



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 31 646 T2 2005.12.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 928 190 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 31 646.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB97/02478

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 919 142.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/010750

(86) PCT-Anmeldetag: 11.09.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 19.03.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.07.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 17.11.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 01.12.2005

(51) Int Cl.⁷: A61K 9/16

A61K 9/14, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:

9619002 11.09.1996 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

PowderJect Research Ltd., Oxford, GB

(72) Erfinder:

BURKOTH, Lee, Terry, Palo Alto, US; MUDDLE, Gordon, Andrew, Cambs. CB6 1AN, GB; PORTER, Maree, Linda, The Gap, AU

(74) Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München

(54) Bezeichnung: VERABREICHUNG VON NUKLEINSÄUREPARTIKELN

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

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

Beschreibung**Fachgebiet**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein DNA-Transfermethoden. Genauer gesagt betrifft die Erfindung den in vivo- und ex vivo-Transfer von pulverisierten Nukleinsäure-Molekülen in Säugergewebe unter Anwendung nadelloser Injektionstechniken.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Gentherapie und DNA-Immunisation stellen vielversprechende Ansätze für die Behandlung und Verhütung sowohl erworbener als auch vererbter Krankheiten dar. Diese Techniken ermöglichen den Transfer eines gewünschten Gens in ein Lebewesen und dessen anschließende in vivo-Expression. Der Gentransfer kann durch Transfizieren der Zellen oder Gewebe des Lebewesens ex vivo und Wiedereinführen des transformierten Materials in den Wirt erreicht werden. Alternativ können die Gene direkt an den Empfänger verabreicht werden.

[0003] Eine Reihe von Methoden wurde in diesem Zusammenhang für den Gentransfer entwickelt. Zum Beispiel wurden auf Viren basierende Systeme unter Verwendung von z. B. Retrovirus-, Adenovirus- und Adeno-assoziierten viralen Vektoren für den Gentransfer entwickelt. Allerdings bergen diese Systeme das Risiko des Transfers von Replikations-kompetenten Viren. Folglich sind nicht-virale Methoden für den direkten Transfer von Genen in Empfängerzellen oder -gewebe wünschenswert.

[0004] Nicht-virale Methoden des Gentransfers beruhen oftmals auf Mechanismen, die von Säugerzellen für die Aufnahme und den intrazellulären Transfer von Makromolekülen angewendet werden. Zum Beispiel wurden Rezeptor-vermittelte Methoden des Gentransfers entwickelt. Die Technik nutzt Komplexe zwischen Plasmid-DNA und Polypeptid-Liganden aus, die durch Zelloberflächenrezeptoren erkannt werden können. Allerdings legt das Datenmaterial nahe, dass diese Methode lediglich eine vorübergehende Expression der Gene ermöglichen und daher nur begrenzte Anwendung finden kann.

[0005] Außerdem wurden Mikroinjektionstechniken für die direkte Injektion des genetischen Materials in die Zellen entwickelt. Die Technik ist jedoch mühsam und erfordert Einzelzell-Manipulationen. Daher ist die Methode zur Anwendung im großen Maßstab nicht geeignet.

[0006] Die direkte Injektion von DNA-enthaltenden Lösungen in das Interstitium zur anschließenden Aufnahme durch die Zellen ist ebenfalls beschrieben worden. Zum Beispiel ist in der Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 90/11092, veröffentlicht am 4. Oktober 1990, der Transfer von isolierten Polynukleotiden in das Zellinnere beschrieben, wobei die isolierten Polynukleotide in das Interstitium des Gewebes transferiert und dann durch einzelne Zellen aufgenommen werden, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen. Diese Methoden erfordern die Injektion der DNA-enthaltenden Lösungen in das Gewebe unter Verwendung herkömmlicher Nadeln oder Kanülen und sind daher für Langzeitherapien oder für den Bereich der Heimanwendungen nicht gut geeignet.

[0007] Biolistische Partikeltransfersysteme (Partikel-Bombardement-Systeme) wurden ebenfalls für den Gentransfer in Pflanzenzellen entwickelt. Diese Techniken wenden eine "Genkanone" zur Einführung DNA-be-schichteter Mikropartikel, wie etwa DNA-beschichteter Metalle, in die Zellen bei hohen Geschwindigkeiten an. Die beschichteten Metalle werden generell mithilfe des Explosionsdrucks eines Inertgases wie Helium in die Zellen getrieben. Siehe z. B. US-Patent Nr. 5 100 792 an Sanford et al. Die Technik ermöglicht den direkten, intrazellulären Transfer geringer Mengen an DNA.

[0008] Generell sind Wolfram- oder Goldpartikel-Mikroprojektil erforderlich, um eine adäquate Gentransferfrequenz mittels solcher direkten Injektionstechniken zu erzielen. Insbesondere wurden diese Materialien auf der Basis ihrer Verfügbarkeit in definierten Partikelgrößen um 1 µm im Durchmesser, als auch mit einer ausreichend hohen Dichte ausgewählt, um die zur Zellwanddurchdringung erforderliche Wucht zu erzielen. Außerdem sind die verwendeten Metalle chemisch inert, um die Wahrscheinlichkeit einer explosiven Oxidation der Mikroprojektil-Feinpulver zu vermindern, und außerdem nicht-reaktiv mit DNA und anderen Komponenten der Fällungsgemische und zeigen eine geringe Toxizität für die Zielzellen. Siehe z. B. Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N., Hrg., Oxford University Press, New York, NY, Seiten 10–11.

[0009] Es liegt jedoch der Nachweis vor, dass die Wolfram-Toxizität die Gewinnung stabiler Transformanten

vermindern kann. Außerdem sind diese biolistischen Techniken zur Anwendung mit großen DNA-Molekülen nicht geeignet, da die Präzipitation solcher Moleküle auf die Metallträger zu instabilen Konfigurationen führen kann, die den Scherkräften beim Genkanonen-Transfer nicht standhalten können. Weiterhin werden die Metallträger durch Gewebe und/oder Zellen rückgehalten und können eine Farbveränderung bewirken, ebenso wie eine Reihe anderer unerwünschter biologischer Wirkungen, insbesondere im Falle des Direkttransfers an innere Gewebe oder der direkten Behandlung der Zellen unter Anwendung von ex vivo-Techniken. Daher ist die Verwendung einer Genkanone zur Beförderung von DNA-beschichteten Metallpartikeln für die wiederholte Therapie wahrscheinlich problematisch, insbesondere bei Säugern.

[0010] WO 94/23738 befasst sich mit Mikropartikeln, die zur kontrollierten Freisetzung einer Nukleinsäure in eine Zielzelle geeignet sind. Die Mikropartikel setzen sich aus einer Anzahl von Komponenten zusammen, einschließlich einer Nukleinsäure, einem Material, welches die Aufnahme oder den Transfer zum Kern der Nukleinsäure oder die Expression der Nukleinsäure fördert, und einer spezifischen biokompatiblen bioabbaubaren polymeren Matrix. Das Material, welches die Aufnahme, den Transfer oder die Expression fördert, kann ein Glykoprotein oder Lipoprotein sein. Die polymere Matrix kapselt die Nukleinsäure ein.

[0011] Dementsprechend besteht nach wie vor Bedarf nach der Bereitstellung einer hochgradig wirksamen Methode zur Einführung therapeutisch relevanter DNA oder anderer Nukleinsäuremoleküle in Säugergewebezellen, wobei mit der Methode die bei den bisherigen Gentransfertechniken häufig anzutreffenden Probleme vermieden werden.

Beschreibung der Erfindung

[0012] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Nukleinsäure-Moleküls und eines Kohlenhydrats als alleinigem Träger für die Herstellung eines Medikaments in Form von Partikeln zur Anwendung in der Therapie durch nadellose Verabreichung an Haut- oder Schleimhautgewebe bereitgestellt, wobei

- das Nukleinsäure-Molekül eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein Immunogen codiert,
- Kontrollsequenzen, die zum Bewirken der Expression der Nukleotidsequenz fähig sind, funktionsfähig daran geknüpft sind, und
- die Partikel eine Größe im Bereich von 10 bis 150 µm und eine Dichte im Bereich von 0,8 bis 3,0 g/cm³ aufweisen.

[0013] Die Erfindung stellt außerdem eine nadellose Spritze bereit, die als eine zu transferierende Wirkkomponente die oben definierten Partikel umfasst.

[0014] Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Entdeckung, dass feste Partikel von Nukleinsäure-Molekülen mit einem nominalen mittleren Durchmesser von mindestens etwa 10 µm, die daher größer als die durchschnittliche Säuerzelle sind, in die Zellen von Säugergewebe für einen hochgradig effizienten Gentransfer befördert werden können. Das Ergebnis ist unerwartet, da hiervor davon ausgegangen wurde, dass lediglich kleine DNA-beschichtete Metallpartikel mit einer wesentlich kleineren Größe als typische Säuerzellen in adäquater Weise als Mikroprojektile bei biolistischen Gentransfertechniken verwendet werden könnten. Siehe z. B. Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994), Yang, N., Hrg., Oxford, University Press, New York, NY, Seiten 10–11.

