



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 35 496 T2** 2006.09.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 939 590 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 35 496.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/16523**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 942 543.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/011779**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A01N 43/04** (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

717084 19.09.1996 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GERMAN, Michael, San Francisco, CA 94122, US;
GOLDFINE, D., Ira, Kentfield, CA 94904, US;
ROTHMAN, S., Stephen, Berkeley, CA 94708, US**

(54) Bezeichnung: **Nukleinsäure zur Verwendung in Gentherapie, welche Therapie intestinale Zell-Expression der Gene involviert**

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 Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Medikamentenabgabe, insbesondere der Abgabe von therapeutischen Genprodukten durch Transformation von Zellen des Darms.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Proteine sind für alle biologischen Funktionen wesentlich, von Stoffwechsel über Wachstum, Reproduktion bis zu Immunität. Als solche weisen sie ein bedeutendes Potenzial als pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung eines großen Bereichs menschlicher Krankheiten auf. Tatsächlich wurden diese bereits verwendet, um Krankheiten wie Krebs, Hämophilie, Anämie und Diabetes erfolgreich zu behandeln, und sind für eine Anzahl Krankheiten die einzige wirksame Behandlung.

[0003] Obwohl Proteinmedikamente ein enormes therapeutisches Potenzial aufweisen, wurde deren breit gefächerte Verwendung durch mehrere restriktive technische Faktoren begrenzt. Erstens bleibt die Herstellung von Proteinen verglichen mit anderen Arzneimitteln schwierig und teuer. Die Reinhaltung in großem Maßstab von Proteinen in bioaktiver Form kann ein einschränkender Schritt bei der Vermarktung dieser Medikamente sein. Zweitens unterliegen viele Proteine einem schnellen Stoffwechsel oder werden auf andere Weise schnell in dem Patienten unwirksam. Dies hat das Erfordernis einer häufigen Neuverabreichung zur Folge. Schließlich müssen Proteinmedikamente im Allgemeinen durch Injektion verabreicht werden. Dadurch werden die Komplexität und die Kosten der Behandlung erhöht, und die unangenehme Art der Verabreichung schränkt ebenfalls mögliche klinische Anwendungen ein.

[0004] Die Abgabe therapeutischer Genprodukte (wie beispielsweise Polypeptide für Proteinersatztherapie) durch Expression in Zellen, die mit einer therapeutischen Genprodukt-codierenden DNA transformiert wurden, hat als Verfahren weite Beachtung gefunden, um verschiedene Krankheiten bei Säugetieren zu behandeln und die Produktion bestimmter Proteine oder anderer Zellprodukte zu steigern. Diese vielversprechende Therapie, auf die oft als Gentherapie Bezug genommen wird, wird im Allgemeinen erreicht, indem exogenes genetisches Material in die Zellen eines Säugetierpatienten eingebracht werden. Das eingebrachte genetische Material kann so gestaltet sein, das es ein unnormales (fehlerhaftes) Gen des Säugetierpatienten ersetzt ("Genersatztherapie"), oder es kann für die Expression des codierten Proteins oder eines anderen therapeutischen Produkts ohne Ersatz eines fehlerhaften Gens ("Genvermehrung") gestaltet sein. Da viele angeborene und erworbene medizinische Funktionsstörungen die Folge von unangemessener Produktion zahlreicher Genprodukte ist, bietet die Gentherapie Mittel zur Behandlung dieser Krankheiten entweder durch vorübergehende oder dauerhafte Expression exogener Nukleinsäure, welche das therapeutische Produkt codiert.

[0005] Die Abgabe therapeutischer Genprodukte durch Expression in transformierte Zellen kann entweder durch direkte Transformation von Zielzellen innerhalb des Säugetiers (in vivo Gentherapie) oder Transformation von Zellen in vitro und anschließender Implantation der transformierten Zellen in das Säugetier (ex vivo Gentherapie) erreicht werden. Eine Vielzahl von Verfahren wurde entwickelt, um in vivo Transformation zu erreichen, einschließlich mechanischer Mittel (zum Beispiel Direktinjektion von Nukleinsäure in Zielzellen oder Partikelbeschuss), rekombinanter Viren, Liposomen und rezeptorvermittelte Endozytose (RME = receptor-mediated endocytosis) (für Abhandlungen s. Chang et al. 1994 Gastroenterol. 106:1076-84; Morsy et al. 1993 JAMA 270:2338-45 und Ledley 1992 J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 14:328-37). WO-A-94/25608 betrifft DNA bindende Proteine als Träger für Gentransfer oder Gentherapie.

[0006] Wie bei allen Therapien ist die Therapie, die am leichtesten verabreicht werden kann, am kostengünstigsten ist und am wahrscheinlichsten von dem Patienten eingehalten wird, die Therapie der Wahl. Im Bereich von Gentherapie-Techniken bietet intestinale Gentherapie eine solche Therapie. Das intestinale Epithel ist ein besonders guter Ort für in vivo Gentherapie, vor allem aufgrund des leichten Zugangs auf oralem Weg oder durch ein anderes Lumen, wodurch eine Verabreichung der exogenen Nukleinsäure durch nicht-invasive Vorgehensweisen möglich wird. Zum Beispiel kann der Patient einfach eine Tablette nehmen, die aus der exogenen Nukleinsäure besteht, oder alternativ kann die exogene Nukleinsäureformulierung durch andere nicht-invasive Mittel (d.h. ein Mittel, das kein größeres chirurgisches Vorgehen erfordert, also beispielsweise endoskopische Katheterisierung oder rektaler Zäpfcheneinschnitt) verabreicht werden.

[0007] WO-A-93/19660 betrifft Gentherapie unter Verwendung des Darms. Takehara et al (1996), Human Gene therapy 7:589-593 und Takehara et al (1996) Gastroenterology, 110:A1124 betreffen submukosale Injek-

tion von DNA in den Gastrointestinaltrakt. WO-A-93/03769 betrifft Adenovirus-vermittelten Transfer von Genen in den Gastrointestinaltrakt.

[0008] Jedoch sind Versuche in der Vergangenheit, in vivo Transformation von intestinalen Zellen zu erreichen, auf zahlreiche Hindernisse gestoßen. Da sich das Gebiet hauptsächlich mit Langzeittransformation und Abgabe des therapeutischen Genprodukts von Interesse beschäftigt hat, haben die meisten Gruppen intestinale Epithelzellen als Ziele für Transformation aufgrund der schnellen Umwandlungsrate der Zellen (2 bis 4 Tage) vermieden (siehe z.B. Sandberg et al. 1994 Hum. Gene Therap. 5:303-9). Versuche, in vivo Transformation zu erreichen, können weiter durch die Schleimschicht des Darms verkompliziert werden, von welcher behauptet wird, dass sie den Zugang der transformierenden Formulierung der Gentherapie zu den Zielzellen blockiert (Sandberg et al., supra). Von der Anwesenheit hoher Konzentrationen von DNAs in dem Darmtrakt wird ebenfalls behauptet, dass dies eine erhebliche Sperre für das wirksame Einbringen von DNA in die Zellen des Darmtrakts ist.

[0009] Viele der Vektoren und Abgabesysteme, die für in vivo Zelltransformation entwickelt wurden, weisen entweder ihnen selbst innewohnende Nachteile auf oder sind nicht vollständig für in vivo Darmzelltransformation geeignet. Zum Beispiel kann es lange dauern, für rekombinante Viren, insbesondere Retroviren, eine Zulassung der FDA (Food and Drug Administration) zu erhalten aufgrund von Bedenken, die im Allgemeinen mit der Verabreichung lebendiger Viren an Menschen verbunden sind. Zusätzlich hat sich herausgestellt, dass virale Vektoren Probleme aufweisen betreffend der Möglichkeit vielfältiger Verabreichungen des Genkonstrukts aufgrund von Immunreaktionen, was deren Verwendbarkeit in großem Maße einschränken kann. Mechanische Mittel, wie beispielsweise die Genpistole, sind zur Verwendung bei der Transformation von Skelettmuskulaturzellen gestaltet und sind bei der Transformation von Darmzellen nicht besonders nützlich aufgrund von Zugangsproblemen und der empfindlichen Natur des Organs.

[0010] Gängige Verfahren zur Medikamentenverabreichung durch Transformation, welche gestaltet sind, um systemische therapeutische Ziele zu erreichen (z.B. um Verabreichung von auf Protein basierenden Medikamenten zu erreichen), schließen sowohl ex vivo als auch in vivo Techniken ein. Jedoch erfordern ex vivo Techniken komplexe Verfahren, um die Transformation zu erreichen, weisen das Risiko auf, dass der Patient das Transplantat abstößt, erfordern wenigstens leicht invasive Verfahren und begrenzen Implantation auf eine geringe Anzahl von Zellen. In vivo Verfahren (z.B. Direktverabreichung über Blut oder an einem Muskel) erfordern ebenfalls häufig invasive Verfahren und weisen Schwierigkeiten auf bei der Abgabe des transformierenden Materials an die Zielzelle. Des Weiteren hat eine Abgabe des transformierenden Materials über die Blutbahn des Patienten eine Exposition der DNA und jedes mit diesem verbundenen Trägers gegenüber dem Immunsystem zur Folge, was Nebenwirkungen zur Folge haben kann (z.B. Entzündungsreaktionen auf die verabreichte DNA und/oder auf Bestandteile der Formulierung, welche die DNA enthält).

[0011] Heutzutage besteht, da die biomedizinische Forschungsindustrie mit steigender Geschwindigkeit neue Proteine entdeckt und da bekannte Proteine als therapeutische Wirkstoffe verfügbar werden, ein entscheidendes Erfordernis, neue Abgabesysteme und -verfahren zu entwickeln, um die Anwendung dieser Moleküle als Medikamente auszudehnen, indem die Möglichkeit und Einfachheit ihrer Verwendung verbessert werden. Die vorliegende Erfindung nimmt sich dieser Probleme an.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Intestinale Epithelzellen werden genetisch verändert durch Exposition gegenüber einer Formulierung, welche Nukleinsäuren (einschließlich DNA, RNA, DNA-RNA-Hybriden, Oligonukleotiden und synthetischer Nukleinsäuren) aufweist, wobei eine solche Exposition zur Folge hat, dass die Nukleinsäure wirksam in die intestinale Epithelzelle eingeschlossen ist, wodurch Expression eines Gens erleichtert wird, welches ein therapeutisch wirksames Protein codiert. Die Nukleinsäureformulierung kann jede Formulierung sein, die zur Abgabe an den Gastrointestinaltrakt geeignet ist, um die Nukleinsäure in der Formulierung in eine intestinale Epithelzelle einzubringen, einschließlich nackter Nukleinsäure und/oder Liposomformulierung, vorzugsweise nackte Nukleinsäure. Genauer offenbart die Erfindung die Verwendung einer funktionellen exogenen DNA-Sequenz bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung eines Patienten, der ein Protein benötigt, durch genetisches Verändern von Zellen des Darms, um wirksam die DNA-Sequenz einzuschließen, wobei die DNA-Sequenz, wenn sie exprimiert ist, ein Protein erzeugt, das direkt von den Zellen in die Blutbahn sekretiert wird, in einer Menge, die ausreichend ist, um therapeutische Mengen des Proteins zu erhalten. Das Medikament kann somit verwendet werden, um Zellen genetisch zu verändern, und eine systemische Therapie zu erreichen.

[0013] Ein erstes Ziel ist es, die Herstellung von Medikamenten für die therapeutische Genprodukt- (z.B. Protein-) abgabe vorzusehen, wobei Zellen des intestinalen Epithels (z.B. Zellen des Dünndarms oder Dickdarms) eines Säugetiers genetisch modifiziert werden durch das Einschließen vollständig funktioneller Gene (exogene DNA), welche ein biologisch aktives und therapeutisch nützliches Protein exprimieren, das von den modifizierten Zellen in das Kreislaufsystem sekretiert wird.

[0014] Die vorliegende Erfindung weist den Vorteil auf, dass sie die enorme Fähigkeit von Zellen, die den Gastrointestinaltrakt säumen, Proteine zu produzieren und zu sekretieren, ausschöpft. Die Därme sind das zweitgrößte Organ des Körpers und das größte Immunorgan. Die Zellen der Darmwand bieten eine Schnittstelle mit einer riesengroßen Oberfläche (ungefähr 300 m²), welche als ihre normale Funktion das bevorzugte Absorbieren von Substanzen aus dem Gastrointestinaltrakt und den Transfer in die Blutbahn aufweist; dies ist bei Lungen- oder Muskelgewebe nicht der Fall. Das Verwenden selbst eines geringen Teils dieser Kapazität kann viele wichtige therapeutische Proteine, wie beispielsweise Hormone, Zytokine und Gerinnungsproteine, an die Blutbahn liefern. Des Weiteren können kurzzeitig wirksame Proteine mit größerer therapeutischer Wirkung verwendet werden, da durch die vorliegende Erfindung deren dauernde Synthese und Sekretion in den gewünschten Geschwindigkeiten sichergestellt wird.

[0015] Ein bedeutender Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass diese die Verabreichung des Proteinmedikaments durch den Mund ermöglicht. Das Abgabesystem der Erfindung versucht nicht, das Protein selbst zu liefern, sondern tut dies indirekt, indem das Gen, welches die therapeutischen Proteine codiert, verabreicht wird. Im Gegensatz zu der herrschenden Meinung, dass jedwede DNA in dem Gastrointestinaltrakt schnell durch den Verdauungsvorgang zerstört würde (entweder durch Magensäure oder intestinale DNAs), ist die orale Abgabe von DNA, die ein gewünschtes therapeutisches Protein codiert, bei der vorliegenden Erfindung erfolgreich. Die DNA wird von den Darmzellen aufgenommen, welche das codierte Protein synthetisieren und dieses in die Blutbahn sekretieren, um therapeutische Ergebnisse zu erzielen. Die Flexibilität dieser Technologie ermöglicht die systemische Abgabe einer breiten Vielfalt von Proteinarzneimitteln, wodurch sie für ein breites Spektrum therapeutischer Anwendungen gut geeignet ist.

[0016] Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass die kurzzeitige Expression des therapeutischen Gens in dem Individuum das Regulieren der Verabreichung des therapeutischen Genprodukts an den Patienten ermöglicht. Da Darmzellen sich schnell umsetzen, kann eine Expression leicht modifiziert oder geändert werden, indem die Dosis und/oder Formulierung der oralen Zubereitung verändert wird. Kurzzeitige Expression ist somit eine Folge des schnellen Umsatzes transformierter Zellen, welche normalerweise innerhalb von zwei oder drei Tagen abgebaut (oder "umgesetzt") sind. Dieser Gegenstand der Erfindung ist sowohl für die Dosissteuerung als auch für die Risikoreduzierung von Langzeitkomplikationen von DNA-Integration (Mutagenese) vorteilhaft.

[0017] Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass die Erfindung invasives Verfahren vollständig vermeidet und ermöglicht, dass der Vektor auf die einfachste mögliche Weise verabreicht wird – durch orale Verabreichung einer Tablette oder eines anderen Materials. Das Lumen des Gastrointestinaltrakts ist tatsächlich "außerhalb" des Körpers und ist von diesem durch eine einzelne durchgehende Schicht von Zellen getrennt. Als solches bleibt alles, das in den Gastrointestinaltrakt über den Mund gelangt, im Außenraum und kann nicht in den Körper selber und dessen Blutbahn eingehen, sofern es nicht zuerst die Zellen, die den Gastrointestinaltrakt säumen, durchquert hat. Ist jedoch das Gen erst einmal in die Darmzellen exprimiert und das Proteinprodukt in die Blutbahn über natürliche Sekretierwege freigesetzt, wirkt das therapeutische Protein auf die gleiche Weise wie geläufige injizierbare Formen des Medikaments.

[0018] Die vorliegende Erfindung ist ebenfalls vorteilhafter als genbasierende Therapien, welche den Genvektor in die Blutbahn an andere Gewebe und Organe verabreichen insofern, als es die Verabreichung der DNA von Interesse direkt an die Zielzellen des Patienten beinhaltet, ohne zuerst breit über die Blutbahn verteilt zu werden. Somit ist die Abgabe von DNA unter Verwendung der Erfindung wirksamer und vermeidet das Erfordernis für zusätzliche Mechanismen, um die DNA von Interesse gezielt zu einem bestimmten Gewebe zu bringen.

[0019] Noch ein weiterer Vorteil ist es, dass durch die vorliegende Erfindung die Exposition der transformierenden DNA gegenüber der Blutbahn, welche die Hauptquelle von Nebenwirkungen der Behandlung ist, minimiert wird. Eine Reaktion des Immunsystems auf den Abgabevektor (insbesondere virale Vektoren) ist ein Haupthindernis für herkömmliche genbasierende Therapien. Durch die Abgabe von Vektoren auf anderen Wegen (z.B. intravenös, durch intramuskuläre Injektion oder pulmonale Verabreichung) werden diese dem Blut und extrazellulärer Flüssigkeit exponiert. Diese Exposition hat für gewöhnlich Entzündung sowie eine Immun-

reaktion zur Folge. Diese Nebenwirkungen werden bei Wiederverabreichung für gewöhnlich schlimmer, bis zu dem Punkt, an dem eine Behandlung nicht fortgesetzt werden kann und vollständig unwirksam ist. Durch die vorliegende Erfindung wird der Vektor direkt in die Därme gebracht, ohne dass er zuerst durch das Blut oder Gewebe des Patienten gelangen muss. Dadurch wird der DNA-Abgabeprozess so weit wie möglich von der systemischen Zirkulation, in der Immun- und Entzündungsreaktionen beginnen, abgeschirmt, wodurch deren Einfluss auf die Therapie minimiert wird.

[0020] Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass eher nackte DNA als Vektor verwendet werden kann als virale Vektoren. Obwohl virale Vektoren für Gentherapie aufgrund der Einfachheit des Verabreichens und des Einfügens der DNA in das Genom beliebt waren, hat sich herausgestellt, dass virale Vektoren erhebliche Antigenreaktionen erzeugen, welche ihr mehrfaches Verabreichen verhindern. Durch die Verwendung nackter DNA wird dieses Problem vermieden.

[0021] Noch ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass mögliche schädliche Nebenreaktionen durch langzeitige Genverabreichung vermieden werden können, da die Epithelzellen in das Darmlumen abgestoßen werden und innerhalb weniger Tage den Körper verlassen.

