



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 38 640 T2** 2009.07.16

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 922 110 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 38 640.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/15270**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 940 696.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/006864**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **19.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.07.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**24213 P**      **15.08.1996**      **US**

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America,  
represented by the Secretary, Department of  
Health and Human Services, Bethesda, Md., US**

(74) Vertreter:

**Rach, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 71083  
Herrenberg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MOONEN, Chrit, Bethesda, MD 20817, US**

(54) Bezeichnung: **RÄUMLICHE UND TEMPORÄRE KONTROLLE DER GENEXPRESSION MITTELS EINES HITZESCHOCKPROTEINPROMOTORS IN KOMBINATION MIT LOKALER HITZE**

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**

nem C1857-Repressor, Hitzeschockpromotoren.

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die räumliche und zeitliche Kontrolle exogener Genexpressionen in gentechnisch veränderten Zellen und Organismen. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf den Einsatz hitzeinduzierbarer Promotoren wie des Promotors von Hitzeschockgenen zur Kontrolle der Expression von exogenen Genen. Genauer gesagt bezieht sich die Erfindung auf die Anwendung von fokussiertem Ultraschall zur Erhitzung von Zellen, die therapeutische Gene unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors enthalten, und somit die Expression des therapeutischen Gens induzieren.

**[0002]** Erkrankungen, die durch ein gestörtes Gen verursacht werden, können dadurch behandelt werden, dass ein exogen funktionelles Gen stabil in eine Wirtszelle transferiert wird, so dass das Genprodukt dieses Gens in der Wirtszelle erzeugt wird. Es kann auch Gentransfer verwendet werden, um in einer Wirtszelle exogene Nukleinsäuren zu exprimieren, die die Wirtszelle abtöten, oder die für Genprodukte codieren, die den Phänotyp der Wirtszelle und/oder den metabolischen Zustand der umgebenden Zellen ändern, oder die Expression gewählter Gene in der Wirtszelle unterdrücken. Menschliche Erkrankungen sind empfänglich für die Behandlung mit diesem Ansatz, insbesondere die Erkrankungen, bei denen die Störung in einem einzigen Gen liegt. Die Anwendung von Gentherapie für die Behandlung von sowohl genetischen als auch erworbenen Erkrankungen wird hier diskutiert: Miller, A. D. (1992) *Nature* 357: 455–460, und Mulligan, R. C. (1993) *Science* 260: 926–932.

**[0003]** In vielen Fällen ist es wünschenswert, gentechnisch veränderte Gene nur in bestimmten Geweben zu exprimieren und/oder nach Belieben nur zu bestimmten Zeiten und/oder nur zu einem gewissen Grad. Jedoch bieten die heutigen Protokolle zum Gentransfer und zur exogenen Genexpression keine geeigneten Mittel zur gleichzeitigen Kontrolle darüber, welche Zellen in einer heterogenen Population transformiert werden und wann, wo und zu welchem Grad die transferierten Gene exprimiert werden.

**[0004]** Ein Ansatz für die Kontrolle exogener Genexpressionen, der sehr viel Aufmerksamkeit erzielt hat, ist die Transformation von Wirtszellen mit einem Gen, das unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors ist, woraufhin das transferierte Gen nach Belieben ein- und ausgeschaltet wird, indem der induzierbare Promotor aktiviert wird. Zu den induzierbaren Promotoren gehören: der Metallothionin-IIA-Promotor, der lacZ-, tac-, und trp-Promotor, der Phage T7-Promotor/T7 RNA Polymerase, der *Candida albicans* MA2-Genpromotor. Manche Promotoren sind hitzeinduzierbar: z. B. der lamda PL-Promotor mit ei-

**[0005]** Hitzeschockproteine („Hsps“) sind eine ubiquitäre Klasse von Proteinen, die als Reaktion auf Stress, insbesondere Hitzestress, sowie eine Anzahl anderer externer Faktoren erzeugt werden. Alle Zellen, die bisher untersucht wurden, enthalten Hsps und viele verschiedene Hsps wurden in einem weiten Bereich von Organismen festgestellt. Viele Hsps wurden gemäß ihrer Molekularmasse zugeordnet (z. B. Hsp70, was sich auf ein Hsp von 70 kDalton bezieht, Hsp56, Hsp28). Zusätzliche Beispiele von Hsps sind Ubiquitin, Crystallin, Rapamycin, P-Glycoprotein und andere. Die folgenden Artikel beschreiben die Eigenschaften von Hitzeschockgenen und -promotoren: Yost et al., (1990) *TIG*, 6: 222–226. RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. Pennier, (1994) *Biochemie*, 76: 737–747. Translational control during heat shock; Minowada and Welch, (1995) "The Clinical implications of the stress response", *J. Clin. Invest.* 95: 3–12; Lis and Wu, (1993) *Cell* 74: 1–4. Protein traffic at the heat shock Promoter: parking, stalling, and trucking along; Holbrook und Udelsman, "Heat shock Protein gene expression in response to physiological stress and aging," in *THE BIOLOGY OF HEAT SHOCK PROTEINS AND MOLECULAR CHAPERONES* (Morimoto et al., (1994) Editors, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 577–593); Macario, (1995), "Heat-shock Proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics," *Int. J. Chem. Lab Res.* 25: 59–70.

**[0006]** Hsps nehmen an einer großen Anzahl von zellulären Effekten teil und beeinflussen diese, einschließlich der Zusammensetzung neu gebildeter Polypeptide (manche Hsps übernehmen die Funktion von Chaperonen) Signalfunktionen (z. B. Reaktion auf Steroidhormone), Proteinexkretion, DNA- und RNA-Synthese (siehe unten). Die Synthese von Proteinen während des Hitzeschocks ist während Stress gewöhnlich gehemmt, außer der Synthese der Hsps.

**[0007]** Hitzeschock (und andere Formen von Stress) führen zu einer fast sofortigen transkriptionellen Aktivierung der Hitzeschockgene. Die Reaktion auf Hitzeschock ist recht dramatisch. Die Hitzeschockmeldungen erscheinen im Zytoplasma im Allgemeinen innerhalb von wenigen Minuten und die Translation der Meldung wird mit hoher Wirksamkeit durchgeführt. Zum Beispiel werden in *Drosophila*-Zellen Hsp-Gene innerhalb von nur 4 Minuten nach einer Temperaturerhöhung von 4 bis 9°C induziert. Innerhalb einer Stunde gibt es mehrere tausend Transkripte pro Zelle. Diese Transkripte werden aktiv in Hsp translatiert, während gleichzeitig die Transkription der zuvor aktiven Gene stark unterdrückt wird. Miller and Ziskin (1990) *Ultrasound Med. Biol.* 15: 707–722 berichteten, dass kurze Expositionen gegenüber stark erhöhten Temperaturen zu einem

schützenden Effekt gegen weitere Hitzeangriffe führen, und dass die Erzeugung von Hitzeschockproteinen durch die Zellen mit dem Beginn eines solchen „thermalen Schutzes“ zusammenfällt. Der Grad der Synthese von Hsp70 in Zellen während eines Hitzeschocks scheint einen linearen Bezug zu ihrer Thermotoleranz zu haben. Li, G. C. (1985) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11: 165–177. Zwei menschliche Hsp70-Proteine wurden beschrieben -Hsp70A (Wu, B., et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 330–341; Hunt, C. und Morimoto, R. I. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82.: 6455–6459) und Hsp70B (Schiller, P., et al. (1988) *J. Mol. Biol.* 203: 97–105). Ein Bericht über Hsps findet sich z. B. unter: Morimoto et al., eds., *Stress Proteins in Biology and Medicine* (1990) Cold Spring Harbor Press; Hightower, L. E. (1991) *Cell* 66: 191–197.; Craig, E. A., und Gross, C. A. (1991) *Trends Bioch. Sci.* 16: 135.

**[0008]** Die Hitzeschockgene vieler Organismen wurden kartiert und sequenziert. Hitzeschockgene sind an verschiedenen Chromosomenorten verstreut. Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieser Gene ist die allgemeine Abwesenheit intervenierender Sequenzen.

**[0009]** Hitzeschock-Promotoren von verschiedenen Quellen wurden isoliert, sequenziert und zur Expression von einer Reihe von Genen verwendet. Zum Beispiel beschreiben Dreano, M. et al. (1986) *Gene* 104: 1–8, die Verwendung des humanen Hsp70B-Promotors sowie des Drosophila Hsp70-Promotors, um die hitzeregulierte Synthese des humanen Wachstumshormons, Hühnerlysozyms und eines humanen Influenza-Hämagglutinin zu steuern. EPA Veröffentlichung Nr. 336,523 (Dreano et al., veröffentlicht 11. Okt. 1989) beschreibt die In-vivo-Expression von humanem Wachstumshormon unter Verwendung eines humanen Hsp70-Promotors. PCT Veröffentlichung Nr. WO 87/00861 (Bromley et al., veröffentlicht 12. Feb. 1987) beschreibt die Verwendung von humanen und Drosophila Hsp-Promotoren mit 5'-untranslatierten Regionsvarianten. EPA Veröffentlichung Nr. 118,393 (Bromley et al., veröffentlicht 12. Sep. 1984) und PCT Veröffentlichung Nr. WO 87/05935 (Bromley et al., veröffentlicht 8. Okt. 1987) beschreiben die Expression von E. coli beta-Galactosidase und humanem Influenza-Hämagglutinin, unter Verwendung eines Drosophila Hsp70-Promotors. Siehe auch U.S.-Patente 4,990,607, 4,797,359, 5,521,084, und 5,447,858. Überexpression von Hsp-70 wurde bei transgenen Mäusen erreicht. Plumeer et al., (1995) *J. Clin. Inv.* 95: 1854–1860. Siehe auch Yost and Lindquist, (1986) *Cell* 45: 185–193, Yost and Lindquist, (1988) *Science* 242: 1544–1548, Garbe et al. (1986) *PNAS*, 83: 1812–1816, Blackman et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 188: 499–515, Bond et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 12: 4602–4610, Kay et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 3723–3741, Bond, (1988) *EMBO J.* 7: 3509–3518.

**[0010]** Die induzierbaren Promotorsysteme, die zur Kontrolle der Expression von Proteinen verwendet wurden, haben eine oder mehrere der folgenden Einschränkungen: Sie sind auf einen relativ engen Bereich von Wirtszellen beschränkt oder sind nur teilweise induzierbar oder sie stammen von Organismen, wie Tumurviren, die inhärent gefährlich sind. Noch wichtiger ist, dass ihre Verwendung keine fein abgestimmte lokalisierte Expression von exogenen Genen in transformierten Zellen ermöglicht.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur selektiven zeitlichen und räumlichen Kontrolle von Genexpressionen mit den folgenden Schritten:

- a) Verbinden eines therapeutischen Gens mit einem Hitzeschockprotein-Promotor, zur Gewinnung eines gentechnisch veränderten Konstrukts, in dem das gewählte therapeutische Gen unter der Kontrolle eines Hsp-Promotors ist;
- b) Einfügen des Konstrukts aus Hsp-Promotor und therapeutischem Gen in einen geeigneten Vektor und Einbringen des Vektors in eine Zielzelle oder einen Organismus,
- c) selektives Erhitzen einer vorbestimmten diskreten Region einer Zellmasse oder eines Organismus, zu dem Zellen gehören, die das Vektorkonstrukt enthalten,
- d) Wiederholung von Schritt c) so oft wie notwendig.

**[0012]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird das lokale Erhitzen durch den Einsatz fokussierten Ultraschalls bewirkt. Ein Kernspintomographie-Instrument wird zur Sichtbarmachung des Zielgewebes und zur Quantifizierung und genauen Kontrolle des Erhitzungsgrads (d. h. der Temperatur) verwendet.

**[0013]** Gemäß dem unabhängigen Anspruch 1 bietet die Erfindung die Verwendung eines gentechnisch veränderten Konstrukts in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Säugetierkrankheit, wobei das gentechnisch veränderte Konstrukt einen Expressionsvektor mit einem humanen Hsp70B-Promotor umfasst, der in Wirkverbindung mit einem therapeutischen Gen zur Kontrolle des letzteren steht, wobei das therapeutische Gen bei normalen physiologischen Temperaturen in den durch das Konstrukt transformierten Zellen minimal oder überhaupt nicht exprimiert wird, wobei das Medikament mittels Einführung gentechnisch veränderter Konstrukte in Zellen im Säugetier durch In-vitro- oder In-vivo-Gen-transfer verabreicht wird und wobei die Verabreichung des Medikaments durch die Einführung einer lokalisierten Expression des therapeutischen Gens in Zellen eines Ziel-Bereichs, die durch das therapeutische Konstrukt transformiert wurden, gekennzeichnet ist, wobei die Expression des therapeutischen Gens aus der kontrollierbaren Steigerung der Temperatur dieses Ziel-Bereichs mittels Anwendung von fo-

kussiertem Ultraschall auf eine nicht-letale supraphysiologische Temperatur und damit einer Aktivierung des humanen hsp70B-Promotors in den transformierten Zellen des Ziel-Bereichs resultiert.

**[0014]** Zusätzliche und erfindungsgemäße Merkmale ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

**[0015]** In einer Anzahl von Ausführungsformen umfasst die Erfindung Verfahren zur Behandlung von Krebs, zur Einführung lokaler Angiogenese und zur Behandlung von genetischen Erkrankungen.

**[0016]** [Abb. 1](#) ist eine Grafik der Abschwächung der Strahlung von menschlichem Gewebe.

**[0017]** [Abb. 2](#) zeigt einen prototypischen Adenovirus-Vektor.

**[0018]** [Abb. 3](#) zeigt einen Hsp-Promotor. [Abb. 3A](#) zeigt einen minimalen Drosophila Hsp70-Promotor, der HSEII-, HSEI-, GAGA- und TATA-Elemente enthält. +1 bezieht sich auf die Startstelle der Transkription.

**[0019]** [Abb. 3C](#) zeigt die Nukleotidsequenz des humanen Hsp70B-Promotors.

**[0020]** [Abb. 4](#) zeigt einen humanen Hsp-Promotor, der aus der Genbank-Datenbank bezogen wurde.

**[0021]** [Abb. 5\(a\)](#) ist ein Intensitätsbild eines Rattenbeins in der Brennebene, das von unten nach oben den Sensor (teilweise), das Wasserbad mit hoher Signalintensität (in der Mitte, der geneigte Tisch mit der Öffnung für FUS ist sichtbar) und schließlich das Rattenbein zeigt. [Abb. 5\(b\)](#) ist eine Karte der Temperaturänderungen für die gleiche Scheibe nach einminütiger Erhitzung.

**[0022]** [Abb. 5\(c\)](#) zeigt die Temperaturänderung nach drei Minuten des Erhitzens. Die thermale Diffusion ist offensichtlich. Dieser Zustand wurde während des 45-minütigen Erhitzungszeitraums aufrechterhalten. Während der FUS-Anwendung wurden Temperaturbilder angefertigt.

**[0023]** [Abb. 6](#) zeigt die Ergebnisse eines Northern Blot des lokal erhitzten Rattenbeins. Die Spuren 5, 6 und 7 sind von Proben, die dem Fokussierbereich des Ultraschalls entnommen wurden. Spur 5 zeigt eine merklich höhere Expression von RNA bei ca. 2,3 kb (Pfeil).

**[0024]** Die differentielle Expression zwischen dieser Probe und den umgebenden Proben erstreckt sich auf einen Faktor von 3 bis 67.

**[0025]** Der Begriff „Nukleinsäure“ bezieht sich auf Deoxyribonukleotide oder Ribonukleotide und Poly-

mere davon in entweder ein- oder doppelsträngiger Form. Soweit nicht ausdrücklich eingegrenzt, umfasst der Begriff Nukleinsäuren, die bekannte Analoge natürlicher Nukleotide enthalten, die ähnliche Bindungseigenschaften wie die Bezugsnukleinsäure haben und auf eine ähnliche Weise wie natürlich auftretende Nukleotide metabolisiert werden. Wenn nicht anders angegeben, umfasst eine bestimmte Nukleinsäuresequenz auch ausdrücklich konservativ modifizierte Varianten davon (z. B. degenerierte Codon-Substitutionen) und komplementäre Sequenzen sowie die ausdrücklich angegebene Sequenz. Der Begriff Nukleinsäure wird austauschbar mit Gen, eDNA und durch ein Gen codierte mRNA verwendet.

**[0026]** Der Satz „exogene“ oder „heterologe Nukleinsäure“ bedeutet gewöhnlich eine Nukleinsäure, die isoliert, geklont und an eine Nukleinsäure ligiert wurde, mit der sie in der Natur nicht kombiniert auftritt, und/oder in eine Zelle oder ein zelluläres Umfeld eingeführt und/oder dort exprimiert wird, in dem die besagte Nukleinsäure oder das Protein in der Natur gewöhnlich nicht gefunden wird. Der Begriff umfasst sowohl Nukleinsäuren, die ursprünglich aus einem unterschiedlichen Organismus oder Zelltyp gewonnen wurden als dem Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, als auch Nukleinsäuren, die von der gleichen Zelllinie gewonnen werden, wie die Zelllinie, in dem sie exprimiert werden.