[0015] Bei der Ausführung der Erfindung werden pulverisierte Nukleinsäure-Moleküle unter Anwendung nadelloser Injektionstechniken verabreicht. Insbesondere wurde vor kurzem ein neuartiges Transfersystem, das eine nadellose Spritze zum Schießen fester Partikel von therapeutischen Mitteln in kontrollierten Dosen in und durch die intakte Haut verwendet, in der demselben Antragsteller erteilten Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 94/24263, veröffentlicht am 27. Oktober 1994, beschrieben. Die Veröffentlichung beschreibt eine nadellose Spritze, mit der in einem Ultraschall-Gasstrom eingefangene pharmazeutische Partikel verabreicht werden. Die nadellose Spritze kann für den transdermalen Transfer von pulverisierten Wirkstoffverbindungen und Zusammensetzungen, zum Transfer von genetischem Material in lebende Zellen (z. B. Gentherapie) und für die Verabreichung von Biopharmazeutika an Haut, Muskel, Blut oder Lymphe verwendet werden. Die nadellose Spritze kann auch in Verbindung mit operativen Verfahren zum Transfer von Wirkstoffen und biologischen Substanzen an Organoberflächen, feste Tumoren und/oder an Operationshohlräume (z. B. Tumorbetten oder Höhlen nach der Tumorresektion) verwendet werden.

[0016] Demgemäß werden bei einer Ausführungsform feste Partikel, die sich aus Nukleinsäure-Molekülen zusammensetzen, an Säugergewebe für die genetische Transformation der Zellen im Gewebe mit den verabreichten Nukleinsäuren befördert. Bei einer wesentlichen Abweichung von herkömmlichen Partikel-Bombarde-

ment-Techniken werden die Nukleinsäurepartikel, die unter Anwendung der Methode der vorliegenden Erfindung übertragen werden, nicht mittels dichter Metallträger befördert. Weiterhin weisen die Moleküle eine Partikelgröße auf, die gleich oder größer als die mittlere Größe einer Säugerzelle ist.

[0017] Genauer gesagt werden verdichtete Partikel, die sich aus ausgewählten Nukleinsäure-Molekülen und einem Kohlenhydrat-Träger zusammensetzen, zur Verabreichung an Säugergewebe über eine nadellose Spritze präpariert, die zum Beschleunigen der Partikel auf Ultraschall-Transfersgeschwindigkeiten von zwischen Mach 1 und Mach 8 in der Lage sind. Die Partikel weisen eine mittlere Größe auf, die mindestens etwa 10 µm beträgt, wobei eine optimale Partikelgröße gewöhnlich mindestens etwa 10 bis 15 µm ausmacht (gleich oder größer als die Größe einer typischen Säugerzelle). Allerdings können Nukleinsäurepartikel mit einer mittleren Partikelgröße von bis zu 50 µm ebenfalls unter Anwendung der vorliegenden Erfindung verabreicht werden. Die Tiefe, mit der die transferierten Partikel in das angezielte Gewebe eindringen werden, hängt von der Partikelgröße ab (z. B. dem nominalen Partikeldurchmesser, ausgehend von einer annähernd kugelförmigen Partikelgeometrie), der Partikeldichte, der Anfangsgeschwindigkeit, mit der der Partikel auf die Gewebefläche auftrifft, und der Dichte und kinematischen Viskosität des Gewebes. Diesbezüglich liegen die optimalen individuellen Partikeldichten (z. B. im Gegensatz zur Pulvermassendichte) zur Verwendung bei der nadellosen Injektion im Bereich von etwa 0,8 bis 3,0 g/cm³, und liegen die Injektionsgeschwindigkeiten generell im Bereich von etwa 200 bis 3.000 m/sec.

[0018] Die Erfindung kann in vivo durchgeführt werden, um einen gezielten Transfer der Nukleinsäurepartikel sicherzustellen, wie etwa durch Verabreichung an die Epidermis (für gentherapeutische Anwendungen) oder an die Basalschicht der Haut (für Anwendungen zur Nukleinsäure-Immunisation). Bei diesen Aspekten werden die Partikel-Eigenschaften und/oder Gerätebetriebsparameter so gewählt, dass ein gewebespezifischer Transfer gewährleistet ist. Ein spezieller Ansatz erfordert die Auswahl der Partikelgröße, Partikeldichte und Anfangsgeschwindigkeit, um eine Impulsdichte (z. B. Partikelwucht, geteilt durch Vorderfläche der Partikel) von etwa 2 bis 10 kg/sec/m, und bevorzugter etwa 4 bis 7 kg/sec/m, zu erzielen. Solch eine Kontrolle über die Impulsdichte ermöglicht einen präzise kontrollierten, gewebeselektiven Transfer der Nukleinsäurepartikel.

[0019] Bei anderen Aspekten wird die nadellose Spritze zum Transfizieren von Zellen oder Geweben ex vivo mit den partikulären Nukleinsäure-Molekülen verwendet, wobei die transformierten Zellen anschließend wieder in den Wirt eingeführt werden.

[0020] Diese und weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden für Fachleute des Gebiets im Lichte der hierin wiedergegebenen Beschreibung ohne weiteres erkennbar werden.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0021] [Fig. 1](#) stellt eine bildhafte Darstellung eines ex vivo-Transferapparates mit einer nadellosen Spritze dar, der über einer Gewebekulturplatte in Position gebracht ist, die mit den hierin beschriebenen partikulären Nukleinsäure-Präparaten zu transformierende Zellen enthält.

[0022] [Fig. 2](#) zeigt ein Histogramm, das die Transformationsleistungen darstellt, die unter Verwendung des Apparates der [Fig. 1](#) zum Transfer der DNA-Partikeln bei einem Druck von 30 Bar über eine Zieldistanz von 60 mm erhalten wurden, wie im Beispiel beschrieben.

[0023] [Fig. 3](#) zeigt ein Schaubild, das die Transformationsleistungen zeigt, die unter Verwendung des Apparates aus [Fig. 1](#) zum Transfer von DNA-Partikeln bei einem Druck von 30 Bar über einen Bereich von Zieldistanzen erhalten wurden, wie ebenfalls im Beispiel beschrieben.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0024] Die Durchführung der vorliegenden Erfindung wendet, sofern nicht anders angegeben, herkömmliche Methoden der Molekularbiologie und rekombinante DNA-Techniken innerhalb der Fachkenntnisse des Gebiets an. Diese Techniken sind in der Literatur umfassend erläutert. Siehe z. B. Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Auflage, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, Band I & II (D. Glover, Hrg.); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning.

[0025] Es sollte zur Kenntnis genommen werden, dass, wie in dieser Beschreibung und den anhängenden Ansprüchen verwendet, die Singularformen "ein/eine" und "der/die/das" die Pluralentsprechungen umfassen, sofern nicht der Inhalt eindeutig anderes vorgibt. So umfasst beispielsweise die Bezugnahme auf "ein Nukle-

"insäure-Molekül" ein Gemisch von zwei oder mehreren Nukleinsäure-Molekülen, der Bezug auf "einen Arzneimittelträger" Gemische von zwei oder mehreren Arzneimittelträgern, usw.

A. Definitionen

[0026] Sofern nicht anders definiert, besitzen alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Bezeichnungen dieselbe Bedeutung wie von einem Fachmann des Gebiets, zu dem die Erfindung gehört, bei üblicher Sachkenntnis herkömmlicherweise verstanden. Die folgenden Begriffe sollen so definiert sein, wie nachstehend angegeben.

[0027] "Gentransfer" bezieht sich auf Methoden oder Systeme zur zuverlässigen Einführung von Fremd-DNA in Wirtszellen. Diese Methoden können zur Expression nicht-integrierter transferierter DNA, extrachromosomalen Replikation und Expression der transferierten Replicons (z. B. Episome) oder Integration des transferierten genetischen Materials in die genomische DNA der Wirtszellen führen.

[0028] Die Nukleotidsequenzen sind generell in einem geeigneten Nukleinsäure-Molekül vorhanden und werden in Form von Vektoren transferiert. Mit "Vektor" ist jegliches genetische Element gemeint, wie etwa ein Plasmid, Phage, Transposon, Cosmid, Chromosom, Virus, Virion, etc., welches zur Replikation in der Lage ist, wenn mit den geeigneten Kontrollementen assoziiert, und welches Gensequenzen zwischen Zellen übertragen kann.

[0029] Eine "Nukleotidsequenz" oder ein "Nukleinsäure-Molekül" bezieht sich auf DNA- und RNA-Sequenzen. Der Begriff umfasst Moleküle, die jegliche der bekannten Basen-Analoga von DNA und RNA enthalten, wie zum Beispiel, doch nicht beschränkt auf 4-Acetylcytosin, 8-Hydroxy-N6-methyladenosin, Aziridinylcytosin, Pseudoisocytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methyladenin, 1-Methylpseudouracil, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Methyladenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarbonylmethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-Oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, Oxybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiacytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, N-Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiacytosin und 2,6-Diaminopurin.

[0030] Eine "Codierungssequenz" oder eine Sequenz, die ein bestimmtes Polypeptid "codiert", ist eine Nukleinsäuresequenz, welche transkribiert (im Falle von DNA) und translatiert (im Falle von mRNA) in ein Polypeptid in vitro oder in vivo wird, wenn unter die Kontrolle geeigneter regulatorischer Sequenzen gestellt. Die Begrenzungen der Codierungssequenz sind herkömmlicherweise bestimmt durch ein Startcodon am 5'-(Amino)-Terminus und ein Translations-Stoppcodon am 3'-(Carboxy)-Terminus. Eine Codierungssequenz kann enthalten, ohne darauf beschränkt zu sein, cDNA von prokaryontischer oder eukaryontischer mRNA, genomische DNA-Sequenzen von prokaryontischer oder eukaryontischer DNA, und sogar synthetische DNA-Sequenzen. Eine Transkriptionsterminationssequenz wird gewöhnlich 3' zur Codierungssequenz lokalisiert sein.