[0022] Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist es, dass das therapeutische Genprodukt in die Blutbahn eines Patienten in einer Weise und mit einer Dosierung abgegeben wird, welche der normalen Produktion des Genprodukts ähnlicher ist (z.B. im Vergleich zu einer intravenösen Bolus-Injektion eines therapeutischen Polypeptids).

[0023] Ebenfalls noch ein weiterer Vorteil ist es, dass das System der Medikamentenabgabe gemäß der Erfindung das körpereigene Gewebe des Patienten nutzt, um das gewünschte Proteinmedikament herzustellen und es in die Blutbahn zu sekretieren.

[0024] Ein weiterer Vorteil ist es, dass die Verabreichung von DNA-Formulierungen direkt in das Lumen des Gastrointestinaltrakts (eher als in die Blutbahn) die Verwendung einer größeren Vielfalt an Transfektionsadjuvantien ermöglicht. Auf Grund seiner physiologischen Funktion ist der Gastrointestinaltrakt robuster gestaltet und ist eher in der Lage, einen breiteren Bereich von Umgebungsbedingungen zu tolerieren und ist weniger anfällig für toxische Reaktionen. Somit kann die vorliegende Erfindung zusammen mit chemischen Verfahren verwendet werden, um die DNA-Aufnahme von Zellen zu erleichtern, welche alternativ zu viral-basierenden Vektoren geeignet sind, kann aber andererseits für Verabreichung auf intravenösem, intramuskulärem oder pulmonalem Weg ungeeignet sein. Zum Beispiel ermöglicht die vorliegende Erfindung, da der Gastrointestinaltrakt weniger anfällig für Toxizität ist und von der Zirkulation nicht erreicht werden muss, eine erweiterte Verwendung von Liposomen, Adjuvantien, die aus kationischen Lipiden zusammengesetzt sind und die DNA-Aufnahme verbessern, sowie einer Vielzahl anderer Adjuvantien.

[0025] Die Erfindung weist weiterhin den Vorteil auf, dass viele der technischen Hindernisse, die mit der Abgabe proteinbasierender Medikamente verbunden sind, vermieden werden. Als Erstes werden durch die Erfindung die Kosten und Schwierigkeiten der Herstellung von Proteinen vermieden, indem körpereigenes Gewebe verwendet wird, um die gewünschten Proteine zu synthetisieren. Als Zweites werden durch die Erfindung die Probleme von schnellem Stoffwechsel vermieden, indem dauerhafte Herstellung und Sekretion des therapeutischen Proteins durch Genexpression vorgesehen wird. Schließlich wird durch orale Verabreichung das Erfordernis des Injizierens vermieden, um therapeutische Mengen in dem Körper zu erzielen.

[0026] Diese und andere Ziele, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden dem Durchschnittsfachmann beim Lesen der Details von Vektoren, Formulierungen und der Methodologie offensichtlich, die nachfolgend gegeben wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungsfiguren

[0027] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Epithelzellenschicht, welche den Gastrointestinaltrakt säumt. Schritt 1 stellt die Verabreichung von DNA und Absorption durch Zellen in dem Darmtrakt dar; Schritt 2 stellt die Synthese von therapeutischen Proteinen dar; und Schritt 3 stellt Sekretion von Proteinen in die Blutbahn dar.

[0028] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung von Darmzotten, welche das Abstoßen von Darmzellen von der Spitze der Zotte nach ihrer Migration von den Stammzellen an dem Zottenboden darstellt.

[0029] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung eines beispielhaften rekombinanten Plasmidkonstrukts, welches bei der Transformation von intestinalen Epithelzellen gemäß der Erfindung nützlich ist.

[0030] [Fig. 4](#) ist eine Abbildung des pFGH-Konstrukts, welches die menschliche Wachstumshormon-Genomsequenz enthält.

[0031] [Fig. 5](#) ist eine Abbildung des pFGH.CMV-Konstrukts, welches die menschliche Wachstumshormon-Genomsequenz enthält, die wirksam mit dem CMV-Promotor verknüpft ist.

[0032] [Fig. 6](#) ist eine Abbildung des pFGH.chymo-Konstrukts, welches die menschliche Wachstumshormon-Genomsequenz enthält, die wirksam mit dem Chymotrypsin B-Promotor verknüpft ist.

[0033] [Fig. 7](#) ist ein Diagramm, welches die Mengen an menschlichem Wachstumshormon in systemischem Blut (gefüllte Balken) und Pfortaderblut (schraffierte Balken) nach Exposition von intestinalen Segmenten gegenüber einer Lösung, die aus DNA zusammengesetzt ist, welche das menschliche Wachstumshormon codiert, darstellt.

[0034] [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) sind Abbildungen von pBAT14.hIns- und pBAT16.hInsG1.M2-Konstrukten, welche eine Nukleotidsequenz enthalten, die jeweils menschliches Insulin oder einen Mutanten von menschlichem Insulin codiert, das/der wirksam mit einem CMV-Promotor verknüpft ist.

[0035] [Fig. 10](#) ist ein Diagramm, welches die Verbesserung von Diabetes durch Darmzelltransformation gemäß der Erfindung zeigt. Offene Quadrate: Blutzuckermengen (mg/dl) bei normalen Ratten; offene Quadrate mit Mittelpunkt: Blutzuckermenge bei Ratten mit durch Streptozotocin induzierter Diabetes; geschlossene Quadrate: Blutzuckermengen bei Ratten mit durch Streptozotocin induzierter Diabetes, durch Darmzelltransformation mit einem Insulin-codierenden Vektor behandelt.

[0036] [Fig. 11](#) ist ein Diagramm, welches die Plasmamengen von menschlichem Wachstumshormon (hGH = human growth hormone) darstellt nach Verabreichung von DNA, die hGH (geschlossene Quadrate), oder Kontroll-DNA (offene Quadrate) codiert, durch einen eingepflanzten Duodenalkatheter bei Tieren mit Bewusstsein. Jeder Datenpunkt stellt das Mittel aus drei Versuchen dar.

[0037] [Fig. 12](#) ist eine Abbildung des pFOXEGFP.N2.CMV-Konstrukts, welches grün fluoreszierendes Protein unter Kontrolle eines CMV-Promotors codiert.

Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen

[0038] Bevor die vorliegenden Medikamente, Systeme und pharmazeutischen Zusammensetzungen zum genetischen Transformieren intestinaler Epithelzellen und zum Vorsehen einer Gentherapie beschrieben werden, wird darauf hingewiesen, dass die Erfindung nicht auf die beschriebenen bestimmten Methodologien, Protokolle, Zelllinien, Darmzellen, Vektoren und Reagenzien beschränkt ist und diese natürlich variieren können. Es wird ebenfalls darauf hingewiesen, dass die hier verwendete Terminologie nur dem Zweck des Beschreibens bestimmter Ausführungsformen dient und nicht dem Zweck, den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung zu begrenzen, welcher nur durch die beigefügten Patentansprüche begrenzt wird.

[0039] Es wird darauf hingewiesen, dass der bestimmte und unbestimmte Artikel im Singular den Plural einschließt, sofern nicht durch den Kontext deutlich anders vorgegeben. Somit beinhaltet zum Beispiel der Bezug auf "eine intestinale Epithelzelle" ebenfalls eine Vielzahl solcher Zellen, und der Bezug auf "den Transformationsvektor" beinhaltet den Bezug auf einen oder mehrere Transformationsvektoren und Äquivalente derselben, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, usw.

[0040] Sofern nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hier verwendet werden, die gleiche Bedeutung wie herkömmlich von einem Durchschnittsfachmann des Gebiets, zu dem die Erfindung gehört, verstanden wird. Obwohl alle Verfahren, Vorrichtungen und Materialien, die den hier beschriebenen gleich sind oder ähneln, in der Praxis oder beim Testen der Erfindung verwendet werden können, werden nachfolgend die bevorzugten Verfahren, Vorrichtungen und Materialien beschrieben.

[0041] Alle hier erwähnten Veröffentlichungen sind durch Bezugnahme eingegliedert zum Zweck des Beschreibens und Offenbarens von Zelllinien, Vektoren und Methodologien, welche in den Veröffentlichungen beschrieben sind und in Verbindung mit der vorliegend beschriebenen Erfindung verwendet werden können. Die

hier erwähnten Veröffentlichungen werden nur aufgrund ihres Einschließens vor dem Anmeldedatum der vorliegenden Erfindung vorgesehen. Nichts in dieser Beschreibung soll als Eingeständnis gedeutet werden, dass die Erfinder nicht das Recht haben, eine solche Offenbarung aufgrund von vorheriger Erfindung vorzudatieren.

Definitionen

[0042] Mit "Darm" wird der untere Teil des Verdauungstrakts bezeichnet, welcher sich vom Magen zum Anus erstreckt und aus einem gewundenen, oberen Teil (Dünndarm) und aus einem unterem Teil mit größerem Durchmesser (Dickdarm) besteht.

[0043] Mit "Dünndarm" wird der Teil des Darms bezeichnet, der aus Duodenum, Jejunum und Ileum besteht.

[0044] Mit "Dickdarm" wird der Teil des Darms bezeichnet, der aus Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Colon sigmoideum und Rectum besteht.

[0045] Mit "intestinaler Epithelzelle" wird eine Zelle bezeichnet, die in dem Gewebe enthalten ist, das die Lumenoberfläche des Darms bedeckt, einschließlich, aber nicht unbedingt darauf begrenzt, Absorptionszellen des Dünndarms, Zylinderepithelzellen des Dickdarms, Endokrinzellen (Dick- und Dünndarm) und Kryptenzellen (einschließlich Schleimdrüsenzellen, seröse Drüsenzellen und Stammzellen). Von besonderem Interesse sind "kurzlebige" Epithelzellen, d.h. Zellen, die sich innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Reifen in das Gastrointestinallumen verbreiten (im Gegensatz zu "langlebigen" Epithelzellen, wie beispielsweise Stammzellen).

[0046] Mit "Transformation" wird eine vorübergehende (d.h. episomale oder auf andere Art nicht-vererbare) oder dauerhafte (d.h. stabile oder vererbare) genetische Änderung bezeichnet, die in einer Zelle nach Einfügen von neuer DNA (d.h. für die Zelle exogener DNA) induziert wird.

[0047] Mit "nackter DNA" oder "nackter Nukleinsäure" oder DNA-Sequenz oder Ähnlichem wird ein Nukleinsäuremolekül bezeichnet, welches nicht in einem Viruspartikel enthalten ist. Nackte Nukleinsäure kann mit nicht-viralen Mitteln verbunden sein, um die Abgabe der Nukleinsäure an den Ort der Zielzelle zu erleichtern (zum Beispiel Mittel, welche den Weg der Nukleinsäure durch den Verdauungstrakt erleichtern, die Nukleinsäure vor Magensäure schützen, dazu dienen, den Darmschleim bis zur Oberfläche der Ziel-Epithelzelle zu durchdringen und/oder die Zellmembran zu durchdringen) und/oder virale oder nicht-virale Bestandteile, die als Adjuvantien dienen (z.B. Viruspartikel, welche zusammen mit der nackten DNA verabreicht werden, aber die an die Zielzellen abzugebende DNA nicht enthalten).

[0048] Mit "transformierte Zelle" wird eine Zelle bezeichnet, in welche (oder in einen Vorläufer derselben) mittels rekombinanter Nukleinsäuretechniken ein Nukleinsäuremolekül, d.h. eine Sequenz von Codonen, die aus Nukleinsäuren (z.B. DNA oder RNA) gebildet ist und die ein Protein von Interesse codiert, eingebracht wurde. Die eingebrachte Nukleinsäuresequenz kann als extrachromosomales oder chromosomales Element vorliegen.

[0049] Mit "DNA von Interesse" wird jede DNA-Sequenz bezeichnet, welche ein Protein oder ein anderes Molekül codiert, welches für die Abgabe (insbesondere intravenöse oder gastrointestinale Abgabe, ganz besonders intravenöse Abgabe) an ein Säugetier durch Transformation einer Darmzelle, vorzugsweise einer intestinalen Epithelzelle, wünschenswert ist. Die Sequenz ist im Allgemeinen wirksam mit anderen Sequenzen verknüpft, welche für ihre Expression erforderlich sind, wie beispielsweise ein Promotor. Der Begriff "DNA von Interesse" ist nicht auf DNA beschränkt, sondern beinhaltet jede Nukleinsäure (z.B. RNA oder DNA), welche ein für die Verabreichung wünschenswertes Protein oder ein anderes Molekül codiert.

[0050] Mit "Protein" wird ein Polypeptid (natürlich (d.h. natürlich auftretend) oder mutant), Oligopeptid, Peptid oder eine andere Aminosäuresequenz bezeichnet. Wie hier verwendet, ist "Protein" nicht auf natürliche oder vollständig lange Proteine beschränkt, sondern umfasst Proteinfragmente mit einer gewünschten Aktivität oder einer anderen gewünschten biologischen Eigenschaft sowie Mutanten oder Derivate solcher Proteine oder Proteinfragmente, welche eine gewünschte Aktivität oder eine andere biologische Eigenschaft aufweisen. Mutante Proteine umfassen Proteine mit einer Aminosäuresequenz, welche bezogen auf das natürliche Protein, von welchem es abgeleitet ist, verändert ist, wobei die Veränderungen Aminosäure-Substitutionen (konservativ oder nicht-konservativ), Deletionen, oder Additionen (z.B. wie in einem Fusionsprotein) beinhalten können. "Protein" und "Polypeptid" werden hier austauschbar verwendet, ohne dass beabsichtigt ist, den Bereich auch nur eines der Begriffe zu begrenzen.

[0051] Mit "Promotor" wird eine minimale DNA-Sequenz bezeichnet, die ausreichend ist, um Transkription zu richten. "Promotor" umfasst ebenfalls jene Promotorelemente, die für Promotor-abhängige Genexpression ausreichend sind, steuerbar für die Zellart spezifisch, für das Gewebe spezifisch oder durch äußere Signale oder Agenzien einleitbar; solche Elemente können an dem 5'- oder 3'-Bereich des natürlichen Gens angeordnet sein.

[0052] Mit "darmzellspezifischer Promotor" wird ein Promotor bezeichnet, welcher Expression einer wirksam verknüpften DNA-Sequenz richtet, wenn durch transkriptionale Aktivatorproteine gebunden, oder andere Transkriptionsregulatoren, welche für eine Darmzelle (z.B. eine intestinale Epithelzelle oder eine spezifische Art von intestinaler Epithelzelle (z.B. Dünndarmzelle, Dickdarmzelle, Drüsenzelle oder Absorptionszelle)) einzigartig sind. Zum Beispiel wird mit "darmzellspezifischem Promotor" ein darmzellspezifischer Promotor bezeichnet, welcher Expression in eine intestinale Epithelzelle richtet, wie z.B. Promotor von Sucrase, Lactasephlorizinhydrolase und Carboanhydrase. Beispielhafte Darmzellpromotoren werden beschrieben in Boll et al. 1991 Am. J. Hum. Genet. 48:889-902; Brady et al. 1991 Biochem. J. 277:903-5; Drummond et al. 1996 Eur. J. Biochem. 236:670-81; Olsen et al. 1994 FEBS Lett. 342:325-8; Rodolosse et al. 1996 Biochem. J. 315:301-6; Sowden et al. 1993 Differentittion 53:67-74; Traber 1990 Biochem. Biophys. Res. Commun. 173:765-73; Traber et al. 1992 Mol. Cell. Biol. 12:3614-27; Troelsen et al. 1994 FEBS Lett. 342:291-6; Troelsen et al. 1994 FEBS Lett. 342:297-301 und Troelsen et al. 1992 J. Biol. Chem. 267:20407-11.

[0053] Mit "wirksam verknüpft" wird bezeichnet, dass eine DNA-codierende Sequenz und (eine) Regulatorsequenz/en auf eine solche Art verbunden sind, dass Genexpression der codierenden Sequenz ermöglicht wird, wenn die geeigneten Moleküle (z.B. transkriptionale Aktivatorproteine) mit der/den Regulatorsequenz/en verbunden sind.

[0054] Mit "operativ eingesetzt" wird bezeichnet, dass die in die Zelle eingeführte DNA von Interesse angengend an eine DNA-Sequenz angeordnet ist, welche Transkription und Translation der eingebrachten DNA richtet (d.h. die Produktion von z.B. einem Polypeptid, das von einer DNA von Interesse codiert ist, erleichtert), und somit derart angeordnet ist, dass die codierende Sequenz exprimiert wird.

[0055] Mit "Säugetier" oder "Säugetierpatient" wird jedes Säugetier bezeichnet, für welches die Gentherapie gewünscht ist, einschließlich Menschen, Schweinen, Rindern, Pferden, Hunden und Katzen.

[0056] Mit "im Wesentlichen frei" (z.B. wie bei dem Begriff "im Wesentlichen frei von Lipofectin, Dendrimeren und Viruspartikeln" (insbesondere Viruspartikel, die geeignet sind, eine Nukleinsäuresequenz in eine Wirtszelle einzubringen)) wird bezeichnet, dass relativ wenig oder im Wesentlichen nichts der genannten Verbindung oder dem Agens enthalten ist, z.B. die Formulierung relativ wenig oder im Wesentlichen nichts von der genannten Verbindung oder dem Agens enthält, z.B. die genannte Verbindung oder das Agens im Wesentlichen zu weniger als 5% der gesamten Zusammensetzung, vorzugsweise weniger als 1 %, noch bevorzugter weniger als 0,1 %, am meisten bevorzugt weniger als 0,01 % bis 0,001 % bis zu nicht erkennbaren oder verunreinigenden Mengen vorhanden ist.

Überblick über die Erfindung

[0057] Die vorliegende Erfindung bietet Zusammensetzungen und Medikamente zur Abgabe eines Genprodukts durch genetische Veränderung einer Darmzelle, vorzugsweise einer intestinalen Epithelzelle eines Säugetierpatienten. Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) ist ein hohler Schlauch, welcher einen ununterbrochenen Weg durch den Körper bildet. Zellen, die ihn von dem wirklichen Körperinnern trennen, säumen seinen Innenraum oder "Lumen". Das Lumen des GI-Trakts ist tatsächlich "außerhalb" des Körpers und wird von diesem von einer einzelnen ununterbrochenen Zellschicht ([Fig. 1](#)) getrennt. Alles, was über den Mund in den GI-Trakt gelangt, bleibt in diesem Außenraum und kann nicht in den eigentlichen Körper und dessen Blutbahn eingehehen, bis es nicht zuerst die Zellen durchquert hat, welche den GI-Trakt säumen.

