukte mehr als ein HIV-Protein oder Fragment davon codieren. Der Promotor kann jeder in einer menschlichen Zelle funktionsfähige Promotor sein. Es ist bevorzugt, dass der Promotor ein SV40-Promotor oder ein CMV-Promotor, vorzugsweise ein unmittelbarer früher CMV-Promotor ist. Das Polyadenylierungssignal kann jedes in einer menschlichen Zelle funktionsfähige Polyadenylierungssignal sein. Es ist bevorzugt, dass das Polyadenylierungssignal ein SV40-Polyadenylierungssignal, vorzugsweise das kleinere SV40-Polyadenylierungssignal ist. Falls mehr als eine codierende Region in einer einzelnen Expressionseinheit bereitgestellt wird, können sie unmittelbar nebeneinander oder getrennt durch nicht codierende Regionen angeordnet sein. Um ordnungsgemäß exprimiert zu werden, muss eine codierende Region ein Startcodon und ein Stoppcodon aufweisen.

[0252] Ein Zwei-Expressionseinheiten-HIV-Genkonstrukt kann codierende Regionen für ein oder mehrere Peptide umfassen, denen mindestens ein Epitop mit einem HIV-Protein oder einem Fragment davon auf jeder der beiden Expressionseinheiten gemeinsam ist. Jede Expressionseinheit steht unter der regulatorischen Kontrolle eines einzigen Promotors und eines einzigen Polyadenylierungssignals. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass die genetischen Konstrukte mehr als ein HIV-Protein oder Fragment davon codieren. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass Nucleotidsequenzen, die gag und pol codieren, auf 1 Expressionseinheit vorhanden sind, und die Nucleotidsequenzen, die env und rev codieren, auf der anderen vorhanden sind. Der Promotor kann jeder in einer menschlichen Zelle funktionsfähige Promotor sein. Es ist bevorzugt, dass der Promotor ein SV40-Promotor oder ein CMV40-Promotor, vorzugsweise ein unmittelbarer früher CMV-Promotor ist. Das Polyadenylierungssignal kann jedes in einer menschlichen Zelle funktionsfähige Polyadenylierungssignal sein. Es ist bevorzugt, dass das Polyadenylierungssignal ein SV40-Polyadenylierungssignal, vorzugsweise das kleinere SV40-Polyadenylierungssignal ist. Falls mehr als eine codierende Region in einer Expressionseinheit vorgesehen ist, können sie unmittelbar nebeneinander oder durch nicht codierende Regionen getrennt angeordnet sein. Um ordnungsgemäß exprimiert zu werden, muss eine codierende Region ein Startcodon und ein Stoppcodon aufweisen.

[0253] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist das kreuzreaktive MHC-Klasse-II-Epitop in env deletiert und durch die analoge Region aus HIV-II ersetzt.

[0254] Wenn ein genetisches Konstrukt gag und/oder pol enthält, ist es im Allgemeinen wichtig, dass auch rev vorhanden ist. Zusätzlich zu rev kann ein rev-Response-Element mit gag und pol zur verstärkten Expression dieser Gene vorgesehen sein.

[0255] Wenn genetische Konstrukte erzeugt werden, ist es bevorzugt, dass das env-Gen, das im Plasmid 1 verwendet wird, aus MN oder MN-artigen Isolaten stammt, einschließlich von klinischen Isolaten, die MN ähnlich sind, vorzugsweise nicht Synzytium-induzierenden klinischen Isolaten, vorzugsweise denjenigen, die Makrophagen-tropistisch sind, aus klinischen Frühstadium-Isolaten.

[0256] Aus einer einzelnen Expressionseinheit können mehrere Proteine durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Es sind Spleiß-Signale vorgesehen, um das alternative Spleißen zu ermöglichen, das verschiedene Botschaften erzeugt, die verschiedene Proteine codieren.

Beispiel 46

[0257] **Fig.** 8 zeigt 4 Hauptketten A, B, C, und D. **Fig. 9** zeigt 4 Inserts, 1, 2, 3, und 4. Insert 1 unterstützt die Expression von gag und pol; das rev-Response-Element wurde auf eine Weise kloniert, um den HIV-Spleißakzeptor zu konservieren. Insert 2 entspricht Insert 1, da es ebenfalls die Expression von gag und pol unterstützt, mit der Ausnahme, dass das rev-Response-Element ohne Konservieren des HIV-Spleißakzeptors kloniert wurde. Insert 3 unterstützt die Expression von gag und pol, umfasst eine Deletion des Integrase-Gens und umfasst nicht die Gegenwart des cis-wirkenden Rev-Response-Elements. Insert 4 unterstützt die Expression von rev, vpu und env. env kann das kreuzreaktive MHC-Klasse-II-Epitop aufweisen, das verändert ist, um die Kreuzreaktivität zu beseitigen, und die V3-Schleife kann verändert sein, um die Möglichkeit der Synzytium-Bildung zu beseitigen.

[0258] Bei einigen Ausführungsformen wird die Hauptkette A mit Insert 1 verwendet. Solche Konstrukte enthalten gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pA1ori+ ist Hauptkette A mit Insert 1 und SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pA1ori– ist die Hauptkette A mit Insert 1 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich können entweder pA1ori+ oder pA1ori– Integrase umfassen, was pA1ori+int+ bzw. pA1ori–int+ ergibt. Die Plasmide pA1ori+, pA1ori–, pA1ori+int+ und pA1ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert werden und ergeben pA1ori+RT–, pA1ori–RT–, pA1ori+int+RT– bzw. pA1ori–int+RT–.

[0259] Bei einigen Ausführungsformen wird die Hauptkette A mit Insert 2 verwendet. Solche Konstrukte enthalten gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Plasmid pA2ori+ ist Hauptkette A mit Insert 2 und SV40-Replikationsursprung. Plasmid pA2ori– ist Hauptkette A mit Insert 1 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich kann entweder pA2ori+ oder pA2ori– Integrase umfassen und ergibt pA2ori+int+ bzw. pA2ori–int+. Die Plasmide pA2ori+, pA2ori–, pA2ori+int+ bzw. pA2ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pA2ori+RT-, pA2ori–RZ–, pA2ori+int+RT– bzw. pA2ori–int+RT–.

[0260] Bei einigen Ausführungsformen wird die Hauptkette B mit Insert 1 verwendet. Solche Konstrukte enthalten gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pB1ori+ ist die Hauptkette B mit Insert 1 und SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pB1ori– ist die Hauptkette B mit Insert 1 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich können entweder pB1ori+ oder pB1ori– Integrase umfassen und ergeben pB1ori+int+ bzw. pB1ori–int+. Die Plasmide pB1ori+, pB1ori–, pB1ori+int+ und pB1ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pB1ori+RT-, pB1ori–RT–, pB1ori+int+RT– bzw. pB1ori–int+RT–.

[0261] Bei einigen Ausführungsformen wird die Hauptkette B mit Insert 2 verwendet. Solche Konstrukte umfassen gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pB2ori+ ist Hautpkette B mit Insert 2 und SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pB2ori– ist Hauptkette B mit Insert 1 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich kann entweder pB2ori+ oder pB2ori-Integrase umfassen und ergibt pB2ori+int+ bzw. pB2ori–int+. Die Plasmide pB2ori+, pB2ori–, pB2ori+int+ und pB2ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pB2ori+RT–, pB2ori–RT–, pB2ori+int+RT– bzw. pB2ori–int+RT–.

[0262] Bei einigen Ausführungsformen wird die Hauptkette A minus rev mit Insert 3 verwendet. Solche Konstrukte enthalten gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pA/r–3ori+ ist Hauptkette A mit Insert 3 und SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pA/r–3ori– ist Hauptkette A minus rev mit Insert 3 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich können entweder pA/r–3ori+ oder pA/r–3ori- Integrase umfassen und ergeben pA/r–3ori+int+ bzw. pA/r–3ori–int+. Die Plasmide pA/r–3ori+, pA/r–3ori–, pA/r–3ori+int+ und pA/r–3ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase (RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pA/r–3ori+RT–, pA/r–3ori-RT–, pA/r–3ori+int+RT– bzw. pA/r–3ori–int+RT–.

[0263] Bei einigen Ausführungsformen wird Hauptkette C mit Insert 1 verwendet. Solche Konstrukte umfassen gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pC1ori+ ist Hauptkette C mit Insert 1 und SV40-Replikationsursprung. Das Plasmid pC1ori– ist Hauptkette C mit Insert 1 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich kann entweder pC1ori+ oder pC1ori– Integrase umfassen und ergibt pC1ori+int+ bzw. pC1ori–int+. Die Plasmide pC1ori+, pC1ori–, pC1ori+int+ und pC1ori–int+ können durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pC1ori+RT–, pC1ori–RT–, pC1ori+int+RT– bzw. pC1ori–int+RT–.

[0264] Bei einigen Ausführungsformen wird Hauptkette C mit Insert 2 verwendet. Solche Konstrukte umfassen gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Plasmid pC2ori+ ist Hauptkette C mit Insert 2 und SV40-Replikationsursprung. Plasmid pC2ori– ist Hauptkette C mit Insert 2 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich können entweder pC2ori+ oder pC2ori-Integrase umfassen und ergeben pC2ori+int+ bzw. pC2ori–int+. Die Plasmide pC2ori+, pC2ori–, pC2ori+int+ und pC2ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pC2ori+RT–, pC2ori–RT–, pC2ori+int+RT– bzw. pC2ori–int+RT–.

[0265] Bei einigen Ausführungsformen wird Hauptkette C mit Insert 3 verwendet. Solche Konstrukte umfassen gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Plasmid pC3ori+ ist Hauptkette C mit Insert 3 und SV40-Replikationsursprung. Plasmid pC3ori– ist Hauptkette C mit Insert 3 ohne den SV40-Replikationsursprung. Zusätzlich kann entweder pC3ori+ oder pC3ori– Integrase umfassen und ergeben pC3ori+int+ bzw. pC3ori–int+. Die Plasmide pC3ori+, pC3ori–, pC3ori+int+ und pC3ori–int+ können weiterhin durch funktionelle Deletion des reversen Transcriptase(RT)-Gens modifiziert sein und ergeben pC3ori+RT–, pC3ori–RT–, pC3ori+int+RT– bzw. pC3ori–int+RT–.

[0266] Bei einigen Ausführungsformen wird Hauptkette D mit Insert 4 verwendet. Solche Konstrukte umfassen gegebenenfalls den SV40-Replikationsursprung. Plasmid pD4ori+ ist Hauptkette D mit Insert 4 und SV40-Replikationsursprung. Plasmid pD4ori– ist Hauptkette D mit Insert 4 ohne den SV40-Replikationsursprung.

Beispiel 47

[0267] Bei einigen Ausführungsformen ist eine einzelne Expressionseinheit/ein genetisches Ein-Impfstoff-Vakzine vorgesehen, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine codierende Sequenz einschließt, die ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop aufweist, das zu Epitopen von HIV-Proteinen identisch ist oder im Wesentlichen ähnlich ist. Die codierende Sequenz steht unter der regulatorischen Kontrolle des unmittelbaren frühen CMV-Promotors und des kleineren SV40-Polyadenylierungssignal.

[0268] Bei einigen Ausführungsformen ist eine einzelne Expressionseinheit/ein genetisches Ein-Impfstoff-Vakzine vorgesehen, das ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine codierende Sequenz einschließt, die mindestens ein HIV-Protein oder ein Fragment davon codiert. Die codierende Sequenz steht unter der regulatorischen Kontrolle des unmittelbaren frühen CMV-Promotors und des kleineren SV40-Polyadenylierungssignals. Das HIV-Protein ist aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus gag, pol, env und rev. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine codierende Sequenz einschließt, die mindestens zwei HIV-Proteine oder Fragmente davon, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon, codiert. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine codierende Sequenz umfasst, die mindestens 3 HIV-Proteine oder Fragmente davon, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon, codiert. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das eine codierende Sequenz umfasst, die gag, pol, env und rev oder Fragmente davon codiert.

[0269] Bei einigen Ausführungsformen ist ein genetisches Zwei-Expressionseinheiten/Ein-Impfstoff-Vakzine

vorgesehen, das ein genetisches Konstrukt umfasst, das zwei Expressionseinheiten einschließt, die jeweils eine codierende Sequenz umfassen, die ein Peptid codiert, das mindestens ein Epitop aufweist, das zu Epitopen von HIV-Proteinen identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist. Die codierende Sequenz steht unter der regulatorischen Kontrolle des unmittelbaren frühen CMV40-Promotors und des kleineren SV40-Polyadenylierungssignals. Die beiden Expressionseinheiten werden in zueinander entgegengesetzten Richtungen codiert.

[0270] Bei einigen Ausführungsformen ist ein genetisches Zwei-Expressionseinheiten/Ein-Impfstoff-Vakzine vorgesehen, das ein genetisches Konstrukt umfasst, das zwei Expressionseinheiten einschließt, die jeweils eine codierende Sequenz umfassen, die mindestens ein HIV-Protein oder ein Fragment davon codiert. Jede Expressionseinheit umfasst eine codierende Sequenz, die unter der regulatorischen Kontrolle des unmittelbaren frühen CMV-Promotors und des kleineren SV40-Polyadenylierungssignals steht. Das HIV-Protein ist aus der Gruppe gewählt, die besteht aus gag, pol, env und rev. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das zwei Expressionseinheiten einschließt, wovon mindestens eine eine codierende Sequenz umfasst, die mindestens zwei HIV-Proteine oder Fragmente davon, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon, codiert, und wovon das andere mindestens 1 HIV-Protein oder Fragmente davon umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das zwei Expressionseinheiten einschließt, wovon mindestens eine eine codierende Sequenz umfasst, die mindestens 3 HIV-Proteine oder Fragmente davon, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon, codiert, und wovon die andere mindestens ein HIV-Protein oder ein Fragment davon umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus gag, pol, env und rev oder Fragmenten davon. Bei einigen Ausführungsformen ist es bevorzugt, dass der genetische Impfstoff vorgesehen ist, der ein genetisches Konstrukt umfasst, das zwei Expressionseinheiten umfasst und eine codierende Sequenz einschließt, die gag, pol, env und rev oder Fragmente davon codiert.

Beispiel 48

[0271] Ein genetisches Konstrukt, das Plasmid pCMN160Δ16, wurde zur Verwendung in einem pharmazeutischen Anti-HIV-Kit oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung hergestellt. pCMN160Δ16 wurde wie folgt konstruiert:
Schritt 1: Die Primer SEQ-ID. NR. 35 und SEQ-ID. NR. 34 wurden als PCR-Fragment aus genomischer HIV/MN-DNA verwendet.
Schritt 2: Die Primer SEQ-ID. NR. 33 und SEQ-ID. NR. 36 wurden als PCR-Fragment aus genomischer HIV/MN-DNA verwendet.
Schritt 3: Die Primer SEQ-ID. NR. 35 und SEQ-ID. NR. 36 wurden mit 2 µl Reaktionsmaterial aus den Schritten 1 und 2 kombiniert.
Schritt 4: Das Reaktionsprodukt aus Schritt 3 wurde mit Not1 und Mlu1 geschnitten und in die Hauptkette A inseriert, die in Beispiel 46 beschrieben und mit Not1 und Mlu1 geschnitten wurde.

[0272] Dadurch wird das Plasmid pCMN160Δ16 gebildet, das als Insert in Hauptkette A eine codierende Region enthält, die das MN-Stamm-ENV-Protein codiert, wobei die rev-Region und die Hälfte von nef HLA-DB-Regionsänderungen nach HIV-2 aufweisen.