[0031] Der Begriff DNA-„Kontrollsequenzen“ bezieht sich kollektiv auf Promotorsequenzen, Polyadenylie rungssignale, Transkriptionsterminationssequenzen, Upstreamregulatorische Domänen, Replikationsursprünge, interne Ribosomen-Zugangsstellen ("IRES"), Enhancers und ähnliches, die gemeinsam für die Replikation, Transkription und Translation einer Codierungssequenz in einer Empfängerzelle sorgen. Nicht alle dieser Kontrollsequenzen brauchen immer vorhanden zu sein, solange das ausgewählte Gen zum Replizieren, Transkribieren und Translatieren in eine geeignete Empfängerzelle fähig ist.

[0032] "Funktionsfähig verknüpft" bezieht sich auf eine Anordnung von Elementen, worin die so beschriebenen Komponenten derart angeordnet sind, dass sie ihre übliche Funktion erfüllen. Daher sind funktionsfähig an eine Codierungssequenz geknüpfte Kontrollsequenzen zum Bewirken der Expression der Codierungssequenz fähig. Die Kontrollsequenzen brauchen nicht an die Codierungssequenz anzugrenzen, solange sie auf die Steuerung ihrer Expression hinwirken. Daher können zum Beispiel dazwischenliegende untranslatierte, jedoch transkribierte Sequenzen zwischen einer Promotorsequenz und der Codierungssequenz vorhanden sein, und dabei die Promotorsequenz nach wie vor als "funktionsfähig geknüpft" an die Codierungssequenz gelten.

[0033] Mit "isoliert" ist bei Bezugnahme auf eine Nukleotidsequenz oder ein Nukleinsäure-Molekül, das die Nukleotidsequenz enthält, gemeint, dass das angegebene Molekül im wesentlichen in Abwesenheit anderer

biologischer Makromoleküle desselben Typs vorhanden ist. Daher bezieht sich ein "isoliertes Nukleinsäure-Molekül, welches ein bestimmtes Polypeptid codiert" auf ein Nukleinsäure-Molekül, welches im wesentlichen frei von anderen Nukleinsäure-Molekülen ist, die das betreffende Polypeptid nicht codieren; das Molekül kann jedoch einige zusätzliche Basen oder Komponenten enthalten, die die Grundeigenschaften der Zusammensetzungen nicht nachteilig beeinflussen.

[0034] Der Begriff "Transfektion" wird bezugnehmend auf die Aufnahme von Fremd-DNA durch eine Wirtszelle verwendet, wobei eine Wirtszelle als Folge ihrer Transfektion "transformiert" wurde. Die Fremd-DNA kann in chromosomal DNA integriert (kovalent geknüpft) sein, die das Genom der Zelle ausmacht, oder auch nicht. Mit "Wirtszelle" oder "Wirts-Sägerzelle" ist eine Zelle gemeint, die transfiziert wurde oder transfizierbar ist, durch ein Nukleinsäure-Molekül, das eine Nukleotidsequenz von Interesse enthält. Der Begriff umfasst die Nachkommen der Stammzelle unabhängig davon, ob der Nachkomme zum ursprünglichen Elter hinsichtlich der Morphologie oder genetischen Zusammensetzung identisch ist oder nicht, solange die Nukleotidsequenz von Interesse innerhalb der Zelle vorhanden ist.

[0035] Der Begriff "transdermaler" Transfer umfasst sowohl die transdermale (oder "perkutane") als auch transmukosale Verabreichung, d. h. den Transfer durch Befördern eines Wirkstoffs oder Pharmazeutikums durch das Haut- oder Schleimhautgewebe. Siehe z. B. Transdermal Drug Delivery: Development Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (Hrg.), Marcel Dekker, Inc. (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (Hrg.), Marcel Dekker Inc. (1987); und Transdermal Delivery of Drugs, Bände 1–3, Kydonieus and Berner (Hrsg.), CRC Press, (1987). Die Aspekte der Erfindung, die hierin im Zusammenhang mit dem "transdermalen" Transfer beschrieben sind, sollen, sofern nicht anders spezifiziert, sowohl auf den transdermalen als auch transmukosalen Transfer zutreffen. Das heißt, dass die Zusammensetzungen, Systeme und Methoden der Erfindung so verstanden werden sollten, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, dass sie gleichermaßen auf transdermale und transmukosale Transferformen zutreffen.

[0036] Die obigen Nukleinsäure-Moleküle werden typischerweise alleine oder in Kombination mit Wirkstoffen oder anderen Therapeutika, als bestimmte Zusammensetzungen zubereitet, die ein Kohlenhydrat als dem alleinigen Träger (Exzipient) enthalten. "Träger" sind normalerweise im wesentlichen inerte Materialien, die nicht-toxisch sind und nicht mit anderen Komponenten der Zusammensetzung in einer abträglichen Weise wechselwirken. Diese Materialien können zur Erhöhung der Menge an Feststoffen in partikulären pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, wie etwa solchen, die unter Anwendung von Sprühtrocknungs- oder Lyophilisationstechniken hergestellt werden, wie weiter unten beschrieben. Das alleinige Trägermaterial im vorliegenden Falle ist ein Kohlenhydrat. Zu Beispielen zählen pharmazeutische Qualitäten von Dextrose, Sucrose, Lactose, Trehalose, Mannitol, Sorbitol, Inositol, Dextran, Stärke und Cellulose. Ebenfalls vorhanden können Zusatzmittel sein, die als Stabilisatoren dienen, welche allgemein verfügbare Kryoprotektanzien und Antioxidanzien umfassen.

B. Ausführungsformen der Erfindung

[0037] Bevor die vorliegende Erfindung nun ausführlich beschrieben wird, sollte verstanden sein, dass diese Erfindung nicht auf bestimmte Formulierungen oder Prozessparameter beschränkt ist, da diese natürlich variieren können. Es sollte ebenfalls verstanden sein, dass die hierin verwendete Terminologie lediglich dem Zwecke der Beschreibung bestimmter Ausführungsformen der Erfindung dient und nicht als Beschränkung zu sehen ist.

[0038] Obschon eine Reihe von Methoden und Materialien ähnlich oder gleichwertig den hierin beschriebenen bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden hierin die bevorzugten Materialien und Methoden beschrieben.

[0039] Wie oben erläutert, erlaubt die vorliegende Erfindung den hochgradig effizienten Transfer fester Partikel von Nukleinsäure-Molekülen mit einem nominalen mittleren Durchmesser von mindestens etwa 10 µm zu Säugergeweben und -zellen. Die Methode wendet biolistische Gentransfer-Techniken an, gestattet jedoch den Transfer der Nukleinsäure-Moleküle, ohne dass metallische Träger erforderlich wären.

[0040] Ein breite Vielfalt von Nukleinsäure-Molekülen kann unter Anwendung der Methoden der Erfindung transferiert werden. Allgemein enthalten die Moleküle Codierungsregionen mit geeigneten Kontrollsequenzen oder andere therapeutisch relevante Nukleotidsequenzen. Die Nukleinsäure-Moleküle werden in Form von Vektoren vorbereitet, welche die erforderlichen Elemente zum Steuern der Transkription und Translation in einer Wirtszelle enthalten. Ist eine Expression unter Ausnutzung der Enzyme des Wirts (zum Beispiel durch Nut-

zung der endogenen RNA-Polymerase) erwünscht, so wird das Gen oder die Gene in den Vektoren in funktionsfähiger Knüpfung an Kontrollsequenzen vorhanden sein, die durch den jeweiligen Wirt, oder sogar durch bestimmte Zellen innerhalb des Wirts, erkannt werden. So werden eukaryontische und Phagen-Kontrollelemente zur Expression in Säugerwirten vorhanden sein. Solche Sequenzen sind im Fachgebiet bekannt und werden nachstehend umfassender erläutert.

[0041] Geeignete Nukleotidsequenzen zur Verwendung bei den Transfermethoden der vorliegenden Erfindung umfassen jegliche therapeutisch relevanten Nukleotidsequenzen, die für ein Immunogen codieren. Die Erfindung wird daher zum Transfer einer Nukleotidsequenz eingesetzt, die zur Schaffung einer Immunität fähig ist, zum Beispiel eine immunogene Sequenz, die zur Hervorrufung einer humoralen und/oder zellulären Reaktion in einem Lebewesen dient.

[0042] Für Nukleinsäure-Immuniationen können Antigen-codierende Expressionsvektoren einem Lebewesen zum Zwecke der Hervorrufung humoraler und/oder zellulärer Immunreaktionen auf Antigene verabreicht werden, die durch den Vektor codiert sind. Insbesondere wurden humorale, zytotoxische zelluläre und protektive Immunreaktionen beschrieben, die durch direkte intramuskuläre Injektion von Antigen-codierenden DNAs ausgelöst wurden. Tang et al. (1992) Nature 358: 152; Davis et al. (1993) Hum. Molec. Genet. 2: 1847; Ulmer, et al. (1993) Science 258: 1745; Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156; Eisenbraun et al., (1993) DNA Cell Biol. 12: 791; Fynan et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 12476; Fuller et al. (1994) AIDS Res. Human Retrovir. 10: 1433; und Raz et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9519.

[0043] Die Ausführungsformen der Erfindung sind nachstehend ausführlicher beschrieben.

