



(12) PATENT

(19) NO

(11) 327491

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/708 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20001244	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.09.15 PCT/US98/19498
(22)	Inng.dag	2000.03.09	(85)	Videreføringsdag	2000.03.09
(24)	Løpedag	1998.09.15	(30)	Prioritet	1997.09.15, US, 58933
(41)	Alm.tilgj	2000.05.15			
(45)	Meddelt	2009.07.20			
(73)	Innehaver	Genetic Immunity LLC, 3000 Reservoir Road N.W., Georgetown University Medical-Dental Bldg., Washington, DC 20007, US			
(72)	Oppfinner	Julianna Lisziewicz, Bethesda, MD, US Franco Lori, Bethesda, MD, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Genavleveringskompleks for transkutan avlevering av gener samt anvendelse derav		
(56)	Anførte publikasjoner	CODON C. et al. DAN-based immunization by in vivo transfection of transfection of dendritic cells, Nature medicine. 1996, Vol. 2, side 1122-1128. TAN A. et al. Mannose receptor-mediated uptake and antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells, Eur. J. Immunology. 1997, Vol. 27, side 2426-2435.		
(57)	Sammendrag			

Et molekylær avleveringskompleks som er spesifikt for antigenpresenterende celler blir dannet fra et ikkeviralt genavleveringssystem kompleks bundet med fremmed genetisk materiale. Komplekset trenger så inn i de målrettede celler via en spesifikk reseptor og overvinner nedbrytningsmekanismen, slik at det funksjonelle opptak av det fremmede genetisk materialet, eller transduksjon, av den celle, resulterer i genekspressjon. Det er også beskrevet en fremgangsmåte for genetisk immunisering uten nålestikk.

Område av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår et genavleveringskompleks for transkutan avlevering av gener som angitt i krav 1 for å avlevere fremmed genetisk materiale til celler samt anvendelse derav som angitt i krav 9. Spesielt kan slike 5 kompleks benyttes for reseptormediert avlevering av gener til celler. Et genavleveringskompleks som er kompatibelt med en spesifikk type målrettet celle, blir dannet fra det fremmede genetiske materiale, en vektor, og eventuelt et 10 bæremateriale. Komplekset blir så eksponert til cellene under betingelser som tillater reseptormediert endocytose, noe som resulterer i funksjonelt opptak, eller transduksjon, av det fremmede genetiske materiale. Komplekset er ikke bare anvendelig for in vitro, men også in vivo gen- 15 avlevering til antigenpresenterende celler, spesielt beskrevet som transkutan genoverføring til Langerhans hudceller. Denne teknikk er spesielt anvendelig for forebyggende og terapeutisk genetisk immunisering når det fremmede genetiske materialet er et immunogen så som DNA som koder 20 for en vesentlig del av antigenene og partikler assosiert med et infeksjonsdyktig virus, og hvor avlevering ved injeksjon er uønsket.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Immunsystemet for dyr har to forskjellige, men relaterte 25 responser, den cellulære immunrespons og den humorale immunrespons. Den cellulære immunrespons danner T-lymfocytter som dreper celler med fremmede identifiseringsmarkører på overflaten. Celler som har slike identifiserende markører på overflaten blir sagt å "presentere" et antigen, og er 30 referert til som antigenpresenterende celler (APCs). I tillegg stimulerer T-lymfocytter også den humorale respons ved hjelpende B-celler, som er prekursorer for plasmaceller.

Den humorale immunrespons resulterer i produksjonen hos plasmaceller av antistoff som virker på spesifikke mole-

kyler i oppløsning. Antistoff (eller immunoglobuliner) er proteiner syntetisert av et dyr som svar på tilstedeværelsen av en fremmed substans. De blir utskilt av plasmaceller, som er avledet fra B-lymfocytter (B-celler). Disse
5 oppløselige proteiner er gjenkjennelseelementene hos den humorale immunrespons. Hvert antistoff har spesifikk affinitet for den fremmede substans som stimulerte den aktuelle syntese. Det vil si antistoffet har et segment eller sete, kalt et antigenbindende sete, som vil feste til den fremmede substans. Et fremmed makromolekyl som er i stand til å
10 fremme dannelsen av antistoff mot seg selv, er kalt et antigen. Proteiner og polysakkarider er vanligvis effektive antigener. Den spesifikke affinitet av et antistoff er ikke for hele det makromolekulære antigen, men for et spesielt sete på dette kalt den antigene determinant eller epitop.
15 Antistoff gjenkjenner fremmede molekyler i oppløsning og på membraner uavhengig av molekylets sammenheng. Den humorale immunrespons er mest effektiv i å bekjempe bakterier og virus i ekstracellulære medier. (Ordet humor er det latinske ord for fluidum eller væske.) En strategi for å gi immunitet mot sykdom er å eksponere individet til ett eller flere antigener som er assosiert med et virus eller bakterium istedenfor å bruke det faktiske virus eller bakterium. En slik vaksine er kjent som en subenhetvaksine, og den virker
25 spesielt godt til å stimulere produksjonen av antistoff.

T-celler gir den cellulære immunrespons. I motsetning til den humorale immunrespons ødelegger den cellulære immunrespons virusinfiserte celler, parasitter, og kreftceller. Overflaten av T-celler inneholder transmembranproteiner
30 kalt T-cellerreseptorer som gjenkjenner fremmede molekyler på overflaten av andre celler. Det vil si T-celler gjenkjenner antigenpresenterende celler (APCs). T-cellerreseptorer gjenkjenner ikke isolerte fremmede molekyler. Den fremmede enhet må være lokalisert på overflaten av en celle, og må bli presentert til T-cellen av et spesielt membranprotein, som er ett som er kodet av et høyt variabelt kromosomalt område av vertsindividet kjent som hovedhis-

tokompatibilitetskomplekset (MHC). MHC koder for tre klasser transmembranproteiner. MHC klasse-1 proteiner, som blir uttrykt i nesten alle typer celler, presenterer fremmede epitoper til cytotoksiske T-celler. MHC klasse-2 proteiner, som blir uttrykt i immunsystemceller og fagocytter, presenterer fremmede epitoper til hjelpe-T-celler. MHC klasse-3 proteiner er komponenter av prosessen kjent som komplementkaskaden.

Det finnes en mengde T-celler, innbefattende cytotoksiske T-lymfocytter (CTL, eller dreper-T-celler) som ødelegger celler som oppviser en fremmed epitop bundet til et MHC-protein. Når det fremmede-epitop-pluss-MHC-protein binder til T-cellerreseptoren, skiller T-cellen ut granuler inneholdende perforin, som polymeriserer for å danne transmembranporer, for derved å bryte cellen åpen, eller indusere celledødsprosessen. Andre klasser T-celler, kalt hjelper-T-celler, utskiller peptider og proteiner kalt lymfokiner. Disse hormonlignende molekyler dirigerer bevegelsene og aktivitetene av andre celler. Enkelte eksempler er interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interferoner, granulocyt-Makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), og tumornekrosefaktor (TNF). T-cellene er implisert i komplementkaskaden, som er en nøyaktig regulert, kompleks serie av hendelser som resulterer i ødeleggelsen av mikroorganismer og infiserte celler. Mer enn femten oppløselige proteiner samarbeider for å danne multienhet antigenantistoffkomplekser som går forut for dannelsen av store hull i cellenes plasmamembran.

Ekspresjon av fremmede gener i antigenpresenterende celler (APC) kan bli benyttet for å danne en effektiv CTL-respons i dyr. Følgelig har genavlevering og genetisk modifikasjon av APC potensiale til å danne effektive vaksiner og terapeutiske metoder mot forskjellige sykdommer, innbefattende virale infeksjoner og kreft. Levende rekombinante virusvektorer som uttrykker forskjellige fremmede antigener, så som koppevirus, adenovirus og retrovirus, kan bli brukt til å fremme både humoral og cellulær immunrespons ved å etter-

late viral infeksjon. I tillegg har levende attenuerte (eller svekkede) virus blitt foreslått som vaksiner. DNA-vaksinasjonsstrategi blir også undersøkt. Forskjellige virale gener har blitt klonet i plasmid DNA og injisert i muskler, hud eller subkutant. Disse konstruksjoner er i stand til å uttrykke proteiner samt fremskaffer både en cellulær og humoral immunrespons.

Det har blitt antydnet at virale sykdommer kan være mottakelige for teknikken med genetisk immunisering. Visse celler, så som dendrittceller, er kjent for å plukke opp antigener og migrere fra kroppsvevet til lymfoidvevet. Der presenterer disse celler antigenene i lymfoidorganene: det vil si de oppviser en fremmed epitop bundet til et MHC-protein. Slike antigenpresenterende celler (APCs) er en kjent del av immunresponsmekanismen. Dersom celler så som dendrittceller (DC) blir modifisert slik at de inneholder DNA som koder for et virus som er infeksjonsdyktig, men ute av stand til effektiv reproduksjon, kunne de ikke bare presentere antigener i klassisk forstand, men også bli manipulert til å danne, eller uttrykke, virale partikler samt en mengde av andre virale proteiner. En ny teknologi har blitt beskrevet i Attorney Docket Nr. RGT-100A, USSN 08/803,484 "Methods and Compositions for Protective and Therapeutic Genetic Immunization". Den beskriver at gener fra et replikasjonsinkompetent virus kan bli inkorporert i antigenpresenterende celler som så migrerer til de lymfoide organer og danner den fulle komplement av virale antigener og virale partikler, for derved å sette i gang både humorale og cellulære immunresponser. Den beskriver at DC i lymfoidorganene kan uttrykke alle virale antigener og danne "autentisk utseende" virale partikler. Disse virale partikler vil følgelig spille en nøkkelrolle i dannelsen av ytterligere immunresponser.

Denne referanse beskriver i eksempel 13 "in vivo transduksjon" av celler innbefattende APC. I dette eksempel er flere velkjente metoder innbefattende viral og ikke-viral

genavlevering eksemplifisert. I eksempel 14 er "in vivo transduksjon" av celler innbefattende APC beskrevet. Disse benytter (1) direkte DNA-injeksjon; (2) injeksjon av liposomer eller virosomer inneholdende DNA; (3) direkte intersplenisk injeksjon av klasse 4 kobbevirus; og (4) rektale og vaginale suppositorier som bærer genavleveringsvehikler. Imidlertid beskrev denne referanse ikke i detalj metodene for in vitro og in vivo genavlevering. Dette er målet for foreliggende oppfinnelse.