Beispiel 49

[0273] Das Plasmid pGAGPOL.rev2 wurde wie folgt hergestellt. Zunächst wurde die Hauptkette hergestellt. Anschließend wurde ein Insert mit HIV-gag und -pol erzeugt und in die Hauptkette inseriert.

[0274] Die Hauptkette wurde wie folgt hergestellt.
Schritt 1: Abbau von pMAMneo (Clonetech) mit Bgl1. Auffüllen mit dem Klenow-Fragment von Polymerase I. Schneiden mit HindIII. Gelreinigung des 1763bp-Fragments.
Schritt 2: Amplifizieren des Kan^R-Gens aus dem Plasmid pJ4Ωkan+ (Kanamycin-Resistenzgen, erhalten von der Fa. Pharmacia Inc., kloniert in pJ4Ω, erhalten als Geschenk von Imperial Cancer Research Fund UK; pJ4Ω wurde ursprünglich konstruiert und beschrieben von Morgenstern, J.P. und H. Land, Nucl. Acids Res. 18(4):1068, durch Bezugnahme eingeschlossen) mit den Oligonucleotiden SEQ-ID. NR. 37 und SEQ-ID. NR. 38. Das PCR-Produkt wird an den Enden abgestumpft. Schneiden mit HindIII. Gelreinigung des PCR-Fragments.
Schritt 3: Ligation der Vektorhauptkette, die aus pMAMneo generiert und in Schritt Nr. 1 beschrieben wurde, wobei das PCR-Produkt das Kan^R-Gen, das in Schritt Nr. 2 beschrieben ist, codiert. Isolieren des Plasmids,

das das Kan^R-Gen und den bakteriellen Replikationsursprung enthält.
Schritt 4: Abbau des resultierenden Plasmids mit MluI, Auffüllen mit dem Klenow-Fragment von DMA-Polymerase I. Ligation mit SacII-Linker (New England Biolabs).
Schritt 5: Abbau des in Schritt 4 erhaltenen Plasmids mit AseI und SspI.
Schritt 6: PCR-Teil des Kan^R-Gens von dem in Schritt 3 beschriebenen Plasmid unter Verwendung der Primer SEQ-ID. NR. 39 und SEQ-ID. NR. 40. Das PCR-Produkt wird mit SspI und AseI geschnitten.
Schritt 7: Ligation des größten in Schritt 5 erhaltenen Fragments mit dem in Schritt 6 erhaltenen PCR-Produkt.
Schritt 8: Schneiden des in Schritt 7 erhaltenen Ligationsprodukts/Plasmids mit HindIII. Abstumpfen der Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I.
Schritt 9: Schneiden von pCEP4 (Invitrogen) mit SalI unter Freisetzung eines DNA-Fragments, das den CMV40-Promotor, Polylinker und eine SV40-Poly-A-Stelle enthält. Reinigung dieses Fragments und Abstumpfen der Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I.
Schritt 10: Ligation des in Schritt 8 erhaltenen Plasmids und des in Schritt 9 erhaltenen Fragments. Isolierung des Plasmids, das den bakteriellen Replikationsursprung, das Kan^R-Gen, den RSV-Enhancer, den CMV-Promotor, Polylinker und die SV40-Poly-A-Stelle enthält.
Schritt 11: Schneiden des in Schritt 10 erhaltenen Plasmids mit BamHI und NheI.
Schritt 12: Annelieren der Oligonucleotide SEQ-ID. NR. 41 und SEQ-ID. NR. 42.
Schritt 13: Ligation des in Schritt 10 erhaltenen Plasmids mit den annelierten, in Schritt 12 erhaltenen Oligonucleotiden. Isolierung des Plasmids, das den in Schritt 12 erhaltenen Adapter enthält.
Schritt 14: Abbau des in Schritt 13 erhaltenen Plasmids mit SalI und MluI.
Schritt 15: PCR-Amplifikation des offenen rev-Leserasters unter Verwendung von BBG35 (Rd Systems Inc. Minneapolis, MN, enthält die codierende Region für rev aus dem HIV-Stamm HX3B in pUC19) als Templat und der Primer SEQ-ID. NR. 43 uns SEQ-ID. NR. 44. Abbau des PCR-Produkts mit SalI und MluI.
Schritt 16: Ligation des in Schritt 14 erhaltenen Plasmids mit dem in Schritt 15 erzeugten PCR-Produkt. Isolierung des Plasmids, das die rev-codierende Region enthält.

Herstellung des gag/pol-Inserts

Schritt 1: Ein Subklon von einem Teil des HIV-I (HXB2)-Genoms, das in Bluescript (Stratagene) kloniert wurde. Der Subklon von HIV-1 enthält den vollständigen 5'-LTR und den Rest des HIV-1-Genoms bis Nucleotid 5795 (Genbanknummerierung), kloniert in die XbaI- und SalI-Stellen von Bluescript. Die HIV-1-Sequenzen werden aus dem HXB2D-Plasmid (AIDS Repository) erhalten.
Schritt 2: PCR-Teil der gag-codierenden Region aus dem offenen Leseraster des in Schritt 1 beschriebenen Plasmids (der Subklon von einem Teil des HIV-1-HXB2-Genoms, das in Bluescript kloniert ist) unter Verwendung der Primer SEQ-ID. NR. 45 und SEQ-ID. NR. 46.
Schritt 3: Abbau des in Schritt 1 beschriebenen Plasmids (Subklon von einem Teil des HIV-1-HXB2-Genoms, das in Bluescript kloniert wurde) mit EcoRI. Reinigen des Plasmids, das die pBluescript-Hauptkette, den 5'-HIV-1-LTR, die gag-codierende Region und einen Teil der pol-codierenden Region enthält, und Religation.
Schritt 4: Schneiden des in Schritt 3 erhaltenen Plasmids mit NotI und SpeI und Ligation mit dem in Schritt 2 beschriebenen PCR-Fragment nach seinem Abbau mit NotI und SpeI. Isolieren des Plasmids, das das PCR-Fragment an Stelle des ursprünglichen NotI/SpeI-Fragments enthält, das den 5'-HIV-LTR enthält.
Schritt 5: Abbau des in Schritt 4 erhaltenen Plasmids mit EcoRI und SalI.
Schritt 6: Annelieren der Oligonucleotide SEQ-ID. NR. 47 und SEQ-ID. NR. 48.
Schritt 7: Ligation der in Schritt 5 erhaltenen Plasmide mit dem in Schritt 6 erhaltenen Adapter. Isolierung des Plasmids, das den in die EcoRI/SalI-Stellen klonierten Adapter enthält.
Schritt 8: Abbau des in Schritt 7 erhaltenen Plasmids mit NdeI und EcoRI.
Schritt 9: PCR-Amplifikation des Rev-Response-Elements (RRE) aus einem Plasmid, das die RRE-Sequenz aus dem HIV-1-Stamm HXB2 enthält, unter Verwendung der Primer SEQ-ID. NR. 49 und SEQ-ID. NR. 50. Abbau des PCR-Produkts mit NdeI und EcoRI.
Schritt 10: Ligation des in Schritt 8 erhaltenen Plasmids mit dem in Schritt 9 erhaltenen PCR-Produkts. Isolierung des Plasmids, das das Insert mit der RRE-Sequenz enthält.
Schritt 11: Abbau des in Schritt 10 erhaltenen Plasmids mit NotI und SalI und Isolierung des Fragments, das die gag-codierende Region, die modifizierte pol-codierende Region und die RRE-Sequenz enthält.
Schritt 12: Abbau des Plasmids, das in Schritt 16 des vorstehend beschriebenen Protokolls zur Herstellung der Hauptkette erhalten wurde, mit NotI und SalI.
Schritt 13: Ligation des in Schritt 12 erhaltenen Plasmids mit dem in Schritt 11 erhaltenen Insert. Isolierung der Plasmide, die das Insert enthalten, das die gag-codierende Region, die modifizierte pol-codierende Region und die RRE-Sequenz enthalten.
Schritt 14: Abbau des in Schritt 13 erhaltenen Plasmids mit XbaI und NheI, Abstumpfen der Enden und Religation. Isolierung des Plasmids, dem die KpnI-Stelle fehlt, die zwischen den XbaI- und NheI-Stellen in dem in

Schritt 13 erhaltenen Plasmid vorhanden ist.
Schritt 15: Abbau des in Schritt 14 erhaltenen Plasmids mit KpnI und Isolierung des größten Fragments.
Schritt 16: Annelieren der Oligonucleotide SEQ-ID. NR. 51 und SEQ-ID. NR. 52.
Schritt 17: Ligation des gereinigten, in Schritt 15 erhaltenen Plasmidfragments mit dem in Schritt 16 erhaltenen Adapter. Isolierung des Plasmids, das den an der KpnI-Stelle des in Schritt 15 erhaltenen Plasmids inserierten Adapter enthält.

Beispiel 50

Genetische Immunisierung mit den Genen für regulatorische Proteine

[0275] Ein Teil der Schwierigkeit bei der Bekämpfung von HIV resultiert aus der außergewöhnlichen Veränderlichkeit des Virus und seiner Fähigkeit, schnell zu neuen Formen zu mutieren. Es existiert nicht nur eine beträchtliche Proteinsequenzvariation bei den HIV-Isolaten, die in der menschlichen Population als Ganzes gesehen festgestellt wurden, sondern das Virus mutiert so schnell, dass jedes HIV-infizierte Individuum in Wirklichkeit eine Anzahl von verwandten HIV-Mikrovarianten beherbergt. Solche HIV-Isolate zeigen Unterschiede in der Replikationseffizienz, im Tropismus, in der Empfindlichkeit gegenüber der Neutralisierung und in der Arzneimittelresistenz. Treten Arzneimittel-resistente Mutanten auf, lassen die günstigen Wirkungen einer Arzneimitteltherapie nach. Mit AZT entsteht typischerweise eine Arzneimittelresistenz innerhalb des ersten Therapiejahres. Diese konstante Generierung von Escape-Mutanten kann eine Rolle spielen bei der Fähigkeit von HIV, schließlich die Abwehrkräfte des Wirts nach einer langen Zeit zu besiegen, während der das Virus scheinbar unter Kontrolle gehalten wird.

[0276] Diese Mutationsverschiebung wurde in verschiedenen Regionen des Hüllen-Glycoproteins gp120, einschließlich der neutralisierenden Hauptdomäne der V3-Schleife und auch in den HIV-Kernproteinen beschrieben. Die HIV-regulatorischen Proteine sind viel stärker hoch konserviert als die Strukturproteine und zeigen auch eine zeitlich geringere Mutationsverschiebung. Die regulatorischen Proteine stellen darum attraktive Ziele für den antiviralen Angriff dar.

[0277] HIV zeigt eine bemerkenswerte zeitliche Regulierung der Expression von regulatorischen Proteinen gegenüber Strukturproteinen. In der frühen Phase der Virusreplikation überwiegen mRNAs, die die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef codieren, wohingegen in der späten Phase eine stärkere Expression von mRNAs besteht, die Strukturproteine, einschließlich der Gag, Pol, und Env-Vorläufer und vieler akzessorischer Proteine, codieren. Diese Verschiebung von der frühen bis zur späten Phase wird ausgelöst, wenn das Rev-Protein eine bestimmte Konzentration erreicht. Die Vorherrschaft von Tat, Rev und Nef frühzeitig während des viralen Replikationscyclus macht diese Proteine auch zu günstigen Zielen für den antiviralen Angriff. Dies trifft insbesondere für tat und rev zu, die eine absolut essentielle Rolle bei der transcriptionalen und posttranslationalen Regulierung der HIV-Genexpression spielen und früh in dem Virus-Replikationscyclus vorherrschen, vor der Transcription der viralen Strukturproteine und der Produktion von infektiösen Virusteilchen.

[0278] Im Gegensatz zu tat und rev, die eindeutig eine essentielle Rolle bei der HIV-Replikation spielen, werden andere regulatorische Proteine, wie nef, vpr, vif, und vpu, manchmal als "akzessorische" Proteine bezeichnet. Ihre Funktionen sind weniger gut verstanden, und das Ausmaß, in dem die Virusreplikation durch den Verlust einer bestimmten Funktion abgeschwächt wird, schwankt beträchtlich und kann von der Wirtszelle, die infiziert wird, abhängen. Dennoch legt die starke Konservierung von solchen Funktionen unter den sehr verschiedenen HIV-Isolaten sowie den anderen Primaten-Immundefizienzviren die Bedeutung dieser "akzessorischen" Funktionen in dem natürlichen Infektionsprozess nahe (siehe allgemein Terwilliger, E.F., (1992) AIDS Research Reviews 2:L3-27, W.C. Koff, F. Wong-Staal, und R.C. Kennedy, Hrsg. (New York: Marcel Dekker, Inc.). In der Tat sind rekombinante Primatenviren, die entweder an vpr, nef oder vif deletiert sind, in vivo nicht pathogen, was weiterhin die Bedeutung dieser akzessorischen Gene im Lebenscyclus des Virus zeigt.

[0279] Es gibt einige Beweise dafür, dass höhere Niveaus von und stärker protektive Immunantworten gegen HIV durch die Präsentation einiger ausgewählter regulatorischer und/oder enzymatischer Proteine statt des gesamten Komplements der HIV-Gene erzielt werden könnte. Demnach kann eine gezielte Immunisierungsstrategie wünschenswerterweise die genetische Immunisierung unter Verwendung von codierenden Sequenzen für ein oder mehrere regulatorische nicht strukturelle HIV-Proteine, einschließlich tat, rev, vpr, nef, vpu oder vif, einschließen. Es wurde festgestellt, dass nur vpr mit Viruspartikeln assoziiert ist, wohingegen die anderen regulatorischen Proteine, einschließlich tat, rev, nef, vif und vpu nicht Virionen-assoziiert sind.

[0280] Bei einigen Ausführungsformen der genetischen Immunisierung gegen HIV unter Verwendung von re-

gulatorischen Genen werden das eine oder mehrere von tat-, rev-, nef-, vif- und vpu-Genen in die in Beispiel 46 beschriebene Hauptkette A inseriert. Es ist bevorzugt, dass tat und/oder rev verwendet wird. Bei einigen Ausführungsformen wird tat oder rev in die Hauptkette A, die in Beispiel 46 beschrieben ist, inseriert. Bei einigen Ausführungsformen sind die nächsten als Ziele in absteigender Erwünschtheits-Reihenfolge nef, vpr, vif und vpu. Vorzugsweise wird mehr als ein regulatorisches Gen eingesetzt, einschließlich tat und rev; tat, rev und nef; tat, rev, nef und vpr; tat, rev, nef, vpr und vif; tat, rev, nef, vpr, vif und vpu; sowie Kombinationen davon; und gegebenenfalls solche zusätzlichen regulatorischen Gene wie tev.