Isolierung von Genen und Konstruktion der Vektoren

[0044] Die zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung ausgewählten Nukleotidsequenzen können von bekannten Quellen hergeleitet sein, indem diese zum Beispiel aus Zellen, die ein gewünschtes Gen oder Nukleotidsequenz enthalten, unter Anwendung standardmäßiger Techniken isoliert werden. Entsprechend können die Nukleotidsequenzen unter Anwendung standardmäßiger Formen der Polynukleotidsynthese, die im Fachgebiet wohlbekannt sind, synthetisch erzeugt werden. Siehe z. B. Edge et al. (1981) Nature 292: 756; Nambair et al., (1984) Science 223: 1299; Jay et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311. Allgemein können synthetische Oligonukleotide entweder mittels der Phosphotriestermethode hergestellt werden, wie beschrieben bei Edge et al. (supra) und Duckworth et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 1691, der Phosphoramiditmethode, wie beschrieben von Beaucage et al. (1981) Tet. Letts. 22: 1859, und Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103: 3185. Synthetische Oligonukleotide können auch unter Verwendung kommerziell verfügbarer Oligonukleotid-Syntheseautomaten hergestellt werden. Die Nukleotidsequenzen können mit geeigneten Codonen für eine bestimmte Aminosäuresequenz designt werden. Im allgemeinen werden bevorzugte Codone für die Expression im angestrebten Wirt ausgewählt. Die vollständige Sequenz wird aus überlappenden Oligonukleotiden zusammengesetzt, die mittels standardmäßiger Methoden hergestellt wurden, und zu einer vollständigen Codierungssequenz zusammengefügt. Siehe z. B. Edge et al. (supra); Nambair et al. (supra) und Jay et al. (supra).

[0045] Eine besonders bequeme Methode zum Erhalt der Nukleinsäuresequenzen zur Verwendung hierin ist die mittels rekombinanter Methoden. So kann eine gewünschte Nukleotidsequenz aus einem Plasmid, das diese trägt, unter Verwendung standardmäßiger Restriktionsenzyme und Verfahrensweisen ausgeschnitten werden. Die ortsspezifische DNA-Spaltung wird durch Behandlung mit dem geeigneten Restriktionsenzym (oder Enzymen) unter Bedingungen vorgenommen, die allgemein im Fachgebiet verstanden sind, wobei die Einzelheiten dazu von den Herstellern handelsüblicher Restriktionsenzyme spezifiziert sind. Sofern erwünscht, kann eine Größenauf trennung der gespaltenen Fragmente mittels Polyacrylamidgel- oder Agarosegel-Elektrophorese unter Anwendung standardmäßiger Techniken durchgeführt werden.

[0046] Restriktions-gespaltete Fragmente können durch Behandeln mit dem großen Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I (Klenow) in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) unter Anwendung standardmäßiger Techniken behandelt werden. Das Klenow-Fragment füllt am 5'-Ende einzelsträngige Überhänge auf, doch verdaut überstehende 3'-Einzelstränge, obschon die vier dNTPs vorhanden sind. Sofern erwünscht, kann eine selektive Reparatur durch Bereitstellen lediglich eines, oder mehrerer ausgewählter dNTPs innerhalb der Begrenzungen, die von der Natur des Überhangs vorgegeben sind, vorgenommen werden. Nach der Klenow-Behandlung kann das Gemisch mit z. B. Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt werden. Die Behandlung unter geeigneten Bedingungen mit S1-Nuklease oder BAL-31 führt zur Hydrolyse jeglichen einzelsträngigen Abschnitts.

[0047] Wurden die Codierungssequenzen für die gewünschten Proteine einmal hergestellt oder isoliert, so können diese Sequenzen in einen beliebigen geeigneten Vektor oder Replicon kloniert werden. Zahlreiche Kloniervektoren sind den Fachleuten des Gebiets bekannt, und die Auswahl eines geeigneten Kloniervektors ist eine Sache der Wahl.

[0048] Ligationen an andere Sequenzen werden unter Anwendung standardmäßiger Verfahrensweisen, wie sie im Fachgebiet bekannt sind, vorgenommen.

[0049] Ausgewählte Nukleotidsequenzen können unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen platziert werden, wie etwa einem Promotor, Ribosomenbindungsstelle und wahlweise einem Operator (kollektiv hierin als "Kontroll"-Elemente bezeichnet), so dass die Sequenz, die das gewünschte Protein codiert, im Wirtsgewebe, das durch einen Vektor transformiert ist, der dieses Expressionskonstrukt enthält, in RNA transkribiert wird. Die Codierungssequenz kann ein Signalpeptid oder eine Leader-Sequenz enthalten oder auch nicht.

[0050] Die Wahl der Kontrollelemente hängt von dem zu transformierenden Wirt und der Art der angewendeten Präparierung ab. Wird daher die endogene Transkriptions- und Translationsmaschinerie des Wirts zum Expressieren der Proteine verwendet, so werden mit dem jeweiligen Wirt kompatible Kontrollelemente genutzt. Diesbezüglich sind verschiedene Promotoren zur Anwendung in Säugersystemen im Fachgebiet bekannt und umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Promotoren, die von SV40, CMV, HSV, RSV, MMTV, T7, T3 und anderen abgeleitet sind. Dementsprechend sind für prokaryontische Enzyme nützliche Promotoren bekannt und umfassen die tac-, spa-, trp-, trp-lac-, λ-p_L-, T7-, phoA-Promotoren ebenso wie weitere.

[0051] Zusätzlich zu den Kontrollsequenzen mag es erwünscht sein, regulatorische Sequenzen zu addieren, was die Regulation der Expression von Proteinsequenzen ermöglicht, die durch die verabreichten Nukleotidsequenzen codiert sind. Regulatorische Sequenzen sind den Fachleuten des Gebiets bekannt, wobei zu Beispielen jene zählen, die das Anregen oder Abstellen der Expression einer Codierungssequenz als Reaktion auf einen chemischen oder physikalischen Reiz, einschließlich des Vorhandenseins einer regulatorischen Verbindung, bewirken. Andere Arten von regulatorischen Elementen können ebenfalls im Vektor vorhanden sein, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen.

[0052] Ein Expressionsvektor wird so konstruiert, dass die bestimmte Codierungssequenz im Vektor mit den geeigneten Kontroll- und wahlweise regulatorischen Sequenzen so lokalisiert ist, dass die Positionierung und Orientierung der Codierungssequenz bezüglich der Kontrollsequenzen die Transkription der Codierungssequenz unter der "Kontrolle" der Kontrollsequenzen (d. h. RNA-Polymerase, welche an das DNA-Molekül an den Kontrollsequenzen bindet, transkribiert die Codierungssequenz) erlaubt. Die Modifikation der Sequenzen, die das bestimmte Protein von Interesse codieren, können zur Erfüllung dieses Zwecks erwünscht sein. Zum Beispiel mag es in einigen Fällen erforderlich sein, die Sequenz so zu modifizieren, dass sie an die Kontrollsequenzen in der geeigneten Orientierung gebunden ist; d. h. damit das Leseraster aufrechterhalten bleibt. Die Kontrollsequenzen und anderen regulatorischen Sequenzen können an die Codierungssequenz vor der Insertion in einen Vektor ligiert werden. Alternativ kann die Codierungssequenz direkt in einen Expressionsvektor kloniert werden, welcher die Kontrollsequenzen und eine geeignete Restriktionsstelle bereits enthält.

Präparierung der partikulären Nukleinsäure-Moleküle

[0053] Einmal erhalten und/oder konstruiert, werden die Nukleinsäure-Moleküle zum Transfer in partikulärer Form zubereitet. Eine herkömmliche Methode zur Zubereitung partikulärer Biopharmazeutika, wie etwa Nukleinsäuren, ist die Lyophilisation (Gefriertrocknung). Die Lyophilisation betrifft eine Technik zur Beseitigung der Feuchtigkeit aus einem Material, welche das schnelle Gefrieren bei einer sehr niedrigen Temperatur einbezieht, gefolgt von schnellem Dehydrieren durch Sublimation in einem Hochvakuum. Diese Technik ergibt typischerweise poröse Partikel von geringer Dichte mit einer offenen Matrixstruktur. Solche Partikel sind chemisch stabil, lassen sich aber schnell rekonstituieren (zersetzen und/oder in Lösung bringen), wenn sie in eine wässrige Umgebung eingebracht werden.

[0054] Eine andere Methode zur Bereitstellung partikulärer Nukleinsäure-Präparate, die mit diesen oder anderen delikaten oder wärmeempfindlichen Biomolekülen angewendet werden kann, ist die Sprühtrocknung. Sprühtrocknen bezieht sich auf das Atomisieren einer Lösung aus ein oder mehreren Feststoffen unter Verwendung einer Düse, einer Zentrifugalscheibe oder eines anderen Elements, gefolgt von Verdampfen des Lösungsmittels aus den Tröpfchen. Genauer gesagt umfasst das Sprühtrocknen das Kombinieren eines hochdispersen Flüssigpräparats (z. B. einer Lösung, Aufschämmung, Emulsion oder ähnlichem) mit einem geeigneten Volumen an Heißluft, um eine Verdampfung und Trocknung der Flüssigkeitströpfchen zu bewirken. Sprüh-

getrocknete Pharmazeutika sind generell als homogene kugelförmige Partikel charakterisiert, die häufig hohl sind. Solche Partikel weisen eine geringe Dichte auf und zeigen eine schnelle Löslichkeitsrate.