10 Det finnes visse bevis som antyder at genetisk modifikasjon av APC vil være effektivt til å vaksinere både neonatale og voksne dyr og mennesker. Ridge et al. (Science 271:1723-1726, 1996) har injisert DC som uttrykker et fremmed antigen isolert fra et annet dyr intravenøs i mus. Både neonatale og voksne mus injisert med disse DC var i stand til å danne god CTL-avlivning av målceller. Disse forsøk viste også at DC som uttrykker et fremmed antigen kan indusere beskyttende cellemediert immunrespons som er i stand til å fjerne infiserte celler i tilfelle med virale infeksjoner. 15 I tillegg viste disse forsøk at DC-mediert immunisering av neonater kan være mulig. Disse forsøk benyttet ikke genetisk modifiserte celler, og heller ikke benyttet de flere fremmede antigener eller et virus som beskrevet i foreliggende beskrivelse.

25 Sarzotti et al. (Science 271:1726-128, 1996) viste at lav dose inokulering med virus resulterer i en beskyttende immunrespons (Th1-type) som danner CTL-respons, men høy dose inokulering ville resultere i en ikke-beskyttende (Th2-type) immunrespons som i hovedsak danner antistoff. Disse CTL-responser var meget langvarige, men kunne også bli dannet i neonater. Høye doser av virus kan overvelde og avkrefte T-celler før DC kunne aktivere T-cellene. Igjen er ruten for administrasjon, ikke via injeksjon, men via presentasjon av DC viktig. Disse funn er konsistente med andre 30 resultater som viser at eksponering til lavdosevirus gir i hovedsak cellulær (Th1-type) immunrespons. I maskeaper

satte en lav dose SIV Th1-type responsen i gang uten anti-stoffproduksjon og beskyttet dyr mot høydoseangrep (Clerici et al. AIDS 8:1391-1395, 1994). I mennesker ble lignende resultater vist av Rowland-Jones et al. (Nature Med 1:59-64, 1995).

Fra Nature medicine, vol. 2, side 1122-1128 (Condon C. et al., 1996) er det kjent en metode for å immunisere dendrittceller ved å transfektere dem med nakent DNA ved hjelp av en genkanon, og fra Eur. J. Immunol., vol. 27, side 2426-2435 (Tan A. et al., 1997) er det kjent at suktermolekyler og komplekser som inneholder sukker, spesielt manose, kan bli tatt opp av dendrittceller ved reseptormediert endocytose.

Modifikasjonsprosessen av celler slik at de inneholder fremmed genetisk materiale er kalt genoverføring, transfeksjon eller transduksjon. Ingen av de angitte artikler heri har gitt bevis for effektiv genoverføring til antigenpresenterende celler, enten in vitro eller in vivo. Som bakgrunn for genoverføring i antigenpresenterende celler så som DC, har flere "laveffektive" in vitro-metoder blitt beskrevet, innbefattende liposommediert genoverføring; elektroporering og retrovirusvektor og adenovirusvektormediert genoverføring (Arthur, J.F et al. Cancer Gene Therapy. 4:1 17-21, 1997, Song, E.S. et. al. Proc Natl Acad Sci USA 94:5, 1943-8, 1997). Alle av disse in vitro-metoder involverer isoleringen av store populasjoner av celler som blir behandlet i laboratoriet med en genavleveringsvehikkel. Alle humane eller animalske applikasjoner involverer reintroduksjon av disse genetisk modifiserte celler. Følgelig er in vitro genavleveringsmetoder ikke mulige for vaksinerings eller behandling av store antall individer. Kjente in vitro-metoder innbefatter intradermal eller intramuskulær injeksjon av rekombinante virusvektorer og intradermal, subkutan og intramuskulær injeksjon av plasmidDNA. Ingen av disse metoder har blitt vist å effektivt avlevere gener i antigenpresenterende celler, så som dendrittceller, og enda

mindre avlevering av gener via huden til Langerhans-celle-
lene.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 illustrerer antistoffmediert genavlevering til cel-
5 ler som uttrykker Fc-reseptorer.

Fig. 2 illustrerer genavlevering til dendrittceller og
Langerhans-celler via mannosereseptoren ved å bruke PEI-
man-DNA-kompleks.

Fig. 3 illustrerer den transkutane genavleveringsmetode.

10 Fig. 4 sammenligner effektiviteten ved in vitro-transfek-
sjon av human DC ved å bruke to forskjellige komplekser
ifølge foreliggende oppfinnelse.

Fig. 5 CTL-assay, illustrerer at transdusert DC er i stand
til å danne cytotoksiske T-celler fra naive T-celler: sam-
15 menligner % cytotoksisitet av DC transfektert med inte-
grase-HIV-plasmid til den av kontroll DC.

Fig. 6 illustrerer CTL-responsen etter ex-vivo genetisk im-
munisering og sammenligner CTL-respons oppnådd in vivo ved
å bruke transfekterte DC.

20 Detaljert beskrivelse av tegningene

I fig. 1 er prosessen for antistoff mediert genavlevering
til celler som uttrykker Fc-reseptorer illustrert i kon-
sept. Målceller (1) som har en eller flere reseptorer (2a,
b, c, d) blir eksponert til et genavleveringskompleks (3)
25 omfattende et bæremateriale (4) og en vektor (5) som inklu-
derer det fremmede genetiske materialet. Genavleverings-
komplekset (3) binder til reseptorene (2 a, b, c, d) av
cellen (1) og vektoren (4) blir inkorporert i cellen via
endocytose eller fagocytose i et endosom (6). Vektoren (4)

har egenskapen å bryte opp endosomet (6), noe som tillater det fremmede genetiske materialet å bli frigjort i cellen.

I fig. 2 er prosessen for sukkermediert genavlevering til celler som uttrykker mannosereseptorer illustrert i konsept. Målceller (10), i dette tilfelle utviklede Langerhans-celler som har en eller flere mannosereseptorer (12), blir eksponert til et genavleveringskompleks (13) som omfatter et polyetyleniminsukker (mannose)-kompleks bundet med det fremmede genetiske materialet. Genavleveringskomplekset (13) binder til reseptorene (12) av cellen (10) og PEI-man-DNA blir inkorporert i cellen via endocytose i et endosom (14). Vektoren (PEI-mann) har egenskapen å bryte opp (15) endosomet, noe som tillater det fremmede genetiske materialet å bli frigjort i cellen. Cellen utvikler seg (16) og uttrykker proteiner (17) kodet av det fremmede genetiske materialet.

I fig. 3 er et eksperiment som viser in vivo sukkermediert genavlevering til celler som uttrykker mannosereseptorer, illustrert. Målceller er Langerhans-celler i huden som er kjent for å uttrykke mannosereseptorer. Mus (21) ble bedøvet og et område på ryggen av hver mus (22) ble barbert. Den barberte overflate ble rensert med etanol. PEI-man-DNA genavleveringskompleks i 8% glukose (23) ble påført på det barberte området (22) hos hver mus. Langerhans-celler (24) funnet i det barberte område av huden (22) plukker opp komplekset som beskrevet i fig. 2 ovenfor, blir aktivert og migrerer (24) til den uttrekkende lymfeknute (25). I løpet av migreringen utviklet Langerhans-celler (24) seg til dendrittceller (26) og uttrykker proteinet (27) kodet av det aktuelle DNA.

I fig. 4 viser eksperimentelle resultater in vitro genavleveringen med PEI-DNA mot PEI-man-DNA-komplekser. Human DC ble dyrket som beskrevet i teksten og transfektert med komplekser. Et markørgen som koder for et grønt fluorescent protein (GFP) ble benyttet som DNA. I disse forsøk ble kom-

pleksene oppløst i en oppløsning av NaCl. Forsøket viste at PEI-man er mer effektivt til å transfektere dyrkede DC enn PEI.

5 Fig. 5-6 viser forsøksresultater og er diskutert i detalj i eksempeldelen nedenfor.

Oppsummering av oppfinnelsen

Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å fremskaffe et genavleveringskompleks med forbedret effektivitet av genoverføring til celler, in vitro og in vivo. Genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremskaffe en effektiv immunrespons overfor virale sykdommer. Enda et annet mål for foreliggende oppfinnelse er å anvende genavleveringskomplekset for å fremstille en vaksine for virale sykdommer som er effektiv og har forbedret sikkerhet.

15 En fordel ved genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse er at det kan bli benyttet for immunoterapi og vaksinerings for et stort antall sykdommer.

Enda en annen fordel ved genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse er at det kan benytte enhver type DNA, eller RNA, innbefattende plasmid-DNA som koder for immunogener lik onkogener, immunogener (som forårsaker allergi), virale proteiner eller forskjellige typer replikasjonsdefektive virus, defektive virale partikler, så vel som plasmid-DNA.

25 Disse og andre mål og fordeler ved foreliggende oppfinnelse vil bli tydelige via teksten og eksemplene heri.

Målene og fordelene ved foreliggende oppfinnelse blir oppnådd ved å danne et genavleveringskompleks egnet for transkutan avlevering av gener til antigenpresenterende celler i huden omfattende en vektor (som inneholder det ønskede fremmede genetiske materialet) og et suktermolekyl eller

polyetylenimin og et suktermolekyl (som kan binde både til cellene og til genavleveringspartikkelen). Målceller eksponeres så til komplekset under betingelser som tillater endocytose. Vektoren har de særtrekkene at den tillater det 5 genetiske materialet å unngå endosomal nedbrytning og den avleverer det ønskede fremmede genetiske materialet til enten cytoplasma eller til nukleus. Fremmede proteiner kan bli uttrykt og presentert til immunsystemet av de genetisk-modifiserte celler. Dersom det fremmede genetiske materialet 10 koder for et replikasjonsdefekt virus som beskrevet i Attorney Docket Nr. RGT-100A, USSN "Methods and Compositions for Protetive and Therapeutic Genetic Immunization", kan de endrede målceller så presentere virale antigener og også uttrykke virale partikler og proteiner i lymfoidorganene, for derved å danne en effektiv cellulær immunrespons 15 så vel som en humoral immunrespons.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår nærmest genavleveringskomplekser for transkutan avlevering av fremmed genetisk materiale 20 til celler. Den er spesielt anvendelig for å øke effektiviteten av genetisk immunisering ved å øke effektiviteten av genoverføring til visse celler som deltar i immunsystemet, så som antigenpresenterende celler (APCs).

