

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

12. Februar 2015 (12.02.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2015/018860 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/066892

(22) Internationales Anmeldedatum:

6. August 2014 (06.08.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

DE 10 2013 215 817.3

9. August 2013 (09.08.2013)

DE

(71) Anmelder: UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-  
EPPENDORF [DE/DE]; Martinstr. 52, 20246 Hamburg  
(DE).

(72) Erfinder: TREPEL, Martin; Rungholt 29, 22149  
Hamburg (DE). KOERBELIN, Jakob; Duschweg 16,  
22769 Hamburg (DE). MICHELFELDER, Stefan;  
Vaubanalallee 10, 79100 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: UEXKÜLL & STOLBERG; Beselerstr. 4,  
22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,  
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,  
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,  
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,  
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

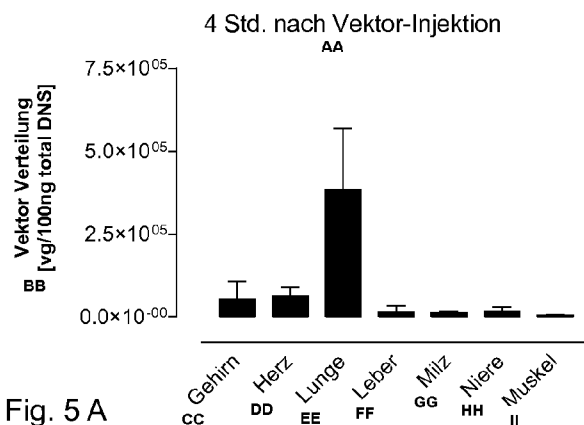
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz  
3)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NEW PEPTIDES HAVING SPECIFICITY FOR THE LUNGS

(54) Bezeichnung : NEUE PEPTIDE MIT SPEZIFITÄT FÜR DIE LUNGE



AA 4 heures après injection du vecteur  
BB Distribution du vecteur (vg/100ng total ADN)  
CC Cerveau  
DD Cœur  
EE Poumon  
FF Foie  
GG Rate  
HH Rein  
II Muscle

(57) Abstract: The invention relates to a peptide, polypeptide, or protein that binds specifically to cells of the lung endothelium. The peptide, polypeptide, or protein can be a component of a viral capsid and can be used to lead a recombinant viral vector selectively to the lung endothelial tissue after systemic administration to a subject and to ensure tissue-specific expression of one or more transgenes there. The invention thus further relates to a recombinant viral vector, preferably an AAV vector, which comprises a capsid containing the peptide, polypeptide, or protein according to the invention and which comprises at least one transgene packaged in the capsid. The viral vector is suitable in particular for the therapeutic treatment of a lung disorder or a lung disease. The invention further relates to cells and pharmaceutical compositions that comprise the viral vector according to the invention.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Peptid, Polypeptid oder Protein, das spezifisch an Zellen des Lungenendothels bindet. Das Peptid, Polypeptid oder Protein kann Bestandteil eines viralen Kapsids sein und dazu verwendet werden, einen rekombinanten viralen Vektor nach systemischer Verabreichung an ein Subjekt selektiv zum Lungenendothelgewebe zu leiten und dort für eine gewebespezifische Expression von einem oder mehreren Transgenen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



---

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5  
Absatz 2 Buchstabe a)

---

zu sorgen. Die Erfindung betrifft somit auch einen rekombinanten viralen Vektor, vorzugsweise einen AAV-Vektor, der ein Kapsid umfasst, welches das erfindungsgemäße Peptid, Polypeptid oder Protein enthält, sowie mindestens ein in dem Kapsid verpacktes Transgen. Der virale Vektor eignet sich insbesondere zur therapeutischen Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Lungenerkrankung. Die Erfindung betrifft ferner Zellen und pharmazeutische Zusammensetzungen, die den erfindungsgemäßen viralen Vektor umfassen.

- 1 -

### NEUE PEPTIDE MIT SPEZIFITÄT FÜR DIE LUNGE

Die Erfindung betrifft ein Peptid, Polypeptid oder Protein, das spezifisch an Zellen des Lungenendothels bindet. Das Peptid, Polypeptid oder Protein kann Bestandteil eines viralen Kapsids sein und dazu verwendet werden, einen rekombinanten viralen Vektor nach systemischer Verabreichung an ein Subjekt selektiv zum Lungenendothelgewebe zu leiten und dort für eine gewebespezifische Expression von einem oder mehreren Transgenen zu sorgen. Die Erfindung betrifft somit auch einen rekombinanten viralen Vektor, vorzugsweise einen AAV-Vektor, der ein Kapsid umfasst, welches das erfindungsgemäße Peptid, Polypeptid oder Protein enthält, sowie mindestens ein in dem Kapsid verpacktes Transgen. Der virale Vektor eignet sich insbesondere zur therapeutischen Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Lungenerkrankung. Die Erfindung betrifft ferner Zellen und pharmazeutische Zusammensetzungen, die den erfindungsgemäßen viralen Vektor umfassen.

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Die pulmonale Hypertonie ist eine schwere chronische Erkrankung der Lunge, die unbehandelt regelmäßig zum Tode führt. Der Begriff fasst Krankheiten verschiedener Ursachen zusammen, die durch eine strukturelle Veränderung der pulmonalen Vaskulatur charakterisiert sind und bei denen es zu einem Anstieg des Blutdrucks im pulmonal-arteriellen System auf mehr als 25 mm Hg kommt [1]. Dies führt bei betroffenen Patienten in der Regel zu einer belastungsabhängigen Atemnot und einer generellen Leistungsminderung. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es zu einer Verengung der Gefäße, die durch eine Umwandlung (Remodeling) und Verdickung aller drei Schichten der Gefäßwände, d.h. Intima, Media und Adventitia, verursacht wird [2]. Damit kommt es oft zu Ruhe-Dyspnoe, globaler respiratorischer Insuffizienz und den mit einer Rechtsherzinsuffizienz einhergehen-

- 2 -

den Stauungssyndromen sowie langfristig zum Herzversagen. Die pulmonal-arteriellen Hypertonie ist eine besonders schwere Form der pulmonalen Hypertonie, bei der das mittlere Überleben ab Diagnose, die auf Grund der anfänglich schwachen Symptome oft sehr spät gestellt wird, bei lediglich etwa drei Jahren liegt [3].

Zur Erforschung der Mechanismen der pulmonalen Hypertonie und für präklinische therapeutische Untersuchungen stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, die unterschiedliche Charakteristika der Erkrankung abbilden. Dabei kann zwischen induzierbaren Modellen (z.B. durch Hypoxie, Monocrotalin oder Antigene) und transgenen Modellen unterschieden werden, wobei die Wahl des geeigneten Modells von der zu untersuchenden Fragestellung abhängt [4].

Nicht alle möglichen Ursachen der verschiedenen Formen der pulmonal-arteriellen Hypertonie sind bis heute aufgeklärt. Trotzdem gibt es mehrere bekannte, auch therapeutisch relevante Faktoren. So wird z.B. bei der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie die vermehrte Freisetzung vasokonstriktiver Faktoren diskutiert [5-7], während in vielen Fällen der familiären pulmonal-arteriellen Hypertonie Mutationen des BMPR2 [8] oder des Activin-Receptor-Like-Kinase-1 (ALK1)-Gens [9] als ursächlich erachtet werden.

Die Entwicklung neuer Therapieoptionen für die Behandlung der pulmonalen Hypertonie bzw. der pulmonal-arteriellen Hypertonie ist dringend erforderlich. Eine solche könnte der Transfer therapeutischer Gene in Lungengewebe, und insbesondere in das Lungenendothel, sein. Vektoren, die einen spezifischen und effizienten Gentransfer in das Lungenendothel ermöglichen, sind jedoch im Stand der Technik bislang nicht beschrieben worden.

- 3 -

Die gentherapeutische Behandlung mittels viraler Vektoren stellt eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Erkrankungen dar, die auf eine konventionelle Behandlung nicht oder nicht in ausreichendem Maße ansprechen. Dieser Ansatz beruht auf der Einschleusung von therapeutischen Genen in den zu behandelnden Organismus mit Hilfe von Viren, die so modifizierte wurden, dass sie die Sequenz des entsprechenden Gens in ihrem Genom aufweisen. Virale Vektoren, die im Rahmen der Gentherapie bereits für gentherapeutische Therapieansätze verwendet wurden, basieren auf Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren.

Adeno-assoziierte Viren (AAV) stellen vielversprechende Kandidaten für den Einsatz in der klinischen Praxis dar, da sie als verhältnismäßig sicher eingestuft werden. AAV-Vektoren sind in der Lage, ein Transgen in ein Gewebe einzuschleusen und dort stabil und effizient zu exprimieren. Gleichzeitig weisen diese Vektoren keine bekannten Pathogenitätsmechanismen auf [10]. Besondere Bedeutung für eine klinische Anwendung kommt den AAV-Vektoren vom Serotyp 2 (AAV2) zu, die als besonders gut untersucht gelten. Nach Einschleusung durch AAV-Vektoren können die Transgene in verschiedenen Formen in der transfizierten Zelle vorliegen, z.B. als episomale, einzel- oder doppelsträngige DNA. Auch konkatamere Formen der DNA wurden in transduzierten Zellen nachgewiesen.

Das Genom von AAV2 wird von einem linearen, einzelsträngigen DNA-Molekül von etwa 4700 Nukleotiden Länge gebildet und umfasst an beiden Enden Inverted Terminal Repeats (ITRs). Das Genom umfasst ferner zwei große offene Leserahmen, die als Replikations-Region (rep) und Kapsid-Region (cap) bezeichnet werden. Die Replikations-Region kodiert für Proteine, die im Rahmen der Virusreplikation erforderlich sind. Die Kapsid-Region hingegen kodiert für die strukturellen Proteine VP1, VP2 und VP3, aus denen sich das ikosaedrische Kapsid des Virus zusammensetzt.