[0058] Die therapeutische Genproduktabgabe konzentriert sich auf die Zellen, welche das Lumen des GI-Trakts säumen. Durch Abgabe der transformierenden Formulierung, welche die DNA von Interesse aufweist, in den GI-Trakt (z.B. über den Mund) geht die therapeutische DNA von Interesse nicht in die Blutbahn des Patienten ein. Die Formulierung, welche die DNA von Interesse aufweist, extern verabreicht, wird von Zellen absorbiert, welche das Lumen des GI-Trakts säumen. Die DNA wird dann in diese Zellen exprimiert.

[0059] Vorzugsweise exprimieren die transformierten Darmzellen ein Protein, das von der DNA von Interesse codiert wird, und sekretieren eine therapeutisch wirksame Menge des Proteins in die Blutbahn oder in den Gas-

trointestinaltrakt, vorzugsweise über natürliche Sekretionswege in die Blutbahn. Sind sie erst einmal in die Zirkulation gelangt, wirken die therapeutischen Proteine, die als Ersatzproteintherapie dienen, auf die gleiche Weise, als wenn sie natürlich von dem Säugetier exprimiert wären. Alternativ oder zusätzlich weist, wenn das therapeutische Genprodukt ein exogenes Protein ist, das eine gewünschte therapeutische Wirkung (z.B. antibiotische Aktivität) bietet, das Medikament die gleiche Aktivität auf, als wenn es über herkömmliche Injektionsverfahren abgegeben wäre. Die endgültigen therapeutischen Wirkungen sind die gleichen, aber die Haupteinschränkungen von Proteinen als Arzneimittel werden vermieden. Somit kann die Erfindung als Plattform dienen, um rekombinante DNA durch den Mund an Zellen des Darmtrakts (d.h. auf dem enterischen Weg) zu verabreichen, was die Abgabe einer breiten Vielfalt von Proteinarzneimitteln, sowohl systemisch als auch lokal, ermöglicht, wodurch die Erfindung für ein breites Spektrum therapeutischer Anwendungen gut geeignet ist.

[0060] Vorzugsweise ist die Darmzelle, in welche die DNA von Interesse eingebracht und exprimiert wird, eine Epithelzelle des Darms und kann entweder eine Darmzelle des Dünndarms oder des Dickdarms sein. Durch genetische Veränderung intestinaler Epithelzellen kann das Verfahren der Erfindung kurzzeitige Exprimierung der DNA von Interesse bieten. Obwohl die meisten Ansätze an genbasierende Therapie langzeitige Exprimierung des therapeutischen Gens erfordern und erstreben, wird in der vorliegenden Erfindung kurzzeitige Exprimierung verwendet, was eine Vielzahl bedeutender Vorteile bietet. Zuerst ermöglicht kurzzeitige Exprimierung das Anpassen der Dosis des therapeutischen Gens entsprechend den Bedürfnissen des Patienten. Diese Fähigkeit ist eine Konsequenz der Tatsache, dass die Zellen, welche den Darm säumen, normalerweise innerhalb von zwei oder drei Tagen ([Fig. 2](#)) verschwunden sind. Wenn die Behandlung als kurzzeitig beabsichtigt ist oder diese nicht länger gewünscht wird, wird die verabreichte DNA schnell aus dem Körper zusammen mit den Darmzellen, die diese enthalten, abgeführt. Des Weiteren wird die Gefahr von langzeitigen Komplikationen von DNA-Integration (d.h. Mutagenese) aufgrund der Tatsache, dass die Zielzellen kurzlebig und an den Enden differenziert sind.

[0061] Vorzugsweise codiert die DNA von Interesse entweder Insulin, ein Wachstumshormon, Gerinnungsfaktor VIII, Intrinsic-Faktor, Erythropoietin, Faktor IX sowie alle anderen Blutfaktoren, die fehlen können, z.B. Plasmaproteine, Hormone oder Plasmaproteine-Inhibitoren. Die DNA von Interesse ist wirksam mit einem Promotor verknüpft, der geeignet ist, das Gen von Interesse in geeigneten Mengen zu exprimieren. Promotoren schließen sowohl überall wirkende Promotoren, wie beispielsweise virale CMV- und RSV-Promotoren, oder darmzellspezifische Promotoren, wie beispielsweise Sucrase- oder Lactase-Promotoren, ein (Traber et al. *Molec. Cell. Biol.*, 1992, 12(8):3614-27).

[0062] Die Erfindung wird nun genauer beschrieben.

Vektoren und Konstrukte

[0063] Jeder Nukleinsäurevektor mit einem eukaryotischen Promotor, der wirksam mit einer DNA von Interesse verknüpft ist, kann bei der Erfindung verwendet werden, um eine Darmzelle umzuwandeln. Die Vektoren, welche die DNA-Sequenz (oder die entsprechende RNA-Sequenz) enthalten, welche gemäß der Erfindung verwendet werden können, können alle eukaryotischen Expressionsvektoren sein, welche die DNA- oder die RNA-Sequenz von Interesse enthalten. Zum Beispiel kann ein Plasmid gespalten werden, um lineare DNA mit verbindbaren Endstellen vorzusehen. Diese Endstellen werden an exogene DNA gebunden, welche komplementäre, ähnliche verbindbare Endstellen aufweist, um ein biologisch funktionelles rekombinantes DNA-Molekül mit intaktem Replikon und einer gewünschten phänotypischen Eigenschaft vorzusehen.

[0064] Techniken zur Produktion von Nukleinsäurekonstrukten für die Expression von exogenen DNA- oder RNA-Sequenzen in einen Wirt sind im Stand der Technik bekannt (siehe beispielsweise Kormal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:2150:2154, 1987; Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; welche jeweils durch Bezugnahme im Hinblick auf Verfahren und Zusammensetzung für eukaryotische Expression einer DNA von Interesse hier eingeschlossen sind).

[0065] Verschiedene Vektoren (z.B. bakterielle Vektoren oder Vektoren, die für Replikation in eukaryotischen und prokaryotischen Wirten geeignet sind) können gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Vorzugsweise ist der Vektor zur Replikation sowohl in eukaryotischen als auch prokaryotischen Wirten geeignet. Zahlreiche Vektoren, welche in eukaryotischen und prokaryotischen Wirten replizieren können, sind im Stand der Technik bekannt und sind kommerziell erhältlich. Im Allgemeinen sind solche Vektoren, die gemäß der Erfindung verwendet werden, aus einer bakteriellen Replikationsquelle und einem eukaryotischen Promotor zusammengesetzt, der wirksam mit einer DNA von Interesse verknüpft ist.

[0066] Vorzugsweise enthält das DNA-Konstrukt einen Promotor, um die Expression der DNA von Interesse innerhalb einer intestinalen Epithelzelle zu erleichtern. Vorzugsweise ist der Promotor ein starker eukaryotischer Promotor. Beispielhafte eukaryotische Promotoren zum Erleichtern der Transkription in eine eukaryotische Zelle schließen Promotoren des Zytomegalievirus (CMV), Maus-Brusttumovirus (MMTV = mouse mammary tumor virus), Rous Sarcomavirus (RSV) und Adenovirus ein. Genauer schließen beispielhafte Promotoren den Promotor des frühen Sofortgens von menschlichem CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985) und den Promotor des langen periodischen Endstücks (LTR = long terminal repeat) von RSV (Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781, 1982) ein. Von diesen beiden ist der CMV-Promotor bevorzugt, da er höhere Expressionsmengen bietet als der RSV-Promotor.

[0067] Für eukaryotische Expression (z.B. in eine intestinale Epithelzelle) weist das Konstrukt vorzugsweise wenigstens einen eukaryotischen Promotor auf, der wirksam mit einer DNA von Interesse verknüpft ist, welche wiederum mit einer Polyadenylierungs-Sequenz wirksam verknüpft ist. Als Polyadenylierungs-Signalsequenz kann jede aus einer Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Polyadenylierungs-Signalsequenzen gewählt sein. Vorzugsweise ist die Polyadenylierungs-Signalsequenz die SV40 Late-Polyadenylierungs-Signalsequenz. Das Konstrukt kann ebenfalls Sequenzen zusätzlich zu Promotoren einschließen, welche die Expression in intestinale Epithelzellen verbessern (z.B. Enhancer-Sequenzen, Introne). Zum Beispiel kann das Konstrukt ein oder mehrere Introne einschließen, welche Expressionsmengen der DNA von Interesse steigern können, insbesondere in dem Fall, in dem die DNA von Interesse eine cDNA ist (z.B. keine Intronen der natürlich auftretenden Sequenz enthalten). Alle einer Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Intronen können verwendet werden. Vorzugsweise ist das Intron das menschliche β -Globin-Intron und in das Konstrukt an einer Position 5' zu der DNA von Interesse eingesetzt.

[0068] Andere Komponenten wie beispielsweise ein Marker (z.B. ein antibiotisches Resistenz-Gen (wie beispielsweise ein Ampicillin-Resistenz-Gen) oder β -Galactosidase), um bei der Auswahl von Zellen zu helfen, welche das Konstrukt enthalten und/oder exprimieren (z.B. während des Vorgangs der Vektorkonstruktion), eine Replikationsquelle zur stabilen Replikation des Konstrukts in eine Bakterienzelle (vorzugsweise eine Replikationsquelle mit hoher Vervielfältigungszahl), ein nukleares Lokalisierungssignal oder andere Elemente, welche die Produktion des DNA-Konstrukts, des von diesem codierten Proteins oder beides erleichtern. Eine schematische Darstellung eines in dem Verfahren der Erfindung nützlichen Konstrukts ist in [Fig. 3](#) dargestellt.

Geeignete therapeutische Genprodukte und Bedingungen für die Behandlung durch Darmzell-Gentherapie

[0069] Die DNA von Interesse kann jede DNA-Sequenz sein, die irgendein Protein oder anderes Genprodukt codiert, das für intravenöse Therapie und/oder Therapie für den Gastrointestinaltrakt wünschenswert ist. Zum Beispiel ist intravenöse Proteintherapie geeignet bei der Behandlung eines Säugetiers mit einer angeborenen oder erworbenen Krankheit, die mit einem bestimmten Proteinmangel verbunden ist (z.B. Diabetes, Hämophilie, Anämie, schwere kombinierte Immunschwächekrankheit). Solche Proteinmangelzustände sind geeignet für die Behandlung durch Ersatztherapie, d.h. Expression eines Proteins, um die Mengen des Proteins in der Blutbahn auf wenigstens normale Mengen wiederherzustellen.

[0070] Alternativ kann das Säugetier einen Zustand aufweisen, welcher geeignet ist für die Behandlung durch Expression oder Überexpression eines Proteins, welches entweder normalerweise in einem gesunden Säugetier vorhanden ist oder für das Säugetier fremd ist. Zum Beispiel kann intravenöse Proteintherapie bei der Behandlung eines Säugetierpatienten mit einer viralen Infektion (z.B. humanes Immunschwächevirus (HIV), Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Herpes-Simplex-Virus (HSV)), bakterielle Infektion, Pilzinfektion und/oder parasitäre Infektion, insbesondere wenn die Infektion chronisch ist, d.h. über eine relativ lange Zeitspanne andauert, verwendet werden. Die Darmzell-Gentherapie der Erfindung kann ebenfalls verwendet werden, um die Expression eines Proteins zu verbessern, das normalerweise in einem normalen Säugetier vorhanden ist, oder um ein Protein zu exprimieren, dass normalerweise nicht in einem normalen Säugetier vorhanden ist, um eine gewünschte Wirkung zu erzielen (z.B. um einen normalen Stoffwechselvorgang zu verbessern). Zum Beispiel können Zellen des Darmtrakts einer Milchkuh mit DNA transformiert werden, welche das Rinderwachstumshormon (BGH = bovine growth hormone) codiert, um die Mengen an BGH in der Blutbahn zu verbessern und die Milchproduktion zu steigern.

[0071] Alternativ kann die DNA von Interesse eine DNA sein, welche ein Genprodukt codiert, das einen Mangel in der für die Genänderung angezielten Darmzelle reparieren kann. Zum Beispiel kann die DNA Genprodukte codieren, die mit Lipoproteinproduktion durch Darmzellen verbunden sind.

[0072] Die DNA von Interesse wird vorzugsweise aus einer Quelle der gleichen Art wie das zu behandelnde

Säugetier erhalten (z.B. Mensch zu Mensch), aber dies ist kein absolutes Erfordernis. DNA, die von einer zu dem Säugetier unterschiedlichen Art erhalten wird, kann ebenfalls verwendet werden, insbesondere wenn die Aminosäuresequenzen der Proteine in hohem Maße konserviert sind und das xenogene Protein nicht in so hohem Maße immunogen ist, um eine wesentliche, ungewünschte Antikörperreaktion gegen das Protein in dem Säugetierwirt hervorzurufen. Des Weiteren kann die DNA synthetisch durch chemische Synthese und/oder genetische Erzeugung an Zellen hergestellt werden.

[0073] Beispielhafte, bevorzugte DNAs von Interesse schließen rekombinante oder isolierte DNA-Sequenzen ein, welche Insulin, Wachstumshormon, Gerinnungsfaktor VIII, Intrinsic-Faktor und Erythropoietin codieren. Von besonderem Interesse ist eine intravenöse Proteintherapie eines Säugetiers (z.B. einer Kuh, eines Hundes, einer Katze, eines Pferdes oder eines Menschen, vorzugsweise einer Kuh oder eines Menschen, noch bevorzugter eines Menschen) durch Expression von DNA, welche ein Protein (z.B. Insulin, Wachstumshormon, Gerinnungsfaktor VIII oder Erythropoietin) in einer transformierten Darmzelle eines Säugetiers codiert.

[0074] Vorzugsweise ist der Patient ein Mensch, und die exprimierte DNA codiert ein menschliches Protein (z.B. menschliches Insulin, menschliches Wachstumshormon, menschlichen Gerinnungsfaktor VIII oder menschliches Erythropoietin). Weitere beispielhafte DNAs von Interesse schließen Gewebe-Plasminogenaktivator (tPA), Urokinase, Streptokinase, sauren Fibroblasten-Wachstumsfaktor, basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor, Tumor-Nekrose-Faktor alpha, Tumor-Nekrose-Faktor β , transformierenden Wachstumsfaktor β , aus Thrombozyten stammenden Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF), Endothelien, und lösliches CD4 ein. Im Allgemeinen können die DNAs von Interesse eine Sequenz sein, die ein Gen codiert, das die Produktion eines Genprodukts senkt (z.B. Gene, die an der Lipoproteinproduktion durch Därme beteiligt sind) oder können Nukleinsäuren sein, welche keine Gene codieren (z.B. Ribozyme oder Antisense-Nukleinsäuren), aber die nützlich sind, um die Lipoproteinproduktion durch die Därme zu mindern. Die DNAs von Interesse können ebenfalls synthetische Nukleinsäuren sein, z.B. modifizierte synthetische Basen, welche die Empfindlichkeit der DNA von Interesse auf endogene Nukleasen verändern oder die Zellaufnahme steigern. Die DNAs von Interesse können ein Genprodukt für Immuntherapie codieren, welches die Entwicklung von Immunität gegenüber Infektion erleichtern kann, oder die Entwicklung von Toleranz für die Behandlung der Autoimmunkrankheit wie bei Typ I-Diabetes mellitus oder Gelenkrheumatismus. Tabelle 1 sieht eine Liste von beispielhaften Proteinen und Proteinklassen vor, welche von der Darmzellgentherapie der Erfindung abgegeben werden können.