**[0027]** Der Satz „eine Nukleinsäuresequenz-Codierung“ bezieht sich auf eine Nukleinsäure, die Sequenzinformationen für eine strukturelle RNA wie rRNA, eine tRNA oder die primäre Aminosäuresequenz eines bestimmten Protein oder Peptids enthält, oder eine Bindungsstelle für ein trans-wirkenden regulatorischen Faktor. Dieser Satz umfasst insbesondere degenerierte Codons (d. h. verschiedene Codons, die für eine einzelne Aminosäure codieren) der nativen Sequenz oder Sequenzen, die eingeführt werden können, um mit Codon-Präferenzen in einer bestimmten Wirtszelle übereinzustimmen.

**[0028]** Der Begriff „rekombinant“ oder „technisch verändert“ im Zusammenhang mit einer Nukleinsäure oder einem Protein bedeutet gewöhnlich, dass die Zusammensetzung oder Primärsequenz der besagten Nukleinsäure oder des Proteins von der natürlich vorkommenden Sequenz unter Verwendung von experimentellen Manipulationen, die dem Fachmann bekannt sind, verändert wurde. Es kann auch bedeuten, dass eine Nukleinsäure oder ein Protein isoliert und in einen Vektor oder eine Nukleinsäure geklont wurde, die in eine andere Zelle oder zelluläre Umgebung eingeführt oder dort exprimiert wurde, als die, in der die besagte Nukleinsäure oder das Protein in der Natur gefunden werden kann.

**[0029]** Der Begriff „rekombinant“ oder „technisch verändert“, bedeutet in Bezug auf eine Zelle, dass die

Zelle eine Nukleinsäure repliziert oder exprimiert oder ein Peptid oder Protein erzeugt, das von einer Nukleinsäure codiert wird, deren Ursprung exogen der Zelle ist. Rekombinante Zellen können Nukleinsäuren exprimieren, die nicht in der nativen (nicht rekombinanten) Form der Zelle gefunden werden können. Rekombinante Zellen können auch Nukleinsäuren exprimieren, die in der nativen Form der Zelle gefunden werden können, wobei die Nukleinsäuren mit künstlichen Mitteln wieder in die Zelle eingeführt werden.

**[0030]** Eine Zelle wurde durch eine exogene Nukleinsäure „transformiert“, wenn eine solche exogene Nukleinsäure in die Zellmembran eingeführt wurde. Exogene DNA kann oder kann nicht in Chromosomen-DNA, aus der das Genom der Zelle besteht, integriert (kovalent verknüpft) werden. Die exogene DNA kann auf einem episomalen Element, wie einem Plasmid, erhalten werden. In eukaryotischen Zellen ist eine stabil transformierte Zelle gewöhnlich eine Zelle, in der die exogene DNA in das Chromosom integriert wurde, so dass es von Tochterzellen durch Chromosomenreplikation geerbt wird, oder eine Zelle, die stabil erhaltene extrachromosmale Plasmide enthalten. Diese Stabilität wird durch die Fähigkeit der eukaryotischen Zelle gezeigt, Zelllinien oder Klone zu etablieren, die eine Population von Tochterzellen mit der exogenen DNA umfassen.

**[0031]** „Hitzeinduzierbarer Promotor.“ Ein Promotor ist eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem Gen assoziiert ist, das die Transkription des Gens kontrolliert, indem es hauptsächlich mit Liganden, wie Polymerasen, Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsverstärkern und Transkriptionssuppressoren interagiert.

**[0032]** Promotoren können entweder konstitutiv oder induzierbar sein. Ein konstitutiver Promotor fördert die konstante Transkription eines Gens, während die Aktivität eines induzierbaren Promotors in Abhängigkeit von dem Vorhandensein (oder Fehlen) eines speziellen Inducers schwankt. Die regulatorischen Elemente eines induzierbaren Promotors sind der transkriptionellen Startstelle gewöhnlich weiter vorgeordnet als die TATA-Box. Im Idealfall sollte ein induzierbarer Promotor die folgenden Eigenschaften besitzen: einen geringen bis nicht vorhandenen grundlegenden Expressionsgrad bei fehlendem induktivem Reiz, ein hoher Expressionsgrad bei Vorhandensein eines induktiven Reizes und ein Induktionsschema, das die Physiologie der Zelle sonst nicht ändert. Ein hitzeinduzierbarer Promotor ist ein Promotor, der dadurch aktiviert wird, dass Zellen, die den Promotor enthalten, einem festgelegten Temperaturanstieg ausgesetzt werden.

**[0033]** Eine „Wirtszelle“ ist eine Zelle, die durch eine exogene DNA-Sequenz transformiert wurde. Wenn nicht anders angegeben, kann die Wirtszelle eine

Pflanzen- oder eine Tierzelle sein.

**[0034]** Der Begriff „Tumorzelle“ oder „Krebszelle“ oder „neoplastische Zelle“ bezeichnet eine Zelle, die eine unangemessene, unregulierte Proliferation aufweist. Ein „humaner“ Tumor besteht aus Zellen, die humane Chromosomen haben. Zu solchen Tumoren gehören die in einem menschlichen Patienten, und Tumoren, die aus dem Einführen einer malignen Zelllinie mit menschlichen Chromosomen in ein nicht-menschliches Wirtstier resultieren.

**[0035]** „Selektives Erhitzen“ bedeutet, dass nur Zellen mit vorbestimmten räumlichen Koordinaten in einem Organismus, Gewebe oder einer Zellmasse direkt von einer Wärmequelle erhitzt werden, wohingegen Zellen außerhalb dieser Koordinaten nicht direkt erhitzt werden, obwohl sie benachbart sind. Das Erhitzen benachbarter Zellen, das durch normalen Wärmeausgleich zwischen den selektiv erhitzten Zellen und den benachbarten Zellen entstehen kann, ist eine Folge des selektiven Erhitzens.

**[0036]** Der Begriff „Promolekül“ bezieht sich auf eine Substanz, die in ihrer Verabreichungsform selbst nicht metabolisch aktiv ist, die jedoch dann aktiviert wird, wenn sie entweder chemisch verändert oder von Zellen metabolisiert wird, die in der Lage sind, das Promolekül zu verändern oder zu metabolisieren, oder wenn sie mit einer oder mehreren anderen Substanzen kombiniert wird, um einen Komplex zu bilden, der metabolisch aktiv ist. Ein Promolekül kann bei chemischer Veränderung oder Kombination mit einer zweiten Substanz für die Wirtszelle toxisch werden. Zu den Beispielen gehören 5-Fluorcytosin („5-FC“), das zu dem letalen Metabolit 5-Fluoruracil („5-FU“) umgewandelt werden kann, 5-Methoxypurin-Arabinosid und Gancyclovir. Promoleküle wirken sich vorzugsweise nicht substantiell schädlich auf einen Organismus aus, mit Ausnahme der Zellen, die dazu in der Lage sind, das Prodrug in ein toxisches Produkt umzuwandeln. (d. h. ein Metabolit oder Komplex). „Prodrug aktivierendes Molekül“ bezeichnet ein Molekül, wie ein Enzym, das in der Lage ist, das nicht toxische Prodrug in seinen toxischen Metabolit umzuwandeln oder ein Molekül, das sich (kovalent oder nicht-kovalent) mit einem Prodrug verbindet, um ein toxisches Produkt zu erzeugen.

**[0037]** Ein „toxisches Molekül“ ist ein Molekül, das das Zellwachstum hemmt oder bestimmte metabolische Pfade blockiert und in manchen Fällen die Zelle abtötet. Siehe z. B. WO 93/24136.

**[0038]** Der Satz „therapeutische Dosis“ oder „therapeutische Menge“ oder „effektive Menge“ bedeutet eine Dosis, die ausreicht, um ein gewünschtes Ergebnis zu erzielen. Das erwünschte Ergebnis kann eine subjektive oder objektive Verbesserung im Empfänger der Dosis, eine Abnahme oder eine Zunahme

der Anzahl der Ziel-Population an Zellen, eine Abnahme der Tumorgroße, eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Krebszellen, eine Abnahme der Metastasen oder eine beliebige Kombination der oben genannten Faktoren sein.

**[0039]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Nukleinsäure erhalten, die einen hitzeinduzierbaren Promotor, vorzugsweise einen Hsp-Promotor, umfasst, der anhand bekannter Verfahren der Gentechnik mit einem gewählten Gen verbunden wird, das Konstrukt wird in Wirtszellen eingeführt und eine Teilmenge transformierter Zellen, die gewählte räumliche Koordinaten einnehmen, wird erhitzt, um den Promotor zu aktivieren und das Gen zu exprimieren.

**[0040]** Der bevorzugte hitzeinduzierbare Promotor zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist ein Hitzeschockprotein-Promotor.

**[0041]** Ein Bereich, der als Hitzeschockelement (HSE) bekannt ist, kann in den ersten 100 bp 5' der RNA-Startstelle eukaryotischer Hitzeschockgene gefunden werden. Sorger, P. K. (1991) Cell 65: 363. Zu diesem Bereich gehört die Sequenz nGAAn, die mindestens zwei mal in „head-to-head“ oder „tail-to-tail“ Orientierung wiederholt wird (nGAAnnTTCn oder nTTCnnGAAn). Hsp70-Gene von verschiedenen Arten unterscheiden sich in der Anzahl und der Orientierung der HSE und in den Typen der Bindungsstellen für andere Faktoren, die vorgelagert sind. Das HSE wirkt in der stressinduzierten Promotoraktivierung durch das Anbinden eines positiven transaktivierenden Faktors, des Hitzeschockfaktors (Hsp). Die Bindungskonstante dieses Faktors an das Hitzeschockelement ist ungefähr hundert Mal höher als die aller anderen bekannten Transkriptionsfaktoren in Säugtieren an die entsprechende Bindungsstelle, wodurch dieser Promotor zu einem der stärksten wird.

**[0042]** Die Primärstelle für die Regulierung der Proteinsynthese ist die Initiation der Polypeptidkette. Insbesondere wird die Aktivität von e1F-2 und e1F-4F, beides Initiationsfaktoren, während des Hitzeschocks moduliert. Es wird angenommen, dass ein Hsp-verwandtes Protein Idanase an der Regulierung des Initiationsfaktors beteiligt ist. Hsp-70 wird als Hitzesensor angesehen, indem es die Ansammlung denaturierter Proteine feststellt, und es wird angenommen, dass die Produktion von e1F-2 die Proteinproduktion einschränkt. Der Faktor e1F-4F könnte wiederum an der präferentiellen Synthese der Hsps beteiligt sein.

**[0043]** Der spezielle Transkriptionsfaktor, der während des Hitzeschocks aktiviert wird, wird oft als HSF-1 bezeichnet. Jüngste Berichte fassen seine Wirkungsweise zusammen. HSP-1 trimerisiert während Stress (vermittelt durch Hsp-70) und bindet sich dann an eine Konsens-Nukleotidsequenz (das Hitzeschockelement (HSE), das sich im Promotorelement

des Hsp-Gens befindet.

**[0044]** Der Hitzeschockpromotor gemäß der Erfindung erfüllt die folgenden Kriterien:

wenn er mit einem Reporter-gen rekombiniert wird, um ein Konstrukt zu bilden, das dann in eine Wirtszelle eingeführt wird, die das Reporter-gen exprimieren kann, wird das Reporter-gen bei normalen physiologischen Temperaturen minimal oder überhaupt nicht exprimiert,

wenn die transformierte Wirtszelle jedoch nicht-letalen supraphysiologischen Temperaturen ausgesetzt wird, wird das Reporter-gen zu einem Grad exprimiert, der mindestens das 5-fache, (vorzugsweise das 10-fache und am meisten bevorzugt mindestens das 100-fache) der Expression bei physiologischen Temperaturen beträgt.

**[0045]** Kurz zusammengefasst wird die Expression von natürlichen oder synthetischen Nukleinsäuren gewöhnlich durch die Wirkverbindung einer Nukleinsäure von Interesse mit einem Promotor (der entweder konstitutiv oder induzierbar ist), das Eingliedern des Konstrukts in einen Expressionsvektor und das Einführen des Vektors in eine geeignete Wirtszelle erzielt. Typische Vektoren enthalten Transkription- und Translationsterminatoren, Transkription- und Translation-Initiationssequenzen und Promotoren, die zur Regulierung der Expression der speziellen Nukleinsäure nützlich sind. Die Vektoren umfassen optional generische Expressionskassetten, die mindestens eine unabhängige Terminatorsequenz, Sequenzen, die die Replikation der Kassette in Eukaryoten oder Prokaryoten oder beiden erlauben (z. B. Pendelvektoren), und Selektionsmarker für sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Systeme enthalten. Vektoren sind zur die Replikation und Integration in Prokaryoten, Eukaryoten oder vorzugsweise beiden geeignet. Siehe Gilman and Smith (1979), Gene, 8: 81-97; Roberts et al. (1987), Nature, 328: 731-734; Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989), MOLECULAR CLONING – A LABORATORY MANUAL (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N. Y., (Sambrook); und F. M. Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel). Die Produktinformationen von Herstellern von biologischen Reagenzien und Versuchsgesetzen stellen auch Informationen zur Verfügung, die für die bekannten biologischen Verfahren nützlich sind. Zu diesen Herstellern gehören die SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee,

WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) und Applied Biosystems (Foster City, CA) sowie viele andere gewerblichen Quellen, die dem Fachmann bekannt sind.

**[0046]** Die Nukleinsäuren (einschließlich Promotoren, Gene und Vektoren), die beim vorliegenden Verfahren verwendet werden, können aus natürlichen Quellen isoliert, von Quellen wie ATCC oder Genbibliotheken bezogen oder anhand synthetischer Verfahren zubereitet werden. Synthetische Nukleinsäuren können anhand einer Vielzahl von Verfahren in Lösungen oder der Festphase zubereitet werden. Ausführliche Beschreibungen der Verfahren der Festphasensynthese von Nukleinsäuren anhand Phosphittriestern-, Phosphotriestern- und H-Phosphonat-Reaktionen sind allgemein erhältlich. Siehe, z. B., Itakura, U.S. Pat. No. 4,401,796; Caruthers, et al., U.S. Pat. Nos. 4,458,066 and 4,500,707; Beaucage, et al., (1981) *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859–1862; Matteucci, (1981) et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 3185–3191; Caruthers, et al., (1982) *Genetic Engineering*, 4: 1–17; Jones, chapter 2, Atkinson, et al., chapter 3 und Sproat, et al., chapter 4, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait (ed.), IRL Press, Washington D. C. (1984); Froehler, et al., (1986) *Tetrahedron Lett.*, 27: 469–472; Froehler, et al., (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14: 5399–5407; Sinha, et al. (1983) *Tetrahedron Lett.*, 24: 5843–5846 und Sinha, et al., (1984) *Nucl. Acids Res.*, 12: 4539–4557.

**[0047]** Eine Anzahl von Vektoren kann verwendet werden, um gewählte Nukleinsäuren in Wirkverbindung mit Hitzeschockpromotoren zu bringen und ihre Replikation, das Klonen und/oder die Expression zu vermitteln. „Klonierungsvektoren“ sind zur Replikation und Amplifizierung der fremden Nukleinsäuren und Gewinnung von Klonen bestimmter fremder Nukleinsäurehaltiger Vektoren nützlich.

**[0048]** „Expressionsvektoren“ vermitteln die Expression der fremden Nukleinsäure. Manche Vektoren sind sowohl Klonierungs- als auch Expressionsvektoren.

**[0049]** Im Allgemeinen ist der spezielle Vektor, der zum Transport des fremden Gens benutzt wird, nicht besonders wichtig. Jeder der konventionellen Vektoren, der zur Expression in der gewählten Wirtszelle verwendet wird, kann verwendet werden.

**[0050]** Ein Expressionsvektor umfasst gewöhnlich eine eukaryotische Transkriptionseinheit oder „Expressionskassette“, die alle Elemente enthält, die zur Expression der exogenen Gene in eukaryotischen Zellen erforderlich sind. Eine typische Expressionskassette enthält einen Promotor in einer Wirkverbindung mit der DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes

Protein codiert und Signale, die zur wirksamen Polyadenylierung des Transkripts erforderlich sind.

**[0051]** Eukaryotische Promotoren enthalten gewöhnlich zwei Typen von Erkennungssequenzen, die TATA-Box und vorgelagerte Promotorelemente. Es wird angenommen, dass die TATA-Box, die der Transkriptionsinitiationsstelle um 25–30 Basispaare vorgelagert ist, an der Steuerung der RNA-Polymerase zu Beginn der RNA-Synthese beteiligt ist. Die anderen vorgelagerten Promotorelemente bestimmen die Geschwindigkeit mit der die Transkription initiiert wird.