Wie die meisten im Stand der Technik bekannten, gentherapeutisch verwendbaren Vektoren allerdings weisen Wildtyp-AAV-Vektoren, wie z.B. die beschriebenen AAV2-Vektoren, keine ausreichende Spezifität für ein bestimmtes Gewebe auf, sondern infizieren eine große Bandbreite von Zelltypen. Bei systemischer Gabe dieser Wildtyp-Vektoren kommt es somit zu einer unzureichenden Transduktion von Lungengewebe, während aufgrund der unerwünschten Transduktion von anderen Geweben mit starken Immunreaktionen im behandelten Patienten gerechnet werden muss. Fortschritte bei der Entwicklung von viralen Vektoren, die eine erhöhte Spezifität für bestimmte Organe aufweisen, wurden in der Vergangenheit durch den Einsatz von Peptidliganden erreicht, die in der Lage sind, die Vektoren zu einem bestimmten Organ zu leiten [11-12]. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Peptidliganden für ein "Homing" zu verschiedenen Organen wie z.B. zum Gehirn sorgen.

Literaturstelle [13] beschreibt ein Verfahren, welches das Screening nach Kapsiden von AAV2 mit modifiziertem Tropismus in randomisierten Peptidbibliotheken erlaubt. Aus diesen Bibliotheken können Vektoren isoliert werden, die *in vitro* spezifisch einen gewünschten Zelltyp transduzieren. Jedoch wurde überraschenderweise festgestellt, dass die auf diese Weise selektierten Kapside oftmals für eine Verwendung *in vivo* ungeeignet sind, da ihnen im Tiermodell die nötige Spezifität fehlte [14].

Es besteht weiterhin ein großes Bedürfnis nach Mitteln, die in der Lage sind, den Tropismus viraler Vektoren zu modulieren und damit für eine ausreichende Zell- oder Gewebespezifität sorgen, die einen gezielten Transport eines viralen Vektors in die Lunge ermöglicht. Solche Vektoren können für eine spezifische Expression von therapeutischen Genen in Lungengewebe sorgen, um auf diese Weise Erkrankungen und/oder Funktionsstörungen der Lunge wirksam zu behandeln.

- 5 -

Die vorliegende Erfindung stellt virale Vektoren für den zielgerichteten Gentransfer in die Lunge bereit. Die erfindungsgemäßen viralen Vektoren exprimieren auf ihrer Kapsid-Oberfläche eine bislang unbekannte Aminosäuresequenz, die *in vivo* spezifisch von Rezeptoren auf dem Endothelgewebe der Lunge erkannt wird. Somit transduzieren die viralen Vektoren der vorliegenden Erfindung nach systemischer Verabreichung an ein Subjekt spezifisch dessen Lungengewebe.

Die erfindungsgemäßen viralen Vektoren ermöglichen darüber hinaus eine starke und lang anhaltende Expression eines Transgens in den endothelialen Zellen der Lunge bei nur geringfügiger Immunreaktion und sind daher insbesondere für die gentherapeutische Behandlung von bestimmten Lungenfunktionsstörungen und/oder Lungenerkrankungen geeignet. Nach der Transfektion rufen die AAV-Vektoren lediglich eine geringfügige Immunreaktion in dem Wirt hervor und sind somit besonders für die Gentherapie geeignet.

#### **BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG**

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden durch Selektion in einer randomisierten AAV2-Heptamer-Peptidbibliothek verschiedene lungenspezifische Sequenzen identifiziert. Auf Basis der identifizierten Peptidsequenz ESGHGYF (SEQ ID NO:2) wurde der rekombinante virale Vektor rAAV2-ESGHGYF hergestellt, bei dem die Peptidsequenz ESGHGYF als Teilsequenz des Kapsid-Proteins VP1 exprimiert wird. Anschließend wurde der Vektor rAAV2-ESGHGYF intravenös an Mäuse verabreicht, wobei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine eindeutige Spezifität des Vektors für Lungenendothelgewebe beobachtet werden konnte. Die Spezifität konnte durch Färbung mit CD31 nachgewiesen werden, wie es in den vorliegenden Beispielen beschrieben wird. Darüber hinaus konnte durch Austausch der Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Serin (S) am N-Terminus des Peptides in einem Alanin-Scan

- 6 -

festgestellt werden, dass diese beiden Aminosäuren für die Spezifität der Transduktion nicht relevant sind, sodass lediglich die Kernstruktur GHGYF (SEQ ID NO:1) für die Lungenspezifität verantwortlich ist.

Die vorliegende Erfindung stellt daher verschiedene lungenspezifische Peptidsequenzen bereit, die in besonderer Weise dazu geeignet sind, therapeutische Mittel, wie z.B. virale Vektoren, gezielt in die Lunge eines zu behandelnden Subjekts zu leiten.

In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung demgemäß ein Peptid, Polypeptid oder Protein, das spezifisch an Endothelzellen der Lunge bindet, wobei das Peptid, Polypeptid oder Protein die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 umfasst. Vorzugsweise umfasst das Peptid, Polypeptid oder Protein die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 oder eine Variante davon, die sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 durch Modifikation von mindestens einer der beiden N-terminalen Aminosäure unterscheidet. Das erfindungsgemäße Peptid, Polypeptid oder Protein bindet vorzugsweise an Endothelzellen der Lunge, insbesondere der menschlichen Lunge.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Peptid, Polypeptid oder Protein, das spezifisch an Endothelzellen der Lunge bindet, wobei das Peptid, Polypeptid oder Protein die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfasst.

Im Rahmen der vorliegenden Offenbarung bezeichnet der Begriff "Peptid" eine Verknüpfung von 2-10 Aminosäuren, die über eine peptidische Bindung miteinander verbunden sind. Der Begriff "Polypeptid" bezeichnet eine Verknüpfung von 11-100 Aminosäuren, die über eine peptidische Bindung miteinander verbunden sind. Polypeptide mit mehr als 100 Aminosäuren werden vorliegend als "Protein" bezeichnet.



- 7 -

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die erfindungsgemäße, lungenspezifische Peptidsequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder der Variante von SEQ ID NO:2 Teil eines Kapsid-Proteins eines Virus. Dies bedeutet, dass die lungenspezifische Sequenz als Teil eines Kapsid-Proteins des Virus vorliegt. Um derartige Kapsid-Proteine herzustellen, wird eine entsprechende, für das lungenspezifische Peptid kodierende Nukleotidsequenz in die Region des Virus-Genoms kloniert, die für ein Kapsid-Protein des Virus kodiert. Wird die lungenspezifische Sequenz als Teil eines Kapsid-Proteins exprimiert, so kann sie vielfach an der Oberfläche des viralen Vektors präsentiert werden.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Kapsid-Protein um ein solches, das von einem Adeno-assoziierten Virus (AAV) stammt. Bei dem AAV kann es sich um einen beliebigen der im Stand der Technik beschriebenen Serotypen handeln, wobei das Kapsid-Protein vorzugsweise von einem AAV von einem der Serotypen 2, 4, 6, 8 und 9 stammt. Ein Kapsid-Protein eines AAV vom Serotyp 2 ist besonders bevorzugt.

Das Kapsid des AAV-Wildtyps setzt sich aus den Kapsid-Proteinen VP1, VP2 und VP3 zusammen, die überlappend von der *cap*-Region kodiert werden. Alle drei Proteine weisen einen identischen C-terminalen Bereich auf. Das Kapsid von AAV umfasst etwa 60 Kopien der Proteine VP1, VP2 und VP3, die im Verhältnis 1:1:8 exprimiert werden. Wird eine Nukleotidsequenz, die für eine der vorliegend beschriebenen lungenspezifischen Peptide kodiert, C-terminal in den Leserahmen von VP1 kloniert (d.h. in den Bereich, der bei allen drei Proteinen identisch ist), so kann man erwarten, dass theoretisch 60 der spezifischen Peptide der auf der Kapsid-Oberfläche zu finden sind.

Wird ein AAV-Vektor im Sinne der vorliegenden Erfindung modifiziert, so wird die für das lungenspezifische Peptid kodie-

rende Nukleotidsequenz in die cap-Region am 3'-Ende des Genoms kloniert. Die für das lungenspezifische Peptid kodierende Sequenz kann in die genomische Sequenz von einem der Kapsid-Proteine VP1, VP2 oder VP3 kloniert werden. Die Kapsid-Proteine von AAV2 sind beispielhaft in SEQ ID NO:6 (VP1), SEQ ID NO:7 (VP2) und SEQ ID NO:8 (VP3) dargestellt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die für das lungenspezifische Peptid kodierende Sequenz in den Leserahmen eines VP1-Gens kloniert, vorzugsweise in das in SEQ ID NO:6 gezeigte VP1-Gen von AAV2. Dabei sollte beachtet werden, dass sich durch die Insertierung der klonierten Sequenz kein Wechsel des Leserahmens und kein vorzeitiger Abbruch der Translation ergibt. Dem Fachmann werden die dazu erforderlichen Methoden ohne Weiteres ersichtlich sein.

In allen drei Kapsid-Proteinen von AVV wurden Stellen identifiziert, an denen Peptidsequenzen für das Homing eingefügt werden können [15-20]. So wurde unter anderem das im VP1 von AAV2 vorkommende Arginin in Position 588 (R588) spezifisch für die Insertion eines Peptidliganden vorgeschlagen [21-22]. Diese Aminosäureposition des viralen Kapsids ist offenbar an der Bindung von AAV2 an seinen natürlichen Rezeptor beteiligt. Es wurde vermutet, dass R588 einer von vier Arginin-Resten ist, der die Bindung von AAV2 an seinen natürlichen Rezeptor vermittelt [23-24]. Eine Modifikation in diesem Bereich des Kapsids schwächt den natürlichen Tropismus von AAV2 ab oder beseitigt diesen vollständig.