Tabelle 1: Beispielhafte Proteine und Proteinklassen zur Verwendung mit der Erfindung

spezifische beispielhafte Proteine	
Insulin	Interferon- α 2B
Humanes Wachstumshormon (hGH)	transformierender Wachstumsfaktor (TGF)
Erythropoietin (EPO)	ciliärer neurotropher Faktor (CNTF)
Gerinnungsfaktor VIII	Insulinartiger Wachstumsfaktor-1 (IGF-1)
Rinderwachstumshormon (BGH)	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
PDGF (aus Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor)	Interferon- α 2A
Gerinnungsfaktor VIII	Hirnstämmiger neurotropher Faktor (Brain-Derived Neurite Factor (BDNF))
Thrombopoietin (TPO)	Insulintropin
IL-1	Gewebeplasminogenaktivator (tPA)
IL-2	Urokinase
IL-1 RA	Streptokinase
Superoxid-Dismutase (SOD)	Adenosindeamidase
Katalase	Calcitonin
Fibroblasten-Wachstumsfaktor (sauer oder basisch)	Arginase
NGF (Nervenwachstumsfaktor)	Phenylalaninammoniumlyase
G-CSF (Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor)	γ -Interferon
L-Asparaginase	Pepsin
Uricase	Trypsin
Chymotrypsin	Elastase
Carboxypeptidase	Lactase
Sucrase	Intrinsic-Faktor
Calcitonin	Parathyroidhormon- (PTH-) artiges Hormon
Ob Genprodukt	Cholecystokinin (CCK)
Glucagon	Insulinotrophe Hormone
glucagonartiges Peptid I (GLP-1)	
Beispielhafte Proteinklassen	
Proteasen	Hypophysenhormone
Protease-Inhibitoren	Wachstumsfaktoren
Zytokine	Somatoadine
Chemokine	Immunoglobuline
Gonadotrophine	Interleukine
Chemotaktine	Interferone
fettbindende Proteine	

[0075] Verschiedene Krankheitsbedingungen sind für die Behandlung unter Verwendung der Darmzell-Gen-therapie der Erfindung geeignet. Der Durchschnittsfachmann kann das geeignete Protein, das durch die Erfindung zum Behandeln bestimmter Krankheitsbedingungen produziert werden sollte, erkennen. Beispielhafte

Krankheiten, die für die Behandlung unter Verwendung der Erfindung geeignet sind, und beispielhafte geeignete Proteine, welche bei der Behandlung dieser Krankheiten verwendet werden können, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Beispielhafte Krankheitsbedingungen, die für Behandlung unter Verwendung der Erfindung geeignet sind

<u>Enzymmangel</u> Adenosindeaminase ¹ Purinnukleotidphosphorylase Galactosidase β -Glucuronidase	<u>Endotoxischer Schock/Sepsis</u> fettbindendes Protein (LBP)
<u>Antioxidantien für Krebstherapie</u> Superoxid-Dismutase Katalase	<u>Anämie</u> Erythropoietin
<u>Krebs</u> α -Interferon γ -Interferon α -IL1 Phenylalaninammoniumlyase Arginase L-Asparaginase Uricase G-CSF (Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor) monoklonale Antikörper Gewebe-Nekrose-Faktor	<u>Wachstumsfaktoren (zur Verwendung bei Wundheilung, Induktion roter Blutzellbildung etc.)</u> epidermaler Wachstumsfaktor G-CSF γ -Interferon transformierender Wachstumsfaktor Erythropoietin Thrombopoietin insulinartiger Wachstumsfaktor-1 Insulin humanes Wachstumshormon
<u>Kardiovaskuläre Krankheit</u> Gewebeplasminogenaktivator Urokinase (natürlich oder chimär) α_1 -Antitrypsin Antithrombin-III andere Proteasen oder Protease-Inhibitoren Apolipoproteine (insbesondere B-48) zirkulierender Scavenger Rezeptor APO A1 ²	<u>Diabetes</u> Insulin Glucagon insulinotrophes Hormon
	<u>Gerinnungsstörungen</u> Gerinnungsfaktor VIII
<u>Fettleibigkeit und Ernährung</u> Ob Genprodukt Cholecystokinin (CCK)	<u>Gastrointestinale und pankreatische Mangel</u> Pepsin (für ösophagealen Reflux) Trypsin Chymotrypsin Elastase Carboxypeptidase Lactose (für Lactosemangel) Sucrase Intrinsic-Faktor (Anaemia perniosa)
<u>Knochenkrankheiten</u> Calcitonin PTH-artiges Hormon	
<u>Organ-spezifische Autoimmunkrankheiten</u> (Antikörperziel in Klammern) Myasthenia gravis (Acetylcholinrezeptoren) Graves' Krankheit (Thyroid-stimulierender Hormonrezeptor) Thyroiditis (Schilddrüse-Peroxidase) insulinresistente Diabetes mit Acanthosis nigricans oder mit Ataxia telangiectasia (Insulinrezeptor) allergischer Schnupfen, Asthma (Beta ₂ -adrenerge Rezeptoren) insulinabhängige Jugenddiabetes (Insulin, GAD65) Anaemia perniosa (gastrische parietale Zellen, Vitamin-B12- Bindungsstelle des Intrinsic-Faktors) Addison's Krankheit (Adrenalzellen) idiopathischer Hypoparathyroidismus (Paraschilddrüsenzellen) plötzliche Unfruchtbarkeit (Sperma) vorzeitige Ovarialinsuffizienz (Interstitialzellen, Corpus luteum-Zellen) Pemphigus (interzelluläre Substanz von Haut und Schleimhaut) bullöses Pemphigoid (Basalmembranzone von Haut und Schleimhaut) primäre Gallenzirrhose (Mitochondrien) hämolytische Autoimmunanämie (Erythrozyten) idiopathische thrombozytopenische Purpura (Thrombozyten) idiopathische Neutropenie (Neutrophile) Vitiligo (Melanozyten) Osteosklerose und Morbus Menière (Typ-II-Kollagen) chronische aktive Hepatitis (Zellkerne von Hepatozyten)	
<u>Systemische Autoimmunkrankheiten</u> (Körperfehler/betroffenes Organ in Klammern) Goodpasture-Syndrom (Basalmembran) Gelenkrheumatismus (γ -Globulin, EBV-verwandte Antigene, Kollagentypen II und III) Sjögren-Syndrom (γ -Globulin, SS-A (Ro), SS-B (La)) systemisches Lupus erythematodes (Zellkerne, doppelstrangige DNA, einzelstrangige DNA, Sm, Ribonukleoprotein, Lymphozyten, Erythrozyten, Neuronen, γ -Globulin) Sclerodermie (Zellkerne, Scl-70, SS-A (Ro), SS-B (La), Zentromer) Polymyositis (Zellkerne, Jo-1, PL-7, Histidyl-tRNA-Synthetase, Threonyl-tRNA-Synthetase, PM-1, Mi-2) rheumatisches Fieber (Myocardium, Herzklappen, Plexus choroideus)	
¹ Zur Behandlung schwerer kombinierter Immunschwäche	
² Wandelt niedrigdichte Lipoproteine in hochdichte Lipoproteine um	

[0076] Zahlreiche Proteine, die für intravenöse Proteintherapie wünschenswert sind, sind im Stand der Technik bekannt, und die DNA, die diese Proteine codiert, wurde isoliert. Zum Beispiel ist die Sequenz der DNAs, welche Insulin, menschliches Wachstumshormon, Intrinsic-Faktor, Gerinnungsfaktor VIII und Erythropoietin codieren, von der GenBank erhältlich und/oder wurden in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben (z.B. menschliches Gerinnungsfaktor VIII-Gen: Gitschier et al., *Nature* 312:326-330, 1984; Wood et al., *Nature* 312:330-337, 1984; menschlicher Intrinsic-Faktor: Hewitt et al., *Genomics* 10:432-440, 1991). Proteine, die für gewöhnlich bei Behandlungen verwendet werden, können für die Gentherapieverfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Solche Proteine sind beispielsweise in der Physicians' Desk Reference (1994 Physicians' Desk Reference, 48th Ed., Medical Economics Data Production Co., Montvale, NJ; eingeschlossen durch Bezug) beschrieben und können unter Verwendung von Verfahren dosiert werden, die beschrieben sind in Harrison's Principles of Internal Medicine und/oder dem AMA "Drug Evaluations Annual" 1993, welche alle durch Bezug eingeschlossen sind.

[0077] In dem Fall, in dem die DNA, welche ein Protein von Interesse codiert, noch nicht isoliert wurde, kann dies durch verschiedene Standardprotokolle, die dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt sind, erreicht werden (siehe zum Beispiel Sambrook et al., *ibid*; Suggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78:6613-6617, 1981; US-Patent Nr. 4,394,443; welche jeweils hier durch Bezug eingeschlossen sind bezogen auf die Identifizierung und Isolierung von DNA, welche ein Protein von Interesse codiert). Zum Beispiel können genomische oder cDNA-Klone, welche ein bestimmtes Protein codieren, aus genomischen oder cDNA-Bibliotheken isoliert werden unter Verwendung von Hybridisierungs sonden, die auf der Basis des Nukleotids oder der Aminosäuresequenzen für das gewünschte Gen gestaltet sind. Die Sonden können durch chemische Synthese oder durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) unter Verwendung von Primern basierend auf Sequenzdaten konstruiert werden, um DNA-Fragmente aus Pools oder Bibliotheken (US-Patent Nrn. 4,683,195 und 4,683,202) zu amplifizieren. Nukleotidsubstitutionen, -deletionen, -additionen und Ähnliches können ebenfalls in die Nukleotide eingeschlossen werden, sofern die Fähigkeit des Polynukleotids zu hybridisieren nicht wesentlich gestört wird (Sambrook et al. *ibid*). Die Klone können exprimiert werden, oder die DNA von Interesse kann herausgeschnitten oder zur Verwendung in anderen Konstrukten synthetisiert werden. Wenn gewünscht, kann die DNA von Interesse unter im Stand der Technik wohlbekannten Verfahren sequenziert werden.

[0078] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das für die vorliegende Erfindung verwendete Konstrukt gestaltet, um die Proteinsekretion von der transformierten intestinalen Epithelzelle in die Blutbahn zu verbessern. Intestinale Epithelzellen sind normalerweise polarisiert, wobei die apikale Fläche zu dem Lumen des Gastrointestinaltrakts ausgerichtet ist und die basolaterale Fläche zur Blutzufuhr ausgerichtet ist.

[0079] Das intestinale Epithel ist bei Tieren die hauptabsorbierende Fläche und transportiert als solche vorzugsweise Substanzen von dem intestinalen Lumen ins Blut. Obwohl diese Vorgänge für Hexosen, Aminosäuren und Elektrolyte weitestgehend studiert wurden, wurde immer klarer, dass auch größere Moleküle absorbiert werden. Zum Beispiel werden kleine Polypeptide in Absorptionszellen absorbiert, und bei neugeborenen Tieren wird Antigenizität erzielt als Ergebnis der Absorption mütterlicher Antikörperproteine. Es ist ebenfalls eine Vielzahl von Beweisen vorhanden, dass zahlreiche Verdauungsenzyme von dem Pankreas sowie andere große Moleküle, wie beispielsweise Insulin und Albumin, das intestinale Epithel mit Wesentlichen Geschwindigkeiten (siehe Literaturangaben) durchqueren. In der Tat sickert der gesamte Plasma-Albumin-Pool jeden Tag durch das intestinale Epithel.

[0080] Permeabilität für Proteine wurde hauptsächlich beim Duodenum und End-Ileum festgestellt, aber es ist ebenfalls bekannt, dass Proteine von den unteren Bereichen des Dickdarms absorbiert werden, und Zäpfchen wurden zu diesem Zweck therapeutisch verwendet. Für Beschreibungen der intestinalen Absorption von Proteinen siehe z.B. Liebow et al. 1975 *Science* 189:472-474; Goetze et al. 1975 *Nature* 257:607-609; Goetze et al. 1976 *Lancet* ii:494-495; Goetze et al. 1978 *Biochim. Biophys. Acta* 512:214-220; Heinrich et al. 1979 *Klin Wochenschr* 57:1295-1297; Lake-Bakaar et al. 1980 *Gut* 21:580-586; Martin et al. 1957 *Nature* 199:815-817; Avakian et al. 1964 *Clin. Pharmacol. Ther.* 5:712-715; Megel et al. 1964 *Arch. Biochem. Biophys.* 108:193-199; Alpers et al. 1967 *J. Biol. Chem.* 242:5617-5622; Katayama et al. 1972 *Biochim. Biophys. Acta* 288: 172-180; Katayama et al. 1972 *Biochim. Biophys. Acta* 288:181-189; Urban et al. 1982 *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1:267-272; Katayama et al. 1968 *Biochim. Biophys. Acta* 167:613-; Moriya et al. 1967 *Chem. Phar. Bull.* 15:1662-1668; Ambrus et al. 1967 *Clin. Pharmacol. Ther.* 8:362-368; Alpers et al. 1970 *M. Gastroenterology* 58:833-842; Brambel, F.W.R. 1958 *Biol. Rev.* 33:488-; Lev et al. 1973 *Gastroenterologia* 65:60-; Waller et al. 1972 *Nature* 177:608; Danforth et al. 1959 *Endocrinology* 65:118; und Warshaw et al. 1974 *Gastroenterologia* 66:987. Proteine, die im Darm hergestellt werden und für die Sekretion in das Blut angezielt werden, beinhalten Hormone wie beispielsweise CCK (Cholecystokinin), Sekretin, Darm-Glucagon, vasoaktives intestinales Pep-

tid (VIP), gastroinhibitorisches Peptid (GIP), Somatostatin, Neuropeptid Y (NPY), Islet Amyloid Polypeptid (IAPP), Polypeptid Y (PPY), Glucagon-ähnliches Peptid I (GLPI) sowie eine Vielzahl von Lipoproteinen, die bei Fettstoffwechsel wichtig sind.

[0081] Die DNA von Interesse enthält vorzugsweise ein Sekretionssignal, welches die Sekretion des Proteins hauptsächlich in die Blutbahn richtet. Sekretionssignale können zum Beispiel durch Stellen-gerichtete Mutagenese von DNA, die ein Blutbahn-angezieltes Protein (z.B. Insulin) codiert, identifiziert werden. Die Mutanten können beobachtet werden durch Expression der mutierten DNA in Darmzellen und anschließendes Bestimmen des Verhältnisses von beispielsweise Expression im Lumen zu intravenöser Expression. Alternativ können intravenös gerichtete Sekretionssignale ebenfalls identifiziert werden durch Konstruieren rekombinanter, chimärer Proteine, die zum Beispiel aus einem vermeintlichen intravenösen Sekretionssignal bestehen, das in ein intestinales, Lumen-gerichtetes Protein eingesetzt ist. Intravenöse Sekretionssignale würden dann aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, Expression des Lumengerichteten Proteins zurück in die Blutbahn zu richten. Vermeintliche intravenöse Sekretionssignale können ebenfalls durch Vergleich von DNA und Aminosäuresequenzen von Proteinen identifiziert werden; welche vorzugsweise in die Blutbahn sekretiert werden. Homologe Bereiche oder gemeinsame Einheiten unter den Proteinen könnten dann wie oben beschrieben getestet werden.

[0082] Die DNA von Interesse kann in ein Konstrukt eingesetzt werden, so dass das therapeutische Protein als Fusionsprotein exprimiert wird (z.B. ein Fusionsprotein mit β -Galactosidase oder einem Bereich davon an dem N-terminalen und dem therapeutischen Protein an dem C-terminalen Bereich). Produktion eines Fusionsproteins kann die Identifizierung transformierter Zellen, welche das Protein exprimieren, erleichtern (z.B. durch Enzym-gebundenen Immunosorbent-Test (ELISA) unter Verwendung eines Antikörpers, welcher sich an das Fusionsprotein bindet).

[0083] Es kann ebenfalls wünschenswert sein, geänderte Formen des therapeutischen Proteins zu produzieren, welche zum Beispiel Protease-resistent sind oder eine verbesserte Aktivität bezogen auf Wild-Typ-Protein aufweisen. Wenn ein zu sekretierendes Protein eine Verarbeitung erfordert, die in Darmzellen nicht verfügbar ist, kann das Protein modifiziert werden, um korrekte Verarbeitung zu ermöglichen. Zum Beispiel kann Proinsulin modifiziert werden, um das Verarbeiten zu reifem Insulin in Darmzellen zu ermöglichen. Des Weiteren kann es wünschenswert sein, wenn das therapeutische Protein ein Hormon ist, die Fähigkeit des Proteins, dimer oder multimere Komplexe zu bilden, zu ändern. Zum Beispiel weist Insulin, das modifiziert wurde, um seine Dimerisierung zu verhindern, ein schnelleres Einsetzen der Aktion bezogen auf Wildtyp-, dimerisiertes Insulin, auf.

[0084] Das Konstrukt, welches die DNA von Interesse enthält, kann ebenfalls so gestaltet werden, dass es stellenspezifische Integration in das Genom der Ziel-Darmzelle vorsieht. Zum Beispiel kann ein Konstrukt derart hergestellt werden, dass die DNA von Interesse und der Promotor, an welchen diese wirksam geknüpft ist, von den positionsspezifischen Integrationsmarkern von *Saccharomyces cerevisiae* Ty3 flankiert werden. Das Konstrukt für stellenspezifische Integration enthält zusätzlich DNA, die eine positionsspezifische Endonuklease codiert, welche die Integrationsmarker erkennt. Solche Konstrukte ziehen Vorteil aus der Homologie zwischen dem Ty3-Retrotransposon und verschiedenen tierischen Retroviren. Das Ty3-Retrotransposon erleichtert Einsetzen der DNA von Interesse in den 5' flankierenden Bereich vieler unterschiedlicher tRNA-Gene, wodurch eine effizientere Integration der DNA von Interesse ohne Nebenwirkung auf die erzeugte rekombinante Zelle vorgesehen wird. Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung solcher zellenspezifischer Konstrukte sind in US-Patent Nr. 5,292,662 beschrieben, welche hier durch Bezug im Hinblick auf die Konstruktion und Verwendung solcher stellenspezifischer Insertionsvektoren eingeschlossen sind.

Intravenöse Proteintherapie durch Transformation von Darmzellen

[0085] Intestinale Epithelzellen, die gemäß der Erfindung transformiert wurden, erleichtern die Expression einer DNA von Interesse und können in großen Mengen exprimiert werden, insbesondere, wenn die DNA von Interesse wirksam mit einem starken eukaryotischen Promotor (z.B. CMV-, MMTV-Promotoren) verknüpft ist. Das exprimierte Protein wird dann in die Blutbahn sekretiert. Das so exprimierte und sekretierte Protein ist somit bei der Behandlung eines Säugetiers bei einer Vielzahl von Zuständen nützlich.

[0086] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Proteine in die Blutbahn in Mengen sekretiert, die für intravenöse Proteintherapie ausreichend sind. Die Mengen an therapeutischem Protein in der Blutbahn können durch Integration mehrerer Kopien der DNA von Interesse in das Genom der Zielzellen erhöht werden und/oder indem ein starker Promotor (z.B. ein Promotor von CMV) und/oder Enhancer-Elemente an die DNA

von Interesse in dem Konstrukt wirksam verknüpft werden. Die Mengen in der Blutbahn können ebenfalls durch Transformation einer größeren Anzahl von Zielzellen in dem Patienten verbessert werden. Wie oben beschrieben, kann die Sekretion des therapeutischen Proteins ebenfalls erhöht werden, indem Leitsequenzen, Aminosäuresequenz-Einheiten oder andere Elemente, welche intravenösgerichtete Sekretion in die Sequenz des therapeutischen Proteins vermitteln, eingebaut werden.

[0087] Wenn die vorliegende Erfindung die Transformation von Absorptions-Epithelzellen des Dünndarms und/oder Zylinderepithelzellen des Dickdarms einbezieht, bietet das Verfahren zur intestinalen in vivo Gentherapie den zusätzlichen Vorteil, dass Expression des Genprodukts durch das Säugetier kurzzeitig ist aufgrund der relativ schnellen Umsatzrate dieser kurzlebigen Epithelzellen (z.B. ist die mittlere Lebensdauer einer kurzlebigen Epithelzelle ungefähr 2 bis 4 Tage und kann ungefähr 2 bis 3 Tage betragen). "Kurzzeitig" wie hier verwendet bedeutet, dass das gewünschte Genprodukt an den Gastrointestinaltrakt oder die Blutbahn während weniger bis mehrerer Tage (z.B. so kurz wie 12 Stunden bis 36 Stunden; oder für eine Spanne bis zu 2 Tagen, 3 Tagen oder 4 Tagen, im Allgemeinen nicht mehr als 4 Tagen) abgegeben wird. Im Gegensatz dazu bedeutet "langzeitig" wie hier im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet, dass Zellen mit längerer Lebensdauer im Darm (d.h. Zellen, welche nicht so schnell umgesetzt werden, z.B. Stammzellen) das gewünschte Genprodukt für mehrere Wochen bis Monate exprimieren. Somit bestimmt die Art der transformierten Zellen (z.B. Absorptionszelle oder Stammzelle) wenigstens zum Teil die Spanne der Proteinabgabe (z.B. jeweils kurzzeitig oder langzeitig).