**[0052]** Enhancer-Elemente können die Transkription bis auf das 1.000-fache verbundener homologer oder heterologer Promotoren stimulieren. Enhancer sind aktiv, wenn sie der Transkriptionsinitiationsstelle vor- oder nachgelagert angeordnet werden. Viele Enhancer-Elemente, die von Viren abgeleitet werden, haben einen weiten Wirtsbereich und sind in einer Vielzahl von Geweben aktiv. Zum Beispiel ist der SV40 Early Gene Enhancer für viele Zelltypen geeignet. Andere Enhancer/Promotor-Kombinationen, die sich für die vorliegende Erfindung eignen, sind z. B. die, die von dem Polyomavirus, dem humanen oder Maus-Cytomegalovirus, der Langzeitwiederholung von verschiedenen Retroviren, wie dem Maus-Leukämievirus, dem Maus- oder Rous-Sarkomvirus und HIV abgeleitet sind. Siehe, *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1983.

**[0053]** Zusätzlich zu einer Promotorsequenz muss die Expressionskassette auch eine Region zu Transkriptionsterminierung haben, die dem strukturellen Gen nachgelagert ist, um eine wirksame Termination zu gewährleisten. Die Terminationsregion kann aus der gleichen Quelle wie die Promotorsequenz oder aus einer anderen Quelle gewonnen werden.

**[0054]** Wenn die mRNA, die von dem gewählten strukturellen Gen codiert wird, wirksam translatiert werden soll, werden häufig auch Polyadenylierungssequenzen zum Vektorkonstrukt hinzugefügt. Zwei bestimmte Sequenzelemente sind zur richtigen und wirksamen Polyadenylierung erforderlich: GU- oder U-reiche Sequenzen, die der Polyadenylierungsstelle nachgelagert sind und eine hochkonservierte Sequenz aus sechs Nukleotiden, AAUAAA, die 11–30 Nukleotide vorgelagert ist. Zu den Terminierungs- und Polyadenylierungssignalen, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, gehören die, die von SV40, oder einer teilweise genomischen Kopie eines Gens abgeleitet sind, das schon auf dem Expressionsvektor residiert.

**[0055]** Zusätzlich zu den Elementen, die schon beschrieben wurden, kann der Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung gewöhnlich andere speziali-

sierte Elemente enthalten, die den Expressionsgrad geklonter Nukleinsäuren erhöhen oder die Feststellung von Zellen erleichtern sollen, die die transduzierte DNA tragen. Zum Beispiel enthalten eine Anzahl von Tierviren DNA-Sequenzen, die die zusätzliche Chromosomenreplikation des Virengenoms in permissiven Zelltypen fördern. Plasmide, die diese viralen Replikons tragen, werden episomal repliziert, solange die geeigneten Faktoren von Genen zur Verfügung gestellt werden, die entweder auf den Plasmiden oder mit dem Genom der Wirtszellen getragen werden.

**[0056]** Die Expressionsvektoren, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, enthalten gewöhnlich sowohl prokaryotische Sequenzen, die das Klonen des Vektors in Bakterien erleichtern, als auch eine oder mehrere eukaryotische Transkriptionseinheit(en), die nur in eukaryotischen Zellen, wie Säugerzellen exprimiert werden. Die prokaryotischen Sequenzen werden bevorzugt so gewählt, dass sie die Replikation der DNA in eukaryotischen Zellen nicht stören.

**[0057]** Gewählte Gene werden normalerweise exprimiert, wenn die DNA-Sequenz funktionell in einen Vektor eingesetzt wird. „Funktionell eingeführt“ bedeutet, dass sie in einem geeigneten Leserahmen und einer geeigneten Orientierung eingesetzt wird, und in einer Wirkverbindung mit den geeigneten regulatorischen Elementen steht.

**[0058]** Gewöhnlich wird ein Gen einem Promotor nachgelagert eingesetzt und ihm folgt ein Stoppcodon, obwohl die Produktion als Hybridprotein gefolgt von Spaltung verwendet werden kann, falls erwünscht.

**[0059]** Der Vektor enthält gewöhnlich, zusätzlich zu dem Gen von Interesse, ein oder mehrere zusätzliche Gene, die für wählbare Marker codieren. Die wählbaren Marker können der positiven Selektion dienen (z. B. Zellen, die das Markergen exprimieren, überleben, während Zellen, die das gewählte Gen nicht exprimieren, sterben; solche Gene können z. B. eine Resistenz gegenüber Antibiotika codieren) oder der negativen Selektion (z. B. die Zellen, die das Markergen exprimieren sterben, während Zellen, die das gewählte Gen nicht exprimieren, überleben; solche Gene können z. B. Cytosindeaminase codieren).

**[0060]** Es können verschiedene Vektoren verwendet werden, dabei muss jedoch beachtet werden, dass virale Vektoren, wie retrovirale Vektoren zur Modifizierung von eukaryotischen Zellen nützlich sind, da die retroviralen Vektoren Zielzellen mit einem hohen Wirkungsgrad transfizieren und in das Zellgenom integrieren. Zusätzlich sind die Retroviren, die den retroviralen Vektor enthalten, in der Lage, Zellen von vielen verschiedenen Geweben zu infizieren.

**[0061]** Retrovirale Vektoren werden durch die gentechnische Veränderung von Retroviren erzeugt. Retroviren werden RNA-Viren genannt, da das virale Genom RNA ist. Nach der Infektion wird diese genomische RNA revers zu einer DNA-Kopie transkribiert, die mit einem hohen Stabilitäts- und Wirkungsgrad in die chromosomale DNA der transduzierten Zellen integriert wird. Die integrierte DNA-Kopie wird als Provirus bezeichnet und wird, wie alle anderen Gene, von Tochterzellen geerbt. Das retrovirale Genom des Wildtyps und die provirale DNA haben drei Gene: Das gag-, das pol- und das env-Gen, die von zwei langen endständigen Wiederholungssequenzen (LTR-Sequenzen) eingerahmt werden. Das gag-Gen codiert für die internen strukturellen (Nukleokapsid) Proteine, das pol-Gen codiert für die von der RNA gesteuerte DNA-Polymerase (Revers-Transkriptase) und das env-Gen codiert für virale Hüllglykoproteine. Die 5' und 3' LTR fördern die Transkription und Polyadenylierung von Virion-RNA. Neben der 5'-LTR liegen Sequenzen, die zur reversen Transkription des Genoms (Bindungsstelle des tRNA-Primer) und zur effizienten Verkapselung viraler RNA in Partikel (Psi-Stelle) erforderlich sind. Siehe Mulligan, R. C., (1983) In: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, M. Inouye (ed), 155–173; Mann R., et al., (1983) *Cell*, 33: 153–159; Cone, R. D. and R. C. Mulligan, (1984) *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.*, 81: 6349–6353.

**[0062]** Retrovirale Vektoren sind wegen dem hohen Wirkungsgrads, mit dem die retroviralen Vektoren Zielzellen transduzieren und in das Zielzellengenom integrieren, zur Modifizierung von Zellen besonders nützlich. Siehe Miller, A. D., (1992) *supra*. Retroviren, die den retroviralen Vektor enthalten, sind in der Lage, sich teilende Zellen von vielen verschiedenen Geweben zu infizieren. Diese Vektoren haben die Fähigkeit, die transferierten Gensequenzen stabil in die chromosomale DNA der Zielzellen zu integrieren.

**[0063]** Das Design retroviraler Vektoren ist dem Fachmann gut bekannt. Siehe Singer, M. and Berg, P. *supra*. Kurz gefasst: Wenn die Sequenzen, die zur Verpackung (oder Verpacken der retroviralen RNA in infektiöse Virionen) erforderlich sind, im viralen Genom fehlen, ist das Ergebnis eine cis Aktiv-Störung, die die Verpackung der genomischen RNA verhindert. Die entstehende Mutante ist jedoch noch immer dazu in der Lage, die Synthese aller Virion-Proteine zu steuern. Retrovirale Genome, von denen diese Sequenzen gelöscht wurden, sowie Zelllinien, die das Mutant-Genom stabil im Chromosom integriert enthalten, sind dem Fachmann gut bekannt und werden zur Konstruktion retroviraler Vektoren verwendet. Die Zubereitung von retroviralen Vektoren und ihre Verwendung werden in vielen Veröffentlichungen beschrieben, einschließlich *European Patent Application EPA 0 178 220*, *U.S. Patent 4,405,712*, Gilboa, (1986) *Biotechniques* 4: 504–512; Mann et al., (1983)



Cell 33: 153–159; Cone and Mulligan, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6349–6353; Eglitis, M. A. et al. (1988) Biotechniques 6: 608–614; Miller, A. D. et al. (1989) Biotechniques 7: 981–990, Miller, A. D. (1992) Nature, supra, Mulligan, R. C. (1993), supra, und Gould, B. et al., und International Patent Application No. WO 92/07943 mit dem Titel „Retroviral Vectors Useful in Gene Therapy“.

**[0064]** Zusätzlich zu den oben erwähnten retroviralen Vektoren, können Zellen mithilfe von Adenviren oder Adeno-assoziierten viralen Vektoren transformiert werden. Siehe, z. B., Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D. V. Goeddel, ed.) (1990) oder M. Krieger (1990), Gene Transfer and Expression – A Laboratory Manual, Stockton Press, New York, NY, und die darin angeführten Referenzen. Adenviren sind doppelsträngige, lineare DNA-Viren, die den „grippalen Infekt“, Lungenentzündung, Konjunktivitis und andere Erkrankungen hervorrufen. Es sind 42 Stereotypen von Adenviren bekannt, die den Menschen infizieren.

**[0065]** Adenviren dringen gewöhnlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Zellen ein. Der genaue Rezeptor ist unbekannt. Nach dem Eindringen integriert das Genom des Vektors wahrscheinlich nicht in das Wirtsgenom, sondern fungiert stattdessen episodisch. Dies führt zu einer nur vorübergehenden Genexpression und vermeidet auch die zufällige Genomintegration und deren potentiellen Probleme, wie induzierte Tumorigenizität.

**[0066]** Adeno-assoziierte Viren (AAV) benötigen Helferviren, wie Adenviren oder Herpesviren, um eine produktive Infektion zu erzielen. Wenn keine Helfervirenfunktionen vorhanden sind, integriert AAV (stellenspezifisch) in das Genom einer Wirtszelle, das integrierte AAV-Genom hat jedoch keine pathogene Wirkung. Der Integrationsschritt ermöglicht es dem AAV-Genom, genetisch intakt zu bleiben bis der Wirt den geeigneten Umweltbedingungen ausgesetzt wird (z. B. einem lytischen Helfervirus), woraufhin es erneut in den lytischen Lebenszyklus tritt. Samulski (1993), Current Opinion in Genetic and Development, 3: 74–80, und die hierin erwähnten Referenzen bieten eine Übersicht über den AAV-Lebenszyklus. Siehe auch West et al. (1987), Virology, 160: 38–47; Carter et al. (1989), U.S. Patent No. 4,797,368; Carter et al. (1993), WO 93/24641; Kotin (1994), Human Gene Therapy, 5: 793–801; Muzyczka (1994), J. Clin. Invest., 94: 1351 und Samulski, supra, für eine Übersicht über AAV-Vektoren.

**[0067]** Rekombinante AAV-Vektoren (rAAV-Vektoren) liefern fremde Nukleinsäuren an einen weiten Bereich von Säugetierzellen (Hermonat & Muzycka (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81: 6466–6470; Tratschin et al. (1985) Mol Cell Biol 5: 3251–3260), integrieren in das Wirtschromosom (McLaughlin et al.

(1988) J Virol 62: 1963–1973), und zeigen stabile Expressionen des Transgens in Zell- und Tiermodellen (Flotte et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 10613–10617). Darüber hinaus sind rAAV-Vektoren im Gegensatz zu retroviralen Vektoren, in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Podsakoff et al. (1994) J Virol 68: 5656–66; Flotte et al. (1994) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 11: 517–521). Zu den weiteren Vorteilen von rAAV-Vektoren gehören der Mangel eines intrinsisch starken Promotors, wodurch eine mögliche Aktivierung von nachgelagerten Zellsequenzen vermieden wird, und ihre nackte icosahedrale Kapsidstruktur, die sie stabil und anhand allgemeiner Labormethoden leicht konzentrierbar macht.

**[0068]** rAAV-Vektoren haben mehrere Eigenschaften, die sie zu bevorzugten Gentransfersystemen in klinischen Anwendungen machen. Sie haben keinen bekannten Pathogenese-Modus und 80% der Menschen in den Vereinigten Staaten sind derzeit für AAV seropositiv (Blacklow et al. (1971) J Natl Cancer Inst 40: 319–327; Blacklow et al. (1971) Am J Epidemiol 94: 359–366). Da rAAV-Vektoren geringe oder keine endogene Promotoraktivität haben, können abhängig vom Zielzelltyp spezielle Promotoren verwendet werden. rAAV-Vektoren können gereinigt und konzentriert werden, so dass Multiplizitäten von Infektionen über 1,0 in Transduktionsexperimenten verwendet werden können. Dadurch können praktisch 100% der Zielzellen in einer Kultur transduziert werden, wodurch die eine Selektion transduzierter Zellen eliminiert wird.

**[0069]** Plasmide, die zur Produktion von rekombinanten Impfstoffen konzipiert sind, wie pGS62, (Langford, C. L. et al. (1986), Mol. Cell. Biol., 6: 3191–3199) können ebenfalls verwendet werden. Schließlich wurde berichtet, dass nicht-pathogene Vektoren, die von HIV abgeleitet wurden, sich nicht teilende Zellen transformieren und ebenfalls verwendet werden können.

**[0070]** Gleichgültig, welcher Vektor verwendet wird, der Vektor ist im Allgemeinen gentechnisch verändert, so dass er in exprimierbarer Form ein Gen von Interesse enthält. Das jeweilige gewählte Gen hängt von der beabsichtigten Behandlung ab. Beispiele für solche Gene von Interesse werden unten beschrieben.

**[0071]** Die Vektoren enthalten außerdem gewöhnlich selektierbare Marker, die zu einer Amplifikation der Nukleinsäure führen, die wie Natrium-Kalium-AT-Pase, Thymidinkinase, Aminoglycosid-Phosphotransferase, Hygromycin-B-Phosphotransferase, Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, CAD (Carbamylphosphatsynthetase, Aspartat-Transcarbamylase und Dihydroorotase), Adenosindeaminase, Dihydrofolatreductase und Asparaginsynthetase und Ouabain Selektion. Alternativ dazu sind auch ertrag-

reiche Expressionssysteme geeignet, die keine Nukleinsäureamplifikation beinhalten, wie z. B. die Verwendung eines Baculovirus-Vektors in Insektenzellen.

**[0072]** Wenn andere Nukleinsäuren als Plasmide verwendet werden, können die Nukleinsäuren Nukleinsäureanaloga, z. B. die Antisense-Derivate enthalten, die in einem Bericht von Stein et al., (1993) *Science* 261: 1004–1011, und in U.S. Patent Nr. 5,264,423 und 5,276,0191 beschrieben werden.

**[0073]** Es gibt mehrere gut bekannte Verfahren zur Einführung von Nukleinsäuren in Tierzellen, die alle in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Dazu gehören: Calcium-Phosphat-Prezipitation, Fusion der Empfängerzellen mit bakteriellen Protoplasten, die die DNA enthalten, Behandlung der Empfängerzellen mit Liposomen, die die DNA enthalten, DEAE-Dextran, Rezeptor-vermittelte Endozytose, Elektroporation, Mikroinjektion von DNA direkt in die Zellen, Infektion mit viralen Vektoren usw.

**[0074]** Für In-vitro-Anwendungen kann der Transfer von Nukleinsäuren an jede kultivierte Zelle erfolgen, gleichgültig ob pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, von Wirbeltieren oder Wirbellosen und von beliebigen Geweben oder Typen. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Zellen Tierzellen, bevorzugter Säugetierzellen, am meisten bevorzugter menschliche Zellen.

**[0075]** Der Kontakt zwischen den Zellen und den gentechnisch veränderten Nukleinsäurekonstrukten, findet bei einer In-vitro-Ausführung in einem biologisch kompatiblen Medium statt. Die Konzentration von Nukleinsäuren ist, abhängig von der speziellen Anwendung, sehr unterschiedlich, liegt jedoch im Allgemeinen zwischen ca. 1  $\mu\text{mol}$  und ca 10 mml. Die Behandlung der Zellen mit der Nukleinsäure wird im Allgemeinen bei physiologischen Temperaturen (ca. 37°C) über Zeiträume von ca. 1 bis 48 Stunden, vorzugsweise von ca. 2 bis 4 Stunden durchgeführt.