Det er for eksempel kjent at spesifikke proteiner blir tatt 25 inn i celler ved en prosess kalt reseptormediert endocytose. I denne prosess binder spesifikke proteiner eller ligander til spesifikke reseptorer i plasmamembranen hos en celle. Membranen danner en vesikkel, eller en lomme omkring proteinet og internaliserer til slutt liganden. Det vil si 30 den importerer proteinet til cellen. Etterpå avleverer endosomet typisk disse komplekser til et lysosom hvor de blir nedbrutt til sine bestanddeler, nemlig peptider. I celler hvor MHC-ekspressjon inntreffer, akkumulerer peptid-MHC-komplekser i lysosomet og når så overflaten av cellen i en 35 prosess kalt antigenpresentasjon. Reseptormediert endocy-

tose er metoden for å avlevere store molekyler så som essensielle metobolitter, hormoner og vekstfaktorer til celler. Den er en vei som benyttes av mange virus og toksiner for å få tilgang til celler, og spiller også en rolle i immunresponser. For eksempel har fagocytiske celler reseptorer som tillater dem å ta opp antigenantistoffkomplekser.

Partikler kompleksbundet til antistoff så som IgG eller komplement så som C3b, eller begge deler, kan effektivt trenge inn i celler via reseptormediert endocytose og fagocytose. Antistoff eller immunoglobuliner har forskjellige deler som tillater dem å utføre forskjellige funksjoner. For eksempel er immunoglobulin G (IgG) et Y-formet molekyl med to F_{ab} -segmenter som har antigenbindende seter og et F_c -segment som overfører effektorfunksjoner. Multivalente antigener kan binde til antistoff og danner immunkomplekser. Størrelsen av disse immunkomplekser er en funksjon av den relative konsentrasjon av antigen og antistoff.

Endocytose kan bli forsterket ved en prosess kjent som opsonisering. Opsonisering er en prosess hvorved antistoff belegger antigener, for derved å gi en mulighet for andre komponenter av immunsystemet til å gjenkjenne og reagere på antigenene. Immunoglobuliner med de passende F_{ab} -seter kan bli brukt til å belegge antigenpartiklene, og etterfølgende kan celler som uttrykker de tilsvarende F_c -reseptorer gjenkjenne F_c -delen av de opsoniserte antigener og lett endosytosere dem. Komplementer så som C3b, C4b og C3bi har også opsoniseringsaktivitet. Større immunkomplekser blir mer effektivt fagocytosert enn små av celler så som B-celler, mononukleære fagocytter, granulocytter, neutrofiler og dendrittceller som uttrykker reseptorer for F_c -delene av immunoglobulinmolekyler.

IgG-antistoff kan bli dannet i dyr ved å injisere dem med antigenet med eller uten adjuvanter. I tillegg kan antistoff bli klonet og humanisert ved å bruke molekylære genetiske teknikker. Andre reseptorer som vanligvis ligger på

membranene av immunsystemceller innbefatter for eksempel transferrin, mannose og asialglykoproteinreseptorer, som lett kan bli brukt for transduksjonen av immunsystemceller. F_c-reseptordelen av antistoffet kan også bli erstattet med
5 andre reseptorbindende domener ved å bruke molekylære genetiske teknikker. For oppfinnelsens formål er F_c-reseptorene og de tilsvarende IgG-molekyler passende, ettersom disse har den videre funksjon å transportere gener til dendrittceller.

10 Når et molekyl eller en partikkel blir tatt opp i en celle via endocytose eller fagocytose, blir den inneholdt i et proteinreseptorkompleks kalt et endosom. Endosomer er intracellulære syrerom som har en sorterende funksjon. Fagosomer som stammer fra fagocytose, er store (10x-20x) endo-
15 somer. Endosomer fuseres så med lysosomer hvor materialet blir spaltet til mindre produkter så som peptider, nukleotider og sukkerer. I foreliggende oppfinnelse er rollen til vektoren å gi det fremmede genet til cellen og unngå nedbrytning av genet. Det vil si vektoren må være i stand til
20 å bryte endosomet og frigjøre genet inn i den intracellulære væske, cytosol eller inn i kjernen. Et antall partikler er kjent for å være i stand til å bryte endosomet etter reseptormediert endocytose, innbefattende virale genavleveringspartikler så som adenovirusvektorer, retrovirusvektorer,
25 kobbevirusvektorer, og SV-40-virus. Ikke-virale genavleveringspartikler innbefatter konjugater av DNA med polylysin, polyetylenimin og dets derivater, liposomer, virosomer og kjemikalier som øker pH i endosomet, så som klorokin.

30 **Målceller**

Foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet med enhver celle som er i stand til reseptormediert endocytose eller fagocytose. Målcellene må uttrykke et reseptorsete som, ved binding med et komplementært molekyl, kan bringe det øns-
35 kede molekyl til endosomet eller fagosomet. Slike celler er

fortrinnsvis celler som deltar i immunresponsen. De innbefatter celler som kan delta i reseptormediert endocytose og fagocytose av antigener. Slike celler innbefatter for eksempel, B-celler, mononukleære fagocytter, granulocytter og dendrittceller. Disse celler uttrykker reseptorer for F_c-delen av immunoglobuliner eller komplementreseptorer eller begge deler. Dendrittceller og makrofager er spesielt foretrukket, fordi de effektivt kan presentere fremmede antigener, for derved å gi en cellulær immunrespons eller CTL-respons. Cellene kan også bli målrettet via andre reseptorer så som transferrin og mannosereseptorene.

Dendrittceller ligger i de lymfoide vev, så som milten, mandelen og lymfeknutene, men de kan bli funnet i blodet, huden, slimhinner og andre perifere vev. Disse celler plukker opp antigener og migrerer med antigenene til lymfoide vev. I huden kan dendrittceller kalt Langerhans-celler bli funnet i epidermis. Når de endocyterer et antigen, migrerer de inn i regionale lymfeknuter. I lymfeknuten blir de kalt interdigiterende celler, og de presenterer antigenet til naive T-celler, for å gi den cellulære immunresponsen.

For å øke effektiviteten av genoverføring bør antallet tilgjengelige dendrittceller bli maksimalisert. Valg av beliggenhet kan være en faktor. Høye konsentrasjoner av dendrittceller blir for eksempel funnet i huden og på mukosa, så som munnen, vagina og rektum. Uutviklede DC i vevet kan endocytere effektivt, og følgelig er de et godt mål for genavleveringskomplekset som avleverer genet med reseptormediert endocytose. Imidlertid for effektiv ekspresjon av MHC-molekyler og antigenpresentasjon, må DC også bli aktivert. In vitro kan utviklede DC bli dannet fra perifert blod med GM-CSF og IL-4 eller fra benmargprekursorer med GM-CSF. Aktivisering av disse utviklede DC kan bli induert in vitro og in vivo ved bakterielle produkter så som lipopolysakkarid og TNF-alfa (Watts C. Nature 338:724-725, 1997).

Dendrittceller kan bli tiltrukket til et spesielt sted og aktivert ved en hendelse som implikerer immunsystemet så som en celle- eller vevsskade. For foreliggende formål kan tiltrekning og aktivering av antigenpresenterende celler innbefattende dendrittceller, bli fremmet med en immunrespons som er urelatert til vaksinerings eller viral infeksjon. Et eksempel vil være hudutslett som er et resultat av kontaktsensitivitet overfor kjemikalier så som medikamenter og toksiner, kosmetika og miljømessige antigener. Dersom et kjemisk irriteringsmiddel blir penslet på huden, vil et utslett eller en lesjon vanligvis oppstå 24-48 timer etter eksponering. Lesjonen er grunnet neoantigener dannet ved binding av kjemikalier til overflateproteinene hos Langerhans-celler. Neoantigener er kovalent modifiserte "normale" proteiner (for eksempel fosforylerte) som blir gjenkjent av antistoff. Ved dette område kan høyere enn normale mengder av dendrittceller bli funnet, og de er mer sannsynlige å være aktivert, det vil si mer mottakelige for umiddelbar endocytose av et antigen. Valget av irriteringsmiddel avhenger av dets effektivitet til å tiltrekke DC og av dets bieffekter. Ved immunkomplaksmedierte skader kan immunkomplekser med både antigen- og antistoffkomponenter bli benyttet for å aktivere B-celler og komplementkaskaden med resulterende vevsskade.

Siden cellene er målrettet via en spesifikk klasse av reseptorer, er en spesiell fordel ved foreliggende oppfinnelse at genavleveringskomplekset kan bli gjort til å målrettes spesifikke celler. Dersom genavleveringskomplekset blir dannet med IgG eller et polyetylenimin modifisert med en passende stivelse eller sukker, vil den bli tatt opp vesentlig av antigenpresenterende celler. Dette ville være en stor fordel ved utvikling av genbaserte vaksiner. Målretting av andre uttrykkende celler, for eksempel komplementreseptorer eller transferrinreseptorer, er også mulig som beskrevet ovenfor.

Genavleveringskompleks

Genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli brukt for å avlevere transkutant gener in vitro eller in vivo til celler som bærer en gitt reseptor. Genavleveringskomplekset er bygget av to deler: det genetiske materialet og en avleveringspartikkel, og kan ytterligere omfatte et bæremiddel (Se fig. 1). I en utførelsesform blir det genetiske materialet avlevert fra en svekket HIV-virus og avleveringspartikkelen er en ikke-viral vektor.

I en annen utførelsesform kan det samme eller forskjellige genetiske materiale bli kombinert med en viral vektor og et bæremateriale. I dette tilfellet er bærematerialet fortrinnsvis et antistoff som har et sete som komplementerer en reseptor som er til stede på overflaten av målcellen, og et antigenbindende sete som er spesifikt for den ønskede avleveringspartikkel. Et slikt bæremateriale er spesifikt for både cellen og avleveringspartikkelen. For genetisk immunisering blir human IgG som er spesifikk for genavleveringspartikkelen passende valgt. Dersom det ikke er noe antistoff som er kommersielt tilgjengelig, kan det blir dannet med teknikker som er kjent for den vanlige fagmann. Dersom genavleveringspartikkelen er replikasjonsdefektivt HIV-1, kan human IgG bli brukt som et bæremateriale, og er tilgjengelig i store mengder for passiv immunoterapi. Genavleveringspartikkelen kan bli kompleksbundet med antistoffet ved å inkubere dem sammen i 5 minutter ved romtemperatur. De relative mengder av genavleveringspartikkel og antistoff blir bestemt ut fra hvorvidt det er ønsket å opsonisere genavleveringspartiklene.