Demgemäß ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass die erfindungsgemäße lungenspezifische Peptidsequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 (oder deren Variante) oder eine der lungenspezifischen Peptidsequenzen von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 im Bereich der Aminosäuren 550-600 des VP1-Proteins von AAV2, insbesondere des Proteins von SEQ ID NO:6, insertiert vorliegt. Noch stärker bevorzugt ist es, die lun-

genspezifische Peptidsequenz im Bereich der Aminosäuren 560-600, 570-600, 560-590, 570-590 des VP1-Proteins inseriert vorliegen.

So kann sich die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder deren Variante (oder alternativ die Peptidsequenzen von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5) z.B. unmittelbar hinter einer der folgenden Aminosäure des VP1-Proteins, insbesondere des Proteins von SEQ ID NO:6, anschließen: 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599 oder 600. Besonders bevorzugt ist es, dass die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder deren Variante (oder alternativ die Peptidsequenzen von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5) auf die Aminosäure 588 des VP1-Proteins von SEQ ID NO:6 folgt, wie es in den Beispielen gezeigt ist. Es ist dabei möglich, dass zwischen dem Arginin-Rest in Position 588 und der ersten Aminosäure von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder der Variante von SEQ ID NO:2 eine oder mehrere, und insbesondere bis zu 5 (d.h. 1, 2, 3, 4 oder 5) Aminosäuren liegen, die durch die Klonierung bedingt sind. Ebenso können hinter der letzten Aminosäure von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder der Variante von SEQ ID NO:2 eine oder mehrere, insbesondere bis zu 5 (d.h. 1, 2, 3, 4 oder 5) Aminosäuren liegen.

Die oben in Bezug auf VP1 angegebenen Stellen und Bereiche in der Aminosäuresequenz des Kapsid-Proteins gelten analog auch für die Kapsid-Proteine VP2 und VP3 von AAV2. Da sich die drei Kapsid-Proteine VP1, VP2 und VP3 von AAV2 lediglich durch die Länge der N-terminalen Sequenz unterscheiden und demgemäß einen identischen C-terminalen Bereich aufweisen, wird der Fachmann keine Probleme haben, durch Sequenzvergleich die oben für VP1 angegebenen Stellen für die Inserierung des Peptidliganden

in den Aminosäuresequenzen von VP1 und VP2 zu identifizieren. So entspricht die Aminosäure R588 in VP1 der Position R451 von VP2 (SEQ ID NO:7) bzw. der Position R386 von VP3 (SEQ ID NO:8).

SEQ ID NO:9 zeigt beispielhaft die Sequenz des VP1-Proteins von AVV2 nach Einbringung der Peptidsequenz von SEQ ID NO:2. Bedingt durch die Klonierung weist das Kapsid-Protein zwei zusätzliche Aminosäuren auf, die in der nativen Sequenz des VP1-Proteins von AVV2 nicht vorkommen. So wird die Peptidsequenz von SEQ ID NO:2 N-terminal von einem Glycin in Position 589 und C-terminal von einem Alanin in Position 597 flankiert. Darüber hinaus ist das Asparagin in Position 587 der nativen Sequenz gegen ein Glutamin ausgetauscht.

In einer besonderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung somit auch ein Kapsid-Protein, das Folgendes umfasst oder daraus besteht:

- (a) die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:9;
- (b) eine Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Identität zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:9 aufweist; oder
- (c) ein Fragment von einer der in (a) oder (b) definierten Aminosäuresequenzen.

In einem weiteren Aspekt richtet sich die Erfindung auf ein virales Kapsid, das ein Peptid, Polypeptid oder Protein umfasst, welches spezifisch an Zellen der Lunge bindet und die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder einer wie oben beschriebene Variante von SEQ ID NO:2 (oder alternativ die Peptidsequenzen von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5) umfasst.

Des Weiteren stellt die vorliegende Erfindung auch eine Nukleinsäure bereit, die für ein wie oben beschriebenes Peptid, Polypeptid oder Protein kodiert. Eine Nukleinsäure, die für

ein Kapsid-Protein kodiert, welches ein wie oben beschriebenes, erfindungsgemäßes Peptid, Polypeptid oder Protein umfasst, wird ebenfalls bereitgestellt. Vorzugsweise umfasst die für das Kapsid-Protein kodierende Nukleinsäure die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:10 oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz mit mindestens 80% Sequenzidentität. Ein Plasmid, das eine solche Nukleinsäure umfasst, wird ebenfalls bereitgestellt.

In einem noch weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen rekombinanten, d.h. einen mittels gentechnischer Verfahren hergestellten, viralen Vektor, der ein Kapsid und mindestens ein darin verpacktes Transgen umfasst, wobei das Kapsid mindestens ein Kapsid-Protein umfasst, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder von einer Variante von SEQ ID NO:2 umfasst, die sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 durch Modifikation von mindestens einer der beiden N-terminalen Aminosäure unterscheidet. Alternativ kann das Kapsid-Protein auch die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfassen. Bei dem rekombinanten viralen Vektor kann es sich um einen rekombinanten AAV-Vektor handeln, z.B. um einen solchen vom Serotyp 2, 4, 6, 8 und 9. AAV-Vektoren vom Serotyp 2 sind besonders bevorzugt.

Die unterschiedlichen AAV-Serotypen unterscheiden sich im Wesentlichen anhand ihres natürlichen Tropismus. So bindet Wildtyp-AAV2 stärker an alveolare Zellen als an Lungenepithelzellen, während AAV5, AAV6 und AAV9 zu einer stärkeren Transduktion der epithelialen Zellen der Atemwege in der Lage sind. Der Fachmann kann diese natürlichen Unterschiede hinsichtlich der Spezifität der Zellen nutzen, um die durch die erfindungsgemäßen Peptide vermittelte Spezifität für bestimmte Zellen oder Gewebe weiter zu verstärken. Auf der Nukleinsäureebene sind die verschiedenen AAV-Serotypen stark homolog. So sind z.B. die Serotypen AAV1, AAV2, AAV3 und AAV6 auf der Nukleinsäureebene zu 82% identisch [25].

Das Kapsid der erfindungsgemäßen viralen Vektoren umfasst ein oder mehrere Transgene. Als Transgen wird vorliegend ein Gen bezeichnet, das mittels gentechnischer Verfahren in das Genom des Vektors eingebracht wurde. Bei dem Transgen (oder den Transgenen) kann es sich um DNA oder RNA handeln. Vorzugsweise handelt es sich um einzelsträngige DNA (ssDNA) oder doppelsträngige DNA (dsDNA), wie beispielsweise genomische DNA oder cDNA. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Transgen, welches mit Hilfe des erfindungsgemäßen rekombinanten viralen Vektors transportiert werden soll, um ein humanes Gen. Geeignete Transgene sind z.B. therapeutische Gene, die ein im Patienten dysfunktionales Gen ersetzen sollen. Es kann sich ferner um ein Gen handeln, das in dem entsprechenden Zielgewebe nicht oder nur in unzureichendem Umfang exprimiert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Transgen, welches vom viralen Vektor der Erfindung exprimiert wird, um ein Gen, das für eine Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder für den Bone-Morphogenic-Protein-Rezeptor 2 (BMP2) kodiert. Bei der NOS kann es sich um eine endotheliale NOS (eNOS) oder eine induzierbare NOS (iNOS) kodiert. Die für eNOS und iNOS kodierenden Gene können für die Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder Lungenerkrankung, insbesondere der pulmonalen oder pulmonal-arteriellen Hypertonie, in einem Subjekt eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform kodiert das Transgen für ein radioprotektives Protein, wie z.B. für ein radioprotektives Enzym. Eine wesentliche Limitation beim Einsatz der Radiotherapie im Rahmen der Behandlung von Krebs ist die strahleninduzierte Schädigung des Normalgewebes, was häufig eine Verringerung der Strahlendosis, eine Unterbrechung des Therapieregimes, oder sogar einen völligen Verzicht auf diese Therapieform nötig macht. Die Lunge ist ein therapeutisch besonders relevanter Ort des Tumorwachstums aber gleichzeitig ein besonders strahlenempfindliches Organ, weshalb Primärtumoren dort oft nur eingeschränkt und diffuses Tumorwachstum meistens gar

nicht radiotherapeutisch behandelt werden kann. Mit Hilfe der lungenspezifischen Vektoren der vorliegenden Erfindung kann das gesunde Gewebe, welches das maligne Gewebe umgibt, durch zielgerichtete Expression radioprotektiver Proteine geschützt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Transgen, welches in das gesunde Lungengewebe eingeschleust wird, um eine Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), die die Konversion von Superoxidanionen, einem der wesentlichen Faktoren der strahleninduzierten Toxizität, zu Wasserstoffperoxid katalysiert. In einer weiteren hier vorgeschlagenen Ausführungsform handelt es sich um die Kinasedomäne des Ataxia telangiectasia mutant (ATM)-Gens, das zur Reparatur der durch Bestrahlung entstandenen DNA-Schäden beiträgt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden beide Gene mittels der vorliegend beschriebenen Vektoren in den zu behandelnden Patienten eingebracht.