[0088] Kurzzeitige Genproduktexpression im Säugetier ermöglicht genaue Regulierung der Menge des therapeutischen Genprodukts, das an den Wirt abgegeben wird. Des Weiteren kann, da die Erfindung im Allgemeinen nicht-invasive Verabreichungsverfahren der transformierenden Nukleinsäure betrifft, die gewünschte Therapie leicht durch wiederholte Verabreichung erzielt werden. Die Verabreichung des Vektors an den Darm kann sowohl kurzzeitige als auch langzeitige Wirkungen erreichen. Wenn reife Absorptionszellen angezielt werden, ist die Wirkung kurzzeitig (2 bis 4 Tage); alternativ sollten, wenn die Vektoren auf Stammzellen an den Boden der Zotte zielen, langzeitige Wirkungen auftreten. Somit kann die Erfindung verwendet werden, um sowohl kurzzeitige als auch langzeitige Wirkungen zu erzielen.

[0089] Die Art der erzielten Darmzelltransformation kann entweder vorübergehend oder dauerhaft sein. Mit "vorübergehende Transformation" wird bezeichnet, dass die eingebrachte Nukleinsäure für die Restlebensdauer der reifen Zelle eingebracht wird und/oder die eingebrachte Nukleinsäure nicht auf Tochterzellen im Anschluss an Zellteilung übergeht. Im Gegensatz dazu bezeichnet "dauerhafte Transformation", dass die Nukleinsäure repliziert und an die Tochterzellen nach Zellteilung weitergegeben wird. Vorübergehende Transformation ist besonders vorteilhaft, wenn der Arzt eine kurze Therapiedauer, Verabreichung einer nur geringen Menge des therapeutischen Genprodukts und/oder die Fähigkeit, die Dosis durch wiederholte Verabreichung zu titrieren, wünscht. Im Allgemeinen kann die Art der Transformation ebenfalls wenigstens teilweise die Dauer der Abgabe des gewünschten Genprodukts bestimmen, d. h. ob das Genprodukt kurzzeitig (z.B. wenige Stunden bis wenige Tage mit vorübergehender Transformation) oder langzeitig (z.B. mehrere Wochen oder Monate mit dauerhafter Transformation) abgegeben wird.

[0090] Die tatsächliche Anzahl transformierter intestinaler Epithelzellen, die erforderlich ist, um therapeutische Mengen des Proteins von Interesse zu erzielen, variiert gemäß mehreren Faktoren einschließlich der Art der erzielten Darmzelltransformation (z.B. entweder vorübergehende oder dauerhafte Transformation), dem zu exprimierenden Protein, der Expressionsmenge des Proteins durch die transformierten Zellen, der Geschwindigkeit der Proteinsekretion, dem Aufteilen des therapeutischen Proteins zwischen dem Gastrointestinaltrakt und der Blutbahn und dem zu behandelnden Zustand. Zum Beispiel kann die gewünschte intravenöse Menge des therapeutischen Proteins leicht berechnet werden, indem die Menge des Proteins bestimmt wird, das in einem normalen Säugetier vorhanden ist (zur Behandlung eines Proteinmangels), oder indem die Menge des Proteins bestimmt wird, die erforderlich ist, um die gewünschten therapeutischen Ergebnisse zu bewirken (z.B. unter Verwendung von Informationen über wirksame therapeutische Mengen von Proteinen, für welche eine Therapie bereits besteht, z.B. Insulin, hGH etc.). Die Expressionsmenge des Proteins von transformierten Zellen und die Geschwindigkeit von Proteinsekretion kann leicht bei einem Tiermodell in vivo (z.B. einem Nagetiermodell, z.B. Ratte oder Maus) bestimmt werden. Sind die Mengen an Proteinexpression und -sekretion in dem Tiermodell und die geschätzte intravenöse Menge des gewünschten therapeutischen Proteins gegeben, kann die Anzahl an Zellen, die transformiert werden sollte, um die gewünschten Mengen zu bewirken, leicht berechnet werden und das Gentherapieprotokoll entsprechend durchgeführt werden.

Formulierungen

[0091] Die Nukleinsäure für in vivo Transformation von Darmzellen kann auf viele Arten formuliert werden, um eine Abgabe an die Oberfläche der Darmzellen zu erleichtern. Die Form (z.B. flüssig, fest, Tablette, Kapsel) und Zusammensetzung der Formulierung variiert entsprechend dem verwendeten Verabreichungsverfahren. Wird zum Beispiel die Formulierung oral verabreicht, kann die Nukleinsäure als Tablette, Pille, Kapsel, Lösung (z.B. Gel, Sirup, dünner Brei oder Suspension) oder in anderer geeigneter Form formuliert werden. Wird die Nukleinsäure durch Direktplatzierung in den Darmtrakt abgegeben, kann die Nukleinsäure als Zäpfchen (z.B. für rektale Verabreichung) oder als Lösung oder als Suspension formuliert werden, die durch endoskopische Katheterisierung verabreicht wird.

[0092] Die Formulierung kann sich ebenfalls mit der angezielten Darmstelle ändern. Zum Beispiel ist die Nukleaseaktivität in Verbindung mit dem Dünndarm größer als jene in Verbindung mit dem Dickdarm. Somit können Formulierungen für Transformation von Dünndarmzellen und/oder Formulierungen, die oral verabreicht werden, welche den Dünndarm passieren müssen, bevor sie die gewünschte Zielzelle erreichen, Antinuklease-Zusammensetzungen enthalten, um den Abbau der verabreichten Nukleinsäure zu verhindern. Verfahren zur Herstellung verschiedener Arten von Formulierungen und Verabreichung solcher Formulierungen sind im Stand der Technik bekannt (siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co., Easton, PA).

[0093] Die Formulierung kann Bestandteile zusätzlich zur Nukleinsäure enthalten, wobei die zusätzlichen Bestandteile bei der Abgabe der Nukleinsäure an die Ziel-Darmzelle helfen. Die DNA von Interesse kann in einer pharmazeutischen Zusammensetzung der Erfindung vorliegen mit zusätzlichen Bestandteilen, wie beispielsweise, aber nicht darauf begrenzt, Stabilisierungsverbindungen und/oder biokompatible pharmazeutische Träger, z.B. Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose oder Wasser. Die DNA von Interesse kann allein oder zusammen mit anderen Agenzien verabreicht werden, einschließlich anderen therapeutischen Agenzien (z.B. Medikamente oder Hormone). Die Formulierung kann ebenfalls organische und anorganische Verbindungen enthalten, um zum Beispiel die DNA-Abgabe an und Aufnahme durch die Zielzelle zu erleichtern (z.B. Detergenzien, Kochsalze, Chelatbildner, etc.).

[0094] Wenn die Formulierung oral verabreicht wird, kann die Formulierung Puffermittel enthalten oder eine Beschichtung aufweisen, um die Nukleinsäure vor Magensäure zu schützen und/oder das Schlucken zu erleichtern. Zusätzlich oder alternativ kann die orale Formulierung während einer Zwischenverdauungsspanne verabreicht werden (zwischen Mahlzeiten oder zur Schlafenszeit), wenn der Magen-pH weniger sauer ist, oder gemeinsam mit der Verabreichung von Inhibitoren der HCl-Sekretion wie beispielsweise H₂-Blocker (z.B. Cimetidin) oder Protonpumpeninhibitoren (z.B. PROLISEC™). Die Formulierung kann ebenfalls eine Verzögerungskapsel aufweisen, die gestaltet ist, die Nukleinsäure bei Erreichen der Oberfläche der Ziel-Darmzellen freizusetzen. Zum Beispiel können Verzögerungsformulierungen gestaltet werden, um die Nukleinsäure an einem bestimmten Ort in dem Darm abzugeben (z.B. die Nukleinsäure zur Transformation von Zellen des Dünndarms abzugeben (Nukleinsäure wird kurz nach Eintritt in den Darm freigesetzt)) oder zur Transformation von Zellen an einer unteren Position in dem Darmtrakt (z.B. Zellen des Dickdarms) abzugeben. Die Formulierung kann ebenfalls gestaltet sein, um eine langsame Freisetzung in einem bestimmten Bereich zu ermöglichen (z.B. in Abwesenheit von Haupt-Peristaltik). Die Formulierung kann ebenfalls Nuklease-Inhibitoren aufweisen, um die Menge intakter Nukleinsäure, die für Transformation der Ziel-Darmzellen verfügbar ist, zu erhöhen.

[0095] Die DNA von Interesse kann als DNA- oder RNA-Liposomkomplexformulierung formuliert sein. Solche Komplexe weisen eine Mischung von Lipiden auf, welche an das genetische Material (DNA oder RNA) binden, wobei ein hydrophober Kern und eine hydrophile Beschichtung vorgesehen wird, welche es ermöglicht, dass das genetische Material in Zellen abgegeben wird. Liposome, die gemäß der Erfindung verwendet werden können, beinhalten DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin), CUDMEDA (N-(5-cholestrum-3- β -ol-3-urethanyl)-N',N'-demethylethylendiamin). Von besonderem Interesse ist die Verwendung kationischer Transportreagenzien und polyfunktioneller kationischer Zytocetone, beschrieben in U.S. Patent Nr. 5,527,928 und den PCT-Veröffentlichungs-Nrn. WO 96/10555 und WO 97/11935, welche hierin durch Bezug für die Herstellung und Verwendung solcher Agenzien eingeschlossen sind. Wenn die DNA von Interesse unter Verwendung eines Liposoms eingebracht wird, wird es bevorzugt, zuerst bei einem Tiermodell (z.B. bei einem Säugetiermodell, vorzugsweise Ratte oder Maus) die optimalen Werte für das DNA:Lipid-Verhältnis zu bestimmen und die absoluten Konzentrationen von DNA und Lipid als Funktion von Zelltod und Transformationseffizienz für die bestimmte zu transformierende Zellart. Diese Werte können dann bei anderen Patienten verwendet werden oder zur Verwendung bei anderen Patienten (z.B. menschlichen Patienten) hochgerechnet werden.

[0096] Andere Formulierungen können ebenfalls gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Solche Formulierungen beinhalten DNA oder RNA, die an ein Trägermolekül (z.B. einen Antikörper oder einen Rezeptorliganden) gebunden ist, was die Abgabe an Wirtszellen zum Zweck des Änderns der biologischen Eigenschaften der Wirtszellen erleichtert. Mit dem Begriff "chemische Modifikation" werden Modifikationen von Nukleinsäuren beschrieben, um beispielsweise das Verbinden von Nukleinsäurezusammensetzungen mit einem Trägermolekül wie beispielsweise einem Protein oder Lipid oder Derivat derselben zu ermöglichen. Beispielfähige Proteinträgermoleküle schließen Antikörper ein, die für die Zellen einer Ziel-Darmzelle oder Rezeptorliganden spezifisch sind, d.h. Moleküle, die geeignet sind, mit Rezeptoren wechselzuwirken, die mit einer Zelle einer Ziel-Darmzelle verbunden sind.

[0097] In einer Ausführungsform besteht die Formulierung hauptsächlich aus nackter DNA (z.B. DNA, welche nicht in einem viralen Vektor enthalten ist) und/oder ist im Wesentlichen frei von Detergenzien (z.B. von ionischen und nicht-ionischen Detergenzien, z.B. Polybren etc.) oder Mucolytica (z.B. N-Acetylcystein, Dithiothreitol und Pepsin). Des Weiteren kann die Formulierung zur Transformation von Darmzellen gemäß der Erfindung im Wesentlichen frei von proliferationssteigernden Faktoren sein (z.B. Faktoren, welche die Aufnahme von Nukleinsäuren in Zellen verbessern, welche sich nicht schnell teilen), wie beispielsweise epidermaler Wachstumsfaktor, Angiogenesefaktor, insulinartiger Wachstumsfaktor-1, insulinartiger Wachstumsfaktor-2, transformierender Wachstumsfaktor- α Gastrin, Methotrexat, Fluorouracil, Floxuridin und Arabinosid-C. Vorzugsweise ist die Formulierung hergestellt, um Epithelzellen des Darms anzuvisieren, noch bevorzugter Absorptionszellen des Dünndarms und/oder Zylinderepithelzellen des Dickdarms. Intestinale Stammzellen sind kein bevorzugtes Ziel für Transformation gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere, wenn kurzzeitige Therapie gewünscht ist.

Verabreichung und in vivo Transformation von Darmzellen

[0098] Gastrointestinale Verabreichung der DNA von Interesse kann auf eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren erreicht werden. Im Allgemeinen betreffen die in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung brauchbaren Verfahren die Exposition der Zielzellen des Darms (z.B. intestinale Epithelzellen, insbesondere Epithelzellen des Dün- oder Dickdarms) gegenüber einer Formulierung, welche Nukleinsäure aufweist, die ein therapeutisches Genprodukt von Interesse codiert. Solche Verfahren schließen ein, sind aber nicht darauf begrenzt, orale Verabreichung und direkte Verabreichung der Nukleinsäure in das Lumen des Darms durch Verwendung von beispielsweise einem Zäpfchen, Endoskop oder Katheter. Vorzugsweise wird die Nukleinsäure dem Patienten oral verabreicht.

[0099] Die Menge an DNA, um eine ausreichende Anzahl der Ziel-Darmzellen zu transformieren und Expression therapeutischer Mengen des Proteins vorzusehen, kann leicht bestimmt werden, basierend auf Faktoren wie der Effizienz von in vivo Transformation in Tiermodellen, den Proteinexpressionsmengen, die bei dem in vivo Tiermodell erzielt wurden und der Eignung der Ziel-Darmzellen für Transformation. Wenn zum Beispiel die Ziel-Darmzelle eine Dünndarm-Epithelzelle ist und die Nukleinsäure oral als nackte DNA verabreicht wird, wird die nackte DNA in einer Konzentration verabreicht, die ausreichend ist, um den Dünndarm zu erreichen, um eine wirksame DNA-Konzentration vorzusehen, um die Ziel-Dünndarm-Epithelzellen zu transformieren und therapeutische Mengen des Proteins entweder in dem Blut oder dem Gastrointestinaltrakt vorzusehen. Im Allgemeinen wird die Nukleinsäure im Bereich von ungefähr 1 mg bis 1 Gramm, im Allgemeinen ungefähr 100 mg bis ungefähr 1 Gramm verabreicht, abhängig von der verwendeten Formulierung. Im Allgemeinen sind die Dosierungen beim Menschen ungefähr das 200-Fache von den bei einem Ratten- oder Mausmodell wirksamen Dosierungen. Zum Beispiel ist die wirksamste Dosis in einem Tiermodell (Ratte) ungefähr 32 μ g bis ungefähr 64 μ g. Folglich beträgt die erwartete wirksame Dosierung beim Menschen ungefähr 6 mg bis ungefähr 12 mg. Die Formulierung kann zum Beispiel mehrmals täglich, täglich oder mehrmals wöchentlich verabreicht werden, abhängig von der gewünschten Menge der gewünschten Proteinexpression und/oder der Dauer, über die eine Therapie gewünscht ist.

Einschätzen von Proteintherapie

[0100] Das Abgabesystem der vorliegenden Erfindung kann in Verbindung mit jedem therapeutischen Genprodukt, insbesondere Proteinen, die für Verabreichung gewünscht sind, verwendet werden. Während das Abgabesystem mit Proteinen verwendet werden kann, deren Wirksamkeit bei intravenösen Therapien noch nicht getestet wurde, kann das Abgabesystem ebenfalls mit DNAs verwendet werden, welche Proteine oder andere Genprodukte von bewährter Wirksamkeit (z.B. hGH, Insulin etc.) codieren. Des Weiteren kann der Durchschnittsfachmann mit den unten gegebenen Beispielen leicht bestimmen, dass, wenn das Abgabesystem wirksam Insulin und hGH in die Blutbahn bei einem Tiermodell nach Abgabe der DNA von Interesse liefert, die Ab-

gabe anderer Proteine dann ebenso leicht unter Verwendung des beanspruchten Abgabesystems erreicht werden kann.

[0101] Da das Abgabesystem der beanspruchten Erfindung in Verbindung mit einer breiten Vielfalt von therapeutischen Genprodukten verwendet werden kann, können die Wirkungen der Expression von Genprodukten, die von der DNA von Interesse codiert werden, auf eine Vielzahl von Arten überprüft werden. Im Allgemeinen kann eine Blutprobe oder eine Probe von intestinalen Schleimsekretionen des Säugetiers auf Vorhandensein des therapeutischen Proteins getestet werden. Geeignete Tests zum Erkennen eines Proteins von Interesse in solchen Proben sind im Stand der Technik bekannt. Wenn beispielsweise Darmzell-Gentherapie durchgeführt wurde, um intravenöse Proteintherapie zu verwirklichen, kann eine Blutprobe auf Vorhandensein des Proteins getestet werden unter Verwendung eines Antikörpers, welcher das therapeutische Protein in einem ELISA-Test spezifisch bindet. Dieser Test kann entweder qualitativ oder quantitativ durchgeführt werden. Der ELISA-Test sowie andere immunologische Tests zum Erkennen eines Proteins in einer Probe werden in *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988, Harlow and Lane, Hrsg. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben.

[0102] Alternativ oder zusätzlich kann die Wirksamkeit der Proteintherapie durch Testen einer Blutprobe oder Darmsekretion auf Aktivität in Verbindung mit dem therapeutischen Protein (z.B. eine enzymatische Aktivität) untersucht werden. Wenn zum Beispiel das therapeutische Protein eine antimikrobielle Aktivität aufweist, kann die Wirksamkeit der Therapie getestet werden, indem die Fähigkeit der Testprobe untersucht wird, bakterielles Wachstum zu hemmen. Des Weiteren kann die Wirksamkeit von Darmzell-Gentherapie eingeschätzt werden, indem der Zustand des Säugetiers auf Verbesserung überwacht wird. Zum Beispiel wird, wenn das therapeutische Protein Erythropoietin ist, das Blut des Patienten auf Eisengehalt oder andere Parameter in Verbindung mit Anämie untersucht. Wenn das therapeutische Protein Insulin ist, kann die Wirksamkeit der Therapie eingeschätzt werden, indem Blutzuckermengen des Säugetiers untersucht werden oder indem Insulin gemessen wird (z.B. unter Verwendung des Radioimmuntest-Kits für menschliches Insulin, Linco Research Inc., St. Louis, MO).