[0055] Die partikulären Feststoffe einer geringen Dichte, wie durch Lyophilisations- und Sprühtrocknungs-techniken erzeugt, sind zur Wiederauflösung für die parenterale Verabreichung in Lösung über eine Spritze oder Katheter ideal. Allerdings sind diese Partikel nicht zur Verabreichung durch eine nadellose Spritze in einer festen Form nützlich. Entsprechend werden die Präparate für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verdichtet, um Nukleinsäure-Moleküle umfassende Partikel bereitzustellen, die sich zur Verabreichung mittels einer nadellosen Spritze wesentlich besser eignen (im wesentlichen feste Partikel weisen z. B. eine Größe von etwa 50 µm und eine Dichte von mindestens etwa 0,9 bis 1,5 g/cc³ auf). Insbesondere können die durch die Sprühtrocknung oder Lyophilisation erhaltenen Partikel mit offenem Gitter oder hohler Schale ohne Erhitzung oder Scherung kondensiert werden, um dichte Partikel zu erhalten, die zu pharmazeutischen Partikeln mit Größen- und Dichte-Eigenschaften, die zur Verabreichung durch nadellose Injektion geeignet sind, gemahlen oder anderweitig größenreduziert werden können.

[0056] Die Nukleinsäuren zur Verabreichung gemäß der Erfindung werden anfänglich in einer Formulierung zubereitet, die zum Sprühtrocknen oder Lyophilisieren geeignet ist. Solche Formulierungen erfordern allgemein lediglich eine Lösung, in der die Nukleinsäuren für das Gefrieren und Lyophilisieren stabil sind, und einen Kohlenhydrat-Träger (Exzipienten) für das Trocknungsverfahren, der für die parenterale Verabreichung geeignet ist. Hierzu können geeignete Kohlenhydrat-Exzipienten den Formulierungen zugesetzt werden, um eine ausreichende Masse für eine Einzeldosis zu erhalten, wobei die Messung der Dosen mittels praktischer Verfahren, wie z. B. nach Gewicht oder Volumen, erfolgt. Typische Dosierungen können etwa 0,5 bis 5 mg, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 2 mg, betragen. Geeignete Exzipienten umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Trehalose, Glucose, Dextrose, Sucrose und Mannitol. Aminosäuren wie Glycerin und sein Hydrochloridsalz können als Puffer verwendet werden, ebenso wie Phosphat-, Lactat- oder Citratpuffer, u. a.. Außerdem wird jegliche bekannte Zusammensetzung zur DNA-Stabilisierung bei den vorliegenden Formulierungen Anwendung finden. Die Zusammensetzungen können wahlweise Zusatzmittel wie Kryoprotektanzien, Antioxidanzien oder ähnliches umfassen. Einstellende Zusammensetzungen zur Erhöhung der physikalischen und chemischen Stabilität der verschiedenen, hierin bereitgestellten partikulären Nukleinsäure-Formulierungen gehören zum Standardwissen des Fachgebiets.

[0057] Ein spezieller Ansatz für die Stabilisierung während der Reprozessierung der Nukleinsäure-Formulierungen betrifft die Verwendung von Zusatzstoffen, die mit der Lösung vor dem Gefrieren für die Lyophilisation kombiniert werden, um das Verdrillen oder Zusammenballen der Nukleinsäuren zu bewirken und so das genetische Material als einer diskontinuierlichen Phase in den ansonsten mikroskopisch homogenen Partikeln bereitzustellen. Bei solchen Formulierungen wäre der Massebilder die kontinuierliche Phase im getrockneten Feststoff, so dass jegliche Vermahlung vor der Kompaktierung, Druckverdichtung oder nochmaligen Mahlung (wie nachstehend ausführlich beschrieben) und jegliche Partikelzerreibung während der Klassierung durch ein Sieb oder die Luftklassierung, Beschleunigung und Injektion, mit geringerer Wahrscheinlichkeit die langkettingen Nukleinsäuren zerstören würde. Die Homogenität der Partikel bezüglich des Nukleinsäuregehalts ist aufgrund des Potentials für die Auf trennung nach Größe während der Lagerung oder Injektion entscheidend.

[0058] Die Kondensation der sprühgetrockneten oder lyophilisierten Pulver wird durch Kompaktieren in einer geeigneten Presse (z. B. einer hydraulischen Presse, Tabletterepresse oder Rotationspresse) vorgenommen, worin die Pulver bei etwa 1000 bis 24.000 pounds/inch² (z. B. 0,5 bis 12 tons/inch² oder 7 bis 170 MPa) über einen geeigneten Zeitraum hinweg komprimiert werden. Die Verdichtung kann unter Vakuum vorgenommen werden, sofern erwünscht. Das resultierende verdichtete Material wird dann nochmals grob gemahlen, bis es sichtbar aufgebrochen ist. Die Partikelgröße wird dann auf eine mittlere Größe von etwa 20 bis 50 µm bei einer individuellen Partikeldichte von rund 0,9 bis 1,5 g/cm³ reduziert. Die Partikelgrößenreduktion kann unter Anwendung von im Fachgebiet wohlbekannten Methoden vorgenommen werden, einschließlich, doch nicht beschränkt auf Walzenmahlung, Kugelmahlung, Hammer- oder Impaktmahlung, Reibmahlung, Siebung, Be schallung oder Kombinationen davon. Die Kompressionsparameter und Partikelklassierung wird natürlich in Abhängigkeit vom verwendeten Ausgangsmaterial, der gewünschten Zielpartikelgröße und -dichte und ähnlichen Überlegungen variieren. Die Partikeldichte lässt sich ohne weiteres unter Anwendung bekannter Quantifizierungstechniken wie der Heliumpyknometrie und ähnlichem bestimmen.

[0059] Daher kann die Methode zum Erhalt von Nukleinsäurepartikeln mit einer Größe im Bereich von 10 bis 150 µm, und am bevorzugtesten 20 bis 60 µm, und einer Partikeldichte im Bereich von 0,8 bis 3,0 g/cm³, und bevorzugt 0,9 bis 1,5 g/cm³, angewendet werden.

Verabreichung der Nukleinsäure-Moleküle

[0060] Im Anschluss an die Herstellung werden die partikulären Nukleinsäure-Präparate in das Säugergewebe unter Verwendung einer nadellosen Spritze transferiert. Eine nadellose Spritze zur Verwendung hierin ist allgemein beschrieben in der demselben Antragsteller erteilten Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 94/24263, veröffentlicht am 27. Oktober 1994. Die Spritze umfasst eine längliche röhrenförmige Düse mit einer aufbrechbaren Membran (oder Membranen), die ursprünglich den Durchgang durch die Düse versperrt und im wesentlichen angrenzend an das stromaufwärts gelegene Ende der Düse angeordnet ist. Die zu befördernden Nukleinsäurepartikel sind angrenzend an die aufbrechbare Membran untergebracht und werden unter Anwendung einer Kraftimpuls-verleihenden Methode transferiert, welche einen gasförmigen Druck auf die stromaufwärts gelegene Seite der Membran ausübt, der ausreicht, um die Membran zu zerreißen und einen Ultraschall-Gasstrom (der die pharmazeutischen Partikel enthält) durch die Düse zum Transfer von ihrem stromabwärts gelegenen Ende zu erzeugen. Die Partikel können auf diese Weise aus der nadellosen Spritze bei Transfersgeschwindigkeiten von zwischen Mach 1 und Mach 8 befördert werden, die auf das Zerbersten der aufbrechbaren Membran hin ohne weiteres erreicht werden.

[0061] Eine andere nadellose Spritzenkonfiguration enthält allgemein dieselben Elemente wie zuvor beschrieben, außer, dass anstelle des Eingeschlussseins der pharmazeutischen Partikel innerhalb eines Ultraschall-Gasstroms das stromabwärts gelegene Ende der Düse mit einem bistabilen Diaphragma versehen ist, welches zwischen einer ruhenden "invertierten" Position (bei der das Diaphragma eine Konkavität an der stromabwärts gelegenen Seite aufweist, die die Nukleinsäurepartikel enthält) und einer aktiven "evertierten" Position (bei der das Diaphragma auswärts konvex zur stromabwärts gelegenen Fläche ist als Folge einer Ultraschall-Schockwelle, die an der stromaufwärts gelegenen Seite des Diaphragmas aufgetroffen ist) bewegbar ist. In dieser Weise werden die in der Konkavität des Diaphragmas enthaltenen Partikel bei einer Ultraschall-Ausgangsgeschwindigkeit aus dem Element zum transdermalen Transfer an eine Zielhaut- oder Schleimhautfläche herausgeschleudert.

[0062] Der transdermale Transfer unter Verwendung der oben beschriebenen nadellosen Spritzenkonfigurationen wird mit Partikeln einer geeigneten Größe vorgenommen, die generell im Bereich von 10 bis 150 µm liegt. Die optimale Partikelgröße beträgt gewöhnlich mindestens etwa 10 bis 15 µm (die Größe einer typischen Zelle). Nukleinsäurepartikel von größer als etwa 250 µm können ebenfalls aus dem Gerät abgegeben werden, wobei die Obergrenze bei dem Punkt liegt, bei dem die Größe der Partikel eine unerwünschte Beschädigung der Haut bewirken würde. Die tatsächliche Distanz, bei der die transferierten Partikel eindringen werden, hängt von der Partikelgröße (z. B. dem nominalen Partikeldurchmesser, ausgehend von einer nahezu kugelförmigen Partikelgeometrie), der Partikeldichte, der Ausgangsgeschwindigkeit, bei der die Partikel auf die Hautoberfläche auftreffen, und der Dichte und kinematischen Viskosität der Haut ab. Diesbezüglich liegen die Partikeldichten zur Anwendung in der nadellosen Injektion im Bereich von 0,8 bis 3,0 g/cm³, vorzugsweise von 0,9 bis 1,5 g/cm³, und die Injektionsgeschwindigkeiten liegen im Bereich von 200 bis 3.000 m/sek.