In einer weiteren Ausführungsform kodiert das Transgen für humanes Alpha-1-Antitrypsin. Der Mangel an ausreichenden Mengen Alpha-1-Antitrypsin ist ursächlich für das Laurell-Eriksson-Syndrom, eine erbliche Stoffwechselerkrankung, die zu einem Lungenemphysem oder einer Leberzirrhose führen kann. Alpha-1-Antitrypsin ist für die Regulation der Aktivität von Proteasen im Serum erforderlich. Der Mangel dieses Inhibitors führt zu einer verstärkten Proteolyse im Serum und dadurch bedingt zu den genannten, schwerwiegenden Folgeerscheinungen.

Die viralen Vektoren der vorliegenden Erfindung eignen sich insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung von Erkrankungen der Lunge. Erkrankungen der Lunge im Sinne der Erfindung umfassen insbesondere alle Arten von Gefäßerkrankungen der Lunge, wie die pulmonale Hypertonie, aber auch Lungentumore, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (A1AD), und andere. Für die Behandlung mit den erfindungsgemäßen Vektoren geeignete Lungentumoren umfassen beispielsweise das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC), das Plattenepithelkarzinom, das

Adenokarzinom und das großzellige Bronchialkarzinom. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die viralen Vektoren der vorliegenden Erfindung zur therapeutischen Behandlung der pulmonalen oder pulmonal-arteriellen Hypertonie eingesetzt.

In einer noch weiteren Ausführungsform kodiert das Transgen für ein Antitumormittel, wie z.B. ein Tumorsuppressor-Protein, oder einen Immunmodulator, wie z.B. ein Zytokin (z.B. Interleukin 1 bis 4, Gamma-Interferon, p53), das selektiv zum Lungengewebe des Patienten transportiert werden soll.

Die Vektoren können ferner auch dazu verwendet werden, um Antisense-RNA, Ribozyme, oder Ähnliches in das Endothelgewebe der Lunge zu transportieren. Ferner können die erfindungsgemäßen Vektoren auch Transgene umfassen, die für sekretorische Proteine kodieren, die systemisch in die Blutlaufbahn gelangen sollen. Solche sekretorischen Proteine können durch das Lungenkapillarnetz, welches Teil des Herzkreislaufsystems ist, effizient in die Blutbahn abgegeben werden.

Wie vorliegend verwendet, bezeichnet der Begriff "Subjekt" alle menschlichen oder tierischen Organismen, die durch AAV-Vektoren infiziert werden können. Vorzugsweise handelt es sich bei dem zu behandelnden Subjekt um ein Säugetier, wie z.B. um einen Menschen, einen Primaten, eine Maus oder eine Ratte. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das zu behandelnde Subjekt ein Mensch. Nach Transfektion in das Subjekt sorgt der Vektor für die ortsspezifische Expression des Transgens in den Zellen des Lungenendothels.

Das Transgen kann in dem viralen Vektor in Form einer Expressionskassette vorliegen, die neben der zu exprimierenden Sequenz des Transgens weitere für die Expression erforderliche Elemente umfasst, wie z.B. einen geeigneten Promoter, der nach Infektion der entsprechenden Zellen die Expression des Transgens steuert. Geeignete Promotoren umfassen neben den AAV-Promotoren z.B. den Cytomegalovirus (CMV)-Promoter, den Chi-



cken-Beta-Actin/Cytomegalovirus-Hybridpromoter (CAG), einen Endothelzellen-spezifischen Promoter, wie z.B. den VE-Catherin Promoter, sowie Steroid-Promotoren und Metallothionein-Promotoren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Transgen einen Lungenendothel-spezifischen Promoter, der in funktionaler Verbindung mit dem zu exprimierenden Transgen verbunden ist. Auf diese Weise kann die Spezifität der erfindungsgemäßen Vektoren für Lungenendothelzellen weiter erhöht werden. Wie hierin verwendet, ist ein Lungenendothel-spezifischer Promoter ein Promoter, dessen Aktivität in Lungenendothelzellen mindestens 2-fach, 5-fach, 10-fach, 20-fach, 50-fach oder 100-fach höher ist als in einer Zelle, die keine Lungenendothelzelle ist. Vorzugsweise ist dieser Promoter ein humaner Promoter. Die Expressionskassette kann auch ein Enhancer-Element zur Erhöhung des Expressionslevels des zu exprimierenden exogenen Proteins enthalten. Ferner kann die Expressionskassette Polyadenylierungssequenzen, wie z.B. die SV40-Polyadenylierungssequenzen oder die Polyadenylierungssequenzen des bovinen Wachstumshormons umfassen.

Die erfindungsgemäßen viralen Vektoren können, vorzugsweise als Teile eines ihrer Kapsid-Proteine, die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfassen. Alternativ können auch Varianten der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 verwendet werden, die sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 durch Modifikation von mindestens einer der beiden N-terminalen Aminosäure unterscheiden. Bei der Modifikation kann es sich um einen Austausch, eine Deletion oder eine Insertion von Aminosäuren handeln, solange die Variante die Fähigkeit beibehält, als Teil des Kapsids die spezifische Bindung des Vektors an Rezeptor-Strukturen von Endothelzellen der Lunge zu vermitteln. Die Erfindung erstreckt sich somit auch auf Varianten der Sequenz von SEQ ID NO:2, bei denen eine der beiden N-terminalen Aminosäuren von SEQ ID NO:2 verändert wurde. Diese Varianten, die vom Umfang der Erfindung umfasst werden, weisen folglich eine

Sequenzidentität von mehr als 85% zu der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz auf, wenn die Sequenzen mit den Programmen GAP oder BESTFIT miteinander verglichen werden. Diese Computerprogramme zur Bestimmung der Aminosäuresequenzidentität sind im Stand der Technik hinreichend bekannt.

Die Variante der Sequenz von SEQ ID NO:2 kann auf einer Substitution von einer oder von beiden N-terminalen Aminosäuren beruhen, d.h. es können eine oder beide N-terminalen Aminosäuren gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht sein. Vorzugsweise ist die Substitution, durch die sich die Varianten von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz unterscheiden, eine konservative Substitution, d.h. eine Substitution einer Aminosäure durch eine Aminosäure ähnlicher Polarität, die dem Peptid ähnliche funktionelle Eigenschaften verleiht. Vorzugsweise stammt die ausgetauschte Aminosäure aus der gleichen Gruppe von Aminosäuren wie die ersetzende Aminosäuren. Beispielsweise kann ein hydrophober Rest durch einen anderen hydrophoben Rest ersetzt werden oder ein polarer Rest durch einen anderen polaren Rest. Funktionell ähnliche Aminosäuren, die im Rahmen einer konservativen Substitution gegeneinander ausgetauscht werden können, umfassen z.B. nicht-polare Aminosäuren wie z.B. Glycin, Valin, Alanin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Prolin, Phenylalanin, und Tryptophan. Beispiele von ungeladenen polaren Aminosäuren umfassen Serin, Threonin, Glutamin, Asparagin, Tyrosin, und Cystein. Beispiele von geladenen polaren (sauren) Aminosäuren umfassen Histidin, Arginin und Lysin. Beispiele von geladenen polaren (basischen) Aminosäuren umfassen Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Als Varianten der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz gelten auch solche Aminosäuresequenzen, bei denen eine Aminosäure im Bereich der beiden N-terminalen Aminosäuren von SEQ ID NO:2 eingefügt wurde. Solche Insertionen können prinzipiell erfolgen, so lange die resultierende Variante ihre Fähigkeit beibehält, spezifisch an Endothelzellen der Lunge zu binden.

- 17 -

Ferner gelten vorliegend auch solche Proteine als Varianten der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz, bei denen eine der beiden N-terminalen Aminosäuren von SEQ ID NO:2 fehlt. Voraussetzung ist wiederum, dass die entsprechend deletierte Variante spezifisch an Endothelzellen der Lunge bindet.

Ebenfalls von der Erfindung umfasst sind Lungenendothelspezifische Varianten der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz, die an einer oder an beiden N-terminalen Aminosäuren strukturell modifiziert sind, wie beispielsweise durch Einführen einer modifizierten Aminosäure. Bei diesen modifizierten Aminosäuren kann es sich erfindungsgemäß um Aminosäuren handeln, die durch Biotinylierung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Verzweigung und/oder Zyklisierung verändert wurden.

Virale Vektoren, deren Kapsid eine der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen oder eine wie oben definierte Variante davon umfassen, binden spezifisch an Endothelzellen der Lunge. Wie vorliegend verwendet bedeutet eine "spezifische" Bindung der erfindungsgemäßen Vektoren, dass sich die Vektoren nach systemischer Verabreichung vorwiegend an oder in den Endothelzellen der Lunge anreichern. Dies bedeutet, dass sich mehr als 50% der ursprünglich verabreichten Vektorgenome in den Endothelzellen oder im Bereich der Endothelzellen der Lunge anreichern, während sich weniger als 50% in oder im Bereich von anderen Zellen oder Geweben anreichern (wie z.B. in der Milz oder der Leber). Es ist bevorzugt, dass sich mehr als 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, oder sogar mehr als 99% der ursprünglich verabreichten Vektorgenome in oder im Bereich der Endothelzellen der Lunge anreichern. Eine spezifische Bindung der Vektoren kann auch über die Expression des Transgens ermittelt werden. Bei viralen Vektoren, die spezifisch an Endothelzellen der Lunge binden, erfolgt mehr als 50% der gesamten Expression des Transgens in oder im Bereich der Endothelzellen der Lunge, während weniger als 50% der Expression in oder im Bereich von

- 18 -

anderen Geweben beobachtet werden kann. Es ist allerdings bevorzugt, dass mehr als 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, oder sogar mehr als 99% der insgesamt gemessenen Expression des Transgens in oder im Bereich der Endothelzellen der Lunge erfolgt.