**[0076]** In einer Gruppe bevorzugter Ausführungsformen wird eine Nukleinsäure zu 60–80% konfluenten kultivierten Zellen mit einer Zelldichte von ca.  $10^3$  bis ca.  $10^5$  Zellen/ml, bevorzugter ca.  $2 \times 10^4$  Zellen/ml hinzugefügt. Die Konzentration der Suspension, die zu den Zellen hinzugefügt wird, liegt bevorzugt zwischen ca. 0,01 bis 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , bevorzugter ca. 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

**[0077]** Alternativ dazu können die Zusammensetzungen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, auch für den In-vivo-Gentransfer verwendet werden, wobei Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Das Einführen von Genen in Zellen zum Zweck der medizinischen Therapie ist ein schnell wachsender Bereich in der Medizin, der

ein enormes klinisches Potenzial hat. Forschung in der Gentherapie wird seit mehreren Jahren betrieben und ist in klinische Studien eingegangen. Zhu, et al., (1993) *Science* 261: 209–211, beschreibt den intravenösen Transfer von Cytomegalovirus (CMV)-Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Expressionsplasmid mithilfe von DOTMA/DOPE-Komplexen. Hyde, et al., (1993) *Nature* 362: 250–256 beschreibt den Transfer des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gens (CFTR) an Epithel der Luftwege und an Alveolen in den Lungen von Mäusen unter Verwendung von Liposomen. Brigham, et al., (1989) *Am. J. Med. Sci.* 298: 278–281, beschreibt die In-vivo-Transfektion von Lungen von Mäusen mit einem funktionsfähigen prokaryotischen Gen, das für das intrazelluläre Enzym Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) codiert.

**[0078]** Zur In-vivo-Verabreichung werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen bevorzugt parenteral verabreicht, d. h. intraartikular, intravenös, intraperitoneal, subkutan oder intramuskulär. Noch bevorzugter werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen intravenös oder intraperitoneal durch Bolusinjektion verabreicht. Siehe z. B. Stadler, et al., U.S. Patent No. 5,286,634. Der intrazelluläre Nukleinsäuretransfer wurde auch in Straubinger, et al., (1983) *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Academic Press, New York diskutiert. 101: 512–527; Mannino, et al., (1988) *Biotechniques* 6: 682–690; Nicolau, et al., (1989) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6: 239–271, und Behr, (1993) *Acc. Chem. Res.* 26: 274–278. Weitere Verfahren zur Verabreichung von Therapeutika werden z. B. in Rahman et al., U.S. Patent No. 3,993,754; Sears, U.S. Patent No. 4,145,410; Papahadjopoulos et al., U.S. Patent No. 4,235,871; Schneider, U.S. Patent No. 4,224,179; Lenk et al., U.S. Patent No. 4,522,803; und Fountain et al., U.S. Patent No. 4,588,578 beschrieben.

**[0079]** In gewissen Ausführungsformen können die pharmazeutischen Zubereitungen in Kontakt mit dem Zielgewebe gebracht werden, indem die Zubereitung direkt auf das Gewebe aufgebracht wird. Das Auftragen kann über topische, „offene“ oder „geschlossene“ Verfahren erfolgen. Mit „topisch“ ist das direkte Auftragen der pharmazeutischen Zubereitung auf ein Gewebe gemeint, das der Umwelt ausgesetzt ist, wie die Haut, der Oropharynx, der externe Gehörgang und dergleichen. „Offene“ Verfahren sind Verfahren, bei denen eine Inzision in die Haut eines Patienten vorgenommen, und das darunter liegenden Gewebe, auf das die pharmazeutischen Zubereitungen angewendet werden, direkt angesehen wird. Dies geschieht gewöhnlich durch einen chirurgischen Eingriff, wie eine Thorakotomie für den Zugriff auf die Lungen, abdominale Laparotomie für den Zugang auf Baucheingeweide oder anderen direkten chirurgischen Zugang auf das Zielgewebe. „Geschlossene“

Verfahren sind invasive Verfahren, bei denen die internen Zielgewebe nicht direkt angesehen werden, sondern durch das Einführen von Instrumenten über kleine Wunden in der Haut zugänglich gemacht werden. Zum Beispiel können die Zubereitungen durch Nadel-Lavage an das Bauchfell verabreicht werden. Genauso können die pharmazeutischen Zubereitungen an die Gehirnhäute oder das Rückenmark durch Infusion bei einer Lumbarpunktion, gefolgt von der geeigneten Lagerung des Patienten verabreicht werden, wie es häufig in der Spinalanästhesie oder der Bildgebung des Knochenmarks mit Metrizamid geschieht. Alternativ dazu können die Zubereitungen über endoskopische Geräte verabreicht werden.

**[0080]** Die Nuldeinsäure kann auch als Aerosol verabreicht werden, das in die Lungen inhaliert wird (siehe, Brigham, et al., (1989) Am. J. Sci. 298(4): 278–281 oder durch direkte Injektion an den Ort der Erkrankung (Culver, (1994) HUMAN GENE THERAPY, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York. pp. 70–71).

**[0081]** Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können in verschiedenen Wirten praktiziert werden. Zu den bevorzugten Wirten gehören Säugetierarten, wie Menschen, nicht-menschliche Primaten, Hunde, Katzen, Rinder, Pferde, Schafe und derartige.

**[0082]** Die Menge der verabreichten Nukleinsäure hängt von der jeweiligen verwendeten Nukleinsäure, dem diagnostizierten Krankheitszustand, dem Alter, Gewicht und Zustand des Patienten und der Beurteilung vonseiten des Arztes ab, liegt jedoch im Allgemeinen zwischen ca. 0,01 und ca. 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht, bevorzugt zwischen ca. 0,1 und ca. 5 mg/kg Körpergewicht oder ca.  $10^8$ – $10^{10}$  Partikel pro Injektion.

**[0083]** Zum In-vivo-Genstransfer werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die gewählte Vektoren mit gewählten Nukleinsäuren enthalten, bevorzugt parenteral verabreicht, d. h. intraartikular, intravenös, intraperitoneal, subkutan oder intramuskulär. Noch bevorzugter werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen intravenös oder intraperitoneal durch Bolusinjektion verabreicht. Siehe z. B. Stadler, et al., U.S. Patent No. 5,286,634. Der intrazelluläre Nukleinsäuretransfer wurde auch in Straubinger, et al., (1983) METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York diskutiert. 101: 512–527; Mannino, et al., (1988) Biotechniques 6: 682–690; Nicolau, et al., (1989) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6: 239–271, and Behr, (1993) Acc. Chem. Res. 26: 274–278. Weitere Verfahren zur Verabreichung von Therapeutika werden z. B. in Rahman et al., U.S. Patent No. 3,993,754; Sears, U.S. Patent No. 4,145,410; Papahadjopoulos et al., U.S. Patent No. 4,235,871; Schneider, U.S. Patent No. 4,224,179; Lenk et al., U.S. Patent No. 4,522,803; und Fountain

et al., U.S. Patent No. 4,588,578 beschrieben.

**[0084]** Zu den Formulierungen, die sich zur Verabreichung eignen, gehören wässrige und nicht-wässrige, isotonisch sterile Injektionslösungen, die Antioxidierungsmittel, Puffer, Bakteriostat und gelöste Substanzen enthalten können, die die Lösung mit dem Blut des beabsichtigten Empfängers isotonisch machen, und wässrige und nichtwässrige sterile Suspensionen, die Suspensionsmittel, Lösungsvermittler, Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Konservierungsstoffe umfassen können. Die Formulierungen verpackter Nukleinsäuren können in dichten Behältern mit einer Dosis oder mehreren Dosen angeboten werden, wie Ampullen oder Röhrchen. Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulaten und Tabletten der zuvor beschriebenen Art zubereitet werden.

**[0085]** Eine Vektordosis, die ausreicht, um im Patienten im Zeitablauf eine günstige therapeutische Reaktion zu erzielen, oder die Infektion mit einem Pathogen zu verhindern, wird einem Patienten verabreicht. Eine therapeutisch effektive Dosis ist eine Menge, die ausreicht, die Symptome einer Krankheit und ihre Komplikationen zu heilen oder ihnen zumindest teilweise Einhalt zu gebieten. Effektive Dosen der Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung zur Behandlung der oben beschriebenen Befunde variieren abhängig vieler verschiedener Faktoren, einschließlich Verabreichungsweise, Zielort, physiologischer Zustand des Patienten und andere verabreichte Medikamente. Daher müssen die Behandlungsdosen titriert werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit zu optimieren. Beim Feststellen der effektiven Menge des zu verabreichenden Vektors bewertet der Arzt die jeweilige verwendete Nukleinsäure, den diagnostizierten Krankheitszustand, das Alter, Gewicht und den Zustand des Patienten, zirkulierende Plasmaniveaus, Vektortoxizitäten, das Fortschreiten der Krankheit und die Produktion von Anti-Vektor-Antikörpern. Die Größe der Dosis wird auch durch das Vorhandensein, die Beschaffenheit und das Ausmaß unerwünschter Nebenwirkungen bestimmt, die die Verabreichung eines bestimmten Vektors begleiten. Dosen von ca. 10 ng bis 1 g, 100 ng to 100 mg, 1 µg to 10 mg, oder 30–300 µg DNA pro Patient sind typisch. Die Dosen liegen gewöhnlich zwischen ca. 0,01 und ca. 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht; bevorzugt zwischen 0,1 und ca. 5 mg/kg Körpergewicht oder ca.  $10^8$ – $10^{10}$  Partikel pro Injektion. Im Allgemeinen ist die zu einer nackten Nukleinsäure äquivalente Dosis von einem Vektor ca. 1 µg bis 100 µg für einen typischen Patienten von 70 kg, und Dosen eines Vektors, die ein retrovirales Partikel enthalten, werden so berechnet, dass sie eine äquivalente Menge von Inhibitor-Nukleinsäure ergeben.

**[0086]** Vor der Infusion werden Blutproben entnommen und für die Analyse aufbewahrt. Zwischen  $10^8$

und  $1 \times 10^{12}$  Vektoren werden intravenös zwischen 60–200 Minuten infundiert. Die Vitalparameter und die Sauerstoffsättigung durch die Pulsoximetrie werden eng überwacht. Blutproben werden 5 Minuten und 1 Stunde nach der Infusion entnommen und für die nachfolgende Analyse aufbewahrt. Nach dem Ermessen des Arztes wird die erneute Infusion alle 2 bis 3 Monate für insgesamt 4 bis 6 Behandlungen im Verlauf von einem Jahr wiederholt. Nach der ersten Behandlung können die Infusionen nach Ermessen des Arztes auf einer ambulanten Basis verabreicht werden. Wenn die erneute Infusion ambulant erfolgt, wird der Teilnehmer mindestens 4 und vorzugsweise 8 Stunden nach der Therapie überwacht.

**[0087]** Wenn ein Patient, der die Infusion eines Vektors oder transduzierte Zelle erhielt, Fieber, Schüttelfrost oder Muskelschmerzen aufweist, erhält er/sie die angemessene Dosis von Aspirin, Ibuprofen oder Paracetamol. Patienten, die Reaktionen auf die Infusion, wie Fieber, Muskelschmerzen und Schüttelfrost erfahren, erhalten 30 Minuten vor der Infusion eine Verabreichung von entweder Aspirin, Paracetamol oder Diphenhydramin. Meperidin wird für schwereren Schüttelfrost und Muskelschmerzen verabreicht, wo keine schnelle Reaktion auf Antipyretika und Antihistaminika vorliegt. Je nach der Schwere der Reaktion wird die Infusion des Vektors verlangsamt oder nicht weiter fortgesetzt.

**[0088]** Einige Verfahren der Gentherapie dienen zum Ausgleich eines Defekts in einem endogenen Gen durch die Integration einer funktionellen Kopie des Gens in das Wirtchromosom. Das eingefügte Gen repliziert sich mit der Wirt-DNA und wird auf einem Grad exprimiert, um für das defekte Gen zu kompensieren. Krankheiten, die empfänglich für die Behandlung mit diesem Verfahren sind, werden oft durch rezessive Mutationen charakterisiert. Das heißt, dass beide Kopien eines endogenen Gens defekt sein müssen, damit die Symptome auftreten. Solche Krankheiten beinhalten zum Beispiel zystische Fibrose, Sichelzellenanämie,  $\beta$ -Thalassämie, Phenylketonurie, Galaktoseämie, Wilson'sche Krankheit, Hämochromatose, schwere kombinierte Immundefektkrankheit, Alpha-1-Antitrypsinmangel, Albinismus, Alkaptonurie, lysosomale Speicherkrankheit, Ehlers-Danlos Syndrom, Hämophilie, Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase-Mangel, Agammaglobulinämie, Diabetes insipidus, Lesch-Nyhan-Syndrom, Muskeldystrophie, Wiskott-Aldrich-Syndrom, Fabry'sche Krankheit, Fragiles-X-Syndrom und andere. Andere rezessive Mutationen sind im Fachgebiet bekannt, und der Einsatz der Verfahren der vorliegenden Erfindung zu deren Behandlung wird hierin beschrieben.

**[0089]** Es gibt mehrere Verfahren zur Einführung eines exogen funktionellen Gens zur Kompensierung für die oben genannten genetischen Defekte. Bei ei-

ner Methode werden Zellen von einem Patienten entfernt, der an der Krankheit leidet und mit einem Vektor In-vitro in Kontakt gebracht. Die Zellen sollten von einem Gewebetyp entfernt werden, in dem sich die Krankheitssymptome manifestiert haben. Wenn sich die Zellen replizieren können und der verwendete Vektor einen selektiven Marker beinhaltet, können die Zellen ausgewählt werden, die den Marker aufgenommen haben und durch ihn markiert werden. Insbesondere, wenn keine Auswahl vorgenommen wird, ist es wichtig, dass die Häufigkeit der Genübertragung in die Zellen hoch ist, zum Beispiel mindestens 1, 5, 10, 25 oder 50% der Zellen.

**[0090]** Nach der Integration des Vektors in den Chromosomensatz der Zellen und optional, der Auswahl, werden die Zellen wieder in den Patienten eingeführt. In dieser Applikation und anderen, die unten besprochen werden (außer standortspezifische Neukombination zur Korrektur dominanter Mutationen), ist es nicht notwendig, dass das bereitgestellte Gen an denselben Ort geliefert wird, der durch das defekte Gen besetzt wird, für den es kompensieren soll.

**[0091]** Alternativ kann die Nukleinsäure direkt in einen Patienten als pharmazeutische Zusammensetzung eingeführt werden. Der Komplex wird an das/die Gewebe geliefert, das/die durch die genetische Krankheit betroffen ist/sind und das in einer therapeutisch effektiven Dosis behandelt wird. In diesen und anderen Verfahren ist eine therapeutisch effektive Dosis eine Menge, die ausreichend für die Heilung oder zumindest für den teilweisen Einhalt der Krankheitssymptome und ihrer Komplikationen ist. Die effektive Dosis der Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung für die Behandlung der oben beschriebenen Zustände unterscheiden sich aufgrund vieler verschiedener Faktoren, einschließlich der Verabreichungswege, Zielort, physiologischen Zustand des Patienten und andere verabreichte Pharmakone.

**[0092]** Somit müssen die Dosen titriert werden, um Sicherheit und Wirksamkeit zu optimieren. Dosen, von ca. 10 ng bis 1 g, 100 ng bis 100 mg, 1  $\mu$ g bis 10 mg oder 30–300  $\mu$ g DNA pro Patient reichend, sind typisch. Verabreichungswege beinhalten die orale, nasale, gastrische, intravenöse, intradermale und intramuskuläre Verabreichung.

**[0093]** Die Nukleinsäuren können auch zur Transfektion von nicht humanen embryonalen Stammzellen oder Zygoten verwendet werden, um Veränderungen in der Keimbahn zu erreichen.

**[0094]** Beispielsweise ist die zystische Fibrose (CF) eine gewöhnlich tödliche rezessive genetische Krankheit, die einen hohen Auftretungsgrad unter der weißen Bevölkerung hat. Das Gen, das für diese Krankheit verantwortlich ist, wurde durch Riordan et al, (1989) Science 245: 1059–1065 isoliert. Es codiert

ein Protein namens zystische Fibrose transmembraner Regulator (CFTR), welches in der Übertragung von Chlorionen ( $\text{Cl}^-$ ) durch epitheliale Zellmembranen involviert ist. Mutationen in den Genen verursachen die Defekte der  $\text{Cl}^-$  Sekretion in epithelialen Zellen und führen zu verschiedenen klinischen Manifestierungen. Obwohl CF über mehrere Symptome verfügt, einschließlich verdickter exokriner Drüsensekrete, Defizienz der Bauchspeicheldrüse, Darmblockierungen und Fehlaborption von Fett, ist der ernsthafteste Faktor, der die Sterblichkeit beeinträchtigt, die chronische Lungenerkrankung. Um einen CF-Patienten entsprechend behandeln zu können, kann ein Vektor, der eine Codierungssequenz für ein funktionelles CFTR-Genprodukt enthält, per nasaler Verabreichung in den Patienten eingeführt werden, sodass die Nukleinsäuren-Zusammensetzung die Lungen erreicht. Die Dosierung des Vektors liegt vorzugsweise bei  $10^8$ – $10^{10}$  Partikel.