[0281] Das Tat-Protein ist ein Transaktivator der LTR-gesteuerten Genexpression. Es ist für die HIV-Replikation absolut essentiell. Tat wird frühzeitig während des Virus-Replikationscyclus produziert, und funktionsfähiges Tat ist zur Expression von Gag, Pol, Env und Vpr erforderlich. Die vorherrschende Form von Tat ist ein 86-Aminosäure-Protein, das aus 2 Exon-mRNAs stammt. Die Aminoterminalen 58 Aminosäuren reichen zur Transaktivierung aus, obwohl mit herabgesetzter Aktivität. Tat wirkt auf eine cis-wirkende Sequenz mit der Bezeichnung tar unter Erzeugung einer drastischen Zunahme der LTR-angetriebenen Genexpression. Tat kann teilweise über eine verstärkte RNA-Synthese und teilweise durch Erhöhung der Menge an Protein, das pro RNA-Transcript synthetisiert wird, wirken. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass Tat nur auf den HIV-1-LTR wirkt. Allerdings wurde auch eine Tat-aktivierte Expression von dem späten JC-Virus-Promotor beschrieben. Tat kann auch die ZellProliferation als exogener Faktor stimulieren und kann eine kontributorische Rolle bei der Beschleunigung des Wachstums des Kaposi-Sarkoms in HIV-infizierten Individuen spielen. Auf Grund solcher potentiell nachteiliger Wirkungen in sowohl HIV-infizierten als auch nicht HIV-infizierten Individuum werden bevorzugte Tat-Konstrukte, die zur genetischen Immunisierung eingesetzt werden, modifiziert, um ausschließlich nicht funktionsfähiges Tat zu exprimieren. Mutationen, die in der Lage sind, Tat oder Rev zu inaktivieren, können zusätzlich als transdominante Mutationen wirken und inaktivieren dadurch potentiell jedes funktionsfähige Tat, das in einem HIV-infizierten Individuum produziert wird.

[0282] Rev ist ein sekundäres regulatorisches HIV-Protein, das für die Virusreplikation essentiell ist. Es ist ein 19-kD(116 Aminosäuren)-Protein, das aus 2 codierenden Exons, die bei einer Vielzahl von mehrfach gespleißten mRNAs festgestellt werden, exprimiert wird. Es wurden zwei distinkte Domänen identifiziert, eine basische Region, die an der Bindung an RRE (Rev-Response-Element) beteiligt ist, und Transcripte enthält, und eine "Aktivierungs"-Domäne, die nukleären Exports solcher Transcripte als Ergebnis des Bindens auslöst. Während der natürlichen Virusinfektion ist Rev zur Expression der HIV-Struktuproteine Gag, Pol, und Env sowie Vpr erforderlich.

[0283] Vpr ist in den meisten HIV-1-Stämmen ein 15-kD-Protein (96 Aminosäuren), obwohl das offene Vpr-Leseraster bei vielen Virusstämmen, die in Zellkultur ausgiebigen Passagen ausgesetzt waren. Das offene vpr-Leseraster ist ebenfalls in HIV-2 und in den meisten SIV-Isolaten vorhanden. Vpr ist das erste retrovirale regulatorische Protein von dem festgestellt wurde, dass es mit HIV-Viruspartikeln assoziiert ist. Seine Gegenwart im HIV-Virion legt nahe, dass es zu einem frühen Zeitpunkt im Virus-Replikationscyclus einer Funktion dienen könnte. Vpr beschleunigt die HIV-Replikation, insbesondere frühzeitig bei der Infektion. Vpr erhöht das Expressionsniveau von Reportergenen, die mit dem HIV-LTR verknüpft sind, um etwa das Dreifache. Ferner wirken Vpr und Tat anscheinend bezüglich der LTR-verknüpften Gene synergistisch. Vpr kann aus dem Serum von HIV-infizierten Individuen isoliert werden und verstärkt anscheinend die Fähigkeit des Virus zur Infektion neuer Zellen. Es wurde festgestellt, dass auch Vpr die Zellproliferationen hemmt und die Zelldifferenzierung auslöst (Levy, D.N. et al., Cell (1993) 72:1–20) eine Feststellung, die hinsichtlich von Berichten von Bedeutung sein kann, dass primäre Monozyten/Makrophagen in vitro nur infizierbar sind, während sie eine Differenzierung durchlaufen (Schuitemaker, H. et al., (1992) J. Clin. Invest. 89:1154–1160). Auch Zellen, die nicht in der Lage sind, die HIV-Replikation zu unterstützen, können durch die Wirkungen von Vpr disreguliert werden. Beispielsweise könnte Vpr für den häufig bei AIDS-Patienten festgestellten Muskelverschleiß verantwortlich sein. Auf Grund der potentiell nachteiligen Aktivität von Vpr sollte die genetische Immunisierung vorzugsweise mit einem modifizierten Vpr-Konstrukt durchgeführt werden, das ein nicht funktionelles Vpr-Protein exprimiert.

[0284] Nef (in der älteren Literatur auch 3' orf genannt) ist ein 25-27-kD-Protein. Es wurde nahe gelegt, dass Nef an der Abwärtsregulierung von CD4+ T-Lymphozyten beteiligt sein könnte. Zusätzlich könnte Nef bei der Zellsignalisierung eine Rolle spielen. Nef ist anscheinend für die Entwicklung einer HIV-Infektion in vivo von Bedeutung. Nef-spezifische CTLs werden bei der Kontrolle der HIV-Infektion in vivo als bedeutend angenommen.

[0285] Vif ist ein zytoplasmatisches 23-kD-Protein mit der Bezeichnung "viraler Infektiostätsfaktor". Obwohl Vif-Mangel-Virusmutanten bezüglich der Zell-zu-Zell-Transmission nicht kompromittiert sind, zeigen sie eine tiefgreifende Abnahme in der Fähigkeit, viele CD4+-Zelllinien zu infizieren. Ohne Vif existieren eine herabge-

setzte Knospung von Virus und eine herabgesetzte Infektiosität. Bei Studien an Primaten zeigen Vif-Deletionsmutanten eine äußerst reduzierte Fähigkeit, die Infektion in vivo zu entwickeln. Diese Studien stützen eine klinische Rolle für Vif bei der Virusreplikation in dem Wirt.

[0286] Vpu ist ein 15-20-kD(81 Aminosäuren)-Protein. Obwohl Vpu(+)- und Vpu(–)-Viren die gleiche Menge an Virusprotein produzieren, zeigt letzteres eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation von Virusproteinen zusammen mit verminderten extrazellulären Virusproteinen. Dies legt nahe, dass Vpu am Zusammenbau und/oder der Freisetzung von Viruspartikeln beteiligt sein kann.

[0287] Einfachen Retroviren, wie murine und aviane Viren, mangelt es an Proteinen, die analog sind zu HIV-1, HIV-2 und SIV-regulatorischen Proteinen. Bei solchen Tieren neigt die retrovirale Infektion dazu, selbst begrenzend zu sein, mit einer Clearance des Virus und abnehmender Pathogeniät. Gleichermaßen wird HTLV-1, das nur Tax (das großenteils wie Tat wirkt und auch eine vpr-artige Aktivität aufzeigt) und Rex (das großenteils wie Rev wirkt) einschließt, bei vielen Individuen ausgeschieden. Die genetische Immunisierung mit regulatorischen Genen wirkt nicht nur für HIV, sondern auch für Viren, wie HBV (X-Gen-Produkt) und HCV, und HTLV-1 (TAX) und (Rex), als relevant betrachtet. Bei allen diesen Viren wird angenommen, dass die regulatorischen Gene eine kritische Rolle im Virus-Lebenscyclus und bei der Infektionsentwicklung spielen.

Beispiel 51

Konstruktion des HIV-1-regulatorischen Plasmids pREG

[0288] Das pREG-Plasmid wird stufenweise konstruiert, und jede Zwischenstufe kann auf die Proteinexpression getestet werden, bevor die Konstruktion fortgesetzt wird. Ein Expressionsvektor, der die Expression von tat und rev unterstützt, wird über zwei Schritte konstruiert. Zuerst wird ein Amplifikationsprodukt, das eine 5'-NheI-Stelle, die hauptsächliche Spleiß-Donorstelle für HIV-1, die Mehrheit der tat-codierenden Region, die Region, die die Amino-terminale Region des rev-Proteins codiert, und eine AvaII-Stelle enthält, aus einem synthetischen Templat amplifiziert. Dieses synthetische Templat wird unter Verwendung der Sequenzen erzeugt, die für den HXBII-Stamm von HIV-1 veröffentlicht wurden, der aus der Genbank Database erhalten wurde, und wird zur Mutation der Cysteinreste an den Positionen 22 und 30 des tat-Proteins geändert. Diese Mutationen haben gezeigt, dass sie tat nicht-funktionsfähig machen (Kuppuswamy, et al. (1989) Nucleic Acids Research 17(9):3551–3561).

[0289] Das PCR-Produkt wird in einen Vektor ligiert, der mit NheI und AvaII abgebaut wird und der ein Kanamycin-Resistenzgen und einen pBR322-Replikationsursprung enthält. Zusätzlich enthält dieses Plasmid einen Cytomegalie-Virus-Promotor, einen Rous-Sarkoma-Virus-Enhancer, die rev-codierende Region und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die rev-Sequenz, die in dem Plasmid vorhanden ist, stammt aus dem proviralen Klon von HIV-1-III_B. Dies erzeugt einen Expressionsvektor, der eine komplette, allerdings mutiert, tat-codierende Region und eine komplette rev-codierende Region enthält.

[0290] Der anschließende Schritt wird zur Erzeugung eines PCR-Produkts durchgeführt, das eine AvaII-Schnittstelle an seinem 5'-Ende, eine Mutation an der Aminosäure-Position 81 von rev, etwa 30 % er rev-codierenden Region, etwa 30 % der nef-codierenden Region und eine MluI-Stelle am 3'-Ende enthält. Die Aminosäureänderung an Position 81 hat gezeigt, dass die rev-Funktion beseitigt wird, und darum führt das resultierende Plasmid zur Produktion von nicht funktionellem rev-Protein (Bogard, H. und Greene, W.C. (1993) J. Virol. 67(5):2496–2502). Es wird angenommen, dass die Hauptdeletion der nef-codierenden Region zur Produktion eines nicht funktionsfähigen nef-Proteins führt. Die 5'-AvaII-Stelle und die Mutation an der Aminosäureposition 81 des rev-Proteins werden auf den 5'-PCR-Primer übertragen, der zu der codierenden Region von rev komplementär ist, die sowohl die AvaII-Stelle als auch die Nucleotid-codierende Aminosäure 81 enthält. Ein Stoppcodon, das die Termination von nef an der Aminosäureposition 63 bewirkt, und die 3'-codierenden Klonierungsstelle MluI werden durch den 3'-PCR-Primer eingebaut. Das Templat für diese PCR-Amplifizierung ist ein Plasmid oder ein synthetisches Templat, das die rev- und nef-codierende Region aus dem Stamm MN von HIV-1 enthält. Das resultierende PCR-Produkt wird mit AvaII und MluI abgebaut und zum Ersatz des kleineren AvaII-MluI-Fragments verwendet, das sich nach dem Abbau des in dem vorhergehenden Abschnitt beschriebenen tat-rev-Plasmids mit AvaII und MluI ergibt.

[0291] Gegebenenfalls kann diesem Plasmid an einer von zwei Stellen vpr hinzugefügt werden. Bei einer Möglichkeit kann vpr unter Verwendung eines 5'-PCR-Primers, der die MluI-Stelle stromaufwärts von den Sequenzen enthält, die das vpr-Translations-Startcodon und einen 3'-PCR-Primer, der zu dem vpr-Stoppcodon komplementär ist, und Sequenzen, die es flankieren, die ebenfalls eine MluI-Klonierungsstelle enthalten, um-

spannen. Sequenzen stromaufwärts von dem Startcodon enthalten einen Spleiß-Akzeptor. Das PCR-Produkt kann mit MluI abgebaut und in das tat-, rev-, nef-Plasmid, das vorstehend beschrieben ist, nach seinem Abbau mit MluI inseriert werden.

[0292] Alternativ kann die vpr-Amplifikation auf analoge Weise durchgeführt werden, allerdings würden die PCR-Primer-Restriktionsstellen enthalten, die mit dem Klonieren in einen anderen Vektor kompatibel sind, so dass er unter der Kontrolle eines zweiten eukariotischen Promotors exprimiert wird. Die diesem Plasmid entstammende Kassette, die den zweiten Promotor enthält, auf den die vpr-codierende Region, gefolgt von der PolyA-Sequenz, folgt, könnte durch Abbau mit Restriktionsenzymen, die die Kassette flankieren aber nicht in sie einschneiden, freigesetzt werden. Das resultierende DNA-Fragment würde in eine einzigartigen Stelle des tat-, rev-, vpr-Plasmids kloniert werden, die aus der Region herausfällt, die zur Expression von tat, rev, vpr notwendig ist. Auf diese Weise wird ein Plasmid mit zwei Expressionseinheiten gebildet.

Beispiel 52

Konstruktion der HCV- und HTLV-1-Plasmide

[0293] Ein ähnlicher Weg kann angewandt werden, um ein Plasmid zu erzeugen, das HTLV-1- oder HCV-codierte Proteine mit Enzymfunktionen exprimiert, die für den viralen Lebenscyclus und/oder für die regulatorischen Proteine dieser Viren erforderlich sind. Für HTLV-1 wird ein Plasmid, das das regulatorische Protein TAX codiert, unter Verwendung einer Plasmid-Hauptkette und einer Klonierungsstrategie entsprechend den vorstehend beschriebenen erzeugt. Solche HCV-Gene, die enzymatische Proteine codieren, umfassen die RNA-abhängige RNA-Polymerase, ein Protein mit Helicase/Protease-Funktion. Die notwendigen Sequenzen sind veröffentlicht und über Genbank erhältlich. Die virale Organisation von HTLV-1 und HCV sind veröffentlicht bei Cann, A.J. und Chen, I.S.Y. Virology, 2. Ausgabe, herausgegeben von B.N. Fiddr, Raven Press, Ltd., New York, 1990 bzw. Bradley, D.W. Transfusion Medicine Reviews, 1(2):93–102, 1992.

Beispiel 53

Genetische Immunisierung mit enzymatischen Genen

[0294] Die genetische Immunisierung mit Genen, die Proteine mit Enzym-Funktionen codieren, wie das HIV-Gen pol, kann ebenfalls eine bedeutende antivirale Strategie darstellen, da Enzyme, die Pol zur Produktion des lebendem Virus notwendig sind. Ohne Polymerase oder eine seiner Komponentenfunktionen ist HIV nicht pathogen und nicht infektiös. Gleichermaßen sind die enzymatischen Gene von anderen Viren, wie die HBV-Polymerase, attraktive Ziele für die genetische Immunisierung. Siehe z.B. Radziwill et al., Mutational Analysis of the Hepatitis B Virus P Gene Product: Domain Structure and RNase H Activity, J. Virol. 64(2):613–620 (1990).

[0295] Ein für die Attraktivität viraler Enzyme als immunologisches Ziel ist die eingeschränkte Fähigkeit solcher Enzyme, ihre Aminosäuresequenz zu mutieren und dennoch ihre enzymatischen Funktionen beizubehalten. Mit HIV-1 zeigt Pol beispielsweise eine eingeschränkte Anzahl von "Escape"-Mutationen, die mit einer Resistenz gegenüber Nucleotid-Analogen, wie AZT, assoziiert sind. Allerdings ist die breite Mehrheit von immunologischen Zielen innerhalb des Proteins, auch bei den Arzneimittel-Escape-Mutanten, konserviert.

Beispiel 54

Konstruktion des HBV-Polymerase-Plasmids

[0296] Die in der Literatur beschriebenen Experimente zeigen, dass die HBV-Polymerase-Expression in Gewebekulturzellen erreicht worden ist, wenn sowohl der Kern- als auch die offenen Polymerase-Leseraster in einem mRNA-Molekül vorhanden sind. Es wurde auch gezeigt, dass in dieser Situation die Mutation des Kern-ATG die Polymerase-Expression nicht beeinflusste.