[0063] Ein besonders einzigartiges Merkmal der nadellosen Spritze besteht in ihrer Fähigkeit, die Eindringtiefe der transferierten Partikel stark zu kontrollieren, wodurch eine gezielte Verabreichung der Nukleinsäuren an verschiedene Stellen ermöglicht wird. Zum Beispiel können die Partikeleigenschaften und/oder Elementbedienungsparameter so gewählt werden, dass Eindringtiefen von weniger als etwa 1 mm für den intradermalen Transfer oder etwa 1 bis 2 mm für den subkutanen Transfer erzielt werden. Ein Ansatz betrifft die Auswahl der Partikelgröße, Partikeldichte und Ausgangsgeschwindigkeit, um eine Impulsdichte (z. B. Partikelwucht, geteilt durch Vorderfläche der Partikel) von etwa 2 bis 10 kg/sek/m, und bevorzugter etwa 4 bis 7 kg/sek/m, zu erreichen. Diese Kontrolle über die Impulsdichte ermöglicht einen präzise kontrollierten, gewebeselektiven Transfer der partikulären Nukleinsäuren.

[0064] Die Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Menge der hierin beschriebenen pulverisierten Nukleinsäure-Moleküle enthalten, können jedem geeigneten Säugergewebe über die oben beschriebenen nadellosen Spritzen verabreicht werden. Zum Beispiel können die Zusammensetzungen an Muskel, Haut, Hirn, Lunge, Leber, Milz, Knochenmark, Thymus, Herz, Lymphe, Blut, Knorpel, Pankreas, Niere, Gallenblase, Magen, Darm, Hoden, Eierstöcke, Uterus, Rektum, Nervensystem, Auge, Drüse und Bindegewebe verabreicht werden. Die Nukleinsäure-Moleküle werden vorzugsweise verabreicht an, und exprimiert in, terminal differenzierte Zellen; allerdings können die Moleküle auch an nicht-differenzierte, oder partiell differenzierte Zellen wie Stammzellen des Blutes und Hautfibroblasten verabreicht werden.

[0065] Die pulverisierten Zusammensetzungen werden dem zu behandelnden Lebewesen in einer Weise verabreicht, die mit der Dosierungsformulierung kompatibel ist, und in einer Menge, die prophylaktisch und/oder

therapeutisch wirksam sein wird. Die Menge der zu verabreichenden Zusammensetzung, die generell im Bereich von 0,5 µg/kg bis 100 µg/kg an Nukleinsäure-Molekülen pro Dosis liegt, hängt vom zu behandelnden Lebewesen ab. Die exakt erforderliche Menge wird in Abhängigkeit vom Alter und Allgemeinzustand des zu behandelnden Individuums, dem Schweregrad des zu behandelnden Zustandes und der jeweils ausgewählten Nukleotidsequenz oder -sequenzen, der Verabreichungsstelle als auch weiteren Faktoren variieren. Eine geeignete wirksame Menge kann durch einen Fachmann des Gebiets ohne weiteres bestimmt werden.

[0066] So wird eine "therapeutisch wirksame Menge" der vorliegenden pulverisierten Nukleinsäuremolekül-Zusammensetzungen ausreichend sein, um eine Verhütung der Krankheit oder Krankheitssymptome zu bewirken, und wird in einen relativ breiten Bereich fallen, der durch routinemäßiges Experimentieren bestimmt werden kann.

C. Experimenteller Teil

[0067] Nachstehend sind Bezugsbeispiele angegeben, die lediglich veranschaulichenden Zwecken dienen sollen und den Umfang der vorliegenden Erfindung in keiner Weise einschränken sollen.

[0068] Es wurden Anstrengungen unternommen, um die Exaktheit bezüglich der angelegten Zahlen (z. B. Mengen, Temperaturen etc.) zu gewährleisten, doch sollte natürlich ein gewisser experimenteller Fehler- und Abweichungsfaktor zugestanden werden.

Bezugsbeispiel 1

[0069] Das folgende Experiment wurde zur Untersuchung der Möglichkeit vorgenommen, gefriergetrocknete DNA als Alternative zu DNA-beschichteten Metallpartikeln beim biolistischen Transfer von genetischem Material zu verwenden. Genauer gesagt wurden pulverisierte DNA-Plasmide als auch DNA-beschichtete Wolfram-partikel als Kontrollen ex vivo zu männlichen humanen Fibroblasten-HT1080-Zellen unter Verwendung eines nadellosen Spritzenapparates wie folgt transferiert.

[0070] Klon 123 ist ein kleines Plasmid von ~11 kb, welches das β-Galactosidase-Markergen enthält, so dass eine transiente Transformation mit dem chromogenen Indikator X-Gal gemessen werden kann. Die Plasmide wurden mit einem Kohlenhydrat-Exzipienten, nämlich Trehalose, verdichtet. Trehalose wurde als dem Exzipienten aufgrund seiner stabilisierenden Eigenschaften ausgewählt (Colaco et al. (1992) Bio/Technology 10: 1009). Die Trehalose wurde in destilliertem Wasser gelöst und filtersterilisiert, bevor die DNA der Lösung zugegeben wurde. Drei verschiedene Lösungen des DNA-Zuckers wurden mit den nachstehend in Tabelle 1 gezeigten Anteilen hergestellt.

Tabelle 1

Präparat	1	2	3
Klon 123 (2,7 µg/µl)	800 µg (296,3 µl)	160 µg (59,3 µl)	80 µg (29,6 µl)
Trehalose (100 mg/15 ml H ₂ O)	10 mg (1,5 ml)	10 mg (1,5 ml)	10 mg (1,5 ml)
Payload (für 8 µg DNA)	0,1 mg	0,5 mg	1,0 mg

[0071] Die Plasmid/Zuckerlösungen wurden dann gefriergetrocknet (unter Verwendung von festem CO₂ und Isopropanol zum Einfrieren der Lösung vor der Vakuumtrocknung), und der gefriergetrocknete DNA-Trehalose-Feststoff wurde dann zum Erhalt von Mikropartikeln unter Verwendung eines Achatmörser und -stößels gemahlen.

[0072] Als einer Kontrolle wurden DNA-beschichtete Wolframpartikel durch Beschichten von Wolfram-Mikroprojektilen ($19,35 \times 10^3$ kb.m⁻³) mit einem mittleren Durchmesser von 1,014 µm (M-17, GTE/Sylvania, Towanda, PA, USA) mit vierzig Mikrogramm der Klon 123-Plasmid-DNA hergestellt, was fünf Payloads von 8 µg DNA

ergab, unter Anwendung einer Ableitung von bekannten Methoden zur Beschichtung von Mikropartikeln. Potter et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7161, Klein et al. (1987) Nature 327: 70 und Williams et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726.

[0073] Genauer gesagt wurden die Wolframpartikel vor dem Beschichten sterilisiert und in Suspension gebracht. Eine 50 mg-Probe von 1,048 µm (mittlerer Durchmesser) Wolfram-Mikroprojektilen (M-17, GTE/Sylvania, Towanda, PA, USA) wurden in ein 1,5-cc-Eppendorf-Röhrchen abgewogen und dann in 100% Ethanol (EtOH) sterilisiert. Um die Mikroprojektilen zu dispergieren (die Partikelaggregate zu zerstören), wurde die sterilisierte Lösung durch Kontaktieren der Außenseite des Eppendorf-Röhrchens mit dem Fühler eines Ultraschallgeräts gründlich beschallt. Die dispergierten Wolframpartikel wurden zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Wolframpartikel wurden in 1 cc steriles destilliertem Wasser resuspendiert und für zwei Zyklen zentrifugiert und dann in 1 cc steriles destilliertem Wasser bis zur Beschichtung gelagert.

[0074] Die Plasmid-DNA wurde an die Wolfram-Mikroprojektilen durch Zugabe von 20 µl der DNA (1 mg/ml) zu 40 µl der Suspension der wie oben hergestellten Wolframpartikel adsorbiert. Die Suspension wurde gevortext, um eine adäquate Vermengung der Reagenzien zu gewährleisten. Die folgenden Reagenzien wurden dann in der angegebenen Reihenfolge unter Vortexen nach jeder Zugabe hinzugefügt: 253 µl CaCl₂ (2,5 M); 50 µl Spermidin (0,1 M, gefroren gelagert); und 207 µl steriles destilliertes H₂O. Das endgültige Gemisch wurde für 10 Minuten bei 4°C gevortext. Die DNA-beschichteten Wolfram-Mikroprojektilen wurden dann bei 500 G für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand vorsichtig entfernt und 100 µl an 70% EtOH zugesetzt. Die beschichteten Partikel wurden nochmals zentrifugiert, der gesamte Überstand entfernt und das endgültige Präparat in 30 µl an 100% EtOH resuspendiert.