Der Fachmann wird problemlos in der Lage sein, die spezifische Bindung der erfindungsgemäßen Vektoren an Endothelzellen der Lunge und die Expression des mit Hilfe der Vektoren eingeschleusten Transgens zu bestimmen. Zu diesem Zweck geeignete Verfahren zur Messung der Spezifität von Transduktion und Expression sind in den nachstehenden Beispielen gezeigt.

Es ist darüber hinaus erfindungsgemäß bevorzugt, dass Vektoren, deren Kapside Varianten der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz enthalten, mindestens etwa 50% der Bindungsaktivität eines entsprechenden viralen Vektors aufweisen, dessen Kapsid die in SEQ ID NO:2 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist. Noch stärker bevorzugt ist es, dass die Varianten etwa 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Bindungsaktivität eines entsprechenden viralen Vektors aufweisen, dessen Kapsid die in SEQ ID NO:2 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist. Die Bindungsaktivität der Vektoren kann mit Hilfe von in vitro-Assays gemessen werden, wie sie in den vorliegenden Beispielen beschrieben werden.

Vorzugsweise ist die Bindungsaktivität der erfindungsgemäßen Vektoren, wie sie durch Verteilung der Vektorgenome oder Expression des Transgens bestimmt werden kann, für Endothelzellen der Lunge mindestens 2-fach, 5-fach, 10-fach, 20-fach, 50-fach, 75-fach, 100-fach, 150-fach, 200-fach, 250-fach, 500-fach, 600-fach, 700-fach, 800-fach, 900-fach, 1000-fach, 2000-fach, 5000-fach, oder 10000-fach höher als die Bindungsaktivität für eine Kontroll-Zelle, die keine Lungenendothelzelle ist, Z.B. eine Milz- oder Leber-Zelle).

Die Erfindung betrifft auch eine Zelle, die ein erfindungsgemäßes Peptid, Polypeptid oder Protein, eine dafür kodierende

- 19 -

Nukleinsäure, ein Plasmid, welches eine solche Nukleinsäure umfasst, oder einen wie oben beschriebenen rekombinanten AAV-Vektor enthält. Es handelt sich vorzugsweise um eine humane Zelle oder Zelllinie.

In einer Ausführungsform wurde eine Zelle z.B. durch ein Biopsieverfahren aus einem humanen Subjekt gewonnen und anschließend mit dem viralen Vektor in einem ex vivo Verfahren transfiziert. Die Zelle kann anschließend dem Subjekt reimplantiert oder diesem auf andere Weise wieder zugeführt werden, z.B. durch Transplantation oder Infusion. Die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung von transplantierten Zellen ist geringer, wenn das Subjekt, aus dem die Zelle gewonnen wurde, genetisch dem Subjekt ähnelt, an das die Zelle verabreicht wird. Vorzugsweise handelt es sich daher bei dem Subjekt, dem die transfizierten Zellen zugeführt werden, um dasselbe Subjekt, aus dem zuvor die Zellen gewonnen wurden. Die Zelle ist vorzugsweise eine humane Lungenzelle, insbesondere eine Zelle des humanen Lungenendothels. Die zu transfizierende Zelle kann auch eine Stammzelle, wie z.B. eine adulte humane Stammzelle, sein. Es ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass es sich bei den zu transfizierenden Zellen um autologen Zellen handelt, die mit dem erfindungsgemäßen viralen Vektor, z.B. dem beschriebenen rekombinanten AAV2-Vektor, ex vivo transfiziert wurde. Die Zellen werden vorzugsweise in einem Verfahren zur Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Erkrankung der Lunge in einem Subjekt verwendet.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines AAV-Vektors, bei dem ein Plasmid verwendet wird, dass für ein Kapsid-Protein kodiert, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder einer Variante davon umfasst. Alternativ kann der Vektor auch die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfassen. Das grundsätzliche Verfahren der Herstellung von rekombinanten AAV-Vektoren, die ein zu exprimierendes

Transgen umfassen, ist im Stand der Technik hinreichend beschrieben [28]. HEK 293-T Zellen werden mit drei Plasmiden transfiziert. Ein erstes Plasmid enthält das die cap- und rep-Regionen des AAV-Genoms, wobei jedoch die natürlich vorkommenden Inverted Repeats (ITRs) fehlen. Die cap-Region dieses Plasmids enthält ein Gen, das für mindestens ein modifiziertes Kapsid-Protein kodiert, d.h. ein Gen, welches die erfindungsgemäße Peptidsequenz umfasst. Ein zweites Plasmid umfasst eine Transgen-Expressionskassette, die von den entsprechenden ITRs flankiert wird, die das Verpackungssignal darstellen. Die Expressionskassette wird daher im Zuge des Zusammenbaus der Viruspartikel in das Kapsid verpackt. Bei dem dritten Plasmid handelt es sich um ein adenovirales Helferplasmid, auf dem die Helferproteine E1A, E1B, E2A, E4-orf6, VA kodiert sind, die für die AAV-Replikation in den HEK 293-T-Zellen erforderlich sind.

Bedingungen, welche die Anreicherung und Aufreinigung der erfindungsgemäßen rekombinanten Vektoren erlauben, sind im Stand der Technik bekannt. Die erfindungsgemäßen Vektoren können beispielsweise durch Gelfiltrationsverfahren, z.B. unter Verwendung einer Sepharosematrix, entsalzt und durch anschließende Filtration aufgereinigt werden. Andere Aufreinigungsverfahren können ferner eine Cäsiumchlorid- oder Iodixanol-Gradienten-Ultrazentrifugation umfassen. Die Aufreinigung reduziert potentiell abträgliche Affekte in dem Subjekt, an das die adeno-assoziierten viralen Vektoren verabreicht werden. Der verabreichte Virus ist im Wesentlichen frei von Wildtyp- und replikationskompetenten Virus. Die Reinheit des Virus kann durch geeignete Verfahren, wie PCR-Amplifikation, überprüft werden.

Die Erfindung stellt in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die einen viralen Vektor der vorliegenden Erfindung, insbesondere einen AAV-Vektor, umfasst. Der virale Vektor wird dabei in einer therapeutisch

wirksamen Menge an den Patienten verabreicht, d.h. in einer Menge, die ausreicht, um mindestens ein Symptom der zu behandelnden Lungenfunktionsstörung oder Lungenerkrankung in einem erheblichen Maße zu verbessern oder die Progression der Erkrankung zu unterbinden. Symptome, die regelmäßig mit einer Lungenerkrankung verbunden sind, sind z.B. Husten, Fieber, Schmerzen des Brustkorbes, Heiserkeit und Atemschwierigkeiten. Eine therapeutisch wirksame Menge des erfindungsgemäßen Vektors ruft eine positive Veränderung in einem der besagten Symptom hervor, d.h. eine Veränderung die den Phänotyp des betroffenen Subjekts an den Phänotyp eines gesunden Subjekts, das nicht unter einer Lungenerkrankung leidet, annähert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Verabreichung des viralen Vektors in einer Menge, die zu einer vollständigen oder im Wesentlichen vollständigen Heilung der Lungenfunktionsstörung oder Lungenerkrankung führt. Die pharmazeutische Zusammensetzung wird demgemäß eine therapeutisch wirksame Dosis des erfindungsgemäßen Vektors enthalten. Eine therapeutisch wirksame Dosis wird in der Regel für das Subjekt, welches sich der Behandlung unterzieht, nicht toxisch sein.

Die genaue Menge an viralen Vektor, die verabreicht werden muss, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, hängt von mehreren Parametern ab. Faktoren, die relevant für die Menge des zu verabreichenden viralen Vektors sind, umfassen z.B. die Art der Verabreichung des viralen Vektors, die Art und Schwere der Lungenerkrankung, die Krankheitsgeschichte des zu behandelnden Patienten sowie Alter, Gewicht, Größe und Gesundheitszustand des zu behandelnden Patienten. Ferner sind auch das Expressionslevel des Transgens, das benötigt wird um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, die Immunantwort des Patienten, sowie die Stabilität des Genproduktes für die zu verabreichende Menge relevant. Eine therapeutisch wirksame Menge des viralen Vektors kann von einem Fachmann ohne Weiteres auf

Basis des allgemeinen Fachwissens und der vorliegenden Offenbarung bestimmt werden.

Der virale Vektor wird vorzugsweise in einer Menge verabreicht, die einer Virusdosis im Bereich von  $1,0 \times 10^{10}$  bis  $1,0 \times 10^{14}$  vg/kg (Virusgenome pro kg Körpergewicht) entspricht, wobei ein Bereich von  $1,0 \times 10^{11}$  bis  $1,0 \times 10^{13}$  vg/kg stärker bevorzugt ist, und ein Bereich von  $5,0 \times 10^{11}$  bis  $5,0 \times 10^{12}$  vg/kg stärker bevorzugt ist, und ein Bereich von  $1,0 \times 10^{12}$  bis  $5,0 \times 10^{12}$  noch stärker bevorzugt ist. Eine Virusdosis von etwa  $2,5 \times 10^{12}$  vg/kg ist am stärksten bevorzugt. Die zu verabreichende Menge des viralen Vektors, z.B. des erfindungsgemäßen AAV2-Vektors, kann abhängig von der Stärke der Expression des einen oder der mehreren Transgene angepasst werden.