**[0095]** Als ein weiteres Beispiel können Defekte in den  $\alpha$  oder  $\gamma$  Globingenen (siehe McDonagh & Niehuis in Hematology of Infancy and Childhood (eds. Nathan & Oski, Saunders, PA, 1992) auf Seiten 783–897) durch eine Ex-vitro-Behandlung der hämopoetischen Stammzellen mit einer Nukleinsäure kompensiert werden, die eine funktionelle Kopie des Gens enthält. Das Gen integriert sich in die Stammzellen, die dann wieder in den Patienten eingeführt werden.

**[0096]** Defekte im Gen, die verantwortlich für Fanconi-Anämie Komplement Gruppe C sind, können mit einer analogen Strategie behandelt werden (siehe Walsh et al., (1994) J. Clin. Invest. 94: 1440–1448).

**[0097]** Andere Applikationen beinhalten die Einführung einer funktionellen Kopie eines Tumorsuppressorgens in die kanzeröse Zelle oder Zellen, die unter das Risiko fallen, kanzerös zu werden. D. Pardoll, (1992) „Immunotherapy with cytokine genetransduced tumor cells: the next wave in gene therapy for cancer“, Curr. Opin. Oncol. 4: 1124–1129; Uckert und Walther, (1994) „Retrovirus-mediated gene transfer in cancer therapy“, Pharmac. Ther. 63: 323–347; Personen, die Defekte in einer oder beiden Kopien eines endogenen Tumorsuppressorgens haben, verfügen insbesondere über das Risiko, Krebs zu entwickeln. Zum Beispiel ist das Li-Fraumeni-Syndrom ein erblicher Zustand, in dem Personen mutante p53 Allele erhalten, was zu einer frühzeitigen Entstehung von verschiedenem Krebsarten führt. (Harris, (1993) Science 262: 1980–1981, Frebourg et al., (1992) PNAS 89: 6413–6417; Malkin et al., (1990) Science 250: 1233). Die Expression eines Tumorsuppressorgens in einer kanzerösen Zelle oder einer Zelle, die dem Risiko unterliegt, kanzerös zu werden ist effektiv, um die zelluläre Proliferation und andere Manifestierungen des kanzerösen Zustands zu verhindern, aufzuhalten und/oder rückgängig zu machen. Geeignete

Tumorsuppressorgene zur Verwendung in der Erfindung beinhalten p53 (Buchman et al., (1988) Gene 70: 245–252), APC, DCC, Rb, WT1 und NF1 (Marx, (1993) Science 260: 751–752, Marshall, (1991) Cell 64: 313–326). Nukleinsäure-Konstrukte, die eine funktionelle Kopie des Tumorsuppressorgens tragen, werden gewöhnlich In-vitro in der zum Zielort am nächsten gelegenen Gegend verabreicht.

**[0098]** Zum Beispiel kann Hautkrebs durch topische Verabreichung und Leukämie durch intravenöse Verabreichung behandelt werden. Die Verfahren der Erfindung sind für die Behandlung von einer Vielfalt von Krebsarten geeignet, dazu gehören Prostata-, Gliom-, Eierstock- und Brusttumore.

**[0099]** Lokale Unterbrechungen des Blutflusses, z. B. koronare Arterienerkrankung, periphere okklusive Arterienerkrankung und zerebrale vaskuläre Erkrankung (Schlag) gehören zu den häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität. Diese Krankheiten werden durch eine unzureichende Gewebepерfusion verursacht.

**[0100]** Die Entdeckung von Polypeptiden, die die Angiogenese stimulieren können, führte zu mehreren Untersuchungen in Bezug auf die Fähigkeit der Verbesserung der lokalen Perfusion, basierend auf solchen Angiogenfaktoren, z. B. der vaskuläre Endothelialwachstumsfaktor (VEGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor (PDGF). L. -Q. Pu et al. (1993) Circulation, 88: 1–147; Symes und Sniderman, (1994), Curr. Opin. Lipidol. 5: 305–312; siehe auch U.S. Patentnummer 5,219,759, 5,512,545, 5,491,220, 5,464,943, 5,464,774, 5,360,896, 5,175,383, 5,155,214. Zum Beispiel wurde über das Auftreten von Revaskularisierung nach einer 10 Tage langen intravenösen Verabreichung von ECGF berichtet. Die Injektion an einem abgelegenen Ort führt nicht zu einer erhöhten Revaskularisierung. Die Dosierungsabhängigkeit wurde eindeutig bewiesen. Angiogenfaktoren sind toxisch, wenn sie in einer hohen Konzentrierung verwendet werden, daher scheint eine lokale Applikation notwendig zu sein. VEGF scheint eine bessere Wahl darzustellen, da es sekretiert werden kann und über eine mitotische Aktivität verfügt.

**[0101]** M. Hoeckel et al. (1993) Arch. Surg. 128: 423–429, listet die folgenden Kriterien für den therapeutischen Gebrauch eines Angiogenfaktors auf:

- 1) Kann Neovaskularisierung stimulieren
- 2) Vernachlässigswerte lokale und systemische Nebenwirkungen
- 3) Hohe Wirksamkeit im nanomolaren und picomolaren Spektrum
- 4) Demonstrierte Beziehung zwischen Dosis – Reaktion
- 5) Chemisch definiert und leicht in der Handhabung

6) Kann im großen Umfang produziert werden

**[0102]** Lokalisierte Wärmezuführung bei gentechnisch veränderten Zellen bietet die lokalisierten Expression von Angiogenfaktoren und minimiert die systemischen Effekte.

**[0103]** Verfahren der Gentherapie, die Nukleinsäurekonstrukte der Erfindung verwenden, können auch für prophylaktische oder therapeutische Behandlungen von Patienten oder Zellen eingesetzt werden, die infiziert sind oder dem Risiko ausgesetzt sind, mit einem pathogenischen Mikroorganismus, wie HIV, infiziert zu werden. Die Effektivität von Antisense-Molekülen beim Blockieren von Zielgenfunktionen wurde in einer Reihe verschiedener Systeme demonstriert (Friedman et al. (1988), *Nature* 335: 452–54, Malim et al., (1989) *Cell* 58: 205–14 und Trono et al., (1989) *Cell* 59:113–20). Der verwendete Vektor beinhaltet ein DNA-Segment, das ein Antisense-Transkript codiert, welches ein Segment des Gens ergänzt. Wenn das Gen von einem pathogenischem Mikroorganismus stammt, sollte es vorzugsweise eine wichtige Rolle im Lebenszyklus spielen und auch einzigartig für den Mikroorganismus sein (oder zumindest im Chromosomensatz des Patienten, der sich in Therapie befindet, fehlen). Geeignete Orte für die Inhibierung des HIV-Virus beinhalten zum Beispiel TAR, REV oder Nef (Chatterjee et al., (1992) *Science* 258: 1485–1488). Rev ist ein regulatives RNA, das Protein bindet, die den Export von ungespleißtem HIV Prä-mRNA vom Nukleus ermöglicht. Malim et al., (1989) *Nature* 338: 254. Es wird angenommen, dass es sich um einen transkriptionellen Aktivator handelt, der durch die Bindung einer Erkennungssequenz in der 5' flankierenden mRNA funktioniert. Kam & Grable, (1992), *Trends Genet.* 8: 365. Die Nukleinsäure wird in die Leukozyten oder hämopoetischen Stammzellen entweder Ex-vivo oder per intravenöser Injektion in einer therapeutisch effektiven Dosis eingeführt. Die Behandlung kann bei HIV-Personen prophylaktisch erfolgen bzw. auch bei Personen, die bereits mit HIV infiziert sind.

**[0104]** Die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung werden verwendet, um Gene an eine breite Vielfalt von Zelltypen zu übertragen, In-vivo und In-vitro. Zu denen, die bei der Gentherapie am häufigsten eingesetzt werden, gehören Präkursor (Stamm-) Zellen, insbesondere hämatopoetische Stammzellen.

**[0105]** Andere Zellen beinhalten diejenigen, von denen eine Proportion der Zielzellen nichtteilend oder langsam teilend ist. Diese beinhalten zum Beispiel Fibroblasten, Keratinozyten, endothiale Zellen, skelettale und glatte Muskelzellen, Osteoblasten, Neuronen, quieszente Lymphozyten, terminal differenzierte Zellen, langsam oder nicht zirkulierende Primärzellen, parenchymale Zellen, lymphoide Zellen, epitheli-

ale Zellen, Knochenzellen usw. Die Verfahren und Zusammensetzungen können bei Zellen bei vielen Wirbeltieren, einschließlich Säugetieren, zum Einsatz kommen, und insbesondere bei denen von veterinärischer Wichtigkeit, z. B. Hunde, Katze, Pferde, Rind, Schaf, Ziege, Nagetiere, Hase, Schwein usw., zusätzlich zu Humanzellpopulationen.

**[0106]** Falls die Gewebekultur von Zellen erforderlich ist, ist dies im Fachgebiet gut bekannt. Freshney (1994) (*Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition Wiley-Liss, New York); Kuchler et al. (1977) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Kuchler, R. J. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., und die darin zitierten Referenzen bieten eine allgemeine Anleitung zur Züchtung der Zellen. Gezüchtete Zellsysteme haben oft die Form einer Monoschicht der Zellen, obwohl Zellsuspensionen auch verwendet werden.

**[0107]** Die Gentherapie hängt von der effizienten Lieferung der therapeutischen Gene an die Zielzellen ab. Die meisten der somatischen Zellen die Ziel der Gentherapie sind, z. B. hämatopoetische Zellen, Haut-Fibroblasten und Keratinozyten, sind gewöhnlich nichtteilend. Retrovirale Vektoren, was die am häufigsten verwendeten Vektoren für die Gentherapie sind, erfordern leider die Zellteilung für die effektive Transduktion (Miller et al., (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 4239–4242). Dies trifft auch auf andere Vektoren der Gentherapie zu, wie die Adeno-assoziierten Vektoren (Russell et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8915–8919; Alexander et al., (1994) *J. Virol.* 68: 8282–8287; Srivastava, (1994) *Blood Cells* 20: 531–538). Vor kurzem wurde berichtet, dass HIV-basierte Vektoren nichtteilende Zellen transfizieren. Nichtsdestotrotz ist die Mehrheit der Stammzellen, ein bevorzugtes Ziel für viele Gentherapiebehandlungen, gewöhnlich nicht proliferierend.

**[0108]** Somit ist die Wirksamkeit der Transduktion oft relativ gering und das Genprodukt kann nicht in therapeutisch oder prophylaktisch effektiven Mengen exprimiert werden. Dies hat Prüfärzte dazu geführt, Techniken zur Stimulierung der Stammzellen zu entwickeln, die der Proliferierung vor oder während der Genübertragung dienen (z. B. durch Behandlung mit Wachstumsfaktoren). Die Vorbehandlung mit 5-Fluorouracil, Infektion bei einer Präsenz von Zytokinen und Verlängerung der Vektor-Infektionsperiode zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, dass sich die Stammzellen während der Infektion teilen, haben jedoch nur einen begrenzten Erfolg gezeigt.

**[0109]** Nachdem eine bestimmte Zelle mit einem Nukleinsäure-Konstrukt transduziert wird, die ein Gen von Interesse unter der Kontrolle eines Hsp-Promotors codiert, ist es wichtig zu entdecken, welche Zellen oder Zelllinien das Genprodukt exprimieren und den Grad des Expression des Genprodukts in

den veränderten Zellen zu bewerten. Dies erfordert die Entdeckung der Nukleinsäure, das die Genprodukte codiert.

**[0110]** Nukleinsäuren und Proteine werden hierin durch eine Reihe von Mitteln entdeckt und quantifiziert, die Fachleuten gut bekannt sind. Diese beinhalten analytische biochemische Verfahren, wie Spektrophotometrie, Radiographie, Elektrophorese, kapillare Elektrophorese, flüssige Hochleistungschromatographie (HPLC), Dünnschicht-Chromatographie (TLC), Hyperdiffusionschromatographie und ähnliches sowie verschiedene immunologische Verfahren, wie Flüssigkeits- und Gel-Präzipitinreaktionen, Immundiffusion (einzeln oder doppelt), Immunoelktrophorese, Radio immunoassays (RIAs), mit Enzymen verbundene immunobasorbente Assays (ELISAs), immunfluoreszierende Assays und ähnliches. Die Entdeckung von Nukleinsäuren geht durch gut bekannte Verfahren, wie die Southern-Analyse, Northern-Analyse, Gel-Elektrophorese, PCR, Radiolabeling, Szintillationsmessung und Affinitätschromatographie weiter.

**[0111]** Die Auswahl des Hybridisierungsformats für die Nukleinsäure ist nicht kritisch. Eine Vielzahl an Hybridisierungsformaten für die Nukleinsäure ist den Fachleuten bekannt. Bekannte Formate sind zum Beispiel Sandwich-Assays und Kompetition oder Verdrängungsassays.

**[0112]** Hybridisierungstechniken werden im Allgemeinen in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH, Ed. Hames, B. D. und Higgins, S. J., IRL Press, 1985 beschrieben.

**[0113]** Die Sensitivität der Hybridisierungsassays muss durch die Verwendung eines Nukleinsäure-Amplifikationssystems verbessert werden, welches die zu entdeckende Zielnukleinsäure multipliziert. In-vitro-Amplifikationstechniken, die sich für die Amplifikation von Sequenzen zum Einsatz als Molekularsonden oder für das Erzeugen der Nukleinsäurefragmente für das nachfolgende Subklonen eignen, sind bekannt. Beispiele von Techniken, die ausreichen, um Personen aus dem Fachgebiet durch solche In-vitro-Amplifikationsmethoden zu führen, einschließlich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Ligase-Kettenreaktion (LCR), Oß-Replikaseamplifikation und anderer RNA Polymerase-Techniken (z. B. NASBA) können in Berger, Sambrook und Ausubel als auch bei Mullis et al. (1987), U.S. Patentnummer 4,683,202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego CA (1990) (Inns); Arnheim & Levinson (1. Oktober 1990), C&EN 34–47; The Journal Of NIH Research (1991), 3: 81–94; (Kwoh et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173; Guatelli et al, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874, Lomell et al. (1989), J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegren et al.

(1988), Science, 241: 1077–1080; Van Brunt (1990), Biotechnology, 8: 291–94; Wu und Wallace (1989), Gene, 4: 560, Barringer et al. (1990), Gene, 89: 117, und Snooknanan und Malek (1995), Biotechnology, 13: 563–564 gefunden werden. Verbesserte Verfahren des In-vitro-Klonens von amplifizierten Nukleinsäuren werden in Wallace et al., U.S. Patentnummer 5,426,039 beschrieben. Andere Verfahren, die vor kurzem im Fachgebiet beschrieben wurden, sind die Nukleinsäuresequenzen, basierend auf Amplifikation (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) und Q-Beta-Replikase-Systeme. Diese Systeme können verwendet werden, um Mitanten direkt zu identifizieren, wo die PCR- oder LCR-Primer zur Erweiterung dienen oder nur zum Abbinden, wenn eine ausgewählte Sequenz vorhanden ist. Alternativ können die ausgewählten Sequenzen allgemein amplifiziert werden, indem zum Beispiel nichtspezifische PCR-Primer verwendet werden und der amplifizierte Ziel-Bereich später auf eine spezifische Sequenz untersucht wird, die eine Mutation aufweist.

**[0114]** Oligonukleotide zur Verwendung als Sonden, z. B. bei In-vitro-Amplifikationsmethoden, zur Verwendung als Gensonden oder als Inhibitorenkomponenten werden gewöhnlich nach dem Festphasen-Phosphoramidite-Triester-Verfahren chemisch synthetisiert, das durch Beaucage und Caruthers (1981) in Tetrahedron Letts., 22 (20): 1859–1862 beschrieben wird, z. B. unter Verwendung eines automatisierten Synthesizer, wie in Needham-Van Devanter et al. (1984), Nucleic Acids Res., 12: 6159–6168 beschrieben. Die Purifikation der Oligonukleotiden wird, wo notwendig, gewöhnlich entweder durch die Acrylamid-Gel-Elektrophorese oder durch einen Anionenaustausch HPLC durchgeführt, wie in Pearson und Regnier (1983), J. Chrom., 255: 137–149 beschrieben. Die Sequenz der synthetischen Oligonukleotide kann unter Verwendung der chemischen Degradationsmethode von Maxam und Gilbert (1980) in Grossman und Moldave (eds) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65: 499–560 verifiziert werden.

**[0115]** Ein alternatives Mittel zur Bestimmung des Grades der Expression der Gene ist die In-situ-Hybridisierung. In-situ-Hybridisierungsassays sind gut bekannt und im Allgemeinen in Angerer et al. (1987), Methods Enzymol, 152: 649–660 beschrieben. In einem In-situ-Hybridisierungsassay werden die Zellen auf einer festen Auflage befestigt, gewöhnlich auf einem Objektträger aus Glas. Wenn die DNA untersucht werden soll, werden die Zellen durch Zuführung von Hitze oder Alkali denaturiert. Die Zellen werden dann mit einer Hybridisierungslösung mit einer moderaten Temperatur in Kontakt gebracht, um das Kühlen von spezifisch markierten Sonden zu ermöglichen. Die Sonden werden vorzugsweise mit Radioisotopen oder Fluoreszenz-Reportern gekennzeichnet.