BEISPIELE

[0103] Die nachfolgenden Beispiele werden gegeben, um dem Durchschnittsfachmann eine vollständige Offenbarung und Beschreibung davon zu geben, wie die Erfindung durchzuführen ist, und dient nicht dazu, den Schutzbereich dessen, was die Erfinder als ihre Erfindung betrachten, einzuschränken. Es wurden Bemühungen unternommen, um Genauigkeit bezogen auf verwendete Zahlen (z.B. Mengen, Temperaturen, etc.) sicherzustellen, aber Versuchsfehler und Abweichung sollten berücksichtigt werden. Sofern nicht anders angegeben, sind Teile Gewichtsanteile, ist Molekulargewicht das durchschnittliche Molekulargewicht, sind Temperaturen in Grad Celsius angegeben und ist der Druck Atmosphärendruck oder diesem nahe.

Beispiel 1: Konstruktion von Vektoren, welche menschliches Wachstumshormon (hGH) für Darmzelltransformation exprimieren

[0104] Vier Konstrukte zur Expression von menschlichem Wachstumshormon (hGH) wurden unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Techniken hergestellt (siehe zum Beispiel Sambrook et al. *ibid*). Das erste Konstrukt, pFGH, enthält die genomische hGH DNA-Sequenz, die in den kommerziell erhältlichen Vektor pBLUESCRIPT SK+™ (Stratagene, La Jolla California) eingesetzt ist ([Fig. 2](#)). Da die hGH codierende Sequenz nicht an einen Promotor gebunden ist, bietet dieser Vektor keine oder nur geringe hGH-Expression. Folglich dient das pFGH-Konstrukt als Negativkontrolle für hGH-Expression in den Darm. Das zweite Konstrukt, pFGH.CMV, wurde konstruiert, indem der Promotor von dem frühen Sofortgen von menschlichem CMV stromaufwärts der genomischen hGH-Sequenz des pFGH-Vektors wirksam eingesetzt wird ([Fig. 3](#)). Das dritte Konstrukt, pFGH.chymo, wurde konstruiert, indem der Chymotrypsin B-Genpromotor von Ratten stromaufwärts der genomischen hGH-Sequenz des pFGH-Vektors wirksam eingesetzt wurde ([Fig. 4](#)). Das vierte Konstrukt, pFGH.RSV, wurde konstruiert, indem der Promotor des langen periodischen Endstücks (LTR) von RSV stromaufwärts der genomischen hGH-Sequenz des pFGH-Vektors wirksam eingesetzt werden.

Beispiel 2: In vivo Gentransfer von DNA, welche humanes Wachstumshormon codiert, durch Einbringen nackter DNA in das intestinale Lumen

[0105] pFGH.CMV wurde verwendet, um das Darmepithel von ungefähr 300 g erwachsenen Ratten (pFGH.CMV 10 Ratten; pFGH.CMV mit Lipofectin, 4 Ratten; pFGH.CMV mit polykationischen Dendrimeren, 4 Ratten; Negativkontrolle (PBS), 1 Ratte, und Negativkontrolle (keine Behandlung), 8 Ratten) zu transformieren.

[0106] Die Ratten wurden mit Pentobarbital anästhesiert. Eine Laparotomie wurde durchgeführt, und das obere Duodenum oder End-Ileum identifiziert. Ein 5 cm langes Stück des Darms wurde abgebunden, eine geringe Teilprobe venösen Bluts wurde genommen, und 400 µl von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit pFGH.CMV oder 400 µl PBS alleine (Negativkontrolle Nr. 1) wurden langsam injiziert oder in den Darm eingeflößt und für 15 Minuten dort gelassen. Die verwendete Lösungsmenge erzeugt ein leichtes Ausdehnen des Darms. Die den Vektor enthaltenden Lösungen waren aus 20 bis 200 µg DNA pro 400 µl PBS; 32 µg DNA pro 400 µl PBS mit 6% Lipofectin (einem kationischen Lipid, welches verwendet wurde, um die Transformations-effizienz zu steigern); oder 32 µg pro 100 µl PBS mit 128 µg Dendrimeren zusammengesetzt. Die elastische Bindung wurde dann entfernt, der Darm an seine normale Stelle zurückgelegt und der Bauch mit Nähten geschlossen. Die Genesung nach Operation war nominal, und es wurden während der nächsten 48 Stunden keine Krankheitszeichen oder Symptome festgestellt. Bei Autopsie sah der Darm in jeder Hinsicht normal aus. Dieses Transfektionsverfahren bietet direkten Zugang des Vektors zu ungefähr 5-10% der Darmzellen.

[0107] Nach 24 Stunden wurden die Ratten erneut mit Pentobarbital anästhesiert, Gewebe entnommen und eine Blutprobe vor dem Töten entnommen. Die Blutproben von vor und nach der Transfektion wurden präpariert, Wachstumshormone in jeder Probe unter Verwendung eines Immuntests für hGH gemessen. Die Mengen an hGH in den Serumproben wurden unter Verwendung des hGH-Radioimmuntests (Nichols Institute) gemessen, mit der Ausnahme, dass gebundene Proben drei Mal gewaschen wurden und dann vor γ-Zählung in neuen Röhrchen angeordnet wurden. Jeder Test wurde drei Mal durchgeführt und mit einem Satz Kontrollproben verglichen.

[0108] Ratten, welchen nur den pFGH.CMV-Vektor erhalten haben (nackte DNA), exprimierten höhere Mengen an hGH in Proben von systemischen und Pfortaderblut ([Fig. 5](#)) im Vergleich zu den Hintergrundhöhen an hGH-Kreuzreaktivität bei Ratten, welche keine DNA erhalten haben. Das Hinzufügen von Lipofectin hat die Transformationseffizienz nicht gesteigert (wie durch das Vorhandensein von hGH in den Blutproben gemessen), aber hat recht signifikant die Transformationseffizienz bezogen auf die Verwendung nackter DNA gemindert. Gleichermaßen wurde die Transformationseffizienz bei Ratten, welche DNA plus Dendrimere erhalten haben, im Vergleich zur Verwendung einzig von nackter DNA gemindert. Somit hatte das Verabreichen von nackter DNA, welche hGH codiert, in einfacher PBS-Lösung nicht nur eine erfolgreiche Transformation von Darmzellen zur Folge, sondern ebenfalls eine effizientere Darmzelltransformation und anschließende intravenöse Sekretion von hGH zur Folge als das Verabreichen des gleichen Konstrukts in einer Formulierung, welche Lipofectin oder Dendrimere enthält. Des Weiteren waren Plasmamengen gleichermaßen sowohl bei duodener als auch ilealer Verabreichung erhöht, was anzeigt, dass Darmzelltransformation an diesen beiden Stellen mit gleicher Wirksamkeit erzielt wurde.

Beispiel 3: Konstruktion von Vektoren, welche humanes Insulin (hIns) für Darmzelltransformation exprimieren

[0109] Zwei Konstrukte zur Expression von humanem Insulin und einem humanem Insulinmutanten wurden gemäß im Stand der Technik bekannten Techniken hergestellt (s. zum Beispiel Sambrook et al., *Ibid*). Das erste Konstrukt, pBAT14.hIns, enthält eine cDNA-Sequenz, die humanes Insulin codiert, die in den kommerziell erhältlichen Vektor pBLUESCRIPT SK+™ (Stratagene, La Jolla California) eingesetzt wird ([Fig. 6A](#)). Die humane Insulin codierende Sequenz ist wirksam mit einem Promotor des frühen Sofortgens von humanem CMV verknüpft, welcher stromaufwärts des ersten Introns von humanem β-Globin und der humanes Insulin codierenden cDNA-Sequenz angeordnet ist. Das zweite Konstrukt pBAT16.hInsG1.M2, wurde konstruiert, indem der CMV-Promotor stromaufwärts einer Nukleotidsequenz, welche einen Mutanten humanen Insulins codiert, wirksam verknüpft wurde ([Fig. 6B](#)). Die Mutation in dem humanen Insulinmutanten wechselt die zweite Proteasestelle zwischen den Peptiden C und A zu einer Furin-Erkennungsstelle, um ein genaues Vorgehen an Nicht-Endokrinzellen zu ermöglichen.

Beispiel 4: In vivo Gentransfer von DNA welche humanes Insulin codiert durch Einsetzen nackter DNA in das intestinale Lumen

[0110] Experimentelle Diabetes wurde bei Ratten durch intravenöse Injektion von 50 mg/kg Streptozotocin induziert. Streptozotocinbehandlung erzeugt hohe Blutzuckermengen innerhalb von 24 Stunden nach Injektion. Sofort nach Streptozotocininjektion wurden die Ratten mit Pentobarbital anästhesiert, und eine Laparotomie wurde wie oben beschrieben durchgeführt. 1 ml an Material (entweder PBS alleine, PBS mit dem Insulinvektor pBAT16.hInsG1.M2) wurde in das Duodenum direkt unter der pylorischen Verbindung sowohl der mit Streptozotocin behandelten Tiere als auch der Kontrolltiere eingeflößt. Das Material bestand hauptsächlich aus nackter DNA; es wurden kein Lipofectin, keine Dendrimere oder andere Materialien, um das Einbringen der DNA in die Zellen zu verbessern, verwendet. Der Bauch wurde dann mit Nähten geschlossen. Kontrollfarbmes-

sungen haben gezeigt, dass während einer Dauer von ungefähr einer Stunde das Material zum größten Teil in dem oberen Bereich des Duodenums verbleibt. Die Genesung nach Operation war nominal und während der nächsten 48 Stunden wurden keine Krankheitszeichen oder -symptome beobachtet. Bei Autopsie sah der Darm in jeder Hinsicht normal aus.

[0111] Blutproben wurden unmittelbar vor Operation und alle 24 Stunden nach Behandlung entnommen. Die Ratten, welche keine Behandlung erhalten haben (keine Operation oder Streptozotocinbehandlung) wurden als Negativkontrollen verwendet, um die normale Blutzuckermenge bei unbehandelten Ratten aufzuzeigen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) dargestellt. Streptozotocin-induzierte Diabetes war bei den mit Insulinvektor behandelten Ratten ungefähr 48 Stunden nach Behandlung verbessert und der Blutzucker wurde bei normalen oder beinahe normalen Mengen gehalten. Diese Daten zeigen, dass die Darmzellen von Ratten erfolgreich mit dem humanes Insulin codierenden Vektor transformiert wurden, menschliches Insulin wurde sowohl in die Blutbahn exprimiert als auch sekretiert, und das humane Insulin hat erfolgreich das Diabetessyndrom bei mit Streptozotocin behandelten Ratten unterdrückt. Des Weiteren trat, als der Vektor nicht länger wirksam war (nach ungefähr 48 Stunden) bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten Diabetes erneut auf.

Beispiel 5: In vivo Gentransfer von DNA welche humanes Wachstumshormon (hGH) codiert mit wiederholter Abgabe nackter DNA in das intestinale Lumen

[0112] Das pFGH-Konstrukt ([Fig. 4](#)) und das pFGH.CMV-Konstrukt ([Fig. 5](#)) wurden zur Verabreichung an Testtiere hergestellt. Das Konstrukt pGFP.CMV.N2.CMV, welches zu pFGH.CMV identisch ist mit der Ausnahme, dass der codierende Bereich des Plasmids eher grün fluoreszierendes Protein (GFP; Clontech, CA) als hGH codiert, diente als Kontrolle.

[0113] Männliche Sprague-Dawley-Ratten, 260-280 g, wurden mit ausgewogenen Mahlzeiten von Laborfutter zu allen Zeiten gefüttert, mit der Ausnahme, dass sie während der Nacht vor der Operation fasten mussten (Wasser ad lib). Die Tiere wurden mit Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und ein Polyethylenkatheter zum Einflößen in dem Duodenum angeordnet. Der Katheter wurde durch die proximale Körperwand unter dem Diaphragma eingesetzt und subkutan über den Brustkorb zu einem Punkt direkt hinter und zwischen den Ohren gelegt. Hier wurde der Katheter durch die Haut gestoßen und mit drei Ligaturen unbeweglich gemacht. Das externe Ende des Katheters wurde mit einem luftdichten, entfernbaren Stopfen bedeckt.

[0114] Die Tiere erholten sich während zwei Tagen vor der ersten Verabreichung von DNA. Am Tag null hat jedes Tier 32 µg DNA in 1,6 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) erhalten, die in den Katheter injiziert wurde. Zweiunddreißig Mikrogramm entweder pFGH.CMV oder pFOXGFP.N2.CMV (Kontrolle) wurden täglich in den Einflößkatheter von Ratten bei Bewußtsein injiziert, um orale Dosierung zu simulieren. Die Kontrolltiere erhielten eine gleiche Menge des Kontrollplasmids.

[0115] Um Abgabe von hGH in die Blutbahn einzuschätzen, wurde Blut durch Herzpunktion am späten Morgen entnommen, und Plasma durch Sedimentation zu 12.000 × g während 15 Minuten hergestellt. Die Überstände wurden bei -80°C vor dem Testen auf hGH gelagert. hGH wurde durch Immuntest unter Verwendung eines humanspezifischen Verfahrens mit beschichteten Kügelchen (coated beads) (Nichols Institutes, San Juan Capistrano, CA) gemessen.

[0116] [Fig. 11](#) zeigt die Wirkung wiederholter Dosierung von hGH-codierender DNA. Plasmamengen von hGH sind gegenüber der Hintergrundmenge nach 24 Stunden deutlich angestiegen und blieben während der Dauer der Studien erhöht. Diese Daten zeigen, dass unter Verwendung des genbasierenden Proteinabgabesystems der Erfindung eine Proteinabgabe über die Zeit durch wiederholte Dosierung erhalten werden kann.

Beispiel 6: Identifizierung und Charakterisierung von transformierten intestinalen Epitelzellen nach Verabreichung nackter DNA

[0117] Die Darmzellarten wurden unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung transformiert, und Expression eines Proteins, das durch das transformierende Konstrukt codiert wurde, wurde durch Untersuchung mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) bei Ratten-Darmzellen nach in vivo Verabreichung eines GFP-codierenden Konstrukts bestimmt. Ein ml entweder PBS alleine (Negativkontrolle) oder PBS mit dem GFP-codierenden Vektor pFOXEGFP.N2.CMV ([Fig. 8](#); siehe ebenfalls German und Wang 1994 Mol. Cell. Biol. 14:4067) wird in das Duodenum direkt unter der pylorischen Verbindungsstelle bei Ratten wie in Beispiel 4 beschrieben eingebracht. Der Bauch wird dann mit Nähten geschlossen. 24 Stunden nach Behandlung werden aus dem Darm von Ratten Gewebeproben entnommen und in 1,5% Glutaraldehyd fixiert und gefrorene Abschnitte hergestellt.

Expression von GFP wird in den Abschnitten unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops erkannt, und die Anzahl und Arten von Zellen, welche GFP exprimieren, werden bestimmt.

Beispiel 7: Orale Gentherapie beim Menschen unter Verwendung nackter DNA

[0118] Die DNA von Interesse wird als Kapsel ("Genpille") gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren formuliert. Die Kapsel weist ungefähr 100 mg bis 1000 mg der DNA von Interesse auf. Die Kapsel kann zusätzlich Liposome, virale Aufnahmeelemente, DNAase-Inhibitoren und/oder verschiedene enterische Beschichtungen enthalten. Vorzugsweise besteht die Kapsel hauptsächlich aus nackter DNA (d.h. DNA ohne virale Aufnahmeelemente, Dendrimere, Lipofectin oder andere Verbindungen oder Agenzien, die in herkömmlichen Formulierungen verwendet werden, um die Zellaufnahme zu verbessern) und kann zusätzlich Bestandteile enthalten, die einen Schutz der DNA gegen DNAasen oder Abbau oder Beschädigung, welche während des Durchquerens des Gastrointestinaltrakts, um die gewünschten Darmzellen zu erreichen, auftreten können, bieten.

[0119] Die Pille wird dem menschlichen Patienten verabreicht, um eine ausreichende Expressionsmenge des durch die DNA in der Pille codierten Proteins zu erhalten. Die Pille kann zum Beispiel mehrmals täglich, täglich oder mehrmals wöchentlich verabreicht werden, abhängig von der gewünschten Menge gewünschter Proteinexpression und/oder der gewünschten Therapiedauer. Die Therapie kann eingeschätzt werden, indem zum Beispiel die Menge an Protein, das in der Blutbahn des Patienten vorhanden ist (wenn das Protein in die Blutbahn sekretiert wird), untersucht wird, oder indem der Patient auf Verbesserung oder Stabilisierung des Zustands überwacht wird.

Beispiel 8: Darmzell-Gentherapie unter Verwendung nackter DNA in einem Zäpfchen

[0120] Die DNA von Interesse wird als Zäpfchen gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren formuliert. Das Zäpfchen weist ungefähr 100 mg bis 1000 mg der DNA von Interesse auf. Das Zäpfchen kann zusätzlich Liposome, virale Aufnahmeelemente, DNAase-Inhibitoren und/oder verschiedene enterische Beschichtungen enthalten. Vorzugsweise besteht das Zäpfchen hauptsächlich aus nackter DNA (d.h. DNA ohne virale Aufnahmeelemente, Dendrimere, Lipofectin oder andere Verbindungen oder Agenzien, die in herkömmlichen Formulierungen verwendet werden, um die Zellaufnahme zu verbessern) und kann zusätzlich Bestandteile enthalten, die einen Schutz der DNA gegen DNAasen oder Abbau oder Beschädigung, welche während des Durchquerens des Gastrointestinaltrakts, um die gewünschten Darmzellen zu erreichen, auftreten können, bieten.