30 Det genetiske materiale

Det genetiske materiale, enten DNA eller RNA, blir båret av avleveringskomplekset. Ett eller flere gener kan bli kodet på en kjede av plasmid-DNA, på dobbeltkjedet DNA eller på RNA. Alternativt kan det genetiske materiale være bygget

inn i rekombinante virus dersom de blir brukt som en gen-
avleveringspartikkel. Dersom formålet med genoverføringen
er å indusere en immunrespons, så må det genetiske materi-
ale uttrykke ett eller flere immunogene proteiner. Trans-
5 duserte celler vil derpå uttrykke nok av de immunogene pro-
teiner (forskjellige virale antigener og danner autentisk
nok virale partikler) for å gi en tilstrekkelig immunres-
pons (for eksempel beskytte individet fra infeksjon med
villtypeviruset).

10 Valget av genavleveringspartikkelen vil bli bestemt av syk-
dommen og valget av gen(er) til overføring. Hvor det er
ønsket å konstruere en vaksine for et reverstranskriptase-
avhengig virus så som HIV, koder DNA fortrinnsvis minst en
vesentlig del av et replikasjons- eller integrasjonsdefek-
15 tivt virus eller det replikasjons- eller integrasjonsde-
fektive virus i seg selv. Eksempler innbefatter integrase-
negative mutanter av et dualt tropisk primært isolat så som
HIV-1/LW, og derivater derav som har en delesjon i protease
spaltningssete av gag-genet. Se Methods and Compositions
20 for Protective and Therapeutic Genetic Immunity, USSN
08/803,484 innlevert 20. februar 1997. Hvor det er ønsket å
konstruere en vaksine mot kreft, er immunogenet fortrinns-
vis DNA som koder for en eller flere onkogener. Andre DNA-
konstruksjoner kan være DNA som koder for replikasjonsde-
25 fektivt Human Papilloma Virus (som forårsaker hjernekreft),
replikasjonsdefektivt Hepatitt A, B og C virus (som forår-
saker hepatitt og leverkreft), og DNA som koder for repli-
kasjonsdefektive animalske virus lik bovinleukemivirus el-
ler katteimmunsviktivirus. Valg for en avleveringspartikkel
30 som inkorporerer det fremmede genetiske materiale kan inn-
befatte: (a) replikasjonsdefektive HIV eller andre retrovi-
rus; (b) rekombinante adenovirus; (c) plasmid eller lineært
DNA eller RNA-kompleks bundet med PEI eller et derivat av
PEI; (d) et virosom inneholdende ethvert DNA eller RNA; (e)
35 liposom inneholdende DNA eller RNA; (f) plasmid DNA-polyly-
sinviruskompleks; (g) sukkerkompleks bundet med ethvert DNA
eller RNA.

Avleveringssystemet

For effektivt å avlevere genene til cellen, må genavleveringssystemet inneholde genet eller genene som skal avleveres og må også ha egenskapen å bryte endosomet (eller fagosomet), i stedet for å bli avlevert til et lysosom eller bli isolert på den utvendige overflate av en celle og målrettet for ødeleggelse. Videre må genavleveringssystemet lette inkorporering av det fremmede genetiske materiale inn i det genetiske materiale hos cellen.

10 Genavleveringssystemet kan innbefatte enten en viral eller ikke-viral vektor. Virale genavleveringssystemer innbefatter rekombinante virusvektorer så som adenovirusvektorer, retrovirusvektorer, kobbevirusvektorer, mutante virus (beskrevet ovenfor) og virosomer. Ikke-virale gen-avleveringssystemer innbefatter DNA-konjugater med sukker, poly-
15 lysin, polyetylenimin, polyetyleniminderivater, og liposomer, sammen med deres derivater.

Ikke-virale genavleveringssystemer så som dem som benytter
20 sukkere, sukkerderivater, liposomer, liposomderivater og polyetylenimin eller polyetyleniminderivater er foretrukket. Av disse er sukker og polyetyleniminderivater tilpasset å målrette mannosereseptoren hos immunsystemcellene mest foretrukket.

Ikke-virale genavleveringssystemer gir flere fordeler i forhold til virale genavleveringssystemer: 1) for det første blir den ikke-virale vektor ikke gjenkjent av immunsystemet, slik at ingen immunrespons blir dannet mot den. Som et resultat er det mer sannsynlig at individer behandlet med sluttvaksinen vil tolerere og utvikle tilfredsstillende immunrespons i tilfeller med gjentatt immunisering; 2) ikke-virale systemer er potensielt sikrere enn virale systemer fordi det ikke finnes noe mulighet for at systemet vil mutere på en uventet måte; 3) ikke-virale systemer kan bli

kjemisk syntetisert i store mengder, og er derfor potensielt mindre kostbare.

Den foretrukne utførelsesform er basert på en kationisk polymer, polyetylenimin (PEI). PEI binder til DNA og danner komplekset. PEI-DNA-komplekset kan trenge inn i endosomet hos hudens antigenpresenterende celler, Langerhans-celler, via asialoglykoprotein reseptormediert endocytose. Derpå utnytter PEI-komponenten av dette komplekset endosombuffering og svelling som en unnslippende mekanisme til cytoplasma [Pollard H; Remy JS; Loussouarn G; Demolombe S; Behr JP; J Biol Chem 1998 Mar 27; 273(13):7507-11]. PEI kan også bli modifisert til å målrette andre reseptorer. For eksempel, oppnår et PEI-derivat, så som en sukkermodifisert PEI, lignende resultater, bortsett fra at det blir tatt opp gjennom cellens mannosereseptor. Slike derivater kan bli laget i laboratoriet. For eksempel kan et isotiocyanantofenylfenyl-mannosederivat bli koblet til PEI 25 kDa, noe som gir en ligand (eller, mannoseresiduum av lav affinitet for mannosereseptoren, 1 mM). En annen mulighet er å bruke lineær PEI 22k Da derivatisert mannotenpaoseligand. (Disse materialer ble vennlig gitt av Dr. Jean-Paul Behr, Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, CNRS-UMR 7514 74 route du Rhin 67401 Illkirch, Frankrike)

Mannosereseptoren er et 175-kDa transmembranglykoprotein som spesifikt uttrykkes på overflaten av makrofager og Langerhans-celler. Ektodomenet av mannosereseptoren har åtte karbohydrat gjenkjennelsesdomener. Mannosereseptoren gjenkjenner mønstrene av sukker som bæres av en mengde bakterier, parasitter, gjær, sopp, og mannosylerte ligander. [Takahashi K; Donovan MJ; Rogers RA; Ezekowitz RA, Cell Tissue Res 1998 mai; 292(2);311-23]. I motsetning til F_c-reseptor, rekonstituerer mannosereseptoren seg selv mens den frigjør sin last [Stahl et al. Cell 1980 19:207]. Det kan således internaliseres ligander i suksessive runder, på en måte som likner transferrinreseptoren, og som gir en vedvarende kapasitet for antigeninnfangning [Goldstein, et

al, 1985, Annu Rev Cell Biol. 1:1]. Det har nylig blitt oppdaget at mannosereseptormediert opptak av antigener resulterer i omkring 100 ganger mer effektiv antigenpresentasjon til T-celler sammenlignet med antigener internalisert via væskefase [Engering et al. 1997, Eur. J. Immunol. 27:2417-2425]. Denne økede antigenpresentasjon er grunnet høyt effektivt opptak av antigener via mannosereseptoren. Av disse grunner er det antatt at det å målrette mannosereseptoren kan gi både spesifisitet for antigenpresenterende celler og forbedret effektivitet av funksjonelt opptak av komplekset i endosomet.

Bærematerialet

Bærematerialet som benyttes i genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse, er den del av genavleveringskomplekset som binder sammen et genavleveringssystem med en cellulær reseptor. I en utførelsesform er bærematerialet et immunoglobulin G (IgG). IgG er et Y-formet molekyl med to F_{ab} -segmenter som har antigenbindende seter og et F_c -segment som binder til den cellulære reseptor kalt F_c -reseptor. Immunsystemceller så som B-celler, mononukleære fagocytter, granulocytter og dendrittceller har F_c -reseptorer. Når IgG blir brukt som et bæremateriale, målretter den spesifikt celler som har F_c -reseptorer.

For å endre spesifisitet til bærematerialet for å målrette andre celler, kan F_c -delen av antistoffet bli erstattet med andre reseptorbindende domener, så som komplement, sukker eller transferrin.

Hvor bærematerialet er et antistoff, blir store komplekser dannet, og bærematerialet og genavleveringssystemet blir fortrinnsvis kombinert i like mengder. Hvor det er ønsket å opsonisere partikkelen, overskrider mengden av bærematerialet i stor grad mengden av genavleveringspartikler. Både endocytose og fagocytose blir øket i tilfellet med store komplekser og opsoniserte partikler. Genavleveringskomplek-

set blir fortrinnsvis opsonisert med bærematerialet. Hvor et opsonisert genavleveringskompleks som danner et antistoff kompleks bundet med en avleveringspartikkel som inkorporerer fremmed genetisk materiale blir administrert til et individ, vil den cellulære immunrespons bli maksimalisert i forhold til den humorale immunrespons. Dendrittcellene vil bli aktivert av de opsoniserte komplekser, og endocytose vil være mer effektiv. I tillegg vil de multiple antistoff blokkere de antigenene determinanter (epitoper) av avleveringspartikkelen. Følgelig vil ingen direkte antistoffrespons til avleveringspartikkelen være ventet. I tillegg vil enkelte antistoffkomplekserte antigener binde til F_c -reseptorsetet av B-celler, noe som ytterligere inhiberer deres antistoffrespons. Imidlertid vil cellulær immunitet bli stimulert fordi komplekset vil bli endocytosert eller fagocytosert av forskjellige typer antigenpresenterende celler, innbefattende dendrittceller og makrofager.

I en foretrukket utførelsesform er bæremidlet kovalent bundet til det ikke-virale genavleveringssystem. PEI kan bli kjemisk modifisert med sukker (for eksempel mannose, glukose, galaktose, etc.). Bærematerialet er i dette tilfelle sukkerliganden, som blir gjenkjent av mannosereseptoren. For å endre bærematerialets spesifisitet, kan sukker bli erstattet med andre reseptorbindende domener.