Der virale Vektor der vorliegenden Erfindung, wie z.B. der erfindungsgemäß bevorzugte AAV2-Vektor, kann für verschiedene Arten der Verabreichung formuliert werden, z.B. für die orale Verabreichung als Kapsel, als Flüssigkeit oder Ähnliches. Es ist jedoch bevorzugt, dass der virale Vektor parenteral, vorzugsweise mittels intravenöser Injektion oder intravenöser Infusion verabreicht wird. Die Verabreichung kann beispielsweise mittels intravenöser Infusion, z.B. innerhalb von 60 Minuten, innerhalb von 30 Minuten, oder innerhalb von 15 Minuten erfolgen. Es ist ferner bevorzugt, dass der virale Vektor während einer Operation an der Lunge lokal mittels Injektion verabreicht wird. Zusammensetzungen, die für die Verabreichung mittels Injektion und/oder Infusion geeignet sind, umfassen in der Regel Lösungen und Dispersionen sowie Pulver, aus denen entsprechende Lösungen und Dispersionen hergestellt werden können. Derartige Zusammensetzungen werden den viralen Vektor und mindestens einen geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten. Geeignete pharmazeutisch akzeptable Träger für die intravenöse Verabreichung umfassen bakteriostatisches Wasser, Ringer-Lösung, physiologische Salzlösung, Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und Cremophor EL™. Sterile Zusam-



mensetzungen für die Injektion und/oder Infusion können hergestellt werden, indem der viralen Vektor in der erforderlichen Menge in einem geeigneten Träger eingebracht und anschließend mittels eines Filters sterilfiltriert wird. Zusammensetzungen für die Verabreichung mittels Injektion oder Infusion sollten nach ihrer Herstellung unter Lagerungsbedingungen über einen längeren Zeitraum stabil bleiben. Die Zusammensetzungen können zu diesem Zweck ein Konservierungsmittel enthalten. Geeignete Konservierungsmittel umfassen Chlorbutanol, Phenol, Ascorbinsäure und Thiomersal. Die Herstellung von entsprechenden Darreichungsformen sowie geeignete Hilfsstoffe sind beispielsweise in "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 21. Auflage (2005) beschrieben.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur therapeutischen Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Lungenerkrankung, bei dem man einen erfindungsgemäßen viralen Vektor, vorzugsweise einen AAV-Vektor, wie er oben beschrieben ist, an ein Subjekt verabreicht. Der Vektor umfasst ein Kapsid, das mindestens ein Kapsid-Protein umfasst, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder eine wie oben beschriebene Variante von SEQ ID NO:2 enthält. Alternativ kann der Vektor auch die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfassen. Der virale Vektor umfasst ferner ein Transgen, z.B. ein therapeutisches Gen, das für die Behandlung der Lungenfunktionsstörung oder Lungenerkrankung nützlich ist. Nach Verabreichung an das zu behandelnde Subjekt, vorzugsweise durch systemische Gabe, wie z.B. intravenöse Injektion oder Infusion, sorgt der Vektor für die spezifische Expression des Gens in den Endothelzellen der Lunge.

### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**Figur 1** zeigt das im Rahmen der Erfindung angewendete *in vivo* Selektionsverfahren der AAV-Peptidbibliothek.

**Figur 2** zeigt die Sequenzen der mittels des Selektionsverfahrens identifizierten lungenspezifischen Peptide. Nach der vierten Selektionsrunde konnten insgesamt vier verschiedene Sequenzen identifiziert werden.

**Figur 3** zeigt die Messung der Expression von Luziferase 14 Tage nach systemischer Verabreichung rekombinanter AAV-Vektoren in Organlysaten der Maus. A: AAV2-Wildtyp-Vektor (obere Tafel) und die Insertionskontrolle AAV2-CVGSPCG (mittlerer Tafel) induzieren eine überwiegend herzspezifische Expression. AAV2-ESGHYGF (untere Tafel) induziert eine starke und zugleich lungenspezifische Expression der Luziferase. B: Vergleich der Expressionsstärke der Vektoren AAV2-Wildtyp, AAV2-CVGSPCG und AAV2-ESGHYGF in Herz (obere Tafel), Leber (mittlere Tafel) und Lunge (untere Tafel). AAV2-ESGHYGF zeigt eine stark abgeschwächte Expressionsinduktion in Herz und Leber und eine signifikante Erhöhung der Expression von Luziferase in der Lunge. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. One-Way ANOVA.  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$  für  $n = 3$ .

**Figur 4** zeigt eine Langzeit-Expressionsanalyse in der Maus nach systemischer Gabe von rekombinantem AAV2-ESGHYGF Vektor. Wiederholte Messungen mittels IVIS<sup>®</sup> 200 Imaging System zeigen eine stabile Genexpression in der Lunge über einen Zeitraum von 168 Tagen ( $n = 1$ ).

**Figur 5** zeigt die Verteilung rekombinanter AAV-Vektoren nach systemischer Verabreichung von  $5 \times 10^{10}$  gp/Maus mittels quantitativer Real-Time-PCR. A: Verteilung von AAV2-ESGHYGF 4 Stunden nach Vektorgabe in sieben verschiedenen Organen. B: Verteilung von Genomen, die durch den AAV2-Wildtyp (obere Tafel), den Kontrollvektor AAV2-CVGSPCG (mittlere Tafel) und AAV2-ESGHYGF

- 25 -

(untere Tafel) bereitgestellt wurden. Kontrollvektor und Wildtyp reichern sich im retikulo-endothelialen System der Leber und der Milz an. AAV2-ESGHYGF akkumuliert ausschließlich in der Lunge. B: Vergleich der Verteilung von AAV2-Wildtyp, Kontrollvektor AAV2-CVGSPCG und AAV2-ESGHYGF in Leber (obere Tafel), Milz (mittlere Tafel) und Lunge (untere Tafel). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. One-Way ANOVA.  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$  für  $n=3$ .

### **BEISPIELE**

Alle Daten wurden als Mittelwerte + Standardabweichung (SD) bestimmt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des GraphPad Prism Programms 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die Daten wurden durch Einweg-Anova, gefolgt von multiplen Vergleichstests nach Bonferoni analysiert. P-Werte  $> 0,05$  wurden als signifikant erachtet.

#### **Beispiel 1: Selektion von AAV2-Peptidbibliotheken**

Um gewebespezifische AAV2-Kapside zu selektieren, wurde eine Zufalls-Display-Peptidbibliothek hergestellt und über vier Runden selektiert. Eine zufallsbasierte X<sub>7</sub>-AAV-Peptidbibliothek mit einer theoretischen Diversität von  $1 \times 10^8$  einzeln vorkommenden Klonen wurde unter Verwendung eines zweistufigen Protokolls hergestellt, wie es zuvor beschrieben wurde [26-27]. Es wurde zunächst ein degeneriertes Oligonukleotid hergestellt, das für sieben zufällig angeordnete Aminosäuren an der Nukleotidposition 3967 im AAV-Genom kodiert, was der Aminosäureposition R588 in VP1 entspricht. Das Oligonukleotid hatte die Sequenz: 5' - CAGTCGCCAGAGAGGC(NNK),GCCCAGGCGGCTGACGAG - 3' (SEQ ID NO:11). Der zweite Strang wurde unter Verwendung einer Sequenase (Amersham, Freiburg, Deutschland) und des Primers mit

- 26 -

der Sequenz 5'-CTCGTCAGCCGCCTGG-3' (SEQ ID NO:12) hergestellt. Das doppelsträngige Insert wurde mit BglI geschnitten, mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und in das mit SfiI verdaute Bibliothek-Plasmid pMT187-0-3 ligiert [26]. Die Diversität des Plasmid-Bibliothek wurde anhand der Anzahl von Klonen bestimmt, die ausgehend von einem repräsentativen Aliquot von transformierten, elektrokompenten DH5 $\alpha$ -Bakterien auf Agar wuchsen, der 150 mg/ml Ampicillin enthielt. Bibliothek-Plasmide wurden geerntet und unter Verwendung des Plasmid Preparation Kit von Qiagen aufgereinigt. Die AAV-Bibliothek-Genome wurden in chimäre Wildtyp- und Bibliothek-AAV-Kapside (AAV-Transfer-Shuttle) verpackt, indem  $2 \times 10^8$  293T-Zellen in 10 Zellkulturschalen (15 cm) mit dem Plasmid pVP3cm (enthält das Wildtyp-Cap-Gen mit modifizierter Kodonnutzung ohne die terminalen inverted repeats) [27], dem Bibliothek-Plasmiden und dem pXX6-Helferplasmid [28] transfiziert wurden, wobei das Verhältnis zwischen den Plasmiden 1:1:2 betrug. Die resultierenden AAV-Bibliothek-Transfer-Shuttle wurden dazu verwendet,  $2 \times 10^8$  293T-Zellen in Zellkulturschalen (15 cm) bei einer MOI von 0,5 replikativen Einheiten pro Zelle zu infizieren. Die Zellen wurden mit Ad5 (bereitgestellt durch das Laboratoire des Thérapie Génique, Frankreich) bei einer MOI von 5 Plaque-bildenden Einheiten (pfu/Zelle) superinfiziert. Die finale AAV-Display-Bibliothek wurde nach 48 Stunden aus den Überständen geerntet. Die Überstände wurden unter Verwendung von VivaSpin-Säulen (Viva Science, Hannover, Deutschland) aufkonzentriert und durch Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wie zuvor beschrieben [29] aufgereinigt und durch real-time-PCR unter Verwendung der cap-spezifischen Primer 5' - GCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACC - 3' (SEQ ID NO:13) und 5' - GCCTGGAAGAACGCCTTGTGTG - 3' (SEQ ID NO:14) mit dem LightCycler-System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) titriert.