[0297] Das HBV-Genom wird aus einem Plasmid amplifiziert, das ein Kopf-Schwanz-Dimer des HBV-Stamms ADW enthält. Da nur die Expression von Polymerase und nicht von Kern erwünscht ist, ist der 5'-PCR-Primer zur Mutation des Vorkern- und Kern-Translations-Startcodons ausgelegt. Zusätzlich baut dieser Primer auch eine mutierte DR1-Sequenz ein, um die Möglichkeit der Generierung einer replikationskompetenten HBV-Genom-RNA auszuschalten. Dieses PCR-Produkt wird in einem Plasmid angeordnet, das ein Kanamycin-Resistenzgen und einen pBR322-Replikationsursprung enthält. Zusätzlich enthält dieses Plasmid einen Cytomega-

lie-Virus-Promotor, einen Rous-Sarcom-Virus-Enhancer und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die Translations-Startcodons für das Oberflächenantigen und das Produkt der X-codierenden Region sind mutiert, um die Expression der HBS- und X-Gen-Produkte zu verhindern.

[0298] Nach einem weiteren Weg zur Durchführung der Expression der HBV-Polymerase wird ein PCR-Produkt, das die gesamte Polymerase-codierende Region codiert, amplifiziert und in einen Vektor kloniert, der ein Kanamycin-Resistenzgen und einen pBR322-Replikationsursprung enthält. Zusätzlich enthält dieses Plasmid einen Cytomegalie-Virus-Promotor, einen Rous-Sarcom-Virus-Enhancer und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Der 5'-PCR-Primer für diese Amplifikation enthält eine Klonierungsstelle und umspannt das Translations-Startcodon des Polymerase-Gens. Das 3'-PCR-Produkt enthält eine Restriktionsstelle für die Klonierung des Insert in den Expressionsvektor und ist auch komplementär zu dem Translations-Stoppcodon des HBV-Polymerasegens und zu Sequenzen, die dieses Stoppcodon flankieren. Nach Ligation dieses PCR-Produkts in ein Plasmid, das das Kanamycin-Resistenzgen, einen pBR322-Replikationsursprung, einen Cytomegalie-Virus-Promotor, einen Rous-Sacom-Virus-Enhancer und ein SV40-Polyadenylierungssignal enthält, werden die Translations-Startcodons für das Hepatitis-B-Oberflächenantigen und die X-Gene zur Verhinderung der Expression dieser Genprodukte mutiert. Eine alternative Strategie, die der vorstehend beschriebenen entspricht, wird verwendet, allerdings umfasst der 3'-PCR-Primer in diesem Fall das HBV-polyA-Signal und Sequenzen, die dieses Signal flankieren. Dieser 3'-Primer wird in dem Fall verwendet, dass Sequenzen, die das HBV-polyA-Signal einschließen und/oder es umgeben, für die Expression von Bedeutung sind. Eine Mutationsanalyse hat gezeigt, dass die Funktion des HBV-Polymerasegenprodukts durch bestimmte Nucleotidänderungen ausgeschaltet werden kann (Radziwell, G. et al. (1990) J. Virol. 64(2):613–620. Vor der Verwendung eines Plasmids, das wie vorstehend beschrieben konstruiert wurde, kann die exprimierte Polymerase durch Einbau von einer dieser Mutationen oder von anderen, die analog sind, mutiert werden.

Beispiel 55

[0299] Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierende Faktor (GM-CSF) zeigt stimulatorische Wirkungen auf eine Vielzahl von Zelllinien, einschließlich von Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen und Eosinophilen. Die Wirkungen von GM-CSF macht ihn zu einem attraktiven therapeutischen Modell. GM-CSF wurde durch die FDA zur Verwendung bei der autologen Knochenmarkstransplantation zugelassen, und es wurde bereits mit klinischen Versuchen begonnen, um die Wirksamkeit bei der Behandlung von verschiedenen Neutropenien zu testen. Derzeit wird GM-CSF als Protein verabreicht, das im Allgemeinen erfordert, dass es in mehreren Dosen verabreicht wird. Die Proteine müssen hergestellt und gereinigt werden.

[0300] Ein alternativer Weg zu der Verwendung des GM-CSF-Proteins besteht in der direkten Verabreichung eines Genkonstrukts, das ein Gen enthält, das GM-CSF codiert, in Verbindung mit der Verabreichung von Bupivacain. Das genetische Konstrukt wird durch PCR einer GM-CSF-Gen-einschließenden Signalsequenz konstruiert. Das genetische Konstrukt enthält vorzugsweise in Kanamycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-3'-phosphotransferase-Gen), einen bakteriellen Replikationsursprung, Sequenzen, die die Expression der GM-CSF-codierenden Region in den Zellen unterstützen, in die das Plasmid eingeschleust wurde, wie die als Hauptketten in Beispiel 46 beschriebenen Vektoren. Vorzugsweise enthält das Plasmid einen Säuger-Replikationsursprung, der durch die zelluläre Replikation ausgelöst wird, die mit der Bupivacain-Verabreichung zusammenhängt. Falls der EBV-Replikationsursprung eingesetzt wird, ist auch die Sequenz, die das nukleäre Antigen EBNA-1 codiert, mit den entsprechenden regulatorischen Sequenzen eingeschlossen. Die Primer zur PCR-Amplifikation des Inserts enthalten Restriktionsenzymstellen, um das Klonieren in den Expressionsvektor zu ermöglichen, und sind komplementär zu dem 5'- und 3'-Enden der GM-CSF-codierenden Sequenzen. Die PCR-Reaktion wird mit einem cDNA-Klon durchgeführt, wie beschrieben bei Lee et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:4360–4364.

Beispiel 56

[0301] Die chronische myelogene Leukämie (CML) ist eine klonale myeloproliferative Störung der hämatopoietischen Stammzellen, die mit dem Philadelphia-Chromosom, eine chromasomale Abnormität auf Grund einer Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, zusammenhängt. Die Bruchpunkte auf Chromosom 22 sind in einer 6-kb-Region mit der Bezeichnung Bruchpunkt-Cluster-Region (BCR) geclustert, während auf Chromosom 9 die Bruchpunkte über eine 90-kb-Region stromaufwärts von dem c-abl-Exon 2 verstreut sind. Die verschiedenen 9:22-Translokationen, die sich ergeben, können in 2 Typen unterteilt werden: die K28-Translokationen und die L6-Translokationen. Die Transcription über die bcr-abl-Translokationen bewirkt die Erzeugung von Fusions-mRNAs. Es wurde gezeigt, dass Anitsense-mRNA, ausgerichtet auf die bcr-abl-Verbindungsstelle der mRNAs, die Fähigkeit von aus CML-Patienten erhaltenen hämatopoietischen

Zellen zur Bildung von Kolonien herabsetzt.

[0302] Eine genetische Konstruktion, die die Antisense-mRNA codiert, wird zusammen mit Bupivacain ex vivo an die Zellen eines Individuums verabreicht, das an CML leidet. Sodann werden die behandelten Zellen dem Individuum wieder zugeführt.

Beispiel 57

[0303] Genkonstrukte, die in pharmazeutischen Kits und Zusammensetzungen zur Impfung gegen und Behandlung von HBV geeignet sind, werden mit den in Beispiel 46 als Hauptketten beschriebenen Vektoren konstruiert. Die Plasmide enthalten HBV-Strukturgene insbesondere Gene, die das HBV-Oberflächen-Antigen und/oder das HBV-Kern-Antigen und/oder das HBV-Vorkern-Antigen codieren.

Beispiel 58

[0304] Genkonstrukte, die in pharmazeutischen Kits und in Zusammensetzungen zum Impfen gegen und zur Behandlung von HCV geeignet sind, werden mit den in Beispiel 46 als Hauptketten beschriebenen Vektoren konstruiert. Die Plasmide enthalten HCV-Strukturgene, insbesondere Gene, die das HCV-Kernprotein und/oder das HCV-Hüllprotein codieren.

Beispiel 59

[0305] Das Genkonstrukt pREV wurde konstruiert, das eine Nucleotidsequenz enthält, die HIV-rev als alleiniges Zielprotein codiert. Die codierende Sequenz von rev wird von BBG35 (RD Systems Inc. Minneapolis, MN), das die codierende Region von rev aus dem HIV-Stamm HX3B in pUC19 enthält, in die in Beispiel 46 beschriebene Hauptkette A kloniert.

Tabelle 1

Picornavirus-Familie Gattungen:	Rhinoviren: (medizinisch) verantwortlich für ca. 50 % der gewöhnlichen Erkältungsfälle. Etheroviren: (medizinisch) umfasst Polioviren, Coxsackieviren, Echoviren und menschliche Enteroviren, wie das Hepatitis-A-Virus. Aphthoviren: (veterinärmedizinisch) die Viren der Maul- und Klauenseuche.
Zielantigene: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG	Viren der Gruppe Norwalk: (medizinisch) diese Viren sind ein wichtiges kausatives Mittel für epidemische Gastroenteritis.
Calcivirus-Familie Gattungen:	
Togavirus-Familie Gattungen:	Alphaviren: (medizinisch und veterinärmedizinisch) Beispiele umfassen Senilis-Viren, Ross-River-Virus und die östliche und die ost- und westamerikanische Pferde-Enzephalitis. Reovirus: (medizinisch) Rubella-Virus
Flavivirus-Familie	Beispiele umfassen (medizinisch) die Viren von Dengue-Fieber, Gelbfieber, Japanischer Enzephalitis, St.-Louis-Enzephalitis und Zecken-Enzephalitis.
Hepatits-C-Virus (medizinisch): Diese Viren sind in keiner Familie angesiedelt, allerdings wird dennoch angenommen, dass sie entweder ein Togavirus oder ein Flavivirus sind. Die größte Ähnlichkeit besteht mit der Togavirus-Familie.	(medizinisch und veterinärmedizinisch) infektiöses Bronchitisvirus (Geflügel) Schweine-übertragbares gastroenteritisches Virus (Schwein) hämagglutinierendes Schweine-Enzephalomyelitis-Virus (Schwein) infektiöses Katzen-Peritonitis-Virus (Katzen) enterisches Katzen-Coronavirus (Katzen) Hunde-Coronavirus (Hund)
Coronavirus-Familie:	Die menschlichen respiratorischen Coronaviren verursachen ca. 40 % der Fälle der gewöhnlichen Erkältung. Bsp. 224E, 0C43 Anmerkung: Coronaviren können Nicht-A-, B-, oder C-Hepatits verursachen.

Zielantigene: E1 – auch M oder Matrixprotein genannt	E2 – auch S oder Spikeprotein genannt E3 – auch HE oder Hämagglutin-Elterose-Glycoprotein genannt (nicht in allen Coronaviren vorhanden) N – Nucleocapsid
Rhabdovirus-Familie Gattungen: Zielantigen: G-Protein N-Protein	Vesiliovirus Lyssavirus: (medizinisch und veterinärmedizinisch) Tollwut (medizinisch) hämorrhagische Fieber-Viren, wie das Marburg- und Ebola-Virus
Filovirus-Familie:	
Paramyxovirus-Familie Gattungen:	Paramyxovirus: (medizinisch und veterinärmedizinisch) Mumpsvirus, New-Castle-Krankheit-Virus (wichtiges Pathogen bei Hühnern) Morbillivirus: (medizinisch und veterinärmedizinisch) Masern, Hunde-Staupe Pneuminvirus: (medizinisch und veterinärmedizinisch) respiratorisches synzitikales Virus
Orthomyxovirus-Familie	(medizinisch) das Influenzavirus
Bungavirus-Familie Gattungen:	Bungavirus: (medizinisch) Kalifornische Enzephalitis, La Crosse-Enzephalitis; Phlebovirus: (medizinisch) Rift-Valley-Fieber Hantavirus: Puumala ist ein hämorrhagisches Fieber-Virus Nairvirus (veterinärmedizinisch) Nairobi-Schaf-Krankheit Auch vielen nicht zugeordnete Bungaviren (medizinisch)
Arenavirus-Familie	LCM, Lassa-Fieber-Virus
Reovirus-Familie Gattungen:	Reovirus: ein mögliches menschliches Pathogen Rotavirus: akute Gastroenteritis bei Kindern Orbiviren: (medizinisch und veterinärmedizinisch) Colorado-Zecken-Fieber, Lebombo (Menschen) Pferde-Enzephalose, blaue Zunge
Retrovirus-Familie Unterfamilie:	Oncorivirinal: (veterinärmedizinisch) (medizinisch) Katzen-Leukämievirus, HTLVI und HTLVII Lentivirinal: (medizinisch und veterinärmedizinisch) HIV, Katzen-Immundefizienzvirus, Pferdeinfektionen, Anämie-Virus Spumavirinal
Papovavirus-Families Unterfamilie: Unterfamilie:	Polyomaviren: (medizinisch) BKU- und JCU-Viren Papillomavirus: (medizinisch) viele Virustypen, die mit Krebs oder einer malignen Papillom-Progression zusammenhängen
Adenovirus (medizinisch)	EX AD7, ARD., O.B. – verursachen Atemwegserkrankungen – einige Adenoviren, wie 275, verursachen Enteritis (veterinärmedizinisch)
Parvovirus-Familie	Katzen-Parvovirus: verursacht Katzen-Enteritis Katzen-Panleukopenievirus Hunde-Parvovirus Schweine-Parvovirus
Herpesvirus-Familie Unterfamilie: Gattungen:	Alpha-Herpesviridae Simplex-Virus (medizinisch) HSVI, HSVII Varicellavirus: (medizinisch – veterinärmedizinisch) Pseudotollwut – Varicella zoster
Unterfamilie: Gattungen:	Beta-Herpesvirus Cytomegalievirus (medizinisch) HCMV Muromegalievirus
Unterfamilie: Gattung:	Gammaherpesviridae Lymphocrypto-Virus (medizinisch) EBV-(Burkitts Lymphom) Rhadinovirus
Pockenvirus-Familie Unterfamilie: Gattungen:	Chordopox-Viridae (medizinisch – veterinärmedizinisch) Variola (Smallpox) Vaccinia (Kuhpocken) Parapoxivirus – veterinärmedizinisch Suipoxvirus – veterinärmedizinisch Capripoxvirus Leporipoxvirus Suipoxvirus
Unterfamilie:	Entemopox-viridae
Hepadnavirus-Familie	Hepatitis-B-Virus
unklassifiziert	Hepatitis-Delta-Virus

Tabelle 2

Bakterielle Patogene	
	Pathogene Gram-positive Kokken umfassen: Pneumokokken, Staphylokokken und Streptokokken. Pathogene Gram-negative Kokken umfassen: Meningokokken und Gonokokken. Pathogene enterische gramnegative Bazillen umfassen: Enterobacteriaceae; Pseudomonas, Acinetobacteria und Eikenella; Melioidosis; Salmonella; Shigellosis; Hämophilus; Chancroid; Brucellosis; Tularemia; Yersinia (pasteurella); Streptobacillus moniliformis und spririllum; Listeria monocytogenes; Erysipelothrix rhusiopathiae; Diphterie; Cholera; Anthrax; Donovanosis (Granuloma inguinale); und Bartonellosis. Pathogene anaerobe Bakterien umfassen: Tetanus; Botulismus; andere Clostridien; Tuberkulose; Leprosie und andere Mykobakterien. Pathogene Spirochäten-Krankheiten umfassen: Syphilis; Treptonematose: Yaw, Pinta und endemische Syphilis; und Leptospirose. Weitere Infektionen, die durch höhere pathogene Bakterien und pathogenische Pilze verursacht werden, umfassen: Aktinomykose; Nocardiose; Cryptokokkose, Blastomykose, Histoplasmose und Kokzidioidomykose; Candidase, Apergillose, und Mukormykose; Sporotrichose; Parakokzidiodomykose, Petriellidose, Torulopsose, Mycetom und Chromomykose; und Dermatophytose. Rickettsien-Infektionen umfassen rickettsienartige Infektionen und Rickettsiosen. Beispiele für Mykoplasma- und Chlamydien-Infektionen umfassen: Mykoplasma-Pneumonie; Lymphogranuloma venereum; Psittakose; und perinatale Chlamydien-Infektionen.
Pathogene Eukaryoten	

	Pathogene Protozoen und Helminthen und die Infektionen damit umfassen: Amöbiase; Malaria; Leishmaniose; Trypanosomiasie; Toxoplasmose; Pneumocystis carinii; Babesiose; Giardiasis; Trichinose; Filariasis; Schistosomiasis; Nematoden; Trematoden oder Plattwürmer; und Cestoden (Bandwurm)-Infektionen.