[0121] Das Zäpfchen wird dem menschlichen Patienten verabreicht, um eine ausreichende Expressionsmenge des durch die DNA in dem Zäpfchen codierten Proteins zu erhalten. Das Zäpfchen kann zum Beispiel mehrmals täglich, täglich oder mehrmals wöchentlich verabreicht werden, abhängig von der gewünschten Menge gewünschter Proteinexpression und/oder der gewünschten Therapiedauer. Die Therapie kann eingeschätzt werden, indem zum Beispiel die Menge an Protein, das in der Blutbahn des Patienten vorhanden ist (wenn das Protein in die Blutbahn sekretiert wird), untersucht wird, oder indem der Patient auf Verbesserung oder Stabilisierung seines Zustands überwacht wird.

[0122] Gemäß Verfahren, die den oben beschriebenen gleichen, können andere therapeutische Proteine aus DNA exprimiert werden, die in das Genom einer intestinalen Epithelzelle durch Gentransfer gemäß der Erfindung eingebracht wurde.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Konstrukts, umfassend ein Nukleinsäuremolekül, das ein sekretorisches therapeutisches Protein codiert und eine damit operativ verknüpfte eukaryotische Promotorsequenz, wobei das Konstrukt nicht in einem Viruspartikel verpackt ist, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Krankheit, die einer intravenösen Therapie mit dem Protein zugänglich ist, wobei das Medikament der Abgabe des Proteins in die Blutbahn eines Säugetierpatienten, der die der intravenösen Therapie zugängliche Krankheit aufweist, dient durch

Verabreichen des Konstrukts in den Gastrointestinaltrakt des Patienten auf eine Art, die zur genetischen Transformation der intestinalen Epithelzellen mit dem Konstrukt führt, so dass das Konstrukt das Protein, das der Patient benötigt, exprimiert und das Protein von den Zellen in die Blutbahn sekretiert wird; und Ermöglichen der Expression des Proteins durch die genetisch transformierten Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge, wodurch der Patient behandelt wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intestinalen Epithelzellen absorptive Zellen des Dünndarmes sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intestinalen Epithelzellen Zylinderepithelzellen des Dickdarms sind.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäure als nackte Nukleinsäure verabreicht wird.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verabreichung durch orale Verabreichung erfolgt.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verabreichung durch rektale Verabreichung erfolgt.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Expression des therapeutischen Proteins in dem Säugetierpatienten für eine Zeitspanne von etwa zwei bis drei Tagen erfolgt.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament im Wesentlichen frei von Lipofectin, Dendrimeren und viralen Komponenten ist.
9. Verwendung eines Konstrukts, umfassend ein Nukleinsäuremolekül, das ein sekretorisches therapeutisches Protein codiert und eine damit operativ verknüpfte eukaryotische Promotorsequenz, wobei das Konstrukt nicht in einem Viruspartikel verpackt ist, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Krankheit, die einer intravenösen Therapie mit dem Protein zugänglich ist, wobei das Medikament zur in vivo Transformation von intestinalen Epithelzellen dient, indem das Konstrukt in den Gastrointestinaltrakt eines Säugetierprobanden, der die der intravenösen Proteintherapie zugängliche Krankheit aufweist, eingebracht wird, wobei das Einbringen zu einer genetischen Veränderung der intestinalen Epithelzellen führt, so dass das Konstrukt das Protein exprimiert, das der Patient benötigt und das Protein aus den Zellen in die Blutbahn sekretiert wird.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

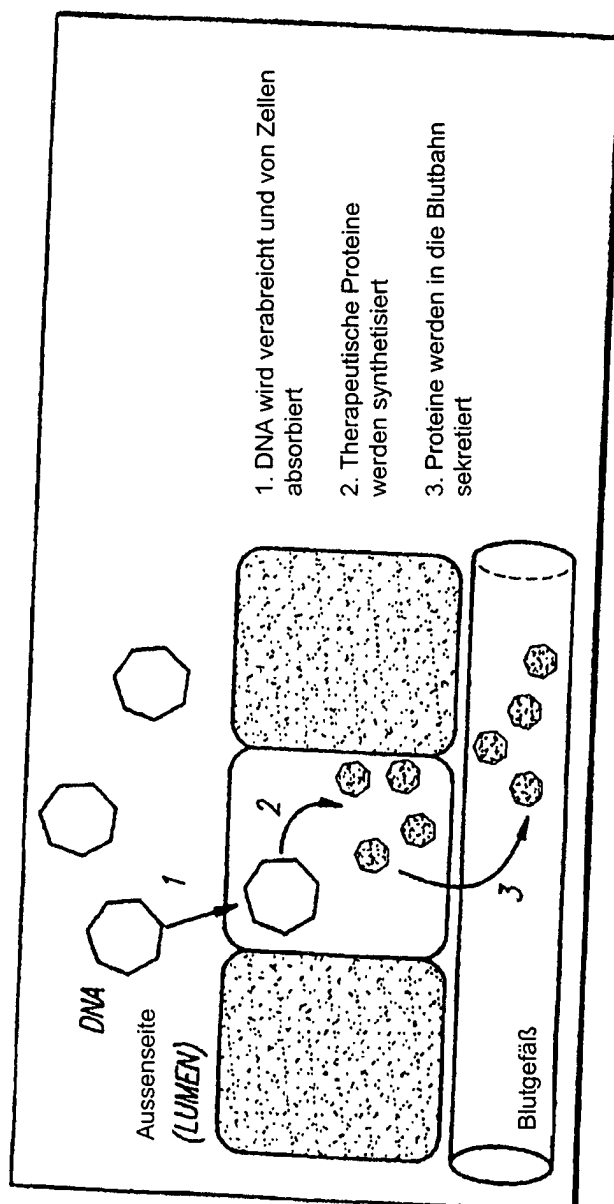


FIG. 1

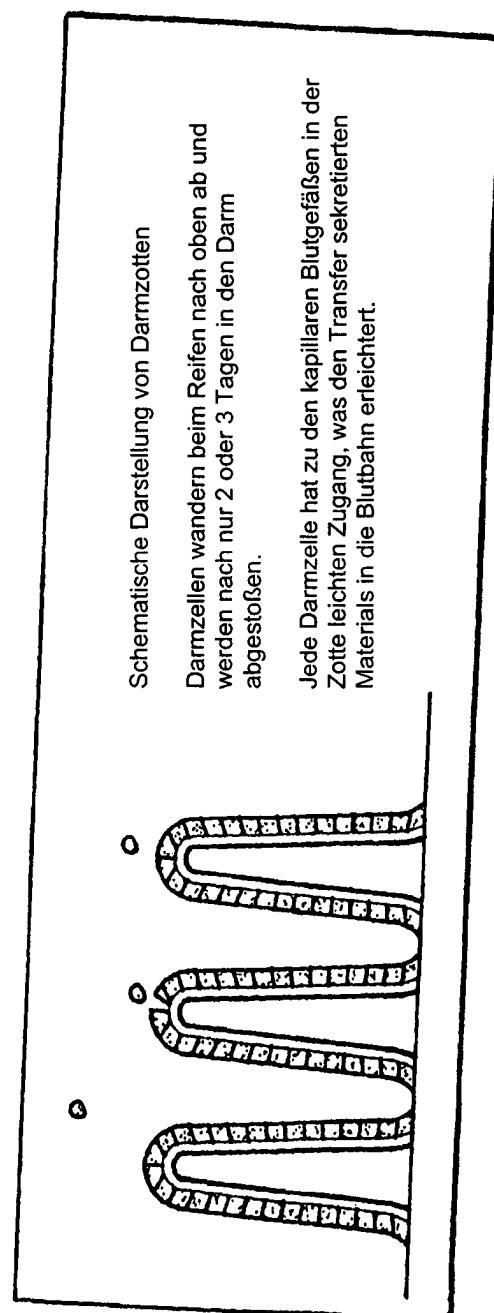
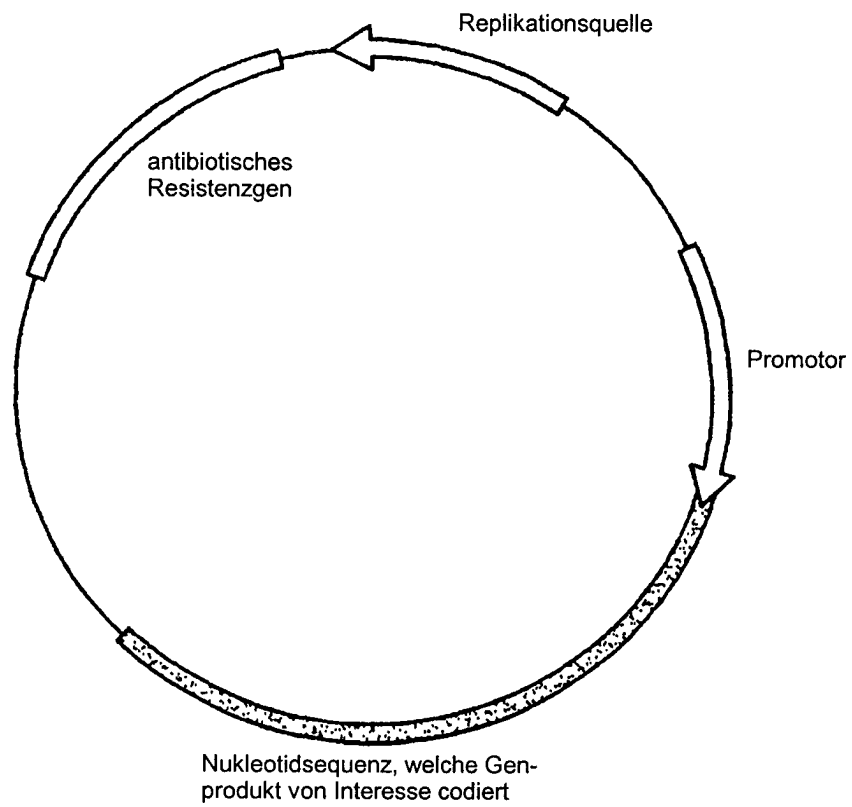


FIG. 2

FIG. 3



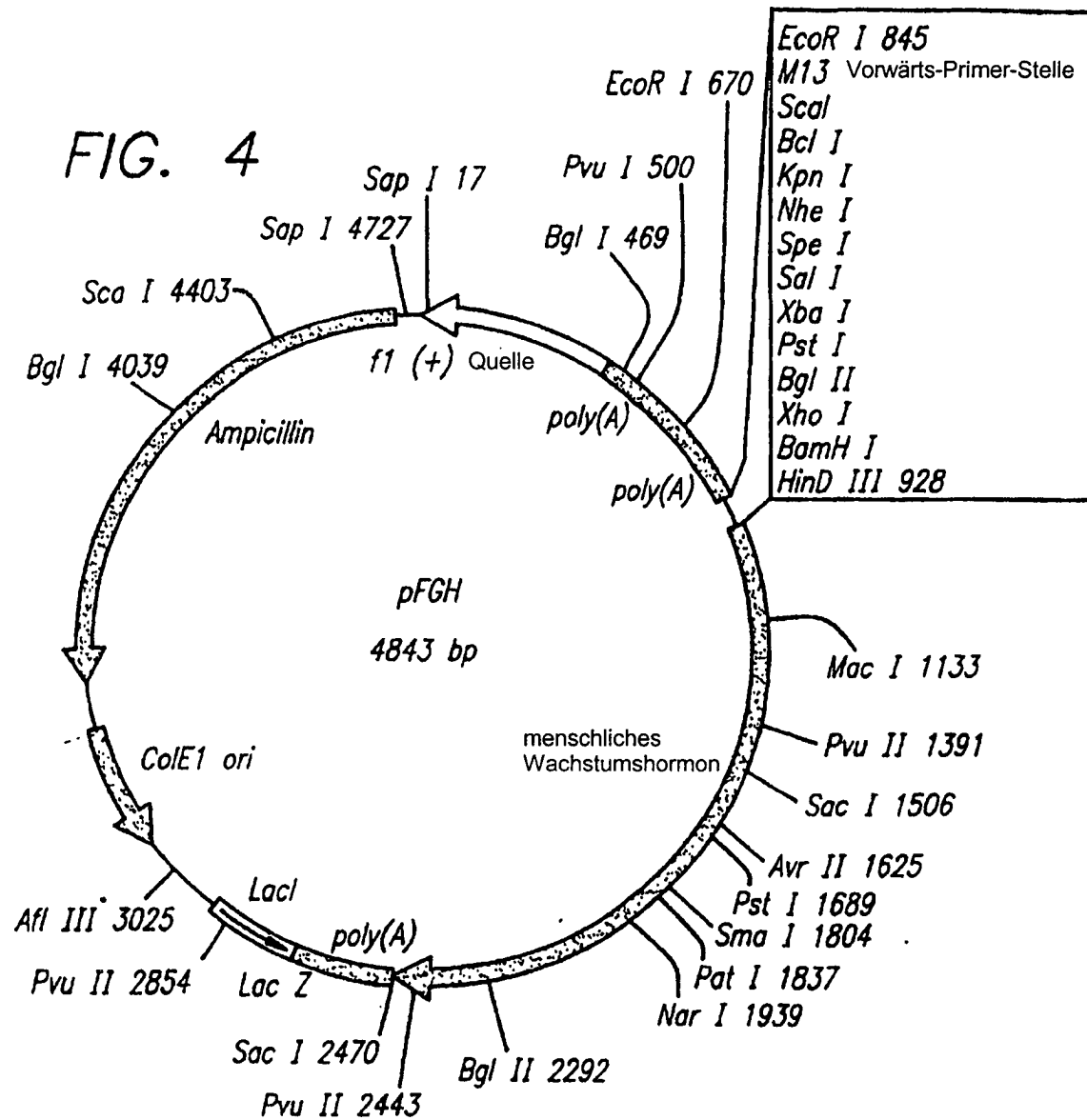


FIG. 5

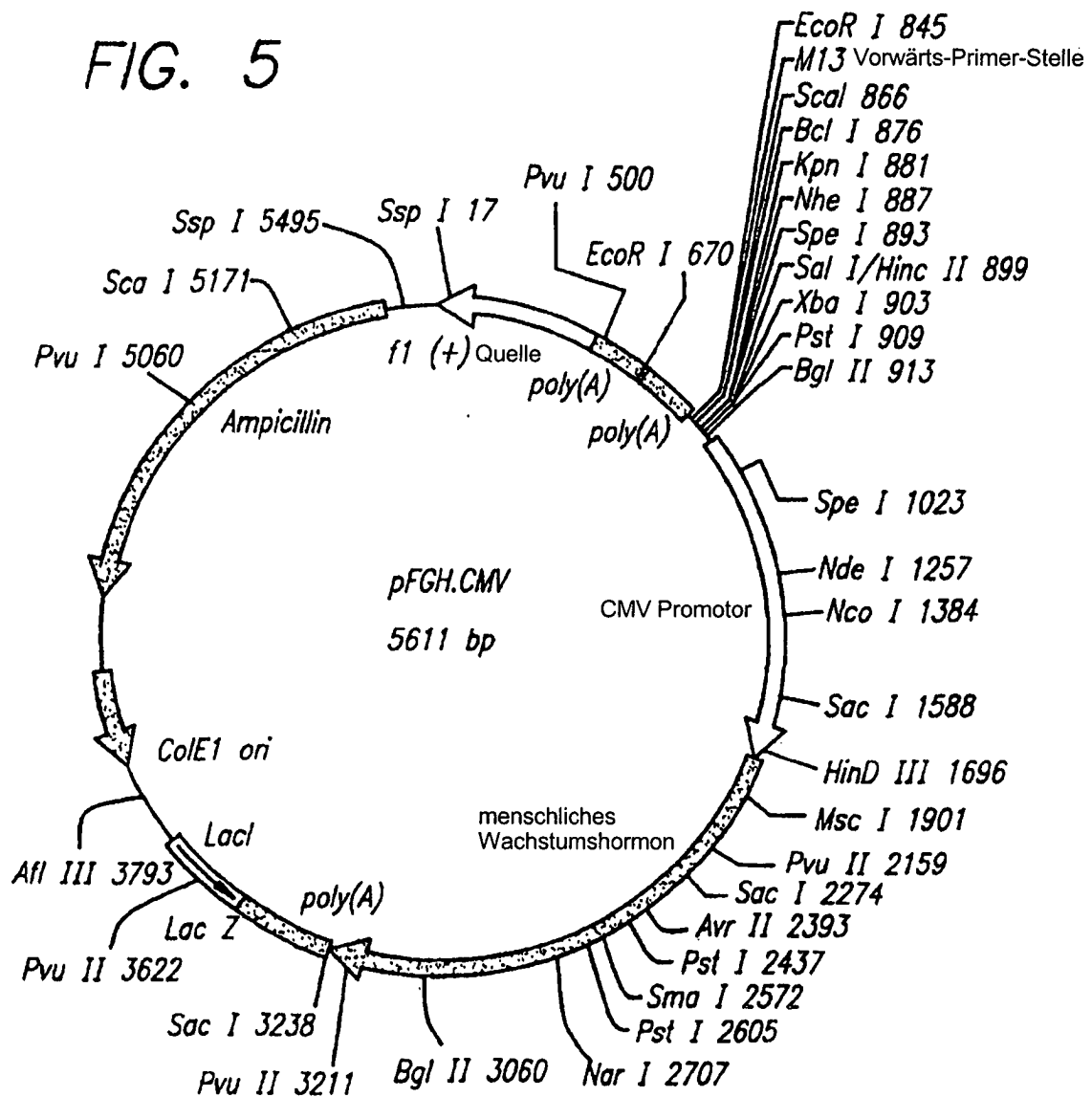
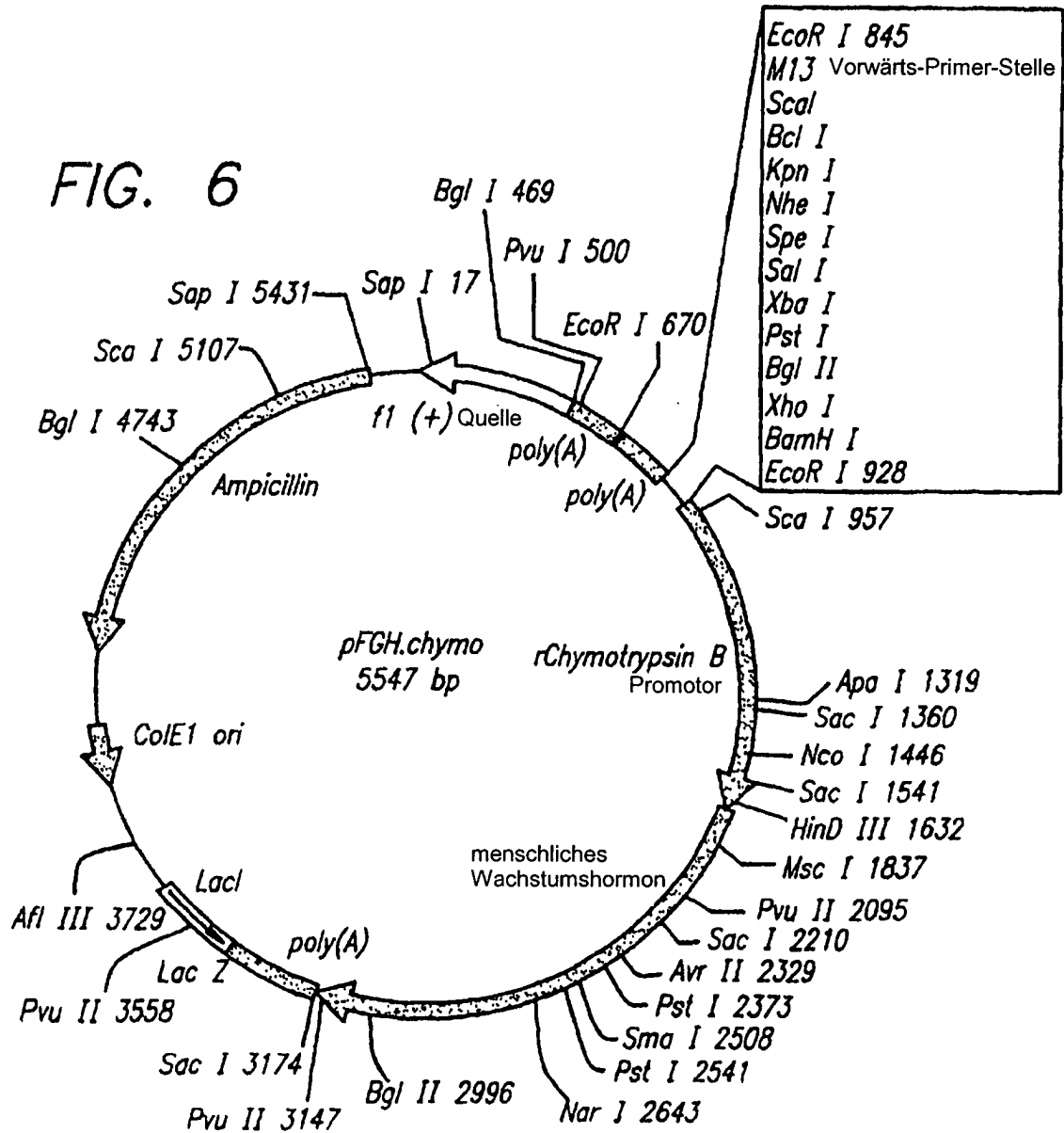