- 27 -

Für das Biopanning *in vivo* wurden  $1 \times 10^{11}$  Partikel der genomischen Bibliothek in die Schwanzvene von FVB/N-Mäusen injiziert. Den Partikeln wurde 8 Tage Zeit für die Verteilung und die Infektion der Zielzellen gegeben. Nach 8 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Lungen wurden entfernt. Die Gesamt-DNA des Gewebes wurde unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits (Qiagen) extrahiert. Die Zufallsoligonukleotide, die in AAV-Partikeln der Bibliothek enthalten waren und sich in dem Gewebe von Interesse angereichert hatten, wurden durch Nested-PCR unter Verwendung der Primer 5'-ATGGCAAGCCACAAGGACGATG-3' (SEQ ID NO:15) und 5'-CGTGGAGTACTGTGTGATGAAG-3' (SEQ ID NO:16) für die erste PCR und den Primern 5'-GGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAG-3' (SEQ ID NO:17) und 5'-TGATGAGAATCTGTGGAGGAG-3' (SEQ ID NO:18) für die zweite PCR amplifiziert. Die mittels PCR amplifizierten Oligonukleotide wurden verwendet, um sekundäre Bibliothek für drei weitere Selektionsrunden herzustellen. Die sekundären Bibliotheken wurden wie die primären Bibliotheken erzeugt (siehe oben), jedoch ohne den zusätzlichen Schritt der Herstellung von Transfer-Shutteln. Die sekundäre Plasmid-Bibliothek wurde verwendet, um  $2 \times 10^8$  293T-Zellen in Zellkultur-schalen (15 cm) bei einem Verhältnis von 25 Bibliothek-Plasmiden pro Zelle zu transfizieren, wobei das Transfektionsmittel Polyfect (Qiagen) verwendet wurde. Nach jeder Selektionsrunde wurden einige Klone sequenziert. Das angewendete Selektionsverfahren ist in Fig. 1 abgebildet.

Ergebnisse: Nach vier Selektionsrunden wurden insgesamt 9 Klone sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass 5 Klone die Peptidsequenz ESGHGYF (SEQ ID NO:2) aufwiesen. Weitere Klone zeigten die Peptidsequenzen ADGVMWL (SEQ ID NO:3), GEVYVSF (SEQ ID NO:4) und NNVRTSE (SEQ ID NO:5). Drei der vier Peptidsequenzen, einschließlich des dominanten Klons ESGHGYF, sowie auch ADGVMWL und GEVYVSF zeigten mindestens einen hydrophoben aromatischen Rest. Die in den verschiedenen Selektionsrunden gewonnenen Peptide sind in Fig. 2 gezeigt.

**Beispiel 2: Herstellung und Quantifizierung rekombinanter AAV-Vektoren**

Die in Beispiel 1 angereicherten Klone wurden als rekombinante AAV-Vektoren hergestellt und auf ihr Transduktionsprofil untersucht. Rekombinante AAV-Vektoren wurden durch dreifache Transfektion von HEK293T-Zellen erzeugt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA), das mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum supplementiert war, angezüchtet. Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsmittel Polyfect (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 293T-Zellen transfiziert. Vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Vektoren wurden mittels Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt, wie es zuvor beschrieben wurde [29]. Für die Transfektionen wurde pXX6 als adenovirales Helfer-Plasmid [28], das Luciferase-Gen pUF2-CMV-luc [27] oder das GFP-Gen pTR-CMV-GFP [30], sowie ein Plasmid, das für das AAV-Kapsid von Interesse kodiert, verwendet. Plasmide, die für die AAV-Kapsid-Mutanten kodierten, welche zuvor aus der AAV-Bibliothek selektiert worden waren, und Wildtyp-Kontrollen waren modifiziertes pXX2-187 [31] bzw. pXX2 [28]. Für ein Alanin-Scanning wurden ferner Oligonukleotid-Inserts hergestellt, die für modifizierte Varianten des Peptids ESGHGYF kodieren. Die Inserte wurden wie beschrieben zu Bibliothek-Inserts verarbeitet (siehe oben). Für die Quantifizierung der rekombinanten Vektoren wurden die genomischen Titer durch quantitative real-time PCR unter Verwendung der CMV-spezifischen Primer 5' - GGCGGAGTTGTTACGACAT - 3' (SEQ ID NO:19) und 5' - GGGACTTTCCCTACTTGGCA - 3' (SEQ ID NO:20) mit dem LightCycler-System bestimmt, wie es zuvor beschrieben wurde [32].

**Beispiel 3: Untersuchung des Tropismus der rekombinanten AAV-Vektoren in vivo**

Um den Tropismus der angereicherten Peptide *in vivo* untersuchen zu können, wurden die Peptide in das Kapsid eines rekombinanten Vektors eingebracht, der ein Luciferase-Reporter-Gen umfasst. Vektoren mit mutierten Kapsiden sowie Kontrollvektoren wurden in Mäuse injiziert. Die AAV-Vektoren wurden intravenös in einer Dosis von  $5 \times 10^{10}$  Vektorgenomen (vg)/Maus verabreicht (n=3 Tiere pro injiziertem AAV-Klon). Am Tag 14 wurden die Tiere mit Isofluran betäubt. Die Luciferase-Expression wurde unter Verwendung eines Xenogen IVIS200-Imaging Systems (Caliper Lifescience, Hopkinton, USA) mit der Software Living Image 4.0 (Caliper) nach intraperitonealer Injektion von 200 µl Luciferin-Substrat (150 mg/kg, Xenogen) pro Maus analysiert. Es wurden repräsentative *in vivo* Biolumineszenz-Abbildungen der Expression des Transgens an unterschiedlichen Positionen (ventral, dorsal, lateral) aufgenommen, wenn die Lumineszenz in relativen Lichteinheiten (Photonen/Sek/cm<sup>2</sup>) die höchste Intensität erreichte. Anschließend wurden die Tiere getötet, die Organe von Interesse wurden schnell entfernt, und Abbildungen der Expression des Transgens in einzelnen Organen wurden sofort aufgenommen. Anschließend wurden die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Dreidimensionale Rekonstruktionen der *in vivo* Lumineszenz-Abbildungen wurden erhalten, indem man die DLIT-Option der Software Living Image 4.0 verwendete und das emittierte Licht in 5 verschiedenen Wellenlängen von 560-640 nm für jeweils drei Minuten gemessen wurde. Um die Luciferase-Expression zu quantifizieren wurden die Organe in Reporter-Lysepuffer (RLB, Promega, Madison, USA) homogenisiert. Die Bestimmung der Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität wurde in ein Luminometer (Mithras LB9 40, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) in 10-Sekunden Intervallen nach Zugabe von 100 µm Luciferase-Assay-Reagenz (LAR, Promega) durchgeführt, wobei zwischen den

Messungen jeweils 2 Sekunden Verzögerung bestand. Die Werte wurden in Bezug auf die Gesamtproteinmenge in jeder Probe normalisiert, wobei der Roti Nanoquant-Proteinassay (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet wurde.

Ergebnisse: Es wurde herausgefunden, dass die Ausbeute in Bezug auf die Vektor-Titer bei rekombinanten Vektoren mit Luciferase-Reporter-Gen vergleichbar zu Vektoren war, die ein Wildtyp-AAV2-Kapsid trugen, was darauf schließen ließ, dass die angereicherten Peptide den Zusammenbau des Kapsids oder die Verpackung des Gens nicht negativ beeinflussen. Die *in vivo* Messung der Biolumineszenz nach 14 Tagen ergab, dass das Peptid ESGHGYF für eine starke und lungenspezifische Expression des Transgens sorgte ( $\leq 10^5$  p/sek/cm<sup>2</sup>/r). Diese Ergebnisse wurden durch die *ex vivo* durchgeführten Kontrollversuche mit explantierten Organen bestätigt. Ein auf Zufallsbasis ausgewählter Kontrollklon der nicht-selektierten Bibliothek (CVGSPCG) führte zu einer schwachen Gen-Expression, die vornehmlich im Herz und an einigen Stellen des Abdomens auftrat, nicht jedoch in der Lunge. Wildtyp-AAV2 verursachte eine schwache Gen-Expression in Herz, Leber und Skelettmuskel, nicht jedoch in der Lunge. Eine dreidimensionale Rekonstruktion der Biolumineszenz-Abbildungen bestätigte die lungenspezifische Expression. Das Peptid ADGVMWL (SEQ ID NO:3), das ebenfalls während der *in vivo* Selektion angereichert wurde, führte auch zu einer lungenspezifischen Expression des Transgens, die jedoch schwächer war als beim Peptid ESGHGYF. Während die Gen-Expression 14 Tage nach Verabreichung des ADGVMWL-Luciferase-Vektors sehr gering war, stieg sie auf etwa  $5 \times 10^4$  p/sek/cm<sup>2</sup>/r an und konnte 28 Tage nach Vektorinjektion spezifisch in der Lunge beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden durch die *ex vivo* durchgeführten Kontrollversuche mit explantierten Organen bestätigt. Die Untersuchung der Luciferase-Aktivität von Gewebelysaten aus repräsentativen Organen ergab, dass Wildtyp-AAV2 im Herz eine geringe Gen-Expression verursachte ( $2,9 \times 10^4$  RLU/mg



Protein, siehe Fig. 3A, obere Tafel) und noch geringere Expressionswerte in anderen Organen. Das Kontrollpeptid CVSGPCG vermittelte eine moderate Gen-Expression im Herz ( $8,7 \times 10^4$  RLU/mg Protein, siehe Fig. 3A, mittlere Tafel). Im Gegensatz dazu führten Vektoren, die das lungenspezifische ESGHGYF-Kapsid aufwiesen, zu einer starken und spezifischen Gen-Expression in der Lunge ( $4,1 \times 10^5$  RLU/mg Protein, siehe Fig. 3A, untere Tafel). Im Herz und in der Leber (d.h. in den beiden Organen, in denen Wildtyp-AAV2 und der Peptidvektor CVGSPCG zu einer starken Expression führen) zeigten die lungenspezifischen ESGHGYF-Vektoren lediglich eine Expression im Bereich des Hintergrundsignals (etwa  $1 \times 10^3$  RLU/mg Protein). Im Gegensatz dazu war die Expression des Transgens in der Lunge bei den ESGHGYF-Vektoren mehr als 200-fach höher als die Expression, die durch Wildtyp-AAV2 oder durch die CVGSPCG-Kontrollvektoren vermittelt wurden (siehe Fig. 3B).