25 **In vivo genavlevering**

Genavleveringskomplekset kan bli injisert direkte i blodet, huden eller et annet sted hvor celler tilsvarende bindings-spesifisiteten til bærematerialet befinner seg. Komplekset kan bli påført på huden eller slimhinneoverflatene direkte. I dette tilfellet er det foretrukket at Langerhans-cellene er overflateaktivert. Aktivering kan bli oppnådd med reseptorstimulering (for eksempel mannosereseptor), toksinaktivering (koleratoksin), en vev- eller celledskade så som inflammasjon, og kan være følgen av annen antigenstimulering.

Komplekset kan bli infusert ved å bruke et pediatrik mate-
rør oralt, vaginalt eller rektalt i tilfellet med voksne
mennesker eller dyr eller neonater. Neonater kan reagere
bedre på oral administrasjon enn voksne. Alternativt kan
5 genavleveringskomplekset bli pakket i et suppositorium og
satt inn i vagina eller rektum.

Hvor det benyttes en viral avleveringspartikkel, kan avle-
veringspartikkelen bli injisert direkte i muskelen eller
 huden, ved tilstedeværelse eller fravær av adjuvanter, hos
10 individet i to separate hendelser for høy titer av anti-
stoffproduksjon in vivo. Den første injeksjon vil i hoved-
sak resultere i en humoral immunrespons. Det vil si egen-
skapen å produsere store antall antistoff vil resultere.
Hvor en konsentrasjon av IgG-antistoff som er tilstrekkelig
15 å opsonisere avleveringspartikler er tilgjengelige (den kan
bli målt eller undersøkt ut fra erfaring), så kan avleve-
ringspartikkelen bli administrert en andre gang som beskre-
vet i 1-3 ovenfor. Setet for den andre administrasjon må
bli valgt nøye for å sikre at celler som kan fagocyttere el-
20 ler endocyttere de opsoniserte antigenene er tilstede.

Behandling av aktiv infeksjon

En vaksine fremstilt ved anvendelse av genavleveringskom-
plekset ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli brukt
for å behandle aktiv HIV-infeksjon. HIV replikerer i stor
25 utstrekning, muterer rask slik at, mens immunsystemet er i
stand til å gi en effektiv respons til en gitt type HIV-
partikkel, blir tilstrekkelige nye varianter av partikkelen
produsert for å ha et forsprang på immunsystemet. Dersom
replikasjon av villtypeviruset kan bli undertrykt enten før
30 immunsystemet blir skadet i vesentlig grad eller lenge nok
til å tillate immunsystemet å komme seg, kan den aktuelle
vaksinen bli brukt til å forsterke immunsystemets egenskap
å gjenkjenne de nye varianter av viruset, og derved å gi en
metode for å kontrollere viral replikasjon i individer som
35 allerede har blitt infisert.

Medikamentkombinasjoner som er effektive til i det minste temporært å inhibere HIV-replikasjon, er kjent. Foreliggende søkere har vist at medikamentkombinasjoner innbefattende hydroksyurea, en eller flere revers transkriptase-inhibitorer og, eventuelt en eller flere proteaseinhibitorer er spesielt effektive, og gir for enkelte pasienter mulighet til å stoppe medikamentbehandling over lengre tidsperioder. Se USSN 09/056,691, innlevert 8. april 1998 "Method of Inhibiting HIV by Combined Use of Hydroxyurea, a Nucleoside Analog, and a Protease Inhibitor, USSN 09/048,-753, innlevert 26. mars 1998 "Method of Inhibiting HIV using Hydroxyurea and Reverse Transcriptase Inhibitor *in vitro*" og USSN 09/048,756, innlevert 26. mars 1998, Method of Rendering a HIV Population Replication Incompetent *in vivo*.

15 Genavleveringskompleksene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes ved behandling av en pasient som har aktiv HIV-infeksjon sammen med en passende medikamentkombinasjon inntil den virale belastning i blodet har nådd et passende lavt nivå, mindre enn omkring 50.000 kopier per ml, fort-

20 rinnsvis mindre enn 10.000 kopier per ml, mer foretrukket mindre enn 200-500 kopier per ml. Pasienten blir så vaksinert ved å bruke genavleveringskomplekset ifølge foreliggende oppfinnelse mens medikamentkombinasjonen undertrykker replikasjon av villtypeviruset.

25 De følgende eksempler blir presentert for det formål å illustrere utførelsen av foreliggende oppfinnelsen.

Eksempler

1. Ekspresjon av plasmid DNA som koder for et replikasjonsdefektivt HIV i dyrket DC

30 Det finnes flere kilder for DC. DC kan bli isolert fra benmarg CD34+ hematopoietiske forløperceller. Mononukleære benmargceller vil bli atskilt med Ficoll-Hypaque gradient-sentrifugering. Disse celler vil bli positivt selektert med humane CD34-antistoffkonjugerte magnetiske kuler (Dynal De-

tachabeads) og CD34+-celler vil bli fjernet fra magnetiske kuler ved å bruke høyaffinitet polyklonalt antistoff mot CD34 monoklonalt antistoff. Disse celler kan differensiere til DC når de blir dyrket med stamcellefaktor, GM-CSF og TNF-alfa [Canque, B., M. Rosenzwaig, et al. (1996). "The effect of in vitro human immunodeficiency virus-infection on dendritic-cell differentiation and function." Blood 88(11):4215-28.]

Monocytstavlede DC ble dannet fra perifere mononukleære blodceller ved tilstedeværelsen av GM-CSF og IL-4 [Bender, A., M. Sapp, et al. (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." J Immunol Methods 196(2):121-35.] På dag 4 ble celler transfektert med lipofektamin, kompleksbundet med plasmid DNA som koder for HIV-1/Lwint- (et integrasjons- og replikasjonsdefektivt HIV beskrevet i USSN 08/803,484). Lipofektamin er et kommersielt tilgjengelig kationisk liposom som er anvendelig som en transfeksjonsreagens (tilgjengelig fra Gibco BRL Life Technology, PM. Gaithersburg, Md., US). 48 timer senere ble celler vasket og analysert. Renheten av DC, karakterisert ved Fluoresensaktivert cellederter (FACS) som måler overflatemarkører (FACS) var 90,6%. DC-celletyper ble funnet å være CD3-, CD19-, CD56-, CD14- og HLA DR+ ved å bruke FACS-analyse. Ekspresjonen av HIV-1 Gag og Env- og Tat-proteiner ble også målt ved FACS i permeabiliserte celler. Nivået av ikke-spesifikk binding av kontrollisotop Ig var den samme i de kontrolltransduserte og spesifikke plasmidtransduserte celler. Det ble funnet i tre uavhengige forsøk at 25-37% av HIV-1/Lwint-transduserte DC uttrykte Env-, Gag- og Tat-proteiner. Det vil si 25-37% av cellene i de transduserte prøver uttrykte HIV-proteiner. Transduserte og kontrollcelleprøver ble også dobbeltfarget med p24- og B7-2-antistoff for å vise at DC og ikke-makrofager uttrykte antigenet. Disse resultater er overraskende gode, fordi ved å bruke samme metoder med et annet plasmid DNA (CMV-drevet hemagglutinin av influensa virusgen) uttrykte kun 5-8% av de

transfekterte celler proteiner. Disse resultater viste at defektive HIV effektivt kan bli uttrykt av transdusert DC.

2. DNA som koder for replikasjonsdefektive virus er mer effektive antigener enn DNA som koder for ett eller flere proteiner

I et uavhengig forsøk ble ekspresjonen av to forskjellige HIV-plasmider i DC sammenlignet: HIV-1/Lwint- og LTR-tat. Begge konstruksjoner er drevet av samme promotoren: HIV-1-LTR og ekspresjonen av begge konstruksjoner avhenger av transaktiveringen av Tat. Transfeksjon ble utført som beskrevet i eksempel 1, og 48 timer senere ble ekspresjon av Tat-proteinet analysert med FACS. Det ble funnet at 32% av HIV-1/Lwint-plasmidtransfekterte DC uttrykte Tat-protein. I motsetning til dette uttrykte kun 10% av de LTR-tat-transfekterte DC det samme Tat-protein. Dette resultat var overraskende fordi i dette sammenligningsstudium ble det ventet samme effektivitet med de to forskjellige konstruksjoner. Replikasjonsdefektive virus har klart egenskapen å danne viral partikkel som kan bli frigjort fra cellen. Siden antigenpresentasjon avhenger av genekspresjon i DC, viser dette forsøk klart at DNA som koder for defektive virus er mer effektive antigener enn DNA som koder for ett eller flere proteiner.

3. Transduserte, dyrkede DC aktiverer naive CTL in vitro

Etter transduksjon ble DC dyrket med autologe T-celler ved et forhold på 1:10. Etter 7 dager ble disse T-celler benyttet som en effektor til å lysere (drepe) en monocytt-/makrofagcellepopulasjon fra samme donor som hadde blitt pulset med p55, som er et HIV-protein passende benyttet som en markør. Denne CTL-aktivitet ble målt ved å bruke Cr-frigjøringsassay. Som figur 5 viser, lyserte CTL induert med transdusert DC målcellene spesifikt og effektivt. Fordi dannelse av CTL in vivo er vanskeligere enn in vitro, viser disse forsøk at celler som har blitt utsatt for genetisk

immunisering kan aktivere naivt CTL slik at de effektivt vil lysere in vivo infiserte celler. Videre viser forsøk ytterligere at DNA som koder for et defekt virus ikke bare uttrykker effektivt HIV-gener, men kan også danne en effektiv immunrespons.

4. Ex vivo genetisk immunisering med transduserte DC

For å bevise in vivo-effektiviteten av genetisk immunisering i aper, ble dendrittceller dannet fra 40 ml perifert blod fra grisehale-maskeaper. Celler ble transfektert med LW/int- plasmid ved å bruke polyetylenimin som beskrevet i eksempel 5. De transfekterte DC ble vasket og injisert i unge grisehale-maskeaper 36-48 timer etter transfeksjon. En del av de transfekterte DC ble injisert subkutant og en del ble injisert intravenøst. Etter 4 uker og kun ett immuniseringsforsøk viste en ape allerede CTL-respons (Fig. 6), noe som antyder at in vitro-resultatet kan bli reproduisert in vivo i dyr. I motsetning til dette har HIV subenhetvaksinene som for tiden er godkjent for fase III humane kliniske forsøk, ikke blitt vist å danne noe CTL-respons, selv etter flere immuniseringsforsøk.