**[0116]** Die Expression der interessanten Gene unter der Kontrolle eines n Hsp-Promotors zur Herstellung eines Produkts kann durch verschiedene Verfahren entdeckt oder quantifiziert werden. Die bevorzugten Verfahren beinhalten die Verwendung spezifischer Antikörper.

**[0117]** Verfahren zur Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern sind Fachleuten bekannt. Siehe z. B. Coligan (1991), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; und Harlow und Lane (1989), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4. Edition) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, und der darin zitierten Referenzen; Goding (1986), MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2. Edition) Academic Press, New York, NY; und Kohler und Milstein (1975), Nature, 256: 495–497. Solche Techniken beinhalten die Zubereitungen von Antikörpern durch die Auswahl der Antikörper aus Sammlungen von rekombinanten Antikörpern in Phagen oder in ähnlichen Vektoren. Siehe Huse et al. (1989), Science, 246: 1275–1281; und Ward et al. (1989), Nature, 341: 544–546. Spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper und Antiseren binden sich gewöhnlich an ein KD von mindestens 0,1 mM, häufiger mindestens ca. 1  $\mu$ M, vorzugsweise mindestens ca. 0,1  $\mu$ M oder besser und am meisten bevorzugt 0,01  $\mu$ M oder besser.

**[0118]** Im Zentrum der vorliegenden Erfindung steht die Fähigkeit, hitzeinduzierbare Promotoren selektiv durch die Verwendung von lokalisierter Wärme zu aktivieren. Dies ist insbesondere für kontrollierbare Wärmezellen innerhalb eines Ziel-Bereiches wichtig, das sich im tiefen Gewebe befindet, während die Erhitzung der Umgebungszellen minimiert wird.

**[0119]** Die lokalisierte Erwärmung des tiefer liegenden Gewebes kann durch invasive oder nicht invasive Verfahren erreicht werden (ohne die Haut zu öffnen). Zu den invasiven Verfahren gehört die Einführung eines Katheters mit einer erhitzten Spitze.

**[0120]** Alternativ kann ein Katheter mit einer optischen Führung verwendet werden. Ein Laserstrahl kann dann durch den Katheter auf das Zielgewebe gerichtet werden und die Hitze kann unter Verwendung von direkter Bestrahlung abgegeben werden (zum Beispiel bei der Verwendung von Infrarotlicht). Obwohl die Bestrahlung durch Laser für die Erhitzung von tiefem Gewebe vorgeschlagen wurde, ist seine Verwendung in der Medizin durch die optische Absorbierung und die thermale Diffusion eingeschränkt.

**[0121]** In der bevorzugten Ausführungsform wird die lokale Erhitzung durch nicht invasive Mittel erreicht. [Abb. 1](#), entnommen von Ernst et al., PRINCIPLES OF NUCLEAR RADIATION IN ONE AND TWO DI-

MENSIONS, Oxford University Press, 1987, stellt die Abschwächung von elektromagnetischen und Ultraschallstrahlung dar. Zur Erhitzung des tiefer liegenden Gewebes wird in [Abb. 1](#) ein Transitionsgebiet verwendet (da sowohl die Absorbierung als auch die Penetration erforderlich ist). Der Röntgenbereich des Spektrums verwendet ionisierende Strahlung, die gefährlich ist. Der Strahlfrequenzbereich hat eine Wellenlänge von mehr als 10 cm. Die akustische Strahlung wird bei Wellenlängen unter 1 mm stark absorbiert. Da die Möglichkeit der Konzentration auf ungefähr die Hälfte der Wellenlänge eingeschränkt ist, kann ein Fokusbereich von 5 cm oder mehr durch die Strahlfrequenz erreicht werden. Dies ist im Allgemeinen nicht lokalisiert genug, um kleine Läsionen zu behandeln. Ultraschall kann mit einer ausreichend kurzen Wellenlänge zur Lokalisierung angewendet werden und kann tief penetrieren und wird zu einem gewissen Grad durch das Körpergewebe absorbiert. Deshalb konzentriert sich das bevorzugte Verfahren für die nicht invasive lokale Erhitzung auf den Ultraschall.

**[0122]** Es ist bekannt, dass man mit Ultraschall auf einen definierten Ziel-Bereich zielen kann und wenn Lebendgewebe über einen längeren Zeitraum mit Ultraschall bestrahlt wird, dass die Temperatur des betreffenden Gewebes ansteigen kann. Insbesondere ist der fokussierte Ultraschall bekannt, sehr effektiv für die Erhitzung von lokalem Gewebe zu sein, solange es einen akustischen Pfad von der Oberfläche zur Läsion gibt, der frei von Luft und Knochen ist. Lele, L. L. (1962) „A simple method for production of trackless focal lesions with focused ultrasound: physical factors“, J. Physiol 160: 494–512; Fry et al., (1978) "Tumor irradiation with intense ultrasound", Ultrasound Med. Biol. 4: 337–341. Unter Verwendung eines Arrays von Ultraschall-Transducer mit hoher Präzision bei der Hitzeabgabe, kann fokussierter Ultraschall mit hoher Intensität an einen definierten sehr kleinen Bereich von tiefem Gewebe abgegeben werden.

**[0123]** Der Fokus des Ultraschalls wird durch die Form des Transducer erreicht (sphärisch, parabolisch) und/oder durch die Kombination mehrerer verschiedener Transducer-Elemente und der Kombination ihrer Ultraschallwellen mit individuell angepassten Phasen um einen fokalen Punkt anzubieten. Die Prinzipien des Ultraschalls können zum Beispiel in Bushberg J. T. et al., THE ESSENTIAL PHYSICS OF MEDICAL IMAGING, Williams und Wilkins, Baltimore, 1994, Seiten 367–526, gefunden werden.

**[0124]** Im Allgemeinen haben veröffentlichte Studien entweder versucht, Ultraschall zu verwenden, um Gewebe absichtlich zu verbrennen oder um Gewebe abzubilden, ohne seine Temperatur bedeutend zu erhöhen. Siehe z. B. McAllister et al. (1994) Teratology 51: 191; Cline et al. (1992) „MR-guided focused ultrasound surgery“ J. Corp. Asst. Tomog. 16: 956–965.



Angles et al. (1991) Teratology 42: 285 berichtete, dass Ultraschall Hitzeschock-Gene beim Fehlen eines entdeckbaren Anstieges in der Temperatur aktivieren kann. Im US-Patent Nr. 5,447,858 wurde ein Sojabohnen-Hsp-Promotor mit einem heterologen Gen rekombiniert, in Pflanzenzellen eingeführt und der Hsp-Promotor wurde mittels der „Hitze des Tages“ aktiviert (Spalte 11, Zeilen 15–25) oder durch Inkubation bei zum Beispiel 42,5°C (Spalte 11, Zeile 37). Fokussierter Ultraschall mit einer hohen Intensität wurde verwendet, um Tumore in tierischen Modellen abzutragen (Lele (1962), J. Physiol. 160: 494–512; Fry et al. (1978), Ultrasound Med. Biol. 4:337–341) und stellt eine vorgeschlagene operative Technik zur Behandlung von Lebertumoren dar (ter Harr et al. (1991), Phys. Med. Biol. 36: 1495–1501; ter Harr et al. (1991), Min. Invas. Ther. 1: 13–19).

**[0125]** Im Gegensatz dazu geht die vorliegende Erfindung von einer absichtlichen Erhitzung des Gewebes innerhalb eines Zielvolumens aus, aber auf eine fein kontrollierte Weise innerhalb eines definierten Temperaturbereichs. In der Vergangenheit haben mehrere Faktoren die Verwendung von Ultraschall zur Erhitzung von Gewebe eingeschränkt: 1) die Unfähigkeit, den genauen Ort der Hitzeabgabe aufgrund der Interferenz von in der Nähe befindlicher Luft-/Wasser-, Wasser-/Knochen- und Fett-/Wasser-Grenzen genau festlegen zu können, 2) die Unfähigkeit, den Temperaturanstieg genau quantifizieren zu können, 3) die Unfähigkeit, gleichzeitig das Zielgewebe und das umgebende Gewebe zu visualisieren, um das Ausmaß und die Effekte der Ultraschallerhitzung zu überwachen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung einer Kombination aus fokussiertem Ultraschall und Kernspintomographie (MRI).

**[0126]** Cline et al. (1994) Magn. Reson. Med. 31: 628–636, Cline et al. (1995) J. Corp. Asst. Tom. 16: 956–965, De Poorter (1995) Magn. Reson. Med. 33: 74–81.

**[0127]** Es sollte angemerkt werden, dass der Hitzeschock-Promotor durch ein Phänomen aktiviert werden kann, bei dem es sich nicht um Ultraschall handelt, was zu einem Anstieg der Körpertemperatur führt (z. B. Fieber, heiße Duschen, Stress). Daher ist es angemessen, während der Dauer der Gentherapie diese Variablen strikt zu kontrollieren (die Temperatur des Patienten eng zu überwachen, heiße Duschen zu vermeiden, Stress verursachende Umgebungen zu vermeiden).

**[0128]** Zusätzlich kann die Hitze endogene Hitzeschockgene unter der Kontrolle des endogenen Hsp-Promotors aktivieren. Die Interaktion zwischen den Prozessen wird noch erforscht.

**[0129]** Ein Element des nicht invasiven Gebrauchs von fokussiertem Ultraschall ist dass man sicherstel-

len muss, dass 1) das erhitzte Gebiet mit dem Zielgewebe übereinstimmt, und 2) die Temperaturerhöhung mit der Zieltemperatur übereinstimmt. Das erste Problem erfordert eine anatomische Visualisierung und das zweite die Visualisierung der Temperaturverteilung.

**[0130]** Während Ultraschall im Prinzip für beide Zwecke eingesetzt werden kann, wird seine Präzision für diesen Zweck als nicht ausreichend erachtet.

**[0131]** Cline et al., (1992) J. Corp. Asst. Tomog. 16: 956–963, beschrieb die Kombination von Kernspintomographie (MRI) und fokussiertem Ultraschall, bei dem MRI verwendet wird, um den Ziel-Bereich zu visualisieren und zu kartieren und um die Temperaturverteilung zu visualisieren und zu kartieren. Die Prinzipien des MRI können zum Beispiel bei Stark D. D. und Bradley, W. G., MAGNETIC RESONANCE IMAGING, Mosby Year Book, 1992, Seiten 1–521 gefunden werden.

**[0132]** Die Abbildung der Temperatur kann bei einem MRI mithilfe der folgenden drei Möglichkeiten erfolgen: 1) Verwendung des Spin-Gitter (T1) Relaxationszeit in Abhängigkeit der Temperatur; 2) Verwendung der Diffusion-konstanten Abhängigkeit von Wasser bei der Temperatur; und 3) Verwendung der Larmor-Präzession Frequenzabhängigkeit der Wasserprotonen bei der Temperatur. Es wird mehr und mehr klar, dass das dritte Verfahren das bevorzugte Verfahren ist, da es ziemlich unabhängig von den meisten intra- und extrazellulären Prozessen ist und sehr schnell in einem Abbildungsverfahren gemessen werden kann.

**[0133]** Cline et al. (1994), „MR temperature mapping of focused ultrasound surgery“, Magn. Reson. Med. 31: 628–636; De Poorter et al. (1995), „Noninvasive MRI thermometry with the proton resonance frequency (PRF) method: In vivo results in human muscle“, Magn. Reson. Med. 33: 74–819; Hall et al. (1985), „Mapping of pH and temperature distribution using chemicalshift-resolved tomography“, J. Magn. Reson. 65: 501–505 (J. de Zwart et al. (1996), J. Magn. Reson. Series B, 112: 86–90 und der darin genannten Referenzen).

**[0134]** Die Protonresonanzfrequenz (PRF) hängt von der Temperatur ab. PRF-Informationen werden von den Phasenveränderungen in den Gradientenecho-Bildern erhalten. MRI-Thermometrie basierend auf PRF zeigt wenig Abhängigkeit, wenn überhaupt, von der intra- und extrazellulären Komposition. Die Abbildungsgeschwindigkeit ist aus zwei Gründen wichtig: Vermeiden von Bewegungsartefakten und Begrenzung der Effekte der Wärmeleitung bei der Quantifizierung der Temperaturerhöhung. Um die gesamte Abbildungszeit zu minimieren, sollte die Zeit zwischen aufeinander folgenden Reizungen (Wieder-

holungszeit, „TR“) kurz sein. Die Echozeit („TE“) sollte jedoch lang sein, um die Phasenakkumulation zu ermöglichen. Unter Verwendung dieser Technologie ist es möglich, 3D Bilder innerhalb von 5 Sekunden mit einer räumlichen Auflösung von ca. 3–4 mm und einer Temperaturgenauigkeit von ca. 2 Grad Celsius zu erhalten.

**[0135]** In der bevorzugten Ausführungsform wird ein MRI-geleiteter fokussierter Ultraschall verwendet, wie in Cline et al., (1995) *Magn. Reson. Imaging*, 194: 731–737 beschrieben. In zukünftigen Ausführungsformen, wird der durch Cline et al. beschriebene einzelne Ultraschall-Transducer unter mechanischer Kontrolle vorzugsweise durch ein Array an Transducer unter elektronischer Kontrolle ersetzt, um den Fokus elektronisch zu steuern, wie bei Fan, X. und Hynynen, (1995) *Med. Phys.* 22 (3): 297–306 beschrieben.

**[0136]** Die folgenden Beispiele werden einzig für den Zweck der Illustration angeboten.

**[0137]** Beispiel 1 beschreibt die Verwendung von fokussiertem Ultraschall, geleitet durch MRI, zur Erhitzung eines Bereichs eines transformierten Humantumors, unter Vorauswahl von dreidimensionalen Koordinaten, wobei die Erhitzung ein gentechnisch verändertes therapeutisches Gen aktiviert, das sich unter der Kontrolle eines Hsp70-Hitzeschock-Promotors befindet.

**[0138]** Vektoren, die vom Adenovirus-Serotyp 5 abgeleitet sind, werden in diesem Beispiel verwendet. S. L. Brody und R. G. Crystal (1994), „Adenovirus-Mediated In Vivo Gene Transfer“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716: 90–101. Der E1A und E1b-Bereich werden optional gelöscht, um eine Replikation zu verhindern (siehe [Abb. 2](#)). Der E3-Bereich kann auch optional gelöscht werden, um einen 7,5 kb Bereich für die exogene DNA zu schaffen.

**[0139]** Der humane Hsp-70B Promotor wird verwendet, da er ausschließlich hitzereguliert ist und die Expression bei Induktion mehrere Tausend Mal fördern kann (M. Dreano et al. 1986), „High level heat-regulated synthesis of Proteins in eukaryotic cells“, *Gene* 49: 1). Die Sequenz des humanen Hsp-70 Promotors wird in [Abb. 3C](#) vorgegeben, zusammen mit seinen Nachbildungen von *Drosophila* und Änderungen in der Aktivität des Promotors unter Verwendung von Insertionen. Voelmy (1994), *Crit. Rev. Euk. Gene Expr.* 4: 1357. HSEII und HSEI beziehen sich jeweils auf die allgemeinen Hitzeschockelemente II und I. Die Insertionen können die Wirksamkeit des Promotors verändern (R. Voellmy et al. (1994), „Transduction of the stress signal and mechanisms of transcriptional regulation of heat shock/stress Protein gene expression in higher eukaryotes“, *Crit. Rev. in Eukar. Gene Expr.* 4: 357–401). Es sollte hier angemerkt

werden, dass Hsp-70B nicht durch Adenovirus-Genprodukte aktiviert wird (M. C. Simon et al. (1987), „Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A Products, including the 13S E1A product“, *Mol. Cell Biol.* 7: 2884.

**[0140]** Der Vektor wird konstruiert, indem eine Kasette in den Vektor eingefügt wird, der das humane Interleukin-2 enthält, wie in Addison et al. (1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8522–6 beschrieben (andere Lymphokine, wie IL-1, IL-4, Tumor-Nekrosefaktoren usw. können verwendet werden; siehe z. B. US Patentnummer 4,992,367 und Furitani et al. (1986), *Nuc. Acids Res.* 14: 3167–79), außer dass das Gen sich unter der Kontrolle des humanen Hsp70-Promotors statt der E1 oder E2 Position des Adenovirus Typ 5 Chromosomensatz befinden wird. Das *E. coli* LacZ Gen ist optional im Vektor als ein Reporter gen beinhaltet. Sein Produkt,  $\beta$ -Galaktosidase, kann leicht durch sein spezifisches Substrat entdeckt und quantifiziert werden. Eine SV40 Polyadenylation wird optional zusammen mit einer inversen terminalen Repetition (ITR) als ein Enkapsidationssignal und Enhancer verwendet (siehe [Abb. 1](#)).