Sequenzlistung

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) Anmelder: Weiner, David B.
Williams, William V.
Wang, Bin
Coney, Leslie R.
Merva, Michael J.
Zurawski, Vincent R., Jr.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG VON GENETISCHEM MATERIAL

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 52

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz & Norris

(B) STRASSE: One Liberty Place 46th Floor

(C) STADT: Philadelphia

(D) STAAT: Pennsylvania

(E) LAND: USA

(F) ZIP: 19103

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: Floppy disk

(B) COMPUTER: PC, IBM compatibel

(C)BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25 mb-MD/JAF

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER

(B) EINREICHUNGSDATUM

(C) KLASSIFIZIERUNG

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/125,012
(B) EINREICHUNGSDATUM: 21. Sept. 1993
(C) KLASSIFIZIERUNG

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/124,962
(B) EINREICHUNGSDATUM: 21. Sept. 1993
(C) KLASSIFIZIERUNG

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/093,235
(B) EINREICHUNGSDATUM: 15. Juli 1993
(C) KLASSIFIZIERUNG

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/029,336
(B) EINREICHUNGSDATUM: 15. März 1993
(C) KLASSIFIZIERUNG

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/008,342
(B) EINREICHUNGSDATUM: 26. JAN. 1993
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:
(A) NAME: DeLuca, Mark
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33,229
(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: APOL-0013

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:
(A) TELEPHON: 215-568-3100
(B) TELEFAX: 215-568-3429

(2) Information für SEQ-ID. NR. 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 1:

AGGCGTCTCG AGACAGAGGA GAGCAAGAAA TG 32

(2) Information für SEQ-ID. NR. 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 2:

TTTCCCTCTA GATAAGCCAT CCAATCACAC 30

(2) Information für SEQ-ID. NR. 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 3:

GAAGGATCCA TGAAAAAATA TTTATTGGG 29

(2) Information für SEQ-ID. NR. 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 4:

ACTGTCGACT TATTTTAAAG CGTTTTTAAG 30

(2) Information für SEQ-ID. NR. 5:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 5:

GCCAGTTTTG GATCCTTAAA AAAGGCTTGG 30

(2) Information für SEQ-ID. NR. 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 6

TTGTGAGGGA CAGAATTCCA ATCAGGG 27

(2) Information für SEQ-ID. NR. 7:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 7:

CAGTGATATC CCGGGAGACT CCTC 24

(2) Information für SEQ-ID. NR. 8:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 8:

GAATAGAAGA ACTCCTCTAG AATTC 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 9:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 9:

GCCTTAGGCG GATCCTATGG CAGGAAG 27

(2) Information für SEQ-ID. NR. 10:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 10

TAAGATGGGT GGCCATGGTG AATT 24

(2) Information für SEQ-ID. NR. 11:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 22 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 11

Cys Asn Thr Arg Lys Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala
1 5 10 15

Phe Val Thr Ile Gly Lys
20

(2) Information für SEQ-ID. NR. 12:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 12:

Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Cys
20 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 13:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 13:

Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
1 5 10 15

Met Thr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Ile Arg Cys
20 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 14:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 14:

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Ile Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10 15

Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
20 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 15:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 15:

TTGTTTAACT TTTGATCGAT CCATTCC 27

(2) Information für SEQ-ID. NR. 16:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 16:

GATTTGTATC GATGATCTGA C 21

(2) Information für SEQ-ID. NR. 17:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 17:

TGTAGTAGCA AAAGAAATAG TTAAG 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 18:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 18:

AATTCTTAAC TATTTCTTTT GCTAC 25

(2) Information für SEQ-ID. NR. 19:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 19.

ATTTGTCGAC TGGTTTCAGC CTGCCATGGC AGGAAGAAGC 40

(2) Information für SEQ-ID. NR. 20:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 20:

ACGACGCGTA TTCTTAGCT CCTGACTCC 29

(2) Information für SEQ-ID. NR. 21:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 21:

GCTGACGGTA GCGGCCGCAC AATT

24

(2) Information für SEQ-ID. NR. 22:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 22:

GTATTAAGCG GCCGCAATTG TT 22

(2) Information für SEQ-ID. NR. 23:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 78 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 23:

AAAAAGCTTC GCGGATCCGC GTTGCGGCCG CAACCGGTCA

CCGGCGACGC GTCGGTCAC 60

CGGTCATGGC TGGGCCCC 78

(2) Information für SEQ-ID. NR. 24:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 24:

CCCAAGCTTA GACATGATAA GATACATTG 29

(2) Information für SEQ-ID. NR. 25:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 25:

CTAGCAGCTG GATCCCAGCT TC 22

(2) Information für SEQ-ID. NR. 26:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 26:

GGATTTCTGG GGATCCAAGC TAGT 24

(2) Information für SEQ-ID. NR. 27:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 27:

TATAGGATCC GCGCAATGAA AGACCCCACC T 31

(2) Information für SEQ-ID. NR. 28:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 28:

ATATGGATCC GCAATGAAAG ACCCCCGCTG A 31

(2) Information für SEQ-ID. NR. 29:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 29:

TAAAGCGGCC GCTCCTATGG CAGGAAGACG 30

(2) Information für SEQ-ID. NR. 30:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 30:

ATTACGCGTC TTATGCTTCT AGCCAGGCAC AATG 34

(2) Information für SEQ-ID. NR. 31:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 31:

ATTACGCGTT TATTACAGAA TGGAAAACAG ATGGCAGGTG 40

(2) Information für SEQ-ID. NR. 32:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 32:

ATTACGCGTT ATTGCAGAAT TCTTATTATG GC 32

(2) Information für SEQ-ID. NR. 33:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 33:

GAGGCTTGGA GAGGATTATA GAAGTACTGC AAGAGCTG 38

(2) Information für SEQ-ID. NR. 34:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 34:

GAATCCTCTC CAAGCCTCAG CTACTGCTAT AGCTGTGGC 39

(2) Information für SEQ-ID. NR. 35:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 35:

AAAAATAAAG CGGCCGCTCC TATGGCAGGA AGAGAAGCG 39

(2) Information für SEQ-ID. NR. 36:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 36:

AAAAAATTAC GCGTCTTATG CTTCTAGCCA GGCACAATG 39

(2) Information für SEQ-ID. NR. 37:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 37:

CCCAAGCTTG GGAATGCTCT GCCAGTGTTA C 31

(2) Information für SEQ-ID. NR. 38

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 38:

GGGGGCCGGA AGGGCACAAT AAAACTGTCT GCTTAC 36

(2) Information für SEQ-ID. NR. 39:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 33 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 39:

CCTGATTCAG GTGAAAATAT TGTTGATGCG CTG 33

(2) Information für SEQ-ID. NR. 40:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 111 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 40:

AACATCAATA CAACCTATTA ATTTCCCCTC GTCAAAAATA
AGGTTATCAA GTGAGAAATC 60
ACCATCAGTG ACGACTGAAT CCGGTGAGAA TGGCAAAAGT
TTATGCATTT C 111

(2) Information für SEQ-ID. NR. 41:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 55 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 41:

CTAGCGCGGG GATCCGCGTT GCGGCCGCAA AAAGTCGACG
GGCGACGCGT AAAAA 55

(2) Information für SEQ-ID. NR. 42:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 55 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 42:

GATCTTTTTA CGCGTCGCCC GTCGACTTTT TGCGGCCGCA
ACGCGGATCC CCGCG 55

(2) Information für SEQ-ID. NR. 43:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 48 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 43:

ATGTCGACTG GTTTCAGCCT GCCATGGCAG GAAGAAGC 48

(2) Information für SEQ-ID. NR. 44:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 35 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 44:

CCCCACGACG CGTCTATTCT TTAGCTCCTG ACTCC 35

(2) Information für SEQ-ID. NR. 45:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 35 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 45:

TTTGCGGCGG CGTAAGTGGA GAGAGATGGT GCGAG 35

(2) Information für SEQ-ID. NR. 46:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 46:

CTGGTGGGGC TGTTGGCTCT G 21

(2) Information für SEQ-ID. NR. 47:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 80 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 47:

AATTTAATAA GTAAGTAAGT GTCATATGTT TGTTTGAATT

CTGCAACAAC TGCTGTTTAT 60

CCATTTTCAG AATTGGGTG 80

(2) Information für SEQ-ID. NR. 48:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 80 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 48:

TCGACACCCA ATTCTGAAAA TGGATAAACA

GCACTTGTTG CAGAATTCAA ACAAACATAT 60

GACACTTACT TACTTATTA 80

(2) Information für SEQ-ID. NR. 49:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 49:

GGGGTTTTTG GCATATGTA TGAGGGACAA TTGGAGAAGT G 41

(2) Information für SEQ-ID. NR. 50:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 50:

AAGCTTGTGG AATTCTTAAT TTCTCTGTCC GGGGTTTTTG 40

GGCATATGTA TGAGGGACAT TGGAGAAGTG 70

(2) Information für SEQ-ID. NR. 51:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 51:

CAGTATCTGG CATGGGTAC 29

(2) Information für SEQ-ID. NR. 52:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID. NR. 52:

CCATGCCAGA TACTGGTAC 29

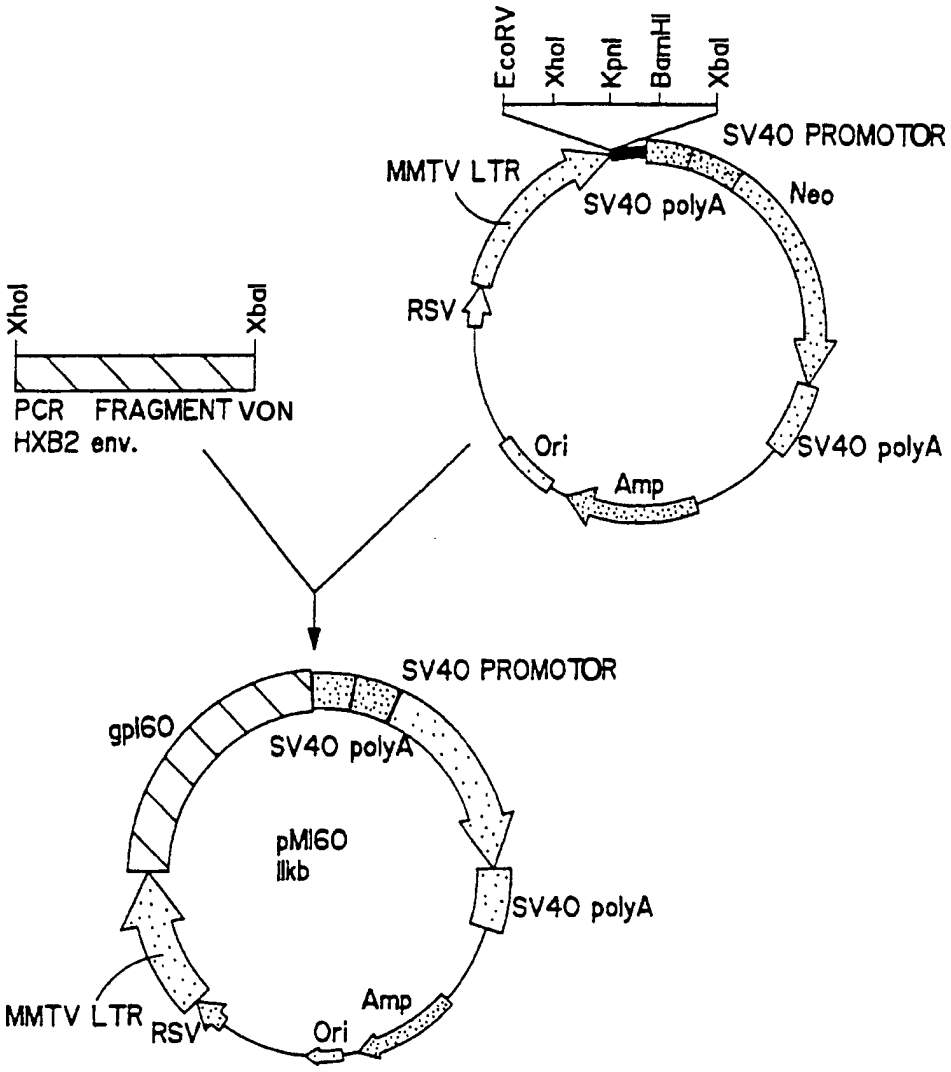


FIG. IA

Patentansprüche

1. Verwendung eines Polynucleotidfunktionsenhancers und eines Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen eines Individuums exprimiert zu werden, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zum Einschleusen genetischen Materials in Zellen eines Individuums durch Kontaktieren der Zellen des Individuums mit dem Polynucleotidfunktionsenhancer und Verabreichen an Zellen eines Individuums des Nucleinsäuremoleküls, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer eine der folgenden Formeln aufweist:

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

R^4-O-R^1-N-R^7

wobei Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen, Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionen in substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist,
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

2. Verwendung eines Polynucleotidfunktionsenhancer und eines Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen eines Individuums exprimiert zu werden, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums gegen ein Pathogen durch Zusammenbringen von Zellen des Individuums mit dem Polynucleotidfunktionsenhancer und Verabreichung an Zellen eines Individuums des Nucleinsäuremoleküls, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer eine der folgenden Formeln aufweist:

Ar-R^1-O-R^2-R^3

oder

Ar-N-R^1-R^2-R^3

oder

R^4-N-R^5-R^6

oder

R^4-O-R^1-N-R^7

wobei Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen, Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionen in substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist;
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines

C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

3. Verwendung eines Polynucleotidfunktionsenhancers und eines Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen eines Individuums exprimiert zu werden, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zum Einschleusen genetischen Materials in Zellen eines Individuums durch Zusammenbringen von Zellen des Individuums mit dem Polynucleotidfunktionsenhancer und Verabreichung an Zellen eines Individuums des Nucleinsäuremoleküls, oder bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums gegen ein Pathogen durch Zusammenbringen von Zellen des Individuums mit dem Polynucleotidfunktionsenhancer und Verabreichen an Zellen des Individuums des Nucleinsäuremoleküls, wobei in jedem Fall der Polynucleotidfunktionsenhancer Piperocain, Meprylcain, Isobucain, Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain, Chloroprocain, Metabuthamin, Primacain, Parethoxycain, Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain, Prilocain, Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin, Cocain, Cinnamoylcocain, Truxillin oder Cocaethylen ist, wobei die Verbindungen zusätzlich mit Hydrochlorid komplexiert sein können.

4. Verwendung nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Bupivacain ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert und mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop eines Antigens, gegen das eine Immunantwort erwünscht ist, identisch ist oder im wesentlichen ähnlich ist, wobei die Nucleotidsequenz mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Protein ein Pathogen-Antigen oder ein Fragment davon ist.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Pathogen ein Virus ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus humanem Immundefizienz-Virus HIV; humanem T-Zellen-Leukämie-Virus HTLV; Influenza-Virus; Hepatitis A-Virus HAV; Hepatitis B-Virus HBV; Hepatitis C-Virus HCV; humanem Papillom-Virus HPV; Herpes-Simplex-Virus Typ 1, HSV1; Herpes-Simplex-Virus Typ 2 HSV2; Zytomegalie-Virus CMV; Epstein-Barr-Virus EBV; Rhinovirus und Coronavirus.

9. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Pathogen HIV ist und das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein HIV-Protein kodiert.

10. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Pathogen HIV ist und das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die mehr als ein HIV-Strukturprotein kodiert.

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder Anspruch 10, wobei das Pathogen HIV ist und das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die mehr als ein HIV-Regulatorprotein kodiert.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei mindestens zwei oder mehr verschiedene Nucleinsäuremoleküle an verschiedene Zellen eines Individuums verabreicht werden, wobei die verschiedenen Nucleinsäuremoleküle jeweils Nucleotidsequenzen umfassen, die ein oder mehrere Pathogen, Antigene des gleichen Pathogens kodieren.

13. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Nucleinsäuremolekül intramuskulär verabreicht wird.

15. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Individuum ein Mensch ist;
das Pathogen das humane Immundefizienz-Virus ist; und das Nucleinsäuremolekül DNA ist und eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Strukturproteine gag und pol mit einer Deletion des psi kodiert,
wobei die DNA-Sequenz, die gag und pol kodiert, zweckorientiert verknüpft ist mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einen SV40-Replikationsursprung.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die DNA-Sequenz außerdem ein HIV-rev-Reaktionselement und eine Deletion der HIV-Integrase umfasst.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder Anspruch 16, wobei die DNA-Sequenz außerdem einen HIV-Splice-Akzeptor umfasst.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei das DNA-Molekül außerdem eine DNA-Sequenz umfasst, die HIV-rev kodiert, das zweckorientiert verknüpft ist mit einem SV40-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die DNA-Sequenz, die rev kodiert, zusätzlich HIV-vpu und HIV-env kodiert.

20. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Individuum ein Mensch ist;
das Pathogen das humane Immundefizienz-Virus ist; wobei das Nucleinsäuremolekül DNA ist und eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Proteine rev, vpu und env kodiert, die zweckorientiert verknüpft sind mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung.

21. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Individuum ein Mensch ist;
das Pathogen das humane Immundefizienz-Virus ist;
zwei verschiedene DNA-Moleküle an verschiedene Zellen eines Individuums verabreicht werden;
wobei eines der Nucleinsäuremoleküle DNA ist und eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Strukturproteine gag und pol mit einer Deletion des psi kodiert, wobei die DNA-Sequenz, die gag und pol kodiert, zweckorientiert verknüpft ist mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung; und
das andere der Nucleinsäuremoleküle DNA ist und eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Proteine rev, vpu und env kodiert, die zweckorientiert verknüpft sind mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung.

22. Verwendung nach Anspruch 6, wobei zwei verschiedene Nucleinsäuremoleküle an Zellen eines Individuums verabreicht werden, wovon jedes Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das mindestens ein Epitop umfasst, das zu einem Epitop von mindestens einem HIV-Antigen identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, das mit Regulatorsequenzen zweckorientiert verknüpft ist; wobei die Nucleotidsequenzen in der Lage sind, in den Zellen exprimiert zu werden; die Nucleotidsequenzen von jedem der verschiedenen Nucleinsäuremoleküle verschiedene Proteine kodieren; die Proteine mindestens ein Epitop umfassen, das identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist zu einem Epitop von mindestens einem der HIV-Proteine, die durch HIV-Gene kodiert werden, die aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus gag, pol und env.

23. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Zielprotein kodiert, das ein Epitop umfasst, das identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist zu einem Epitop eines Proteins, das mit Zellen assoziiert ist, die eine Krankheit charakterisieren, die mit Regulatorsequenzen zweckorientiert verknüpft ist; wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen exprimiert zu werden.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Krankheit durch hyperproliferierende Zellen gekennzeichnet ist.

25. Verwendung nach Anspruch 23 oder Anspruch 24, wobei das Nucleinsäuremolekül intramuskulär verabreicht wird.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Zielprotein kodiert, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:
Proteinprodukten der Oncogene myb, myc, fyn, ras, sarc, neu und trk; Proteinprodukten des Translokationsgens bcl/abl; P53; EGRF; den variablen Regionen der Antikörper, die aus B-Zell-Lymphomen hergestellt werden; und den variablen Regionen der T-Zell-Rezeptoren aus T-Zell-Lymphomen.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, wobei das Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus: den variablen Regionen der Antikörper, die an einer B-Zellen-vermittelten Autoimmunerkrankung beteiligt sind, und den variablen Regionen der T-Zell-Rezeptoren, die an einer T-Zellen-vermittelten Autoimmunerkrankung beteiligt sind.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 27, wobei die Zusammensetzung zusätzlich ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfasst, dass ein Cytokin oder ein Lymphokin kodiert.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das weitere Nucleinsäuremolekül α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

30. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das weitere Nucleinsäuremolekül IL-12 oder GM-CSF kodiert.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus: Enzymen, Strukturproteinen, Cytokinen, Lymphokinen und Wachstumsfaktoren.

32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

33. Verwendung nach Anspruch 31, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die IL-12 oder GM-CSF kodiert.

34. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
a) ein DNA-Molekül, das eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Strukturproteine gag und pol mit einer Deletion des psi kodiert, wobei die DNA-Sequenz, die gag und pol kodiert, zweckorientiert verknüpft ist mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung; und
b) einen Polynucleotidfunktionsenhancer mit einer der folgenden Formeln:

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

$R^4\text{-}O\text{-}R^1\text{-}N\text{-}R^7$

wobei Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionen in substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist,

R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend
a) ein DNA-Molekül, das eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Struktur Proteine gag und pol mit einer Deletion des psi kodiert, wobei die DNA-Sequenz, die gag und pol kodiert, zweckorientiert verknüpft ist mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung; und
b) einen Polynucleotidfunktionsenhancer, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Piperocain, Meprylcain, Isobucain, Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain, Chloroprocain, Metabuthamin, Primacain, Parethoxycain, Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain, Prilocain, Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin, Cocain, Cinnamoylcocain, Truxillin oder Cocaethylen ist, wobei die Verbindungen zusätzlich mit Hydrochlorid komplexiert sein können.

36. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34 oder 35, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Bupivacain ist.

37. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 34 bis 36, wobei die DNA-Sequenz außerdem ein HIV-rev-Response-Element und eine Deletion der HIV-Integrase umfasst.

38. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 34 bis 37, wobei die DNA-Sequenz außerdem einen HIV-Splice-Acceptor umfasst.

39. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 34 bis 38, wobei das DNA-Molekül außerdem eine DNA-Sequenz umfasst, die HIV-rev kodiert, das mit einem SV40-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung zweckorientiert verknüpft ist.

40. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 39, wobei die DNA-Sequenz, die rev kodiert, zusätzlich HIV-vpu und HIV-env kodiert.

41. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 34 bis 40, die zusätzlich ein zweites Nucleinsäuremolekül umfasst, das ein Cytokin oder ein Lymphokin kodiert.

42. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

43. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 42, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die IL-12 oder GM-CSF kodiert.

44. Pharmazeutische Zusammensetzung, die umfasst:

a) ein DNA-Molekül, das eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Proteine rev, vpu und env kodiert, die zweckorientiert verknüpft sind mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalie-Virus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung; und
b) einen Polynucleotidfunktionsenhancer mit einer der folgenden Formel

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

$R^4\text{-}O\text{-}R^1\text{-}N\text{-}R^7$

wobei:
Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen, Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionenund Substitutionen in substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist,
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
$R^2 + R^3$ ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

45. Pharmazeutische Zusammensetzung, die umfasst:
a) ein DNA-Molekül, das eine DNA-Sequenz umfasst, die die HIV-Proteine rev, vpu und env kodiert, die mit einem Rous-Sarkom-Virus-Enhancer, einem unmittelbaren frühen Zytomegalievirus-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungs-Nebensignal und gegebenenfalls einem SV40-Replikationsursprung zweckorientiert verknüpft sind; und
b) einen Polynucleotidfunktionsenhancer, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Piperocain, Meprylcain, Isobucain, Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain, Chloroprocain, Metabuthamin, Primacain, Parethoxycain, Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain, Prilocain, Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin, Cocain, Cinnamoylcocain, Truxillin oder Cocaethylen ist, wobei die Verbindungen zusätzlich mit Hydrochlorid komplexiert sein können.

46. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 44 oder 45, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Bupivacain ist.

47. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 44 bis 46, die zusätzlich ein zweites Nucleinsäuremolekül umfasst, das ein Cytokin oder ein Lymphokin kodiert.

48. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

49. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die IL-12 oder GM-CSF kodiert.

50. Verwendung eines Polynucleotidfunktionsenhancers und eines Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, dessen Gegenwart ein fehlendes, nicht funktionierendes oder teilweise funktionierendes Protein kompensiert oder eine therapeutische Wirkung auf ein Individuum hervorruft, wobei die Nucleotidsequenz mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen des Individuums exprimiert zu werden, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Behandlung einer [Autoimmun]-Erkrankung, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer eine der folgenden Formeln aufweist:

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

$R^4\text{-}O\text{-}R^1\text{-}N\text{-}R^7$

wobei Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen, Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionen in substituierten Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist,
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

51. Verwendung eines Polynucleotidfunktionsenhancers und eines Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, dessen Gegenwart ein fehlendes, nicht funktionierendes oder teilweise funktionierendes Protein kompensiert oder eine therapeutische Wirkung

auf ein Individuum ausübt, wobei die Nucleotidsequenz mit regulatorischen Sequenzen zweckorientiert verknüpft ist, wobei das Nucleinsäuremolekül von retroviralen Partikeln frei ist und in der Lage ist, in den Zellen des Individuums exprimiert zu werden, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Behandlung einer [Autoimmun]-Erkrankung, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Piperocain, Meprylcain, Isobucain, Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain, Chloroprocain, Metabuthamin, Primacain, Parethoxycain, Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain, Prilocain, Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin, Cocain, Cinnamoylcocain, Truxillin oder Cocaethylen ist, wobei die Verbindungen zusätzlich mit Hydrochlorid komplexiert sein können.

52. Verwendung nach Anspruch 50 oder 51, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Bupivacain ist.

53. Verwendung nach Anspruch 50 oder 51, wobei das Nucleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 50 bis 53, wobei das Nucleinsäuremolekül intramuskulär verabreicht wird.

55. Verwendung nach einem der Ansprüche 50 bis 54, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Enzymen, Strukturproteinen, Cytokinen, Lymphokinen und Wachstumsfaktoren.

56. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

57. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die IL-12 oder GM-CSF kodiert.

58. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend:
i) ein Nucleinsäuremolekül, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus: Proteinen, die mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop eines pathogenen Antigens identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist;
Proteinen, die ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop eines Proteins, das mit der Hyperproliferation von Zellen zusammenhängt, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist; Proteinen, die ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop oder einem Protein, das mit Zellen zusammenhängt, die eine Autoimmunerkrankung charakterisieren, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist, Proteinen, deren Gegenwart ein fehlendes, nicht funktionierendes oder teilweise funktionierendes Protein in einem Individuum kompensiert; und Proteinen, die eine therapeutische Wirkung bei einem Individuum erzeugen;
ii) einen Polynucleotidfunktionsenhancer;
wobei die pharmazeutische Zusammensetzung von retroviralen Partikeln frei ist und wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer eine der folgenden Formeln aufweist:

$Ar\text{-}R^1\text{-}O\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$Ar\text{-}N\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3$

oder

$R^4\text{-}N\text{-}R^5\text{-}R^6$

oder

$R^4\text{-}O\text{-}R^1\text{-}N\text{-}R^7$

wobei:
Ar Benzol, p-Aminobenzol, m-Aminobenzol, o-Aminobenzol, substituiertes Benzol, substituiertes p-Aminobenzol, substituiertes m-Aminobenzol, substituiertes o-Aminobenzol ist, wobei die Aminogruppe in den Aminobenzolverbindungen, Amino, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5-Dialkylamin sein kann und Substitutionen in substituierten

Verbindungen Halogen, C_1-C_5-Alkyl und C_1-C_5-Alkoxy sind;
R^1 C=O ist,
R^2 C_1-C_{10}-Alkyl, einschließlich von verzweigten Alkylresten, ist;
R^3 Wasserstoff, Amin, C_1-C_5-Alkylamin, C_1-C_5, C_1-C_5-Dialkylamin ist;
R^2 + R^3 ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, einen Heterocyclus, einen C_1-C_{10}-Alkyl-substituierten Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, bilden können;
R^4 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist;
R^5 C=NH ist;
R^6 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist; und
R^7 Ar, R^2 oder C_1-C_5-Alkoxy, ein cyclisches Alkyl, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches Alkyl, ein cyclisches aliphatisches Amin, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituiertes cyclisches aliphatisches Amin, ein Heterocyclus, ein C_1-C_{10}-Alkyl-substituierter Heterocyclus und ein C_1-C_{10}-Alkoxy-substituierter Heterocyclus, einschließlich eines C_1-C_{10}-Alkyl-N-substituierten Heterocyclus, ist.

59. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend:
i) ein Nucleinsäuremolekül, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:
Proteinen, die mindestens ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop eines pathogenen Antigens identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist;
Proteinen, die ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop eines Proteins, das mit der Hyperproliferation von Zellen zusammenhängt, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist; Proteinen, die ein Epitop umfassen, das zu einem Epitop oder einem Protein, das mit Zellen zusammenhängt, die eine Autoimmunkrankheit charakterisieren, identisch oder im Wesentlichen ähnlich ist; Proteinen, deren Gegenwart ein fehlendes, nicht funktionierendes oder teilweise funktionierendes Protein in einem Individuum kompensiert; und Proteinen, die eine therapeutische Wirkung bei einem Individuum hervorrufen; und
ii) einen Polynucleotidfunktionsenhancer;
wobei die pharmazeutische Zusammensetzung von retroviralen Partikeln frei ist und wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Piperocain, Meprylcain, Isobucain, Procain, Tetracain, Butethamin, Propoxycain, Chloroprocain, Metabuthamin, Primacain, Parethoxycain, Lidocain, Etidocain, Mepivacain, Bupivacain, Pyrrocain, Prilocain, Dibucain, Benzocain, Dyclonin, Pramoxin, Proparacain, Butacain, Benoxinat, Carbocain, Methylbupivacain, Butasinpicrat, Phenacain, Diothan, Luccain, Intracain, Nupercain, Metabutoxycain, Piridocain, Biphenamin, Cocain, Cinnamoylcocain, Truxillin oder Cocaethylen ist, wobei die Verbindungen zusätzlich mit Hydrochlorid komplexiert sein können.

60. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 58 oder 59, wobei der Polynucleotidfunktionsenhancer Bupivacain ist.

61. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 58 bis 60, die zusätzlich ein zweites Nucleinsäuremolekül umfasst, das ein Cytokin oder ein Lymphokin kodiert.

62. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 61, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die α-Interferon, γ-Interferon, den platelet derived Wachstumsfaktor (PDGF), GC-SF, GM-CSF, TNF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 oder IL-12 kodiert.

63. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 61, wobei das zweite Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz umfasst, die IL-12 oder GM-CSF kodiert.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

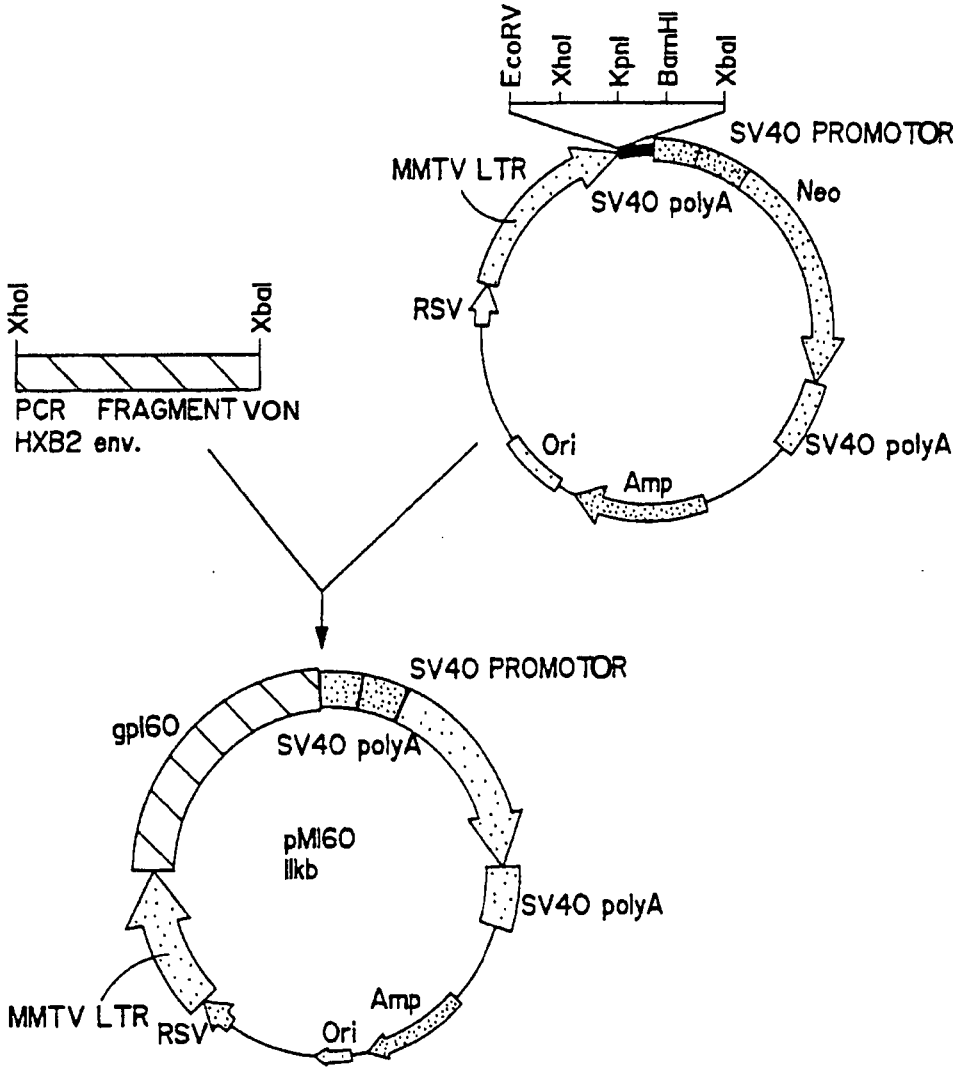


FIG. IA

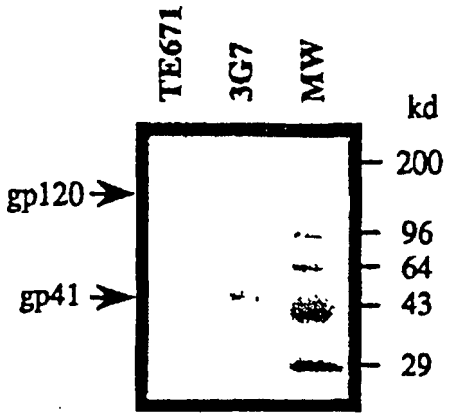


FIG. 1B

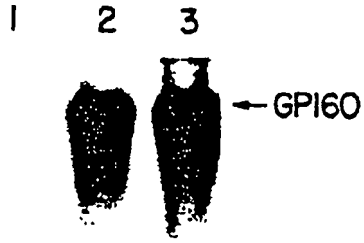


FIG. 2

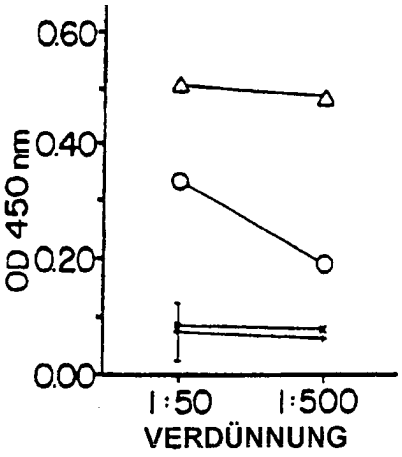


FIG. 3A

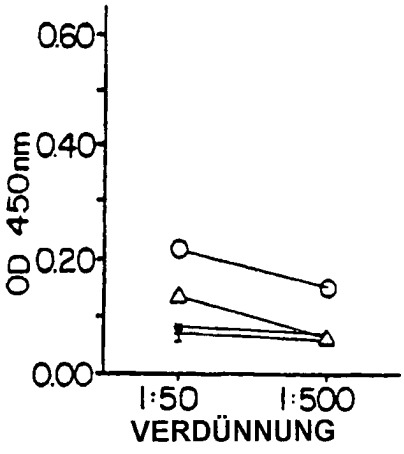


FIG. 3B

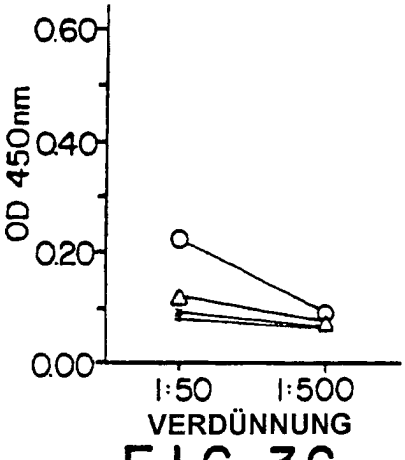


FIG. 3C

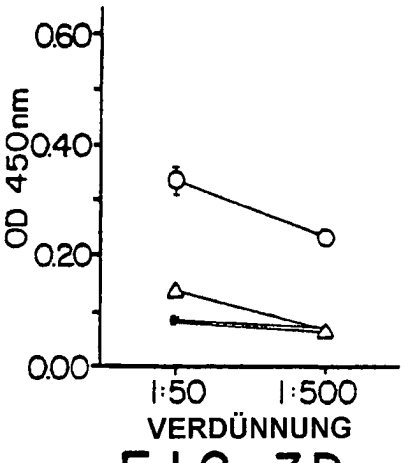


FIG. 3D

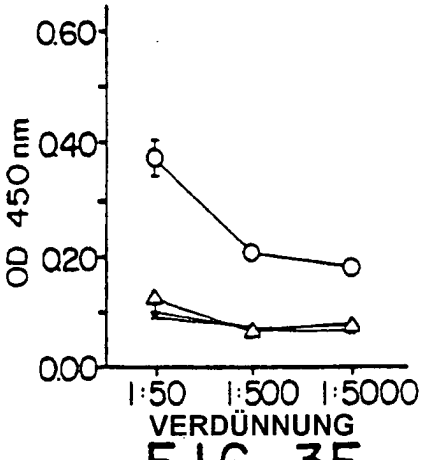


FIG. 3E



FIG. 4A

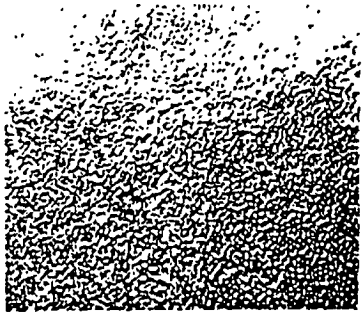


FIG. 4B

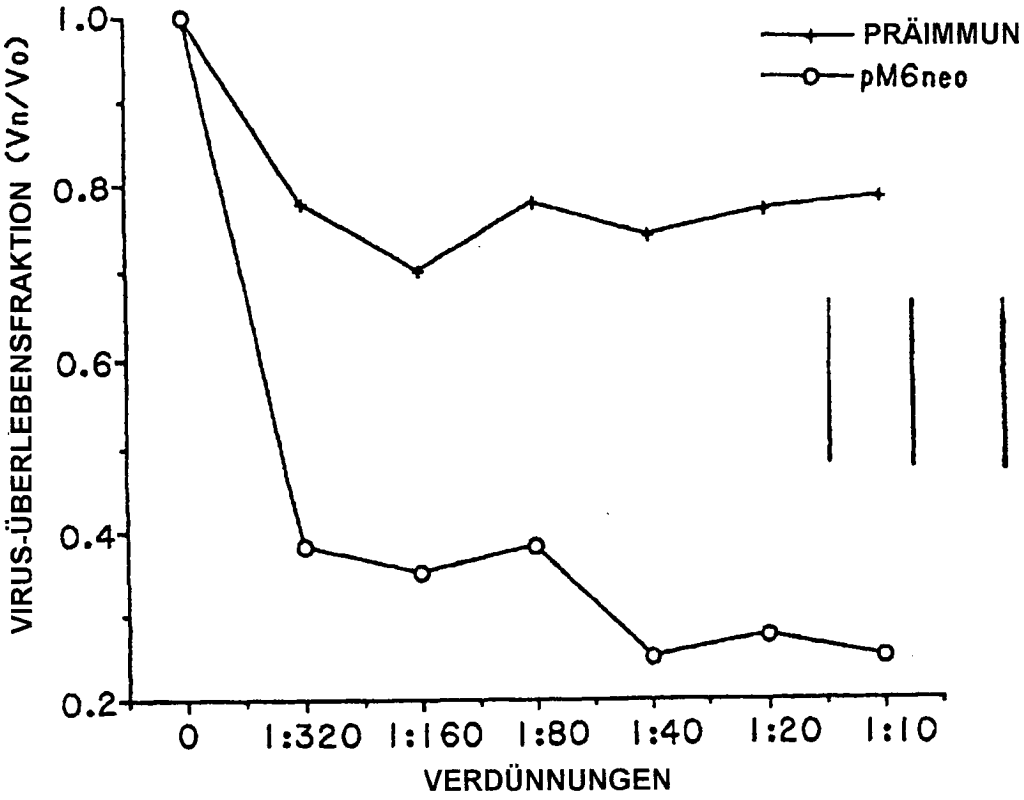


FIG. 4C



FIG. 4D



FIG. 4E

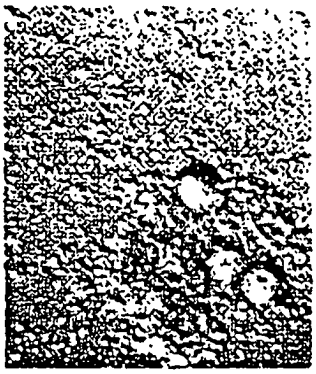


FIG. 4F

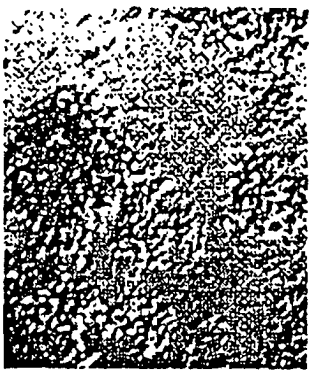


FIG. 4G

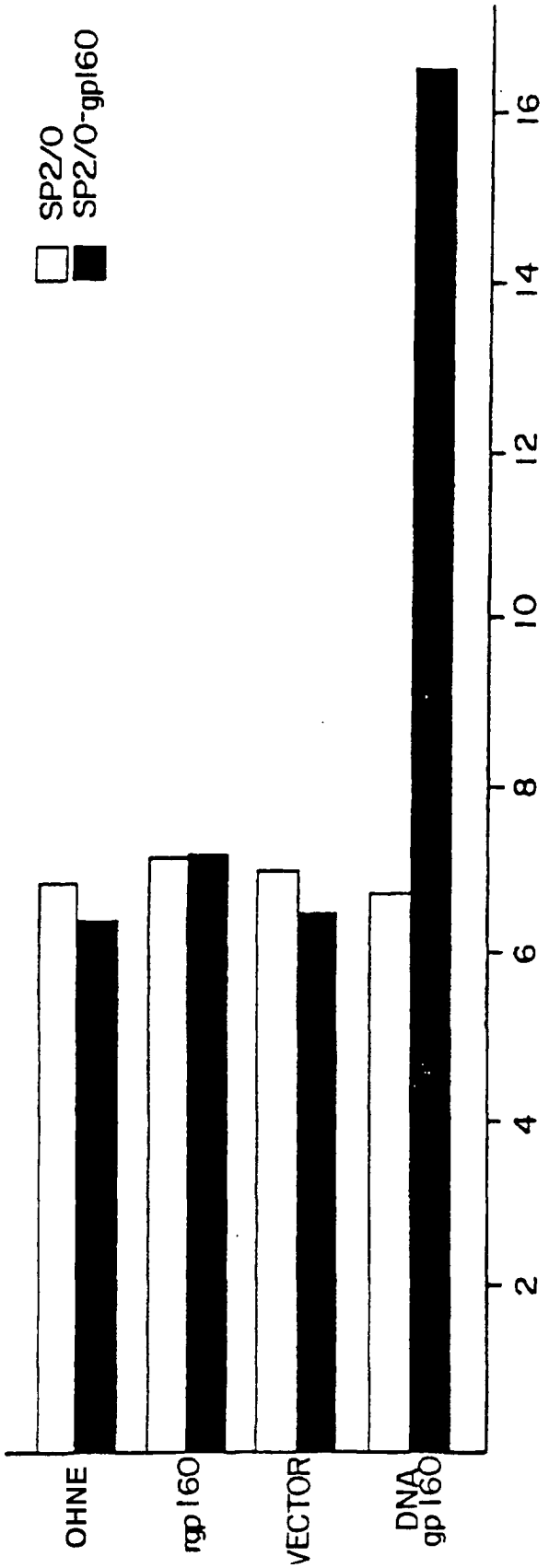

SP2/0
SP2/0-gp160
2
4
6
8
10
12
14
16
(WOCHEN)
OHNE
rgp 160
VECTOR
DNA gp 160

FIG. 5

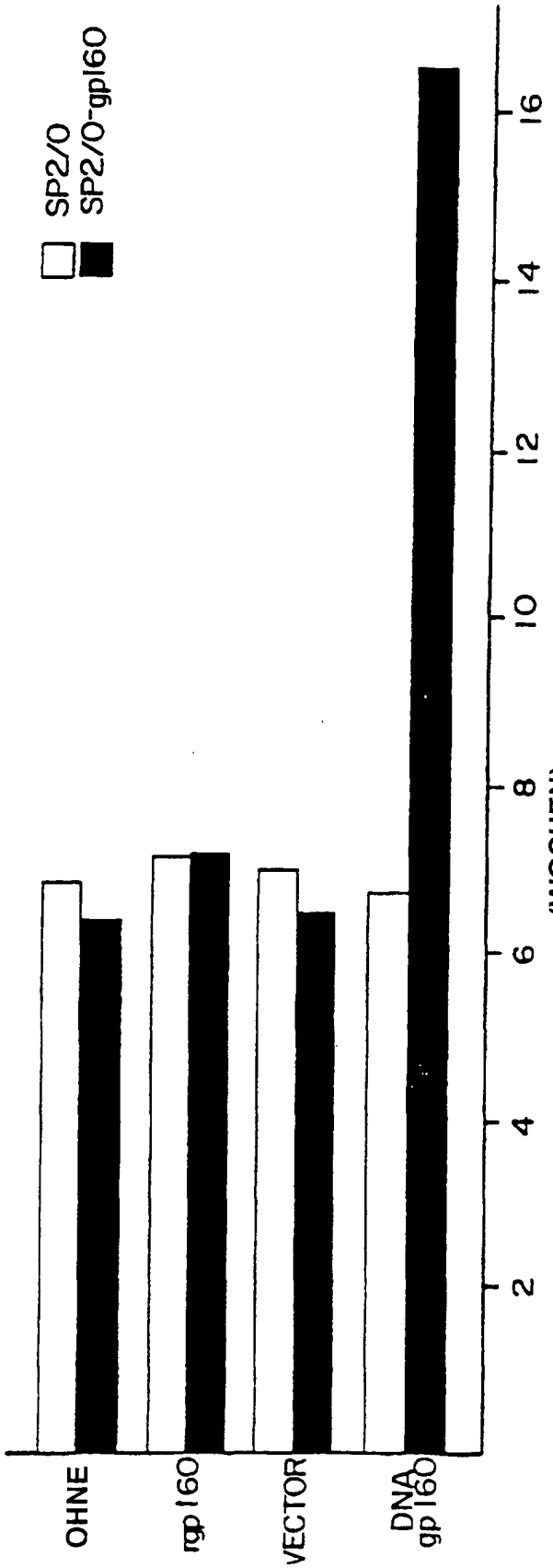

SP2/0