5. Polyetyleniminmediert genoverføring i dyrkede dendrittceller.

Dendrittceller ble transdusert med plasmid som koder for HIV-1/Lwint- som i eksempel 1, bortsett fra polyetylenimin (PEI vennlig gitt av Dr. Behr) ble benyttet istedet for lipofektamin. Cellene ble undersøkt som i eksempel 1, og mer enn 60% av dendrittcellene transdusert ved å bruke polyetylenimin uttrykte HIV-1-proteiner i motsetning til 25-37% av celler transdusert ved å bruke lipofektamin. Siden lipofeksjon til nå var den beste genoverføringsmetode til å introdusere plasmid DNA i DC, viser dette forsøk at PEI er det mest effektive ikke-virale genavleveringssystemet til å overføre gener i DC. Imidlertid viste både PEI og lipofek-

tamin stor toksisitet overfor dendrittceller, som målt med tripanblå farging.

6. Spesifikk målretting av DC via mannosereseptor

Ikke-utviklede DC ble dannet som beskrevet ovenfor i eksempel 1 og transfektert med DNA som koder for et grønt fluorescent protein (GFP). Dette DNA ble brukt som en markør for genekspresjon, fordi celler som uttrykker det grønne fluorescente protein lyser opp grønt etter fluorescent-stimulering. Følgelig kan transfekterte celler bli gjort synlige med fluorescentmikroskopi og strømningscytometri (FACS).

PEI modifisert med forskjellige sukkerer ble valgt til å målrette mannosereseptoren på overflaten av dendrittceller fordi mannosereseptoren gjenkjenner alle mønstrene av sukkerer på overflaten av bakterier, parasitter, gjær og sopp. DNA ble kompleksbundet med PEI og med forskjellige sukkerbærende polyetyleniminer (tilgjengelig ved spesiell bestilt basis fra Dr. Jean-Paul Behr, Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, CNRS-UMR 7514 74 route du Rhin 67401 Illkirch, Frankrike). 2 mikrogram DNA ble inkubert med forskjellige derivater av PEI i 150 mM NaCl (10:1 N:P forhold) ved romtemperatur i omkring 5 minutter. Derpå ble DC transdusert med kompleksene i 6 timer, vasket, og grønne fluorescente celler ble analysert etter 48 timer. Det ble funnet at den mest effektive PEI-sukkermodifikasjon er PEI-mannose (Tabell 1).

Tabell 1. Forskjellige komplekser for in vitro-transduksjon av dendrittceller

Forsøk	% av celler som uttrykker grønt fluorescentprotein
1. Kontroll	4
3. PEI-mannose-DNA	43
4. PEI-galaktose-DNA	23
5. PEI-glukose-DNA	19

7. In vitro PEI-mannosemediert genoverføring i dyrkede dendrittceller

Det mannosebærende polyetylenimin (PEI-man) er et isotiocyanantofenylfenylmannosederivat, koblet til PEI 25 kDa, noe som gir en ligand (eller mannoseresiduum av lav affinitet for mannosereseptoren, 1 mM). Det har tidligere blitt vist at inngang via asialoglykoproteinreseptoren (benyttet av PEI) krever at komplekset er ladet, dette vil si mer PEI enn DNA må bli brukt. Når komplekset blir nøytralisert, det vil si PEI blir nøytralisert av DNA, kan komplekset ikke trengte inn via asialoglykoproteinreseptoren. [Zanta MA; Boussif O; Adib A; Behr JP. Bioconjug Chem 1997 nov-des;8(6):839-44]. Disse forskere utviklet et hepatocyttdirekte kompleks; det induserer flere nøkkeltrekk antatt å favorisere in vivo genavlevering til leveren: 1) elektrostatiske nøytrale partikler som unngår ikke-spesifikk binding til andre celler, og 2) å unngå asialoglykoproteinreseptormediert endocytose. Dette system var basert på en 5% galaktosebærende polyetylenimin (PEI-gal)-polymer som er kondensert med plasmid DNA til nøytralitet.

Det blir funnet at med PEI-man-DNA-komplekser er mindre DNA nødvendig til å nøytralisere PEI-man sammenlignet med PEI. Gel-elektroforeseforsøk ved å bruke forskjellige N:P forhold av PEI-DNA-komplekser viste at 5:1 (N:P) av PEI-man:DNA-kompleks har nøytral ladning, i motsetning til 3:1 (N:P) PEI-DNA-kompleks. {Nøytraliseringen av PEI med DNA avhenger av N(nitrogen):P(fosfat) forholdet; hvor ett mikrogram DNA = 3×10^9 molar P og 1mM PEI = 109 molar N/mikroliter. Dette betyr for eksempel at 10:1 forhold er blandingen av 3 mikroliter 10mM PEI og 1 mikrogram DNA).

Human DC ble isolert som beskrevet ovenfor. Renhet av DC, karakterisert ved FACS, var over 99%. Ved å måle cellelevedyktighet med tripanblå farging, ble det funnet at PEI-man

var mye mindre toksisk enn PEI. Det ble også funnet at både PEI og PEI-man er i stand til å introdusere DNA i DC, men PEI-mannose er mer effektivt. Ved 5:1 (N:P) forhold er PEI-man-DNA-kompleks nøytral, og følgelig er komplekset kun i stand til å trenge inn DC via mannosereseptoren. Under disse forhold uttrykte 30% av DC det grønne fluorescente protein. I motsetning til dette er 5:1 (N:P)-forhold PEI-DNA-kompleks ladet og komplekset trenger inn via asialoglykoproteinreseptoren. Under disse forhold uttrykte 14% av DC det grønne fluorescente protein (fig. 4).

8. In vivo genavlevering til Langerhans-celler i huden

I huden er de eneste celler som kan endocyttere mannosylerte ligander Langerhans-cellene. Følgelig var hovedspørsmålet hvor vidt PEI-(man)-komplekset kan trenge inn i huden og transfektere Langerhans-celler in vivo. PEI-(man) ble kompleksbundet med plasmid-DNA som koder for et grønt fluorescent protein (GFP). Forsøk med forskjellige genavleveringskomplekser ble utført som beskrevet i fig. 3. Komplekset inneholdt 50 mikrogram DNA og 8,25 mikroliter 100 mM PEI-man i en 5-10% glukoseoppløsning (optimum = 8%). BALB/c-mus ble bedøvet, og ryggene hos musene ble barbert. 0,1 ml av kompleksene ble påført på huden i en time eller subkutant som indikert i tabell 2. Mus ble avlivet 6 timer etter immunisering og hudprøver ble plassert i DMEM-medium supplementert med 10% føtalt kalveserum og antibiotika. Under disse betingelser migrerer celler innbefattende Langerhans-celler ut fra huden. En dag etter ble de migrerende celler samlet opp og analysert med strømningscytometri (FACS), fordi denne analyse kan gjenkjenne celler som uttrykker det grønne fluorescente protein. I den aktuelle analyse ble kun den store og tette cellepopulasjon analysert, fordi både dendrittceller og Langerhans-celler er kjent for å være store, tette celler.

Tabell 2. In vivo-transduksjon av Langerhans-celler i huden

Forsøk	% av celler som uttrykker det grønne fluorescent protein
1. Kontroll	0,84
2. Subkutant PEI-DNA	0,20
3. Subkutant DNA	1,74
4. Transkutant PEI-DNA	6,52
5. Transkutant DNA	29,10
6. Transkutant PEI-man-DNA	22,99

Disse forsøk viser at 1) transkutan genavlevering resulterer i mer effektiv genoverføring i Langerhans-celler enn subkutan avlevering (sammenlign forsøk 2 & 4 eller 3 & 5). Dette er viktig, fordi en av de beste foreliggende vaksinasjonsteknologier benytter subkutan injeksjon. 2) Inntrengning via mannosereseptorer er mer effektiv til å transfektere in vivo Langerhans-celler enn inntrengning via asialoglykoproteinreseptoren (sammenlign forsøk 4 & 6). Disse in vivo-forsøk bekrefter in vitro-forsøk (se fig. 4). Følgelig er det sukkermodifiserte genavleveringssystem foretrukket til å transdukere antigenpresenterende celler.

9. Transduserte Langerhans-celler migrerer til lymfeknutene

BALB/c-mus ble preparert som i eksempel 8, og 0,1 ml prøver av PEI-man-DNA-komplekset ble påført på huden i en time. 2 dager senere ble dyrene avlivet og lymfeknuter (LN) ble fjernet. Ekstra LN ble undersøkt fordi de er de uttrekkende LN på ryggen, og migrerende Langerhans-celler kunne bli funnet der. De aktuelle LN ble frosset, skåret i skive og undersøkt under fluorescent mikroskop. De aktuelle LN fra forsøksmus ble sammenlignet med LN fra en kontrollmus. Det var mulig å påvise omkring 15 grønne fluorescente celler i prøvene fra forsøks-LN og ingen i kontroll-LN. Disse resultater demonstrerer at komplekset trengte inn i celler som lå i huden, og cellene var i stand til å migrere i LN og uttrykke det grønne fluorescente protein. Morfologien av disse grønne celler ligner DC-morfologi: de er store celler

og beliggenheten av den grønne fluorescens viser et "bul-
kede" mønster, som er karakteristisk for DC. (Andre celler,
for eksempel 293 celler viser et diffust grønt mønster i
cytoplasma.) I tillegg er den eneste celletype som er i
5 stand til å plukke opp antigener og migrere til LN Langer-
hans-cellene. Disse celler er de eneste celler i huden som
bærer mannosereseptoren for å ta opp komplekset, og etter
aktivering er de kjent for å migrere i de uttrekkende LN.

Disse forsøk viser at PEI-(Man)-DNA-komplekset er i stand
10 til å trenge gjennom huden, og avlevere DNA til Langerhans-
celler. Langerhans-cellene ble aktivert og migrerte til de
uttrekkende LN og uttrykte gener kodet av DNA-konstruksjo-
nen i LN. Det er kjent at dyrket DC reinjisert i kroppen
migrerer i LN og danner effektiv immunrespons. Foreliggende
15 oppfinnelse viser at in vivo-isolering av DC ikke er nød-
vendig for å overføre gener til Langerhans-celler eller for
genekspresjon i lymfoidorganene. Det har også vist at eks-
presjon av et replikasjonsdefektivt virus i DC resulterer i
effektiv induksjon av en CTL-respons in vitro og in vivo
20 (se ovenfor). Følgelig er det vist at transkutan genavleve-
ring med komplekser (lik PEI-man-DNA) kan bli benyttet for
å danne immunresponser mot proteiner kodet av DNA.