[0075] Die obige Methode ergab geeignete Mengen an DNA-beschichteten Wolframpartikeln, um 4 bis 5 Transfers mittels der nadellosen Spritze zu ermöglichen. Die oben vermerkten Reagensmengen können natürlich zur Bereitstellung unterschiedlicher Beladungen mit DNA gemäß bekannter Methoden variiert werden. Das Volumen und die Molkonzentration (M) der verwendeten Ausgangslösungen zur Beschichtung von Wolfram mit DNA sind nachstehend in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Komponente	Menge (µl)
Wolframpartikel (50 mg/ml)	40
Klon 123 (2,7 µg/µl)	14,8
CaCl ₂ (2,5 M)	253
Spermidin (0,1 M)	50
destilliertes H ₂ O	212,2

[0076] Für die Transformation wurden Kulturschalen von 6 cm Durchmesser mit 5×10^5 männlichen humanen Fibroblasten-HT1080-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion besät. Zwei Replikat-Schalen wurden für jede der Behandlungen präpariert, ebenso wie zwei negative Kontrollplatten.

[0077] Die Mikropartikel und Wolfram-beschichteten Partikel wurden dann zu den Zellen unter Verwendung einer nadellosen Spritze wie oben beschrieben transferiert. Die Spritze enthielt eine 4,5 ml-Speicherkammer mit einem Taucher-artigen Ventil, einen Heliumgasspeicher, eine Mach 2-Düse und 12 µl Mylar-Film, der zu Diaphragmen von 6 mm Durchmesser handgestanzt worden war.

[0078] Genauer wurden die Mylar-Diaphragmen zunächst sterilisiert, indem sie einzeln zwischen Filterpapierstücke geschichtet und diese aufeinander gestapelt wurden, dieser Stapel dann in Aluminiumfolie eingewickelt und vollständig mit Autoklaven-Klebeband versiegelt wurde, um sicher zu gehen, dass kein Wasser in den Filterpapier/Diaphragmasteapel während des Autoklavierprozesses eindringen konnte. Dies wurde in einen Becher eingebracht, mit Aluminiumfolie bedeckt und in eine Autoklavenkammer eingebracht.

[0079] Zwei 12 µm-Mylar-Diaphragmen von 6 mm Durchmesser wurden in der Membrankassette verwendet. Ein Milligramm- und 0,5 Milligramm-Payloads des gefriergetrockneten DNA-Pulvers wurden auf die untere

Membran in der Kassette aufgebracht. Dieser Payload wurde dann mit den anderen Stücken der Kassette und dem verbliebenen Diaphragma bedeckt. Lediglich Präparate **2** und **3** wurden bei diesem Experiment aufgrund der Schwierigkeit verwendet, kleine Massen exakt abzuwiegen. Weitere fünf der Kassetten wurden jeweils mit 5 µl der DNA/Wolframpartikel-Suspension beladen. Die Gesamtheit der obigen Mengen ergab eine Masse von etwa 8 µg an DNA, die bei jedem Schuss unabhängig von der verwendeten Partikelformulierung transferiert wurde.

[0080] Bezugnehmend auf [Fig. 1](#) ist ein zusammengesetzter Transferapparat **2** gezeigt, der eine nadellose Spritze **4**, beladen mit einer wie oben beschriebenen Kassette, enthält. Die nadellose Spritze **4** wurde auf einem ringförmigen Halter **6** unter Verwendung einer standardmäßigen Röhrenklemme **8** zum Halten der Spritze in Position relativ zu einer Kulturschale **10**, die mit den HT1080-Zellen **12** besät war, angeordnet. Der Abstand zwischen dem stromabwärts gelegenen Ende **14** der nadellosen Spritze **4** und den Zellen **12** in der Kulturschale **10** wurde gemessen, um eine Zieldistanz zu fixieren, die allgemein bei d angegeben ist. Um die Parameter zum Transfer der gefriergetrockneten DNA zu optimieren, wurde entweder die Zieldistanz d über einen konstanten Transferdruck variiert, oder wurde der Transferdruck über eine konstante Zieldistanz variiert. Genauer wurden die DNA-Präparate bei einer Zieldistanz im Bereich von 20 bis 60 mm unter Anwendung von Heliumtreibgasdrücken im Bereich von 30 bis 50 Bar abgeschossen.

[0081] Nach der Transformation wurden die Zellen 2 Tage lang inkubiert, gefärbt und dann transiente Assays mit X-Gal zur Bestimmung der Transformationsleistungen unter Anwendung zuvor beschriebener Methoden durchgeführt. Murray, E. J. (Hrg.) (1991) Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols, Band 17, Humana Press, Clifton, New Jersey. Spezifisch wurden die Transformationsleistungen durch Auszählen der Anzahl der blau gefärbten Zellen bewertet. Die Transferparameter und Transformationsergebnisse sind nachstehend in Tabelle 3 dargestellt. Die Druckstoßwirkung wurde von 1 Punkt für recht klein (Durchmesser einer toten Zellzone beträgt etwa 5 bis 8 mm) bis fünf Punkte für sehr groß (Durchmesser der Zellzone größer als 30 mm) punktbewertet. Wie zu erkennen, lag die Transformation der Plamid/Trehalose-Pulverpräparat der vorliegenden Erfindung in derselben Größenordnung wie für die Metallpartikel beobachtet.

[0082] Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, waren optimale Transformationsergebnisse mit dem partikulären Plasmid/Trehalose-Präparat zu erkennen, wenn dieses unter Anwendung eines Drucks von 30 Bar bei einer Zieldistanz von 60 mm transferiert wurde. Genauer gesagt zeigt [Fig. 2](#) einen direkten Vergleich der Transformationsleistung, wie durch Transfer des partikulären Nukleinsäure-Präparats (Präparate 2 als auch 3) mit historischen und aktuellen Transfermethoden der DNA-beschichteten Wolframpartikel erhalten. Bezugnehmend auf [Fig. 3](#) sind die Daten, die für Transfers bei 30 Bar erhalten wurden, in einem Graphen dargestellt, der die Transformationsleistung als einer Funktion der Zieldistanz darstellt. Wie zu erkennen, wurde die optimale Zieldistanz für die Präparate Nummer 2 und 3 (bezeichnet als F#2 bzw. F#3) nicht erreicht; allerdings nahm die Transformationsleistung mit steigenden Zieldistanzen beträchtlich zu. Wurden weiterhin Transfers bei der maximal getesteten Distanz (60 mm) durchgeführt, so waren die mit den partikulären DNA-Formulierungen (F#2 und F#3) erzielten Transformationsleistungen merklich besser als jene Transformationsleistungen, die mit den DNA-beschichteten Wolframkontrollen beobachtet wurden.

[0083] In [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gelten die folgenden Abkürzungen (die oben nicht definiert sind):

B/P blaue Zellzählung pro Platte
TCC aktuelle Wolframkontrolle
THC historische Wolframkontrolle

[0084] Außerdem sind in [Fig. 3](#) die aufgetragenen Punkte wie folgt:

- F#2 ■F#3
- Wolfram (der Punkt ist verdeckt bei d = 20)

Bezugsbeispiel 2

[0085] Die folgenden Studien wurden zur Bewertung der Transferierbarkeit einer pulverisierten Nukleinsäure-Zusammensetzung an eine Testperson in vivo unter Anwendung der Methoden der Erfindung durchgeführt.

[0086] Plasmid-Vektorkonstrukt: Das pGREEN-1-Vektorkonstrukt, welches das grün fluoreszierende Protein-(GFP)-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält, wurde so verwendet, dass die Genexpression durch UV-Mikroskopie oder histologische Schnitte aus behandelten Gewebeproben direkt bewertet werden konnte.

[0087] Pulverisierte Nukleinsäure-Zusammensetzungen: Eine pulverisierte Nukleinsäure-Zusammensetzung wurde wie folgt hergestellt. Ein Gemisch wurde durch Kombinieren des pGREEN-1-Vektorplasmids mit Trehalosezucker erzeugt, um eine 1 µg: 1 mg (w/w) DNA-Zucker-Zusammensetzung zu erhalten. Diese Zusammensetzung wurde lyophilisiert, komprimiert, gemahlen und dann gesiebt unter Anwendung der oben beschriebenen Techniken. Die resultierende kondensierte Nukleinsäure-Zusammensetzung wies eine mittlere Teilchengröße im Bereich von etwa 38 – 75 µm auf.

[0088] Verabreichungen: C57BL/10-Mäuse wurden mit 1 mg der partikulären Zusammensetzung über eine nadellose Injektion behandelt. Die Zusammensetzung wurde einer in geeigneter Weise zu einer präparierten Zielhautfläche transferiert, und Gewebeschnitte wurden von der Zielstelle 24 Stunden nach Verabreichung entnommen. Die GFP-Expression wurde unter Anwendung der UV-Mikroskopie direkt bestimmt. Als Ergebnis der Verabreichungen wurde eine GFP-Expression im behandelten Hautgewebe erkannt, was einen erfolgreichen *in vivo*-Transfer der pulverisierten Nukleinsäure-Zusammensetzung an die Zielhaut und die anschließende Transfektion der Wirtszellen und Expression des GFP-Gens daraus bestätigte.

[0089] In einer anderen Studie wurden Plasmide, die entweder ein humanes Wachstumshormon-(hGH)- oder β-Galactosidase-(β-Gal)-Expressionskassette enthielten, mit einem Trehalose-Exzipienten lyophilisiert, um Nukleinsäure-Formulierungen zu erhalten, die komprimiert, gemahlen und dann gesiebt wurden unter Anwendung der oben beschriebenen Techniken. Die resultierenden kondensierten Nukleinsäure-Zusammensetzungen wiesen eine mittlere Partikelgröße im Bereich von etwa 38–75 µm auf.