**[0141]** Die Konstruktion des Vektors wird unter Verwendung eines Plasmids erreicht, das die Kasette und den Adenovirus Typ 5 Sequenz enthält, der für die homologene Rekombination mit der E1- oder E3-Adenovirus genomischen DNA verwendet wird.

**[0142]** Das modifizierte Adenovirus wird in 293 Zellen gezüchtet, eine transformierte humane embryonische Nierenzelllinie, die E1 Proteine exprimiert, vorausgesetzt (im Fall eines Replikationsdefizienten Adenovirus) E1 Funktionen erlauben die Produktion des Virus. Virale Vektoren werden in Titern von bis zu  $10^{12}$  plattenformenden Einheiten pro mL produziert.

**[0143]** Der Vektor wird systematisch an einen Patienten verabreicht, der mit einem Brust-Adenokarzinom diagnostiziert wurde. Vorzugsweise werden 1  $\mu$ g bis 100  $\mu$ g Vektor DNA in 0,1–2 ml saliner Lösung direkt in den Tumor injiziert.

**[0144]** Alternativ können ca. 10  $\mu$ g bis 1 mg Vektor DNA intravenös in 1–5 ml einer salinen Lösung injiziert werden.

**[0145]** Die Präsenz und/oder der Vektor wird durch den Erhalt einer Biopsie des kanzerösen Gewebes bestimmt und durch die Demonstration der Präsenz der Gene oder Genprodukte durch gut bekannte Northern, Southern oder Western Blotting-Techniken oder durch das Entdecken der Aktivität des optionalen Reporter-LacZ-Gens.

**[0146]** Ein Patient wird auf ein spezielles Bett gelegt (z. B. General Electric Co., Milwaukee, WI, wie in Cline et al. 1994 und 1995, supra) beschrieben und wird

in den Magneten eines Kernspintomographie-Instruments (MRI) geschoben (z. B. 1,5T MR Imaging System von Signa, GE Medical Systems, Milwaukee, WI). Das Mm-Instrument ist mit einem fokussierten Ultraschall-(FUS)Gerät ausgestattet (Specialty Engineering Associates, Milpitas, CA), das computergesteuert ist. Insbesondere kann das FUS-Gerät im Bett des MRI so integriert werden, dass der Transducer frei unter dem Patienten mit Bewegungsfreiheit in den drei Hauptrichtungen bewegt werden kann, damit der Fokus überall am menschlichen Körper platziert werden kann. Alternativ kann der Fokus elektronisch angepasst werden, indem ein komplizierterer FUS-Transducer verwendet wird, ein so genannter schrittweiser Array FUS-Transducer. Es kann sich in der Tat um mehrere Transducer handeln, die individuell auf elektronische Weise gesteuert werden können und somit die Bewegung des Fokus ermöglichen. Der akustische Kontakt zwischen dem Fokus und dem FUS-Transducer wird unter Verwendung des entsprechenden Wassers, Gels oder eines anderen Mittels sichergestellt, das einen ununterbrochenen akustischen Pfad vom Transducer zum Fokus gewährleistet. Eine Sparc 10 (Sun Microsystems, Mountain View, CA) Arbeitsstation, die an die Motorsteuerung angekoppelt ist, der FUS-Pulsgenerator und das MRI-Abbildungssystem wird zur Programmierung, Planung, Überwachung und zur Kontrolle der Therapie verwendet. Cline et al., supra, und Zwart et al., supra.

**[0147]** Der Ziel-Bereich wird durch sanfte Haltebänder zum Bett immobilisiert. (Hinweis: Je schneller das Verfahren, desto weniger besteht Bedarf für Immobilisierung; bei sehr beschleunigten Verfahren ist die Immobilisierung nicht notwendig.) Hochdetaillierte MRI-Bilder werden mit einem geeigneten Kontrast erhalten, um genauestens die Computerkoordinaten des Ziels zu ermitteln (z. B. Tumor oder ischämisches Gebiet), gemäß den Standard-MRI-Verfahren. Basierend auf i) Koordinaten des Ziels, ii) Schätzungen der Ultraschallabschwächung, iii) akustische Impedanzwechsel in den Ultraschallwegen, stehen der Fokus, die Stärke und der Bestrahlungszeit des FUS-Geräts im Mittelpunkt, um eine Erhöhung der Temperatur von drei Grad Celsius in ca. 10 Sekunden beim Ziel zu bewirken.

**[0148]** Das FUS-Gerät wird für 10 Sekunden angeschaltet. Unmittelbar nach der FUS-Bestrahlung wird ein schnelles MRI-Temperaturbild aufgenommen, gemäß den Verfahren, die in J. de Zwart et al. (1996), J. Magn. Reson. Serie B, 112: 86–90 umrissen werden und auf die darin Bezug genommen wird).

**[0149]** Zu den folgenden Kriterien wird eine Bewertung vorgenommen: i) Stimmt der erhitzte Punkt mit dem Ziel überein (Vergleich des anatomischen MRI mit dem Temperatur-MRI), und ii) Beträgt die Temperaturerhöhung in der Tat 3 Grad Celsius (Für die

Quantifizierung der Temperatur siehe J. de Zwart et al. Unter 5)? Wenn nicht, wird das FUS-Ziel im ersten Fall verschoben und im zweiten Fall wird die Stärke angepasst. Die Versuchserhitzung wird wiederholt, bis die Position und die Stärke mit dem Ziel übereinstimmen. Hinweis: Da die Aktivität des Hsp-70B Promotors linear proportional mit der Dauer ist, wird die Gen-Expression in diesem Anpassungsverfahren aufgrund der kurzen Dauer eingeschränkt.

**[0150]** Nachdem die Stärke und der Fokus angepasst wurden, wird die therapeutische Ultraschalldosis geliefert. Beim Hsp-70B Promotor resultiert eine Erhöhung von 3 Grad für 15 Minuten zu einem Anstieg zu einer sehr großen Expression des Gens unter Hsp-70B Kontrolle. Deshalb beträgt die anfängliche Bestrahlung 15 Minuten. Sie kann nach dem Ermessen des bewohnenden Arztes unter Beachtung der Schwere des behandelten Zustands, dem Patientenzustand (Alter, Gesundheit) und die Größe und Lage des Ziel-Bereiches erhöht und vermindert werden.

**[0151]** Der Patient wird dann vom MRI entfernt.

**[0152]** Die Bewertung der Therapie erfolgt durch eine klinische Untersuchung und einem regulären Nachfassen durch ein detailliertes anatomisches MRI, um die Tumorverkleinerung zu bewerten.

**[0153]** Das Beispiel 2 wird unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren ausgeführt, außer dass das Gen für den vaskulären Endothelialwachstumsfaktor (VEGF) in Gewebezellen übertragen wird, die an ischämischen Schäden leiden. Der Adenoviral-Vektor, der das VEGF-Gen enthält, wird direkt in die Umgebung des beeinträchtigten Gewebes injiziert oder in Blutgefäße, die direkt das betroffene Gebiet versorgen. Die Gen-Expression wird wie oben beschrieben induziert und überwacht. Die Bewertung der Therapie erfolgt durch eine klinische Untersuchung und einem regulären Nachfassen durch ein detailliertes anatomisches MRI, um die Heilung des ischämischen Gewebes zu bewerten.

**[0154]** Beispiel 3 beschreibt die Verwendung des fokussierten Ultraschalls (FUS) geführt durch das MRI zur Erhitzung eines vorbestimmten Bereiches des Oberschenkelmuskels und Aktivierung des endogenen Hitzeschockgens in einem Rattenmodell.

**[0155]** Harlan Sprague-Dawley Ratten (n = 6) mit einer Masse von  $428 \pm 48$  g wurden nach einem genehmigten Tierprotokoll des Nationalen Gesundheitsinstituts studiert. Die relativ große Größe der Ratte stellt sicher, dass der Ultraschall tief innerhalb des Bizeps-Femoris-Muskels im rechten hinteren Beins der Ratte fokussiert.

**[0156]** Es wurde ein Polykarbonat Rattenhalter kon-

struiert, der sowohl den FUS-Transducer als auch eine MRI-Oberflächenmagnetspule enthielt. Der Halter wurde in einer Fiberglasröhre platziert, die zum Teil mit Wasser gefüllt war. Der Ultraschall passiert durch eine 38 mm Öffnung in der Plattform, auf der das Tier steht.

**[0157]** Der Halter war schräg um sicherzustellen, dass sich das hintere Bein der Ratte unter Wasser befand, während sein Kopf in einem sicheren Grad über Wasser gehalten werden konnte. Das Bein wurde durch vier 2-0 umflochtene Polyesterfaser-Nähte unterstützt, die ein Raster entlang der Öffnung bildeten. Der FUS-Transducer wurde so positioniert, dass der Fokus 5 mm in den Oberschenkel der Ratte betrug.

**[0158]** Frühere Tests mit Hochintensitäts-FUS, die an Ratten und frischen Hühnchenbeinen ausgeführt wurden, zeigten, dass ein Fokus zu nahe zur Haut zu Verbrennungen der Haut führen kann. Die Ratte wurde mit einer intraperitonealen Verabreichung von Ketamin und Xylazin anästhesiert. Drei weitere Schritte wurden unternommen, um die Reflektion und die Unterbrechung des Ultraschalls, verursacht durch akustischen Impedanzversatz an der Schnittstelle zu minimieren. Erstens wurde das rechte Bein vorn und hinten mit elektrischen Scheren rasiert. Das Rasieren half ferner auch potenzielle Quellen der RNA-Degradierung beim Sammeln des Gewebes zu reduzieren. Die Haut wurde dann mit Alkoholtupfern gereinigt und mit einem Tensid befeuchtet, um die Retention von Luftmikrobläschen entlang der Haut zu reduzieren. Nachdem schließlich die Ratte in Wasser getaucht wurde, wurden große Luftblasen, die unter dem Bein eingeschlossen waren, freigegeben. Die Ratte wurde sicher auf seiner rechten Seite auf der Plattform positioniert und es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass der Fokussierbereich des Ultraschalls nicht zu nahe an den Knochen in den Beinen lag. Die Respiration wurde überwacht, um einen entsprechenden Grad der Narkose beizubehalten. Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem Paar Faseroptiktemperatursonden gemessen (Luxtron Fluoroptic Model SMM, Santa Clara, CA). Ein weiteres Sondenpaar überwachte die Temperatur des Wasserbads. Die Badtemperatur wurde durch den Wärmeaustausch mit einem Umlaufwasserheizer gesteuert. Die rektale Zieltemperatur betrug 37 bis 38°C. Deionisiertes Wasser wurde für das Bad verwendet, da es frei von Mikrobläschen war, die den Ultraschall beeinträchtigen können.

**[0159]** Die direkte Übertragung des Ultraschalls durch das Wasser zum Bein wurde effektiver erachtet als andere Verfahren, die eine Kombination aus Ultraschall-Gel und Wasser beinhalteten, die sich in einem Ballon oder in einem Kondom befand. Der FUS-Transducer (Specialty Engineering Associates, Soquel, CA) war 38 mm lang im Durchmesser mit ei-

nem Kurvenradius und nominaler Fokallänge von 25 mm. Seine Resonanzfrequenz betrug 1,459 MHz. Der prognostizierte Fokussierbereich, basierend auf der Geometrie und definiert als ein Gebiet mit voller Breite und halber maximaler Intensität (Barober JC, Tristam M., „Diagnostic Ultrasound“, in: Webb S, ed THE PHYSICS OF MEDICAL IMAGING, Bristol: Adam Nilger, 1988; 328–334) war ein Ellipsoid mit einer Hauptachse von 6 mm orientierend entlang der Transducer-Achse und eine kleinere Achse von 1 mm. Die rf-Oberfläche der Magnetspule wurde mit Epoxid in einem 58 mm Durchmesser des Kanalschnitts in der Plattform um die FUS-Öffnung versehen. Abstimmende und übereinstimmende Kondensatoren wurden außerhalb des Wassers über der Ratte angebracht.

**[0160]** Experimente wurde an einem 4,7 t Magnet, gesteuert mit einer Inova-Konsole (Varian NMR Instruments, Palo Alto, CA) ausgeführt. Die Kartierung der MRI-Temperatur erfolgte unter Verwendung einer rf-gespoilter Gradientenecho-Abbildung (de Poorter et al. (1995), „Noninvasive MRI thermometry with the proton resonance frequency (PRF) method: in vivo results in human muscle“, Magn. Reson. Med. 33: 74–81 (1996); de Zwart et al., „Fast magnetic-resonance temperature imaging“. J. Magn. Reson. B 112: 86–90). Die Gradientenechodaten ermöglichten, Karten der Phasenunterschiede zu rekonstruieren. Der Hydrogenkern demonstriert in Wasser eine Temperatur, die von der chemischen Veränderung abhängt, die es erlaubt, Temperaturveränderungen von diesen Phasendifferenzen zu berechnen. Echo- und Wiederholungszeiten betrugen jeweils 12 und 75 ms.

**[0161]** Fünf Scheiben mit einer Dicke von 2 mm und einem Abstand von 3,5 mm wurden hintereinander auf ununterbrochene Weise erhalten. Diese waren anfänglich um den nominalen Fokuspunkt zentriert. 128 × 128 Karten wurden für das 10 × 10 cm<sup>2</sup> große Sichtfenster berechnet. Die Temperaturauflösung betrug ca. 0,15°C.

**[0162]** Ein ursprüngliches „kaltes“ Referenzbild wurde abgerufen, nachdem die Ratte entsprechend im Magnet positioniert und seine Temperatur im Ziel-Bereich stabilisiert wurde. Dieses Bild wurde verwendet, um die Temperaturveränderungen in den nachfolgenden Karten zu berechnen. Dann wurde der Ultraschall auf einer niedrigen Stufe angeschaltet (~1 W elektrisch), lang genug, um ein Set von fünf Scheiben zu erhalten. Die Daten wurden zu einer Sun-Arbeitsstation exportiert, wo der benutzergeschriebene IDL-Code zur Konstruktion von Temperaturkarten verwendet wurde (siehe auch Referenz 7). Durch diese Karten wurde der Fokussierbereich identifiziert. Bei Bedarf wurden Anpassungen an den Orten der Scheiben vorgenommen, um den Fokus in die Mitte der Scheibe zu zentrieren. Die Erhitzung des Beinmuskels durch fortlaufende FUS erfolgte dann für 45

Minuten. Karten mit Temperatur in Echtzeit wurden verwendet, um den Fokussierbereich mit 8°C in ihrem Zentrum erhöht zu halten, mit einem ca. 5°C Anstieg am Rand des Bereichs. Somit wurde der Fokussierbereich auf 42–45°C erhitzt. Die Expression des Hsp70-Gen wurde für weitere 45 Minuten nach dem Erhitzungszeitraum fortgesetzt, während das MRI die Beintemperatur überwachte. Während des Experiments wurde die Temperatur des Hauptkörpers der Ratte, wie durch die rektalen Sonden gemessen, innerhalb von einem Grad im Ziel-Bereich beibehalten und die Respiration wurde überwacht, um eine angemessene Betäubung sicherzustellen.

**[0163]** Die Ratte wurde mit Pentobarbital eingeschläfert und der rechte Beinmuskel wurde mit Hilfe einer Gefrierklemme, gekühlt in flüssigem Stickstoff (–196°C) gefroren. Die gefrorene Probe wurde in einem sterilen Probenbehälter, der in flüssigem Stickstoff eingetaucht war, zu einem Labor transportiert, wo die Gewebeproben für die Analyse präpariert wurden. Die Proben wurden von einem drei Mal drei Raster entnommen, das auf der nominalen Achse des FUS-Strahls zentriert wurde. Die Probe aus dem Zentrum wurde in der Tiefe dreimal unterteilt, womit insgesamt elf Proben erhalten wurden. Die Größe jeder Muskelprobe betrug ungefähr 4 mm × 4 mm × 2 mm.

**[0164]** Die Proben blieben eingefroren, bis sie in Eppendorf-Röhrchen platziert wurden, die 0,5 ml einer Trizol-Lösung enthielten (Life Technologies, Gaithersburg, MD) und homogenisiert wurden. Die Lösung und das homogenisierte Gewebe wurden dann bei –80°C aufbewahrt, bis RNA extrahiert wurde. Die RNA (30 µg Probe pro Spur) wurde durch Gel-Elektrophorese separiert und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Integrität der mRNA wurde durch Visualisierung der Ethidiumbromid gefärbten RNA nach der Übertragung bewertet. Die Membranen wurden mit einer <sup>32</sup>P-gekennzeichneten cDNA hybridisiert, die die induzierbare Hsp70-mRNA ergänzt. Es wurden Autoradiografen geschaffen und für die Menge induzierbarem Hsp70 in jeder Probe analysiert.