10. Sukker-DNA-komplekser for å transdusere Langerhans- celler i huden

25 Forsøksresultater vist i tabell 2 ga bevis for at et suk-
ker-DNA-kompleks, ved fravær av PEI-man, kan transdusere
Langerhans-celler in vivo. Sukkerkompleksbundet DNA i fra-
vær av PEI er mer effektiv for bruk i både subkutane og
transkutane metoder enn DNA kompleksbundet med PEI (se ta-
30 bell 2, forsøk 3 & 5). Dette er et meget overraskende re-
sultat. Det viser at sukkerer (for eksempel 8% glukose i
disse forsøk) også kan kompleksbinde DNA og avlevere DNA
til Langerhans-cellene via mannosereseptoren. Viktig er det
at den mest effektive genavlevering in vivo til Langerhans-

cellene var det sukkerkompleksbundne DNA benyttet på transkutan måte.

Det blir ventet at immunisering med sukker-DNA-komplekset også ville resultere i migrering av Langerhans-cellene til den uttrekkende lymfeknute. Grunnen er at den samme mekanismen blir benyttet for inngang til Langerhans-celler: mannosereseptormediert opptak. Fordelen ved å bruke sukkerer som adjuvanter i de for tiden benyttede vaksinasjonsteknologier er at høyere prosentdel av Langerhans-celler vil være involvert i dannelsen av immunrespons. Dette er ventet signifikant å øke effektiviteten av aktuelle vaksinasjonsstrategier, for eksempel å blande vaksiner med sukkerer for subkutan, intradermal og intramuskulær injeksjon av DNA og proteinantigener.

11. Implikasjoner av transkutan immunisering

Foreliggende teknologi vil revolusjonere immuniseringsmetodene fordi ingen nåler er nødvendige. Den beskrevne transkutane immunisering er en meget enkel teknologi som kan bli brukt for billig vaksinasjon i både den utviklede og utviklende verden.

Enkelheten ved metodologien og det faktum at de antigenpresenterende celler blir effektivt transdusert tillater å bruke enhver DNA-sekvens som er i stand til å danne et immunogent protein. Derved kan det bredeste spektrum av sykdommen bli målrettet for immunisering, for eksempel infeksjonssykdommer og kreft.

Den eneste måte å fjerne infeksjonsdyktige sykdommer, lik HIV-infeksjon, hepatitt, malaria, er en enkel og billig vaksineringsmetode.

Vaksiner uten nålestikk vil være spesielt velkommen for foreldre av små barn.

Bruk av foreliggende oppfinnelse tillater potensielt utviklingen av sikrere vaksiner. De få negative reaksjoner på klassiske vaksiner er enkelte ganger grunnet en allergisk reaksjon overfor bi-produkter av den vaksinefremstillende prosess. Hvor slike ytterligere materialer (for eksempel 5 eggealbumin) kan bli eliminert, kan graden av negative reaksjoner samtidig bli redusert.

Den kan bli brukt for immunisering til behandling av sykdommer med eller uten kombinatorisk kjemoterapi.

P A T E N T K R A V

1. Genavleveringskompleks egnet for transkutan avlevering av gener til antigenpresenterende celler av huden, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter fremmed
5 genetisk materiale og et suktermolekyl eller polyetylenimin og et suktermolekyl.

2. Genavleveringskompleks ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det fremmede gene-
tiske materialet koder for et reverstranskriptaseavhengig
10 virus eller et mutant reverstranskriptaseavhengig virus, eksempelvis minst en vesentlig del av et replikasjonsdefekt humant immunsviktvirus.

3. Genavleveringskompleks ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det fremmede gene-
15 tiske materialet er DNA som koder for minst en vesentlig del av et integrasjonsdefekt humant immunsviktvirus, så som minst en vesentlig del av en integrasenegativ mutant av et to-tropisk primært isolat av et humant immunsviktvirus.

4. Genavleveringskompleks ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA ytterligere inn-
20 befatter en eller flere stopkodoner i en eller flere av leserammene for integrasegenet.

5. Genavleveringskompleks ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at komplekset er valgt
25 fra gruppen omfattende DNA-konjugater av sukkere, sukkere og polyetylenimin, polyetyleniminderivater, og blandinger derav, eksempelvis et DNA-konjugat av sukkermodifisert polyetylenimin eller et DNA-konjugat av glukose.

6. Genavleveringskompleks ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at komplekset har en spe-
30 sifikk affinitet for mannosereseptoren.

7. Genavleveringskompleks ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den antigenpresente-
rende celle er en Langerhans-celle, eller hvor den anti-
genpresenterende celle er en dendrittcelle.
- 5 8. Genavleveringskompleks ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at reseptoren er en man-
nosereseptor.
9. Anvendelse av et genavleveringskompleks ifølge ethvert
av kravene 1- 8, for å fremstille et medisinsk produkt som
10 er egnet for preventiv og terapeutisk immunisering mot en
virusinfeksjon, fortrinnsvis en reverstranskriptaseavhengig
virusinfeksjon, mer foretrukket mot en HIV-infeksjon.