SP2/0-gp160
2
4
6
8
10
12
14
16
(WOCHEN)
OHNE
gp 160
VECTOR
DNA gp 160

FIG. 5

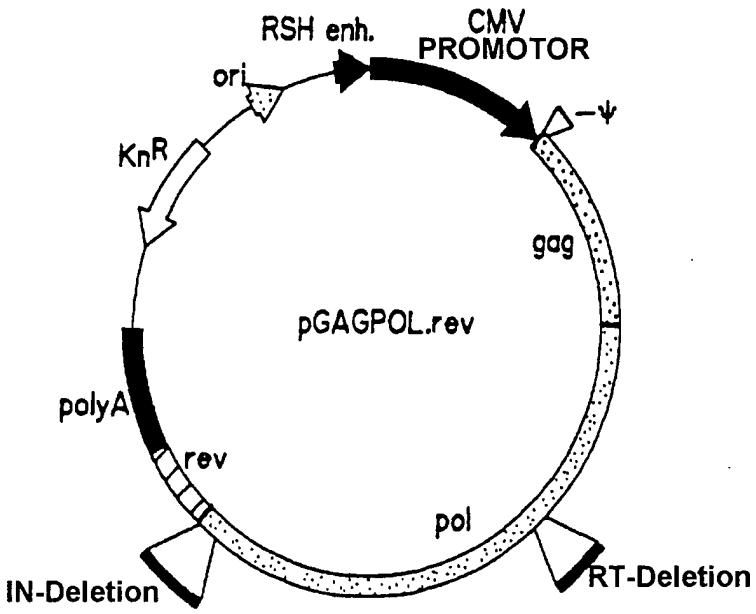

RSH enh.
CMV
PROMOTOR
ori
-ψ
KnR
gag
pGAGPOL.rev
polyA
rev
pol
IN-Deletion
RT-Deletion

FIG. 6

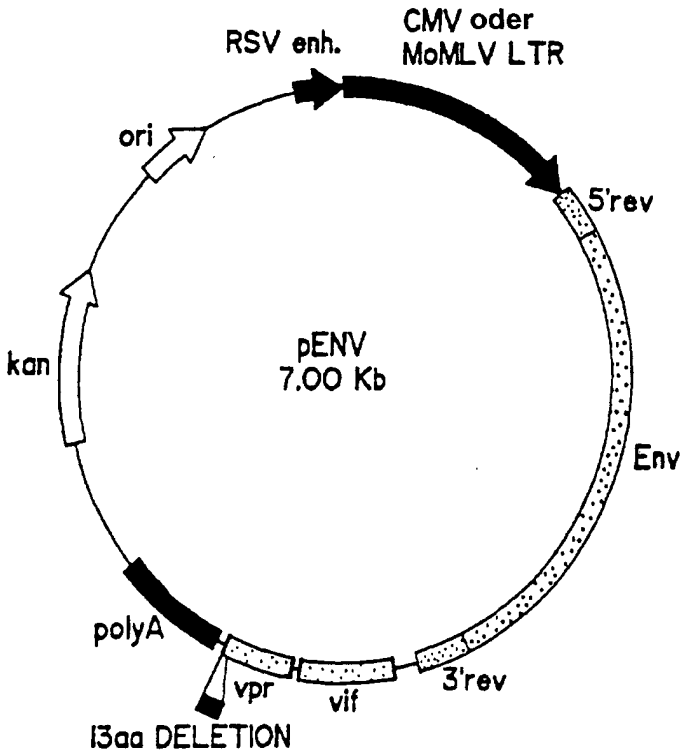

RSV enh.
CMV oder
MoMLV LTR
ori
5'rev
pENV
7.00 Kb
kan
Env
polyA
vpr
vif
3'rev
13aa DELETION

FIG. 7

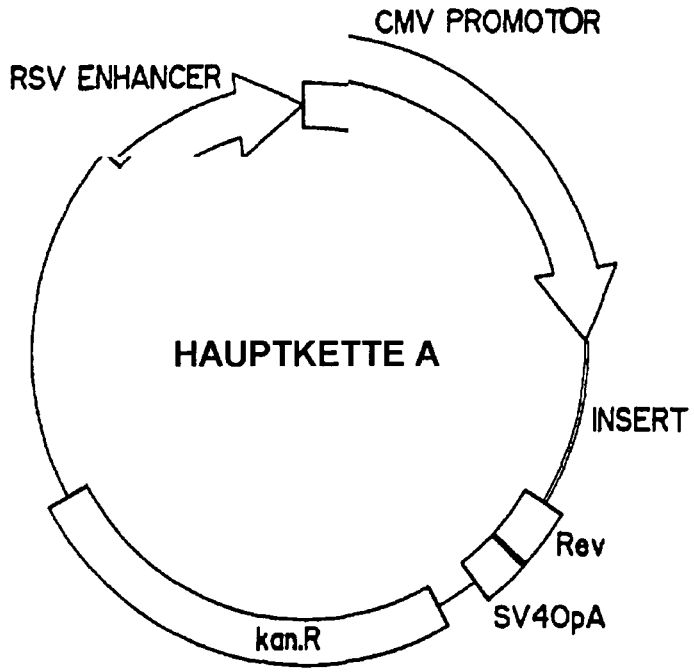

CMV PROMOTOR
RSV ENHANCER
HAUPTKETTE A
INSERT
Rev
SV40pA
kan.R

FIG. 8A

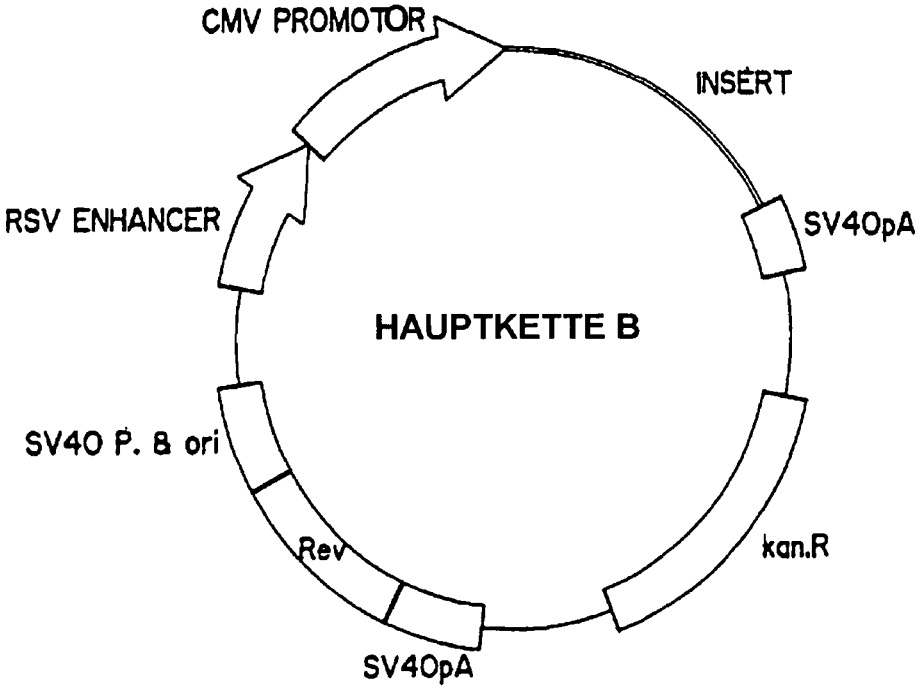

CMV PROMOTOR
INSERT
RSV ENHANCER
SV40pA
HAUPTKETTE B
SV40 P. & ori
Rev
kan.R
SV40pA

FIG. 8B

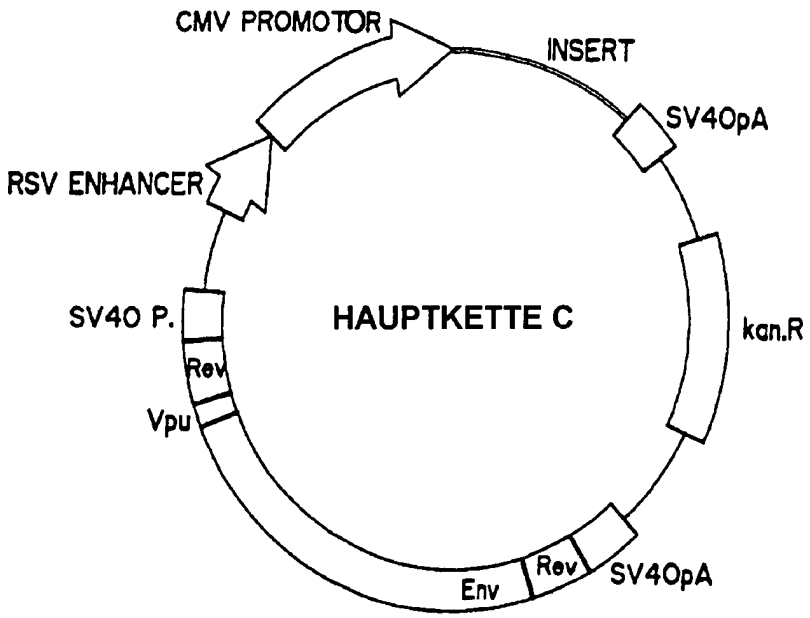

CMV PROMOTOR
INSERT
SV40pA
RSV ENHANCER
SV40 P.
HAUPTKETTE C
kan.R
Rev
Vpu
Env
Rev
SV40pA

FIG. 8C

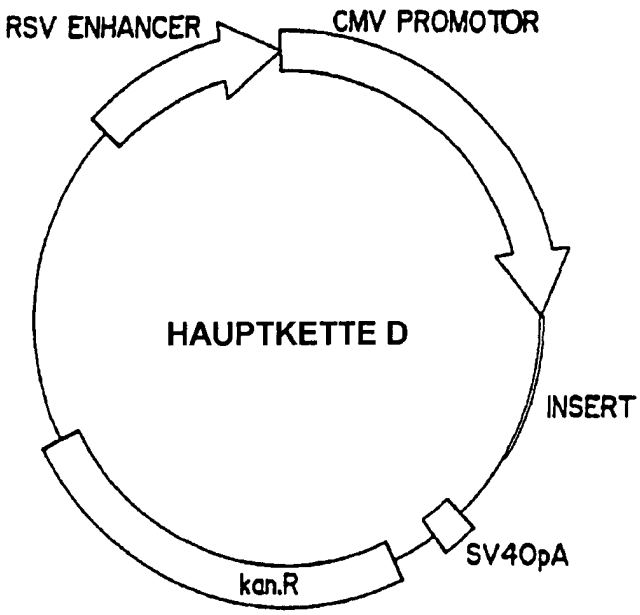

RSV ENHANCER
CMV PROMOTOR
HAUPTKETTE D
INSERT
SV40pA
kan.R

FIG. 8D

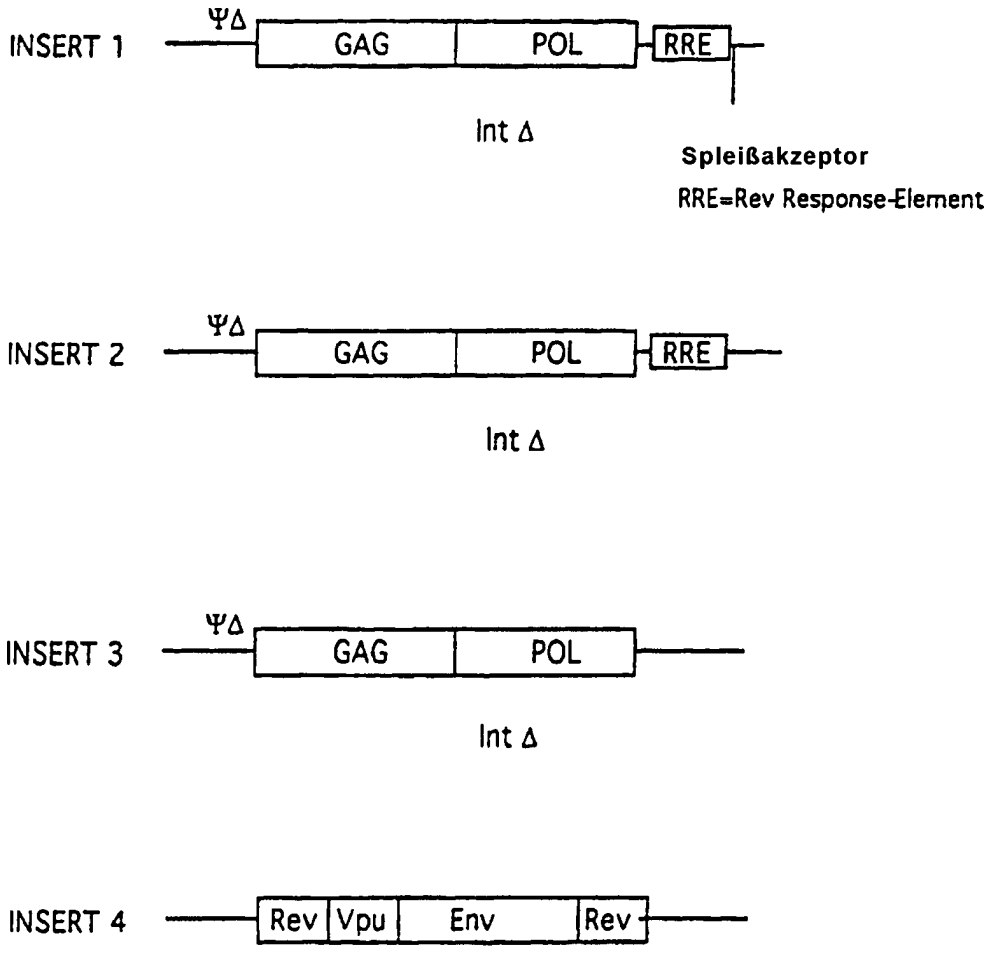

INSERT 1
ΨΔ
GAG
POL
RRE
Int Δ
Spleißakzeptor
RRE=Rev Response-Element
INSERT 2
ΨΔ
GAG
POL
RRE
Int Δ
INSERT 3
ΨΔ
GAG
POL
Int Δ
INSERT 4
Rev
Vpu
Env
Rev

FIG. 9