[0090] Weibliche Schweine (Gewicht 20–25 kg) wurden mit Halothan anästhesiert und die Bauchhaut abgeklemmt, um eine geeignete Zielstelle aufzuzeigen. Die obigen pulverisierten Nukleinsäure-Zusammensetzungen wurden einzeln an die präparierte Zielstelle in 0,1 µg (hGH) oder 1 µg (β-Gal)-Dosen über ein nadelloses Injektionsgerät (Transferdruck 60 Bar) übertragen. Die Zielstellen wurden 24 Stunden nach der Behandlung biopsiert, und Gewebeschnitte wurden auf die Expression von humanem Wachstumshormon oder β-Gal analysiert. Obwohl keine hGH-Expression innerhalb der Nachweigrenzen des Assays erkennbar war, wurde doch ein mäßiger Grad der β-Gal-Expression in den behandelten Stellen festgestellt. Das Fehlen einer nachweisbaren hGH-Expression bei dieser Studie liegt vermutlich an der geringen Beladungsdichte der Nukleinsäure (0,1 µg) in der Zusammensetzung.

Tabelle 3

Schuss	Formulierung	Zieldistanz	Druck	Blaue Zellzählung	Druckstoßwirkung
A1	Wolfram	60	30	224	2
A2	Wolfram	60	30	596	2
A3	Wolfram	60	30	575	2
A4	Wolfram	60	30	581	2
A5	Wolfram	60	30	-	-
B1	#3 Trehalose	20	30	155	3
B2	#3 Trehalose	20	30	227	3
C1	#3 Trehalose	40	30	654	2
C2	#3 Trehalose	40	30	643	2
D1	#3 Trehalose	40	50	394	4
D2	#3 Trehalose	40	50	175	5
E1	#3 Trehalose	60	30	1416	1
E2	#3 Trehalose	60	30	1654	1
F1	#3 Trehalose	60	50	408	3
F2	#3 Trehalose	60	50	486	3
G1	#2 Trehalose	20	30	166	3
G2	#2 Trehalose	20	30	180	3
H1	#2 Trehalose	20	50	129	4
H2	#2 Trehalose	20	50	53	4
J1	#2 Trehalose	40	30	347	2
J2	#2 Trehalose	40	30	546	2
K1	#2 Trehalose	40	50	377	4
K2	#2 Trehalose	40	50	198	4
L1	#2 Trehalose	60	30	1451	1
L2	#2 Trehalose	60	30	1164	1
M1	#2 Trehalose	60	50	409	3
M2	#2 Trehalose	60	50	336	3

Patentansprüche

1. Verwendung eines Nukleinsäure-Moleküls und eines Kohlenhydrats als alleinigem Träger für die Herstellung eines Medikaments in Form von Partikeln zur Anwendung in der Therapie durch nadellose Verabreichung an Haut- oder Schleimhautgewebe, wobei
 - das Nukleinsäure-Molekül eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein Immunogen codiert,
 - Kontrollsequenzen, die zum Bewirken der Expression der Nukleotidsequenz fähig sind, funktionsfähig daran geknüpft sind, und
 - diese Partikel eine Größe im Bereich von 10 bis 150 µm und eine Dichte im Bereich von 0,8 bis 3,0 g/cm³ aufweisen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäure-Molekül eine DNA-Sequenz ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Nukleinsäure-Molekül ein Plasmid ist.
4. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kohlenhydrat Trehalose ist.
5. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Partikel eine Größe im Bereich von 20 bis 60 µm aufweisen.
6. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Partikel eine Dichte im Bereich von 0,9 bis 1,5 g/cm³ aufweisen.
7. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Nukleotidsequenz für ein Antigen

codiert, das zum Hervorrufen einer humoralen Immunantwort fähig ist.

8. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Nukleotidsequenz für ein Antigen codiert, das zum Hervorrufen einer zellulären Immunantwort fähig ist.

9. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Partikel bei einer Impulsdichte von zwischen 2 und 10 kg/sec/m verabreicht werden.

10. Nadellose Spritze, umfassend, als dem zu verabreichenden Wirkstoff, Partikel, wie in einem der Ansprüche 1 bis 8 definiert.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1.

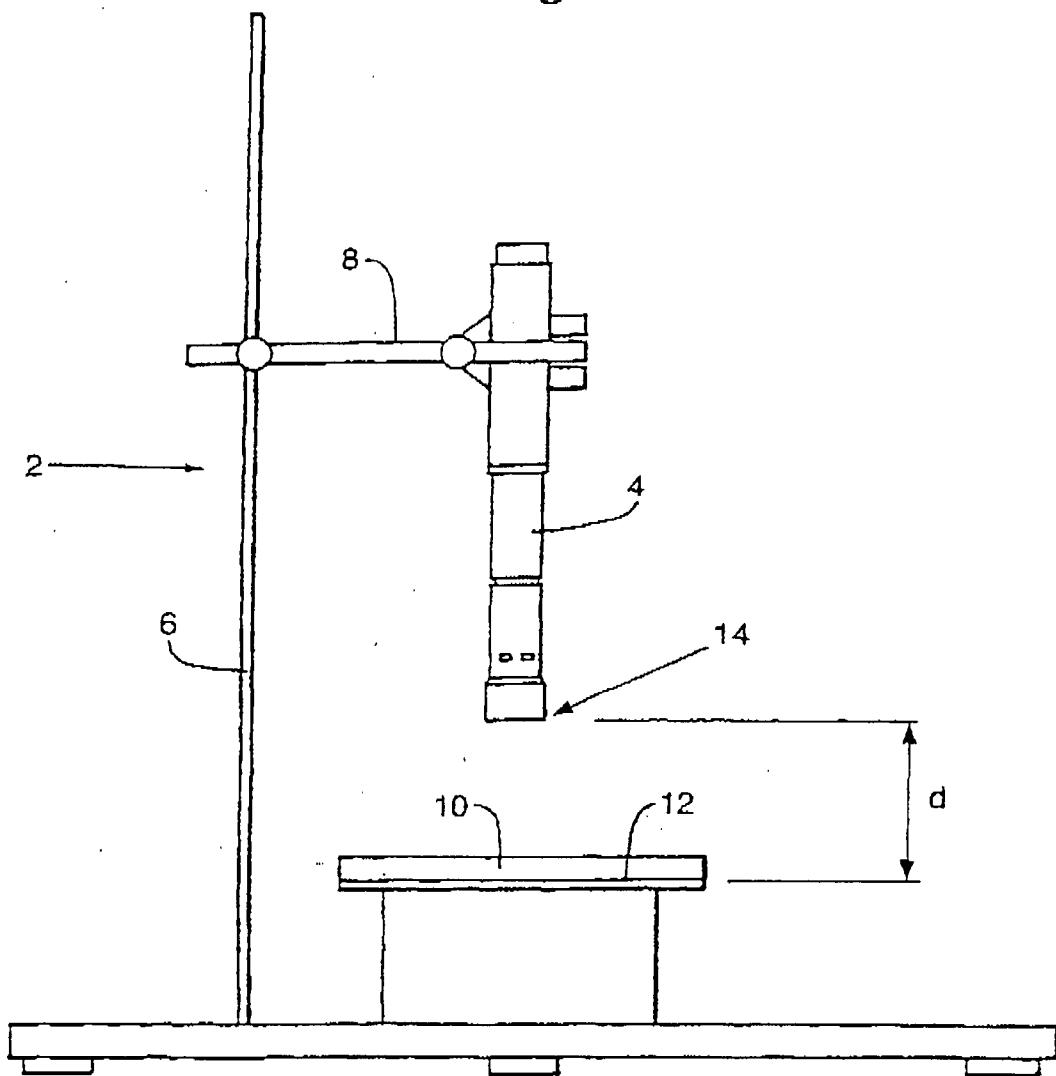


Fig.2.

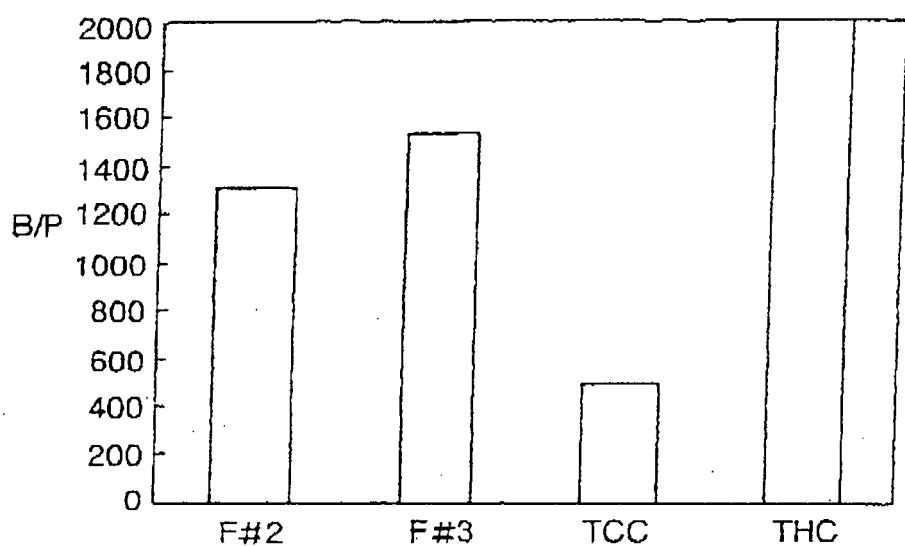


Fig.3.