**[0165]** Ein Intensitätsbild der Scheibe, die den Fokussierbereich beinhaltet, wird in [Abb. 5\(a\)](#) gezeigt. [Abb. 5\(b\)](#) zeigt die Temperaturänderung in derselben Scheibe des Rattenbeines nach einer Minute Erhitzung auf. Das Sichtfenster ist identisch mit der [Abb. 5\(a\)](#), aber die Temperaturen wurden in nur einem kleineren Interessengebiet berechnet. Ferner wurden die Pixel, die unter einem Intensitätsschwellwert fallen aufgrund eines schlechten Signal-Störverhältnisses nicht berechnet und erscheinen in schwarz. Da etwas Diffusion der Hitze in das umgebende Gewebe stattfand, dient [Abb. 5\(c\)](#) als ein guter Indikator der Größe des Fokussierbereichs. Die [Abb. 5\(c\)](#) stellt eine Temperaturkarte dar, die nach

nur drei Minuten Erhitzung erhalten wurde. Die thermale Diffusion ist offensichtlich und nachfolgende Daten zeigen, dass ein ungefährender stetiger Zustand erreicht wurde.

**[0166]** Die [Abb. 6](#) zeigt den Northern Blot der gesamten RNA, angefertigt vom Oberschenkelmuskel der Ratte nach der Bestrahlung durch das MRI-geleitete FUS, das mit einer randomisierten präparierten gekennzeichneten humanen Hsp70 stressinduzierbaren Gensonde reagierte. Die Sonde hybridisiert stark in Spur 5 bei einer Position von ca. 2,3 kb (Pfeil), wie bei einem 70.000 Daltonprotein zu erwarten. Die RNA, die in die Spuren 8 und 11 geladen wurde, war etwas abgeschwächt. Messungen zeigen, dass die differentielle Expression des hitzeinduzierbaren Hsp70 im Fokussierbereich von den Faktoren 3 bis 67 reicht.

**[0167]** Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine fortlaufende FUS auf niedrigem Niveau verwendet werden kann, um die Expression der endogenen Hsp70 mRNA In-vivo zu erhöhen und dass der Hsp70-Promotor ein geeignetes Ziel zur Verwendung bei der Kontrolle der Genexpression basierend auf lokaler Hitze ist. Die Ergebnisse zeigen auch, dass das MRI interaktive Temperaturkarten für die Überwachung der lokalen Erhitzung von In-vivo-Gewebe durch FUS bereitstellen kann. Die Integration von dreidimensionalen schnellen Abbildungsverfahren, wie PRESTO, sollte schnellere Temperaturkarten ermöglichen.

**[0168]** Beispiel 4 beschreibt den Gebrauch von fokussiertem Ultraschall (FUS), geführt durch MRI zur Erhitzung eines vorbestimmten Gebiets im Oberschenkelmuskel und zur Aktivierung von endogenen Hitzeschockgenen in einer Maus, dessen Muskelgewebe mit einem Adenoviral-Vektor transformiert wurde.

**[0169]** Eine transgenische Maus, die ein gentechnisch verändertes LacZ-Gen unter Kontrolle des Hsp70-Promotors enthält (Für Verfahren zur Herstellung von transgenischen Mäusen sehen Sie bitte z. B. Charron et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 30604–10; für Adenoviral-Vektoren die bei der Transformation von Zellen nützlich sind, sehen Sie z. B. Addison et al. (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 92: 8522–6 und Wang et al. (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 93: 3932–6), wird wie im Beispiel 3 beschrieben behandelt (d. h., Bereiche des Oberschenkelmuskels verfügen über vorausgewählte Koordinaten, die unter Verwendung des FZS-MRI erhitzt werden). Eine signifikante Erhöhung der gewünschten Gen-Transkripte im FUS fokalen Punkt wird beobachtet.

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines gentechnisch veränderten Konstrukts in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Säugetierkrankheit, wobei das gentechnisch veränderte Konstrukt einen Expressionsvektor mit einem humanen hsp70B-Promotor umfasst, der in Wirkverbindung mit einem therapeutischen Gen zur Kontrolle des letzteren steht, wobei das therapeutische Gen bei normalen physiologischen Temperaturen in den durch das Konstrukt transformierten Zellen minimal oder überhaupt nicht exprimiert wird, wobei das Medikament mittels der Einführung gentechnisch veränderter Konstrukte in Zellen im Säugetier durch In-vitro- oder In-vivo-Gen-transfer verabreicht wird und wobei die Verabreichung des Medikaments durch die Einführung einer lokalisierten Expression des therapeutischen Gens in Zellen eines Ziel-Bereichs, die durch das therapeutische Konstrukt transformiert wurden, gekennzeichnet ist, wobei die Expression des therapeutischen Gens aus der kontrollierbaren Steigerung der Temperatur dieses Ziel-Bereichs mittels Anwendung von fokussiertem Ultraschall auf eine nicht-letale, supra-physiologische Temperatur und damit einer Aktivierung des humanen hsp70B-Promotors in den transformierten Zellen des Ziel-Bereichs resultiert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Säugetierkrankheit ein Krebs oder ein Tumor ist und wobei das therapeutische Gen ein Tumorsuppressorgen ist.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der Krebs ein Gliom, ein Prostata-, Eierstock- oder Brustkrebs sein kann.

4. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Tumorsuppressorgen p53 ist.

5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Säugetierkrankheit eine lokalisierte Blutstörung ist und wobei das therapeutische Gen ein Angiogenfaktor ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das therapeutische Gen einen vaskulären Endothelwachstumsfaktor (VEGF), einen Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) oder einen aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF) codiert.

7. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Säugetierkrankheit in einem tiefen Gewebe des Säugetiers lokalisiert ist.

8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Säugetierkrankheit eine genetische Erkrankung ist und wobei das therapeutische Gen eine funktionale Kopie eines defekten Gens, das die genetische Erkrankung auslöst, codiert.

9. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das therapeutische Gen ein Antisense-Molekül codiert und wobei das Säugetier mit einem pathogenen Mikroorganismus infiziert oder dem Risiko einer solchen Infektion ausgesetzt ist.

10. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Expression des therapeutischen Gens mindestens fünf Mal, vorzugsweise 10 Mal und meistbevorzugt 100 Mal dem Expressionsgrad bei physiologischen Temperaturen entspricht.

11. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Anstieg der Temperatur von der physiologischen auf die supraphysiologische Temperatur des Ziel-Bereichs vorzugsweise 3°C beträgt.

12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das zu behandelnde Säugetier ein Mensch ist.

13. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das zu behandelnde Säugetier ein Mensch ist und einen Befund hat, der aus der Gruppe bestehend aus Zystische Fibrose, Sichelzellenanämie,  $\beta$ -Thalassämie, Phenylketonurie, Galaktosämie, Wilson'sche Krankheit, Hämochromatose, schwere kombinierte Immundefekterkrankung, Alpha-1-Antitrypsinmangel, Albinismus, Alkaptonurie, lysosomale Speicherkrankheit, Ehlers-Danlos-Syndrom, Hämophilie, Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase-Mangel, Agammaglobulinämie, Diabetes insipidus, Lesch-Nyhan-Syndrom, Muskeldystrophie, Wiskott-Aldrich-Syndrom und Fabry'sche Krankheit ausgewählt ist.

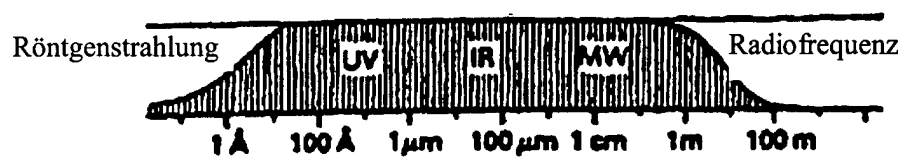
14. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Medikament für eine parenterale, subkutane oder intramuskuläre Verabreichung formuliert ist.

15. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die In-vivo-Verabreichung eine Verabreichung mittels Direktinjektion am Ort der Krankheit, eine topische Applikation, ein offenes Applikationsverfahren, ein geschlossenes Applikationsverfahren oder eine Aerosol-Inhalation ist.

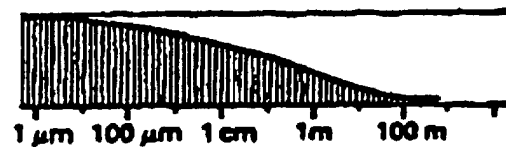
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

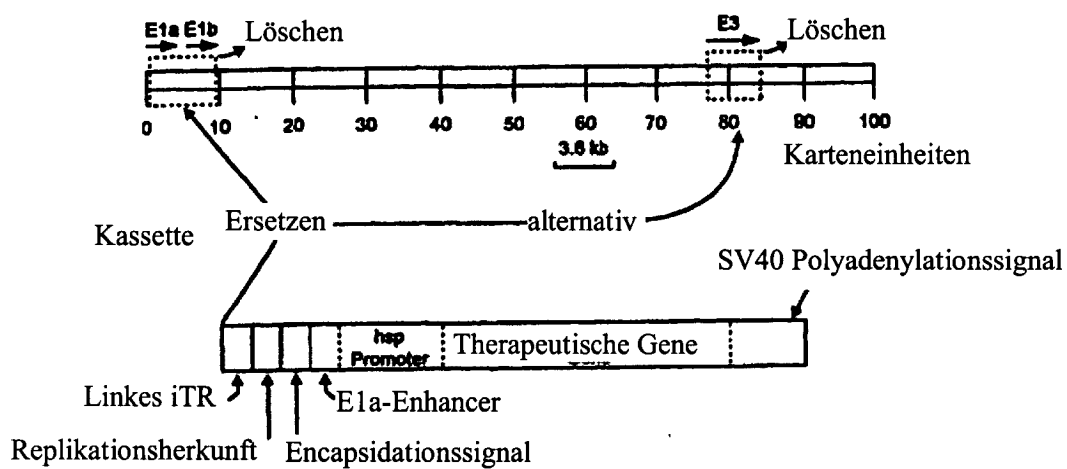
Elektromagnetische Strahlung



Ultraschall

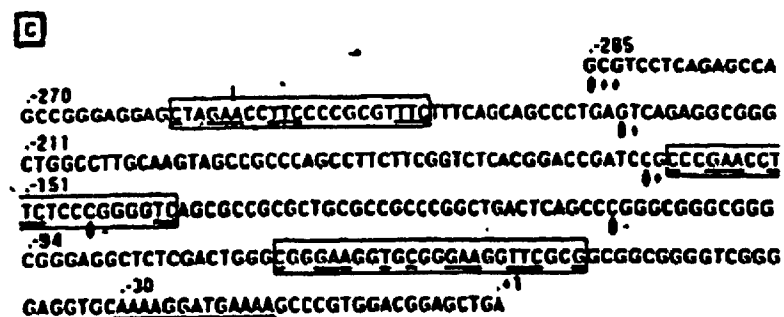
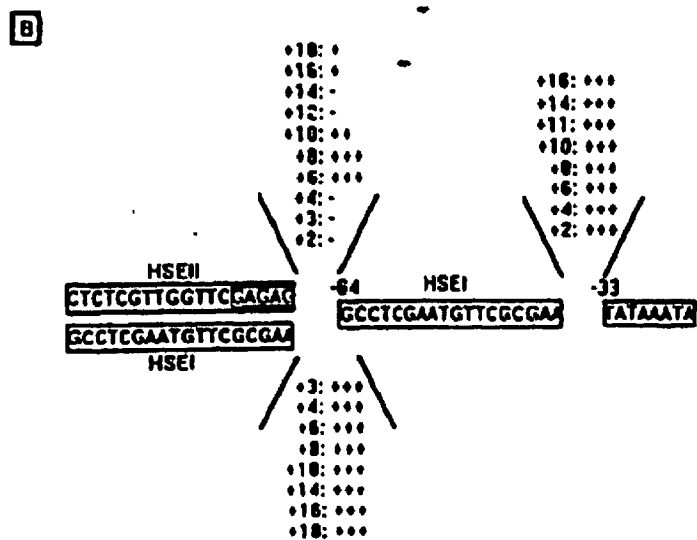
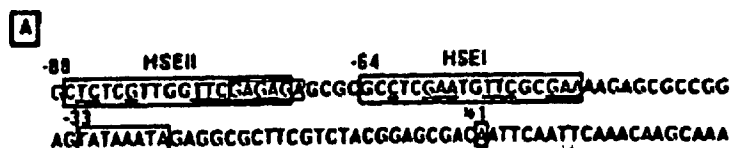


## Adenovirus Typ 5



**ABBILDUNG 2.** Allgemeiner Konstrukt eines Prototyps mit rekombinanter Replikation und defizienten Adenovirus-Vektor. Die genomische DNA des Typ 5 Adenovirus wird durch das Löschen der E1- und E3-Bereiche präpariert. Eine Expressionskassette, die wichtige *cis*-agierende virale Elemente am linken Ende enthält, ein Promotor, und das exogene Gen, das übertragen werden soll sowie Poly-A Signale werden auf der E1-Position oder dem E3-Bereich eingefügt (ITR, inverse terminale Repetition; SV40, Simian-Virus 40). Das rekombinante Adenovirus-Genom ist in 293 Zellen verpackt, embryonische humane Nierenzellen, die Adenovirus E1-Genprodukte *In-trans* an das E1-defiziente Genom bereitstellen.





LOCUS HUMHSP70C 197 bp DNA PRI 1. SEP 1988  
 DEFINITION Humanes 70k Dalton Hitzeschock-Protein-Promotor  
 AKZESSION M12690  
 NID g184415  
 SCHLAGWÖRTER Hitze Schock Protein  
 QUELLE Homo sapiens DNA.  
 ORGANISMUS Homo sapiens  
 Eukarya; mitochondriale Eukaryoten; Metazoa; Chordata; Vertebrata;  
 Eutheria; Primaten; Catarrhini; Hominidae; Homo.  
 REFERENZ 1 (Base 1 bis 197)  
 AUTOREN Wu, B.J., Kingston, R.E. und Morimoto, R.I.  
 TITEL Humaner HSP70-Promotor enthält mindestens zwei unterschiedliche  
 regulative Domänen  
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 629-633 (1986)  
 MEDLINE 86120994  
 MERKMALE Lage/Qualifikanten  
 Quelle 1. . 197  
 /Organismus = „Homo sapiens“  
 BASISZAHL 44 a 48 c 73 g 32 t  
 HERKUNFT

```

1  gaagagtcctg gagagttctg agcagggggc ggcactcttg cctctatttg tccaggaagg
61  ctggggggca ggacgggagg ccaaaccctt ggaatattcc cgacctggca gcctcatcga
121 ggctcgggtg ttggctcaga agggaaaagg cgggtctccg tgacgactta taaaacgcca
181 ggggcaacgg gtccgga

```

Figure 6



a



b



c

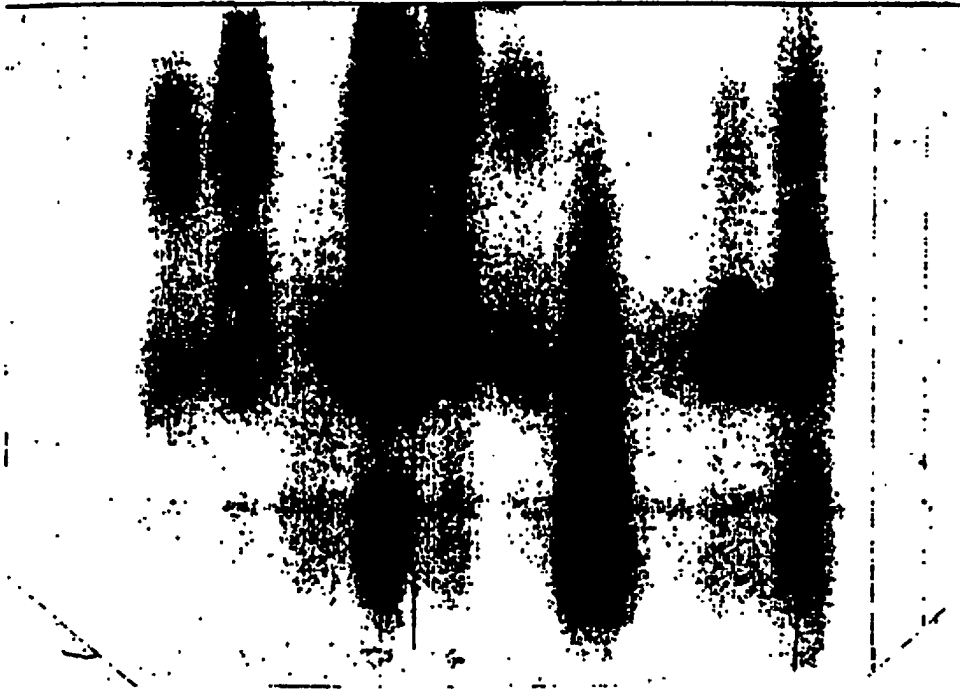


Fig. 6