FIG. 6



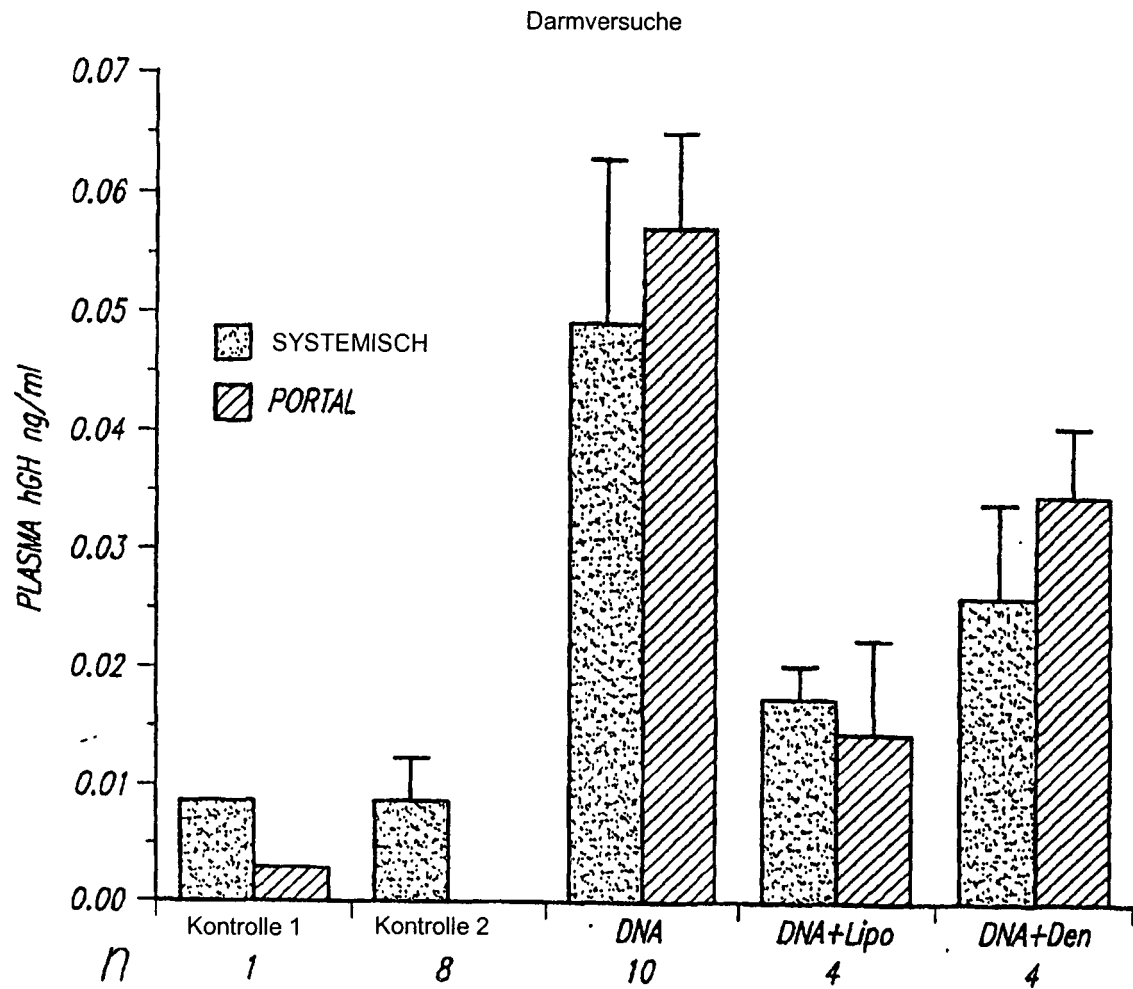
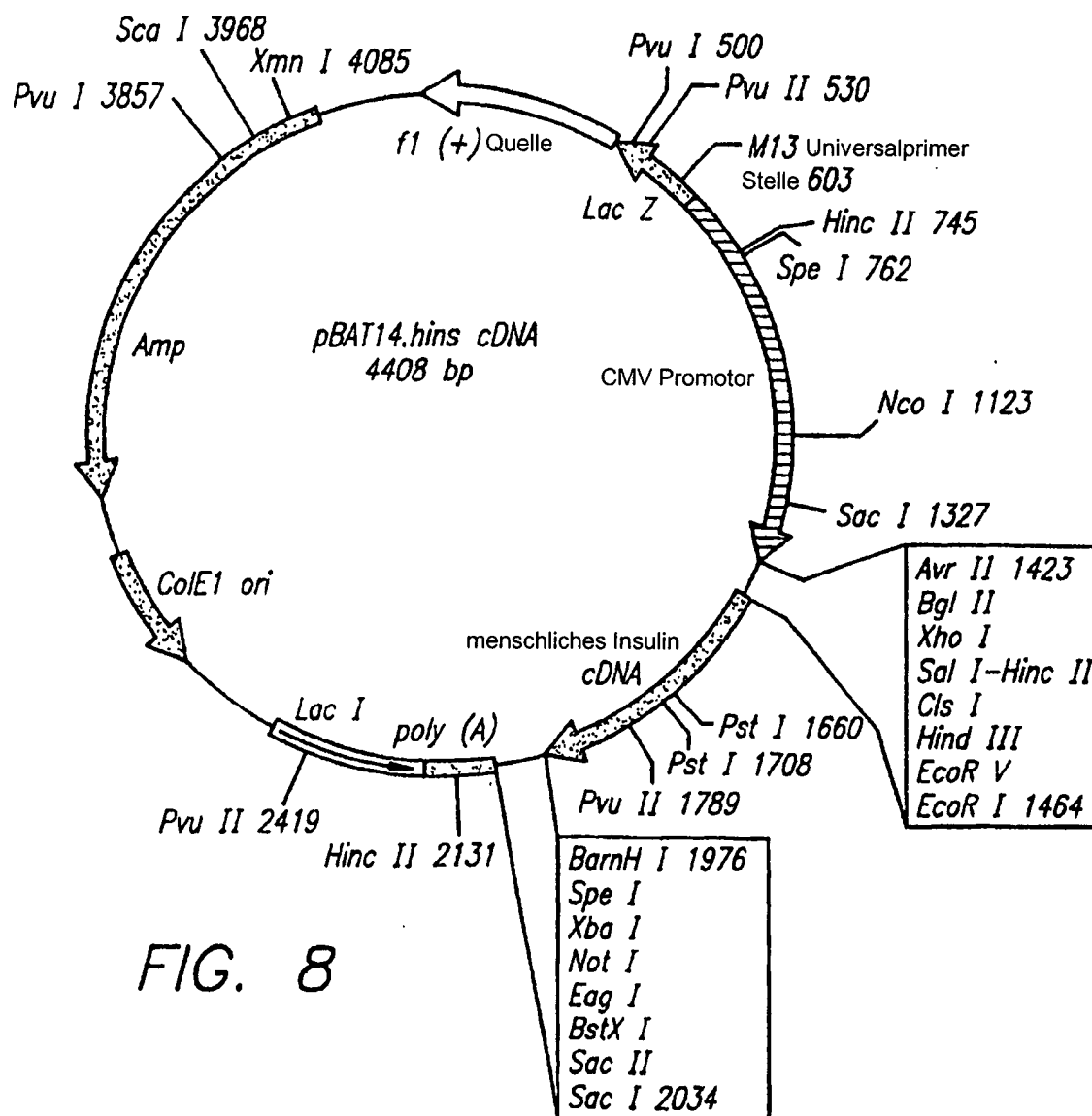


FIG. 7



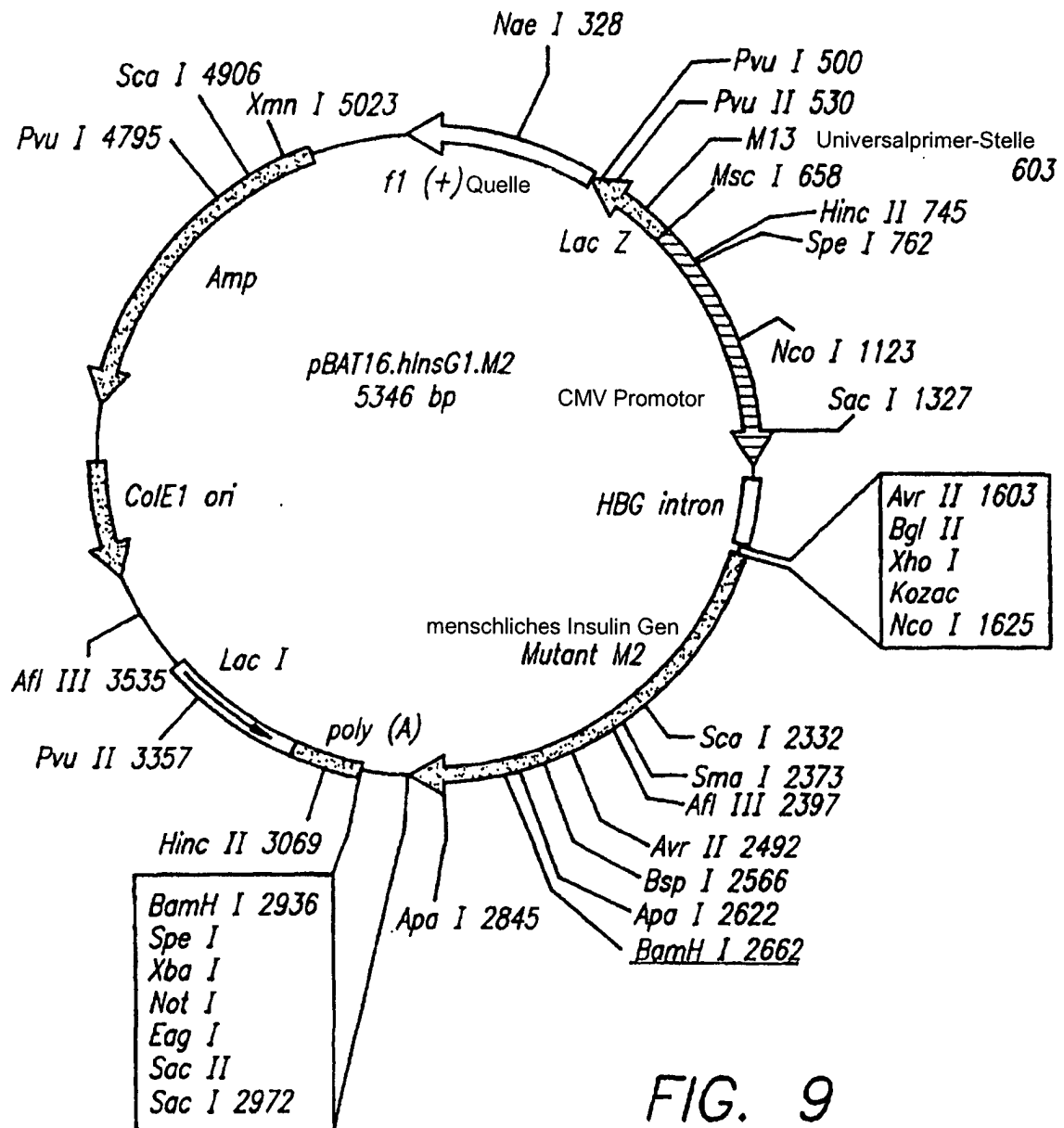


FIG. 9

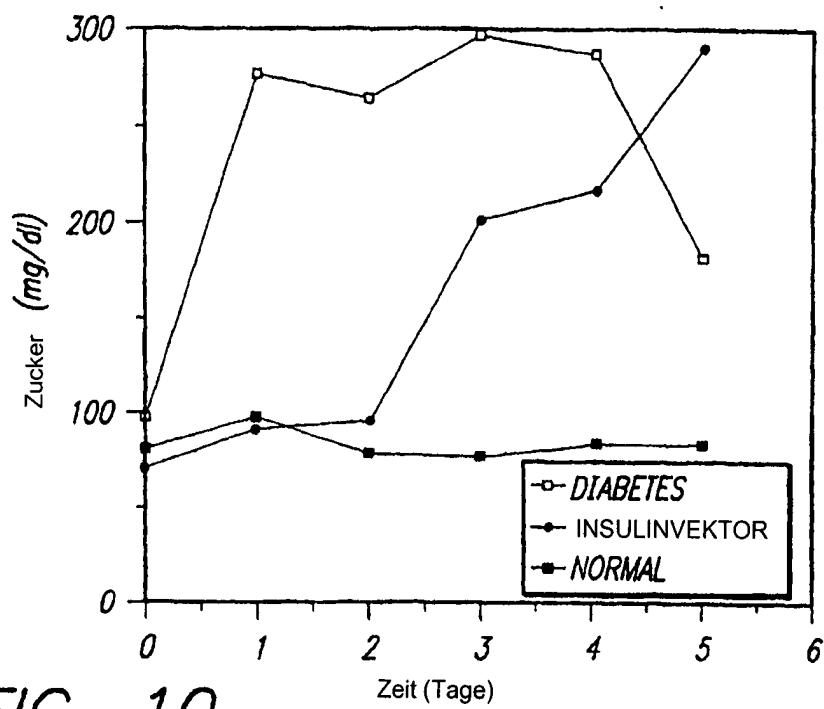


FIG. 10

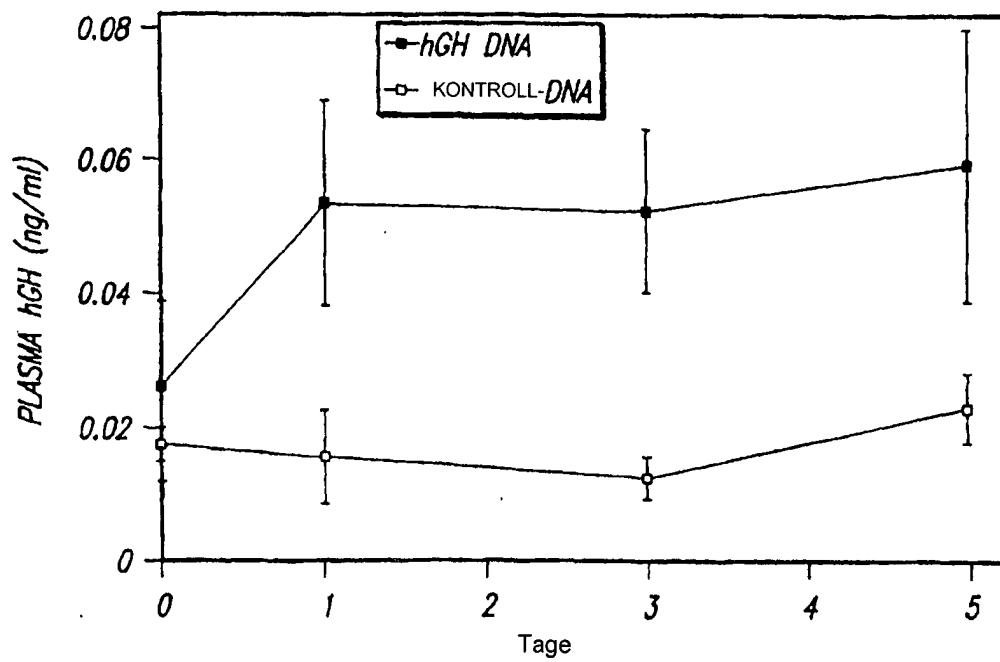


FIG. 11

FIG. 12