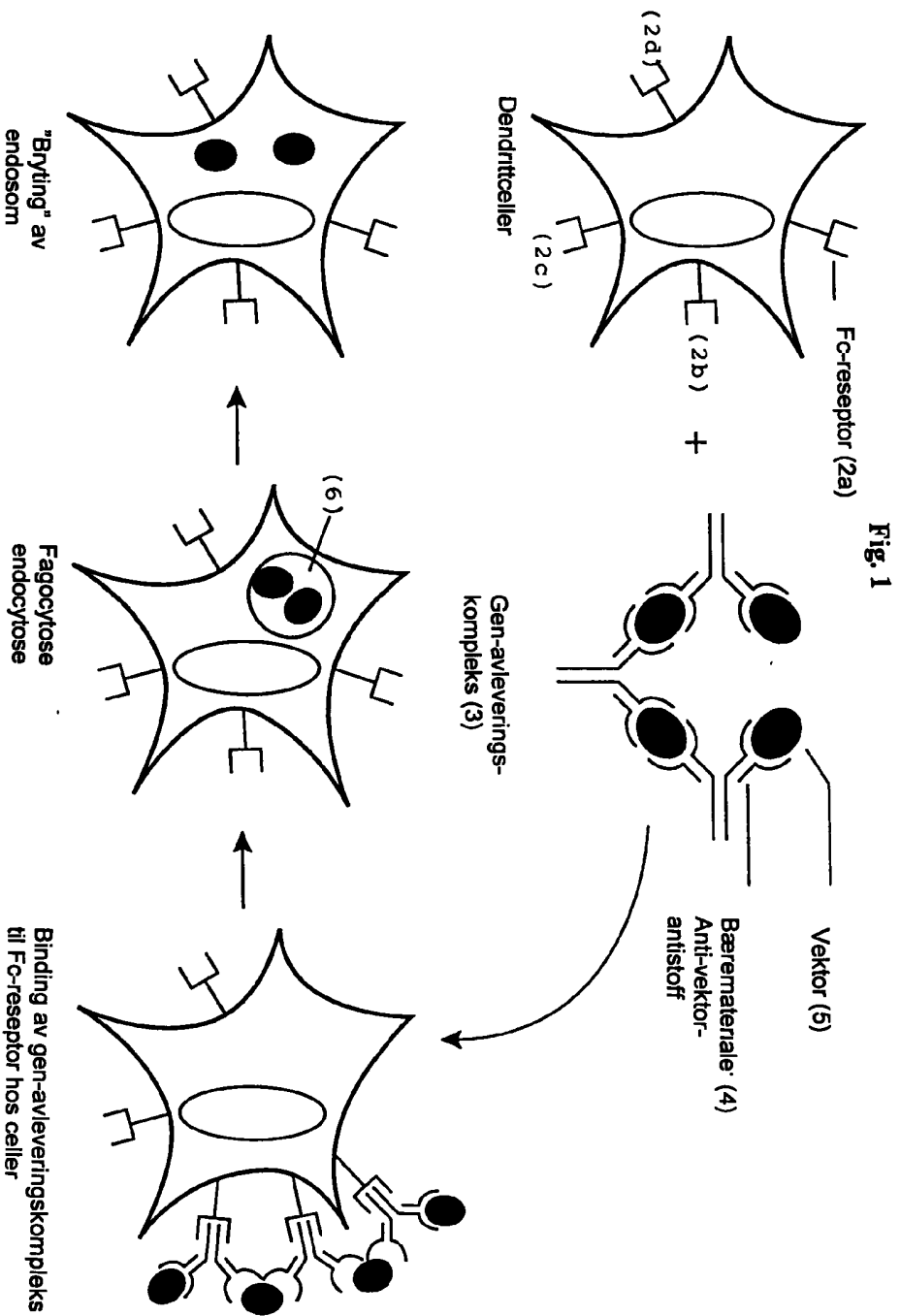


Fig. 1

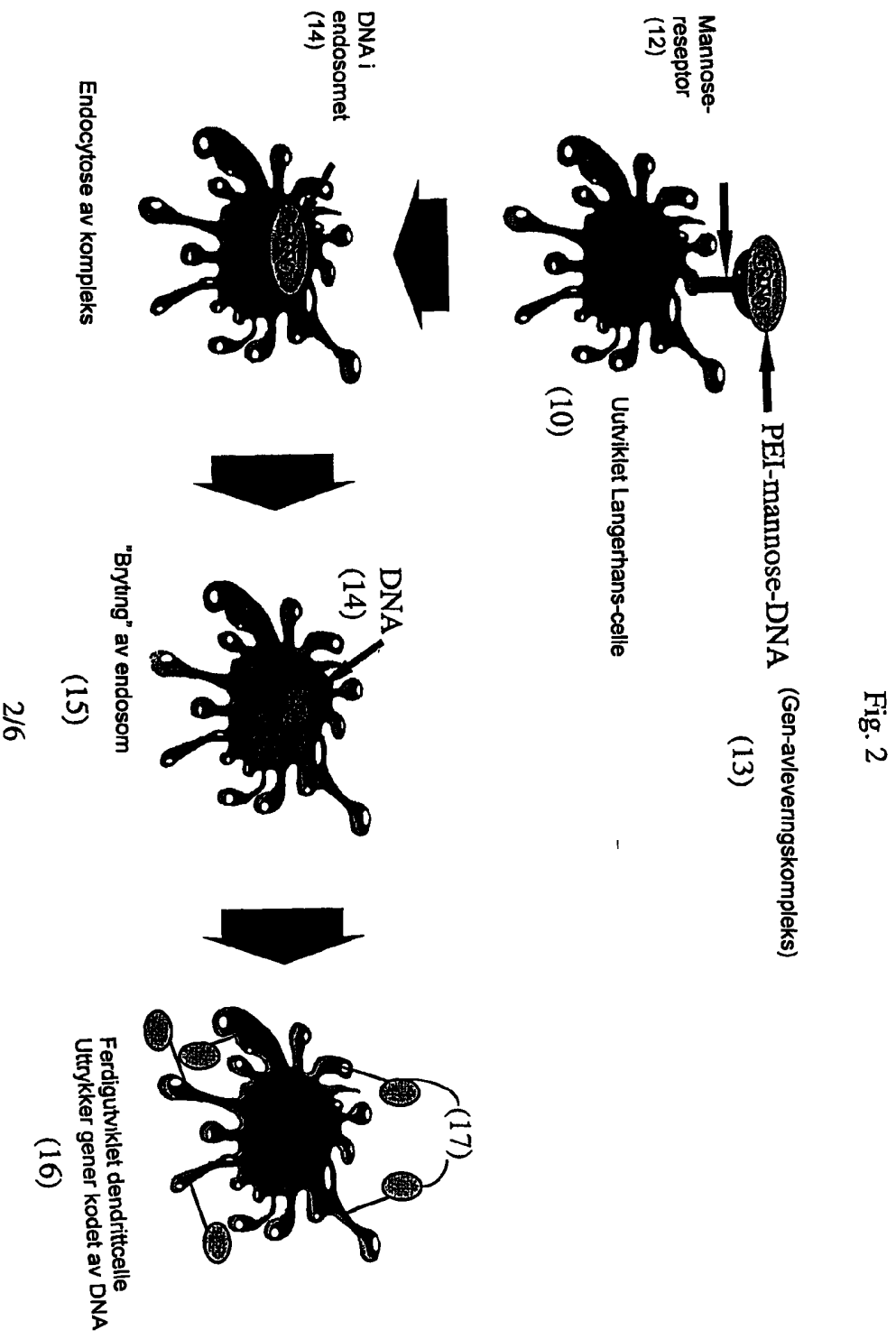


Fig. 2

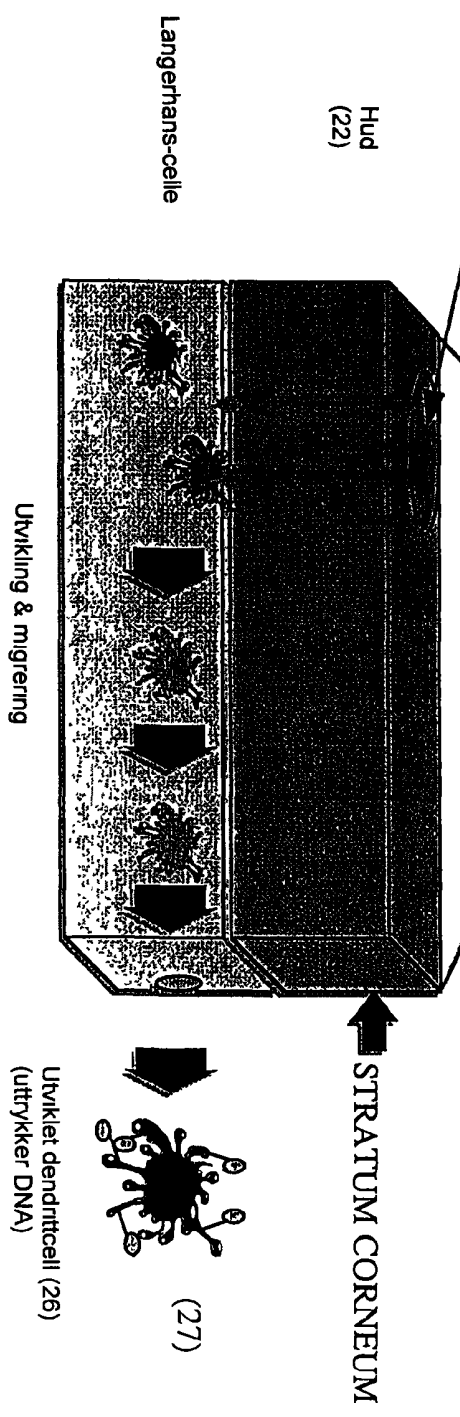
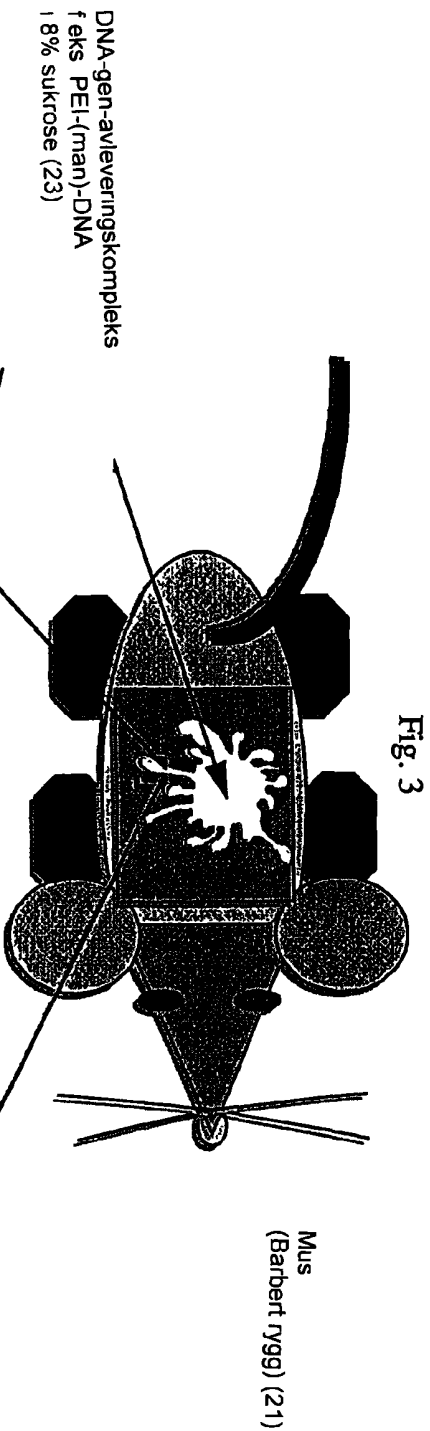


Fig. 4

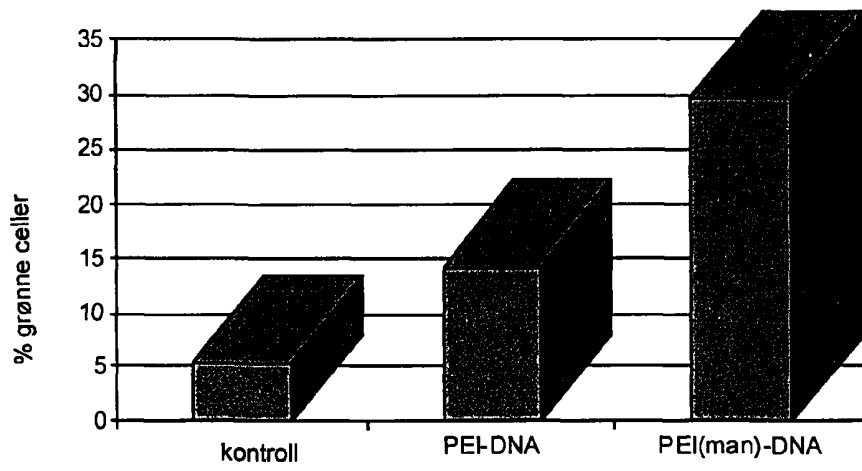


Fig. 5

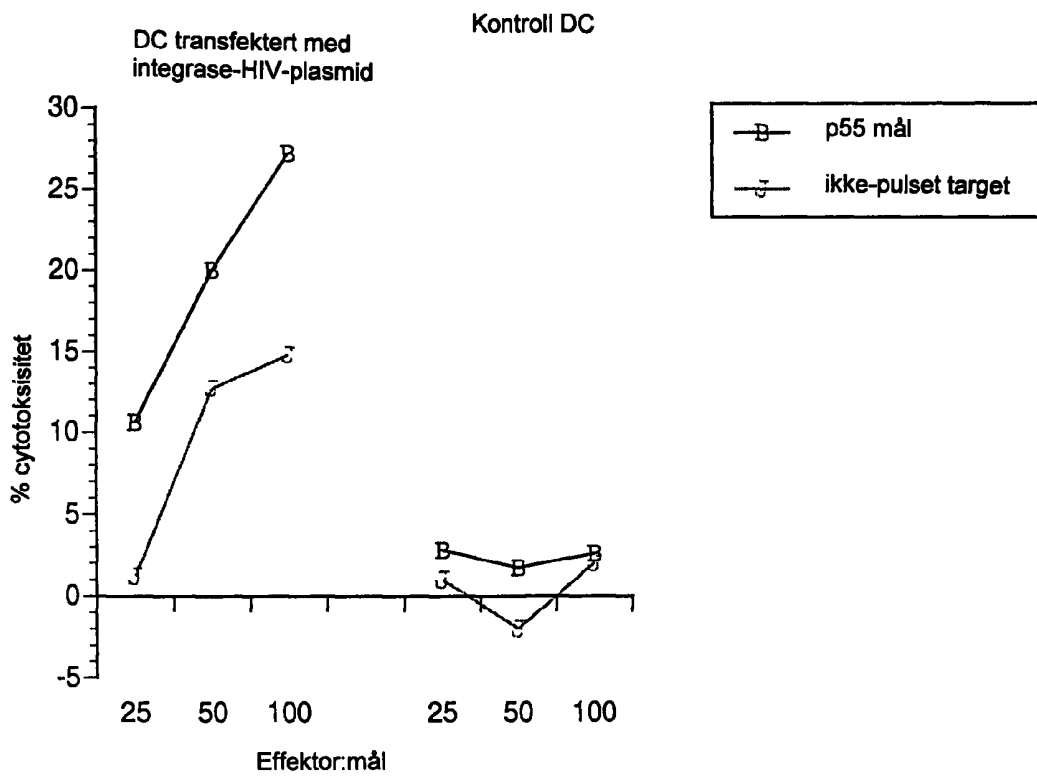


Fig. 6