Die Ergebnisse zeigten ferner, dass die durch die den ESGHGYF-Vektoren vermittelte lungenspezifische Expression des Transgens auch über einen langen Zeitraum organspezifisch blieb. Nach intravenöser Verabreichung der lungenspezifischen AAV2-ESGHGYF-Luciferasevektoren wurde die Expression des Transgens über einen Zeitraum von 164 Tagen gemessen. Die im Bereich der Lunge emittierte Strahlung wurde dabei quantitativ erfasst. Über den gesamten Zeitraum hinweg erfolgte die Expression des Transgens stabil auf hohem Niveau, und sie war auf die Lunge beschränkt. Die geringste Expression in der Lunge wurde am Tag 7 gemessen, ein Peak wurde am Tag 42 erreicht, und die Strahlung nahm bis zur letzten Messung am Tag 164 nur langsam ab (Fig. 4).

#### **Beispiel 4: Alanin-Scanning beim Peptid ESGHGYF**

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren in dem Peptid ESGH-GYF in Bezug auf die Lungenspezifität zu untersuchen, wurde ein Alanin-Scanning durchgeführt.

Ergebnisse: Es wurde festgestellt, dass durch Austausch der ersten beiden Aminosäuren der Lungen-spezifische Tropismus nicht verändert wurde. Wurden hingegen die Aminosäuren 3-4 oder 5-7 ausgetauscht, so kam es entweder zu einem Totalverlust der Infektionsfähigkeit (Position 3 oder 4) oder zu einer Veränderung der Spezifität zu Herz oder Skelettmuskel (Positionen 5-7).

#### **Beispiel 5: Analyse der Vektor-Verteilung**

Um nachzuprüfen, ob die Lungenspezifische Expression des Transgens von intravenös injizierten ESGHGYF-Vektoren auf einem lungenspezifischen Homing basiert, wurde zunächst die Verteilung der Vektoren vier Stunden nach intravenöser Verabreichung von  $5 \times 10^{10}$  gp/Maus untersucht. Die Quantifizierung der Vektorgenome erfolgte durch real-time PCR. Zunächst wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Verabreichung von  $5 \times 10^{10}$  vg/Maus die Gesamt-DNA aus dem betreffenden Organ unter Verwendung eines Gewebehomogenisators (Precellys 24, Peqlab, Erlangen, Deutschland) und des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde unter Verwendung eines Spektralphotometers (Nanodrop ND-2000C, Peqlab) quantifiziert. Die Analyse der AAV-Vektor-DNA in den Geweben wurde durch quantitative real-time PCR unter Verwendung der zuvor beschriebenen CMV-spezifischen Primer durchgeführt, wobei 40 ng Template verwendet wurden, die in Bezug auf die Gesamt-DNA normalisiert wurden.

Ergebnisse: Die Quantifizierung der Vektorgenome durch real-time PCR zeigte ein lungenspezifisches Homing von ESGHGYF. Die Menge an Vektorgenomen, die in der Lunge nachgewiesen werden konnten ( $3,8 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$  vg/100ng Gesamt-DNA) war etwa 6-100fach höher als die Menge an Vektorgenomen, die in einem anderen Organ nachgewiesen wurde (Fig. 5A). Um die direkte Korrelation zwischen Vektor-Homing und Expression des Transgens zu ermitteln, wurde die Vektorverteilung von Wildtyp-AAV2, des Kontrollpeptids CVGSPCG und des lungenspezifischen Peptids ESGHGYF 14 Tage nach intravenöser Verabreichung von  $5 \times 10^{10}$  gp/Maus gemessen, d.h. zu dem Zeitpunkt, an dem die Expression des Transgens bestimmt wurde (siehe oben). Die von Wildtyp-AAV2-Vektoren bereitgestellten Genome konnten hauptsächlich aus Leber und Milz gewonnen werden, wobei auch die Genome von Vektoren, die das Kontrollpeptid aufwiesen, hauptsächlich aus der Milz gewonnen wurden. Insgesamt waren die Menge an Vektorgenomen, die in der Milz nachgewiesen wurden, bei allen untersuchten Kapsid-Varianten verhältnismäßig gleich ( $4 \times 10^3$  vp/100 ng Gesamt-DNA), was auf einen unspezifischen Aufnahmemechanismus für die Partikel im retikulo-endothelialen System weist, der unabhängig von der Bereitstellung und der Expression des Transgens ist. Im Gegensatz dazu ähneln die Verteilungsdaten von Genomen, die durch Vektoren bereitgestellt wurden, welche das lungenspezifische Peptid ESGHGYF aufwiesen, stark den Expressionsdaten des Transgens, wobei eine hochspezifische Anreicherung in der Lunge beobachtet werden kann. Die Menge von in der Lunge nachgewiesenen Vektoren, die das Peptid ESGHGYF zeigten, war etwa 250-fach höher als in anderen Organen und bis zu 500-fach höher als in Lungen, denen ein Wildtyp-Vektor oder ein Kontroll-Kapsid-Vektor injiziert wurde (Fig. 5B). Dieselben Verteilungswerte zwischen den Organen wurden 28 Tage nach Vektorverabreichung nachgewiesen. Der direkte Vergleich der Mengen der nachgewiesenen Genome zwischen den drei Vektor-Kapsid-Varianten ist in Fig. 5C für die drei Gewebe gezeigt, in denen relevante Mengen Vektor-DNA detek-

tiert werden konnte. Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine lungenspezifische Expression des Transgens, die durch ESGHGYF-Vektoren vermittelt wird, durch ein Gewebe-spezifisches Homing von zirkulierenden Partikeln erreicht wird.

#### **Beispiel 6: Immunhistochemie und Histologie**

Es wurde eine Immunhistochemie durchgeführt, um 14 Tage nach intravenöser Verabreichung des rAAV-GFP-Vektors, der das Peptid ESGHGYF aufweist, bzw. des Wildtyp-AAV-Kapsids als Kontrolle die Expression des Transgens auf zellulärer Ebene in der Lunge sowie in einem Kontroll-Organ sichtbar zu machen. Die Lungen der Tiere wurden ex situ mit 4% (w/v) Paraformaldehyd über die Luftröhre unter hydrostatischem Druck einer 20 cm Wassersäule für 20 Minuten fixiert, gefolgt von 24 Stunden Immersion im selben Fixierungsmittel. Die Lungengewebe wurden in Paraffin eingebettet. Schnitte einer Stärke von 2 µm wurden von Wachs entfernt, rehydratisiert und für die Immunhistochemie verwendet. Die Immunhistochemie wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen GFP (A-11122, Invitrogen) oder CD31 (AB28364, Abcam, Cambridge, USA) durchgeführt. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 Minuten inaktiviert. Vor der Färbung mit CD31 wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) für 20 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten mit PBS, 10% Ziegen Serum (Vector Lab, Burlingame, USA) und 2% Milchpulver (Roth) inkubiert. Primären Antikörpern wurde es erlaubt, für 1 Stunde bei 37°C zu binden. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einem sekundären, biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (Vector Lab) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden unter Verwendung des VECTASTAIN-Elite-ABC-Kits (Vector Lab) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) visualisiert. Ausgewählte Schnitte wurden mit Hemalum gegengefärbt.

Ergebnisse: In Lungen von Mäusen, denen rAAV-ESGHGYF injiziert wurde, ergab eine mikroskopische Untersuchung eine intensive Färbung der Endothelzellen über die gesamte pulmonale Mikrovaskulatur hinweg und in einem geringfügig geringeren Ausmaß in den großen pulmonalen Gefäßen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte pulmonales Gewebe von Mäusen, denen Wildtyp-AAV2-Vektor injiziert wurde, keine Färbung. Um die Gewebespezifität zu bestätigen, wurde die Leber als Kontrollorgan analysiert (ein Gewebe, von dem bekannt ist, dass es häufig eine hohe Expression eines Transgens nach Injektion von Wildtyp-AAV2-Vektor zeigt. In der Leber wurde eine Färbung von Hepatozyten nach der Verabreichung von Wildtyp-AAV2-Vektor beobachtet, jedoch keine Färbung nach Verabreichung des rAAV2-ESGHGYF-Vektors. Die endotheliale Abstammung der mit den Vektoren transduzierten pulmonalen Zellen wurde durch CD31-Färbung bestätigt, wobei das durch die GFP-Färbung erhaltene Muster in seriellen Schnitten der Lunge von Mäusen, denen rAAV2-ESGHGYF injiziert wurde, bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

**LITERATURLISTE**

- [1] Barst et al., 2004, J Am Coll Cardiol, 43: 40-47
- [2] McLaughlin et al., 2009, Circulation, 119: 2250-2294
- [3] Stenmark et al., 2009, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 297: 1013-1032
- [4] Friedman et al., 2012, J Obes, 2012: 505274
- [5] Chin et al., 2005, Coron Artery Dis, 16: 13-18.
- [6] Hemnes et al., 2008, Int J Clin Pract Suppl: 11-19
- [7] Humbert et al., 2009, Am J Respir Crit Care Med, 179: 650-656
- [8] Simonneau et al., 2009, J Am Coll Cardiol, 54: 43-54
- [9] Humbert et al., 2006, Am J Respir Crit Care Med, 173: 1023-1030
- [10] Tenenbaum et al., 2003, Curr Gene Ther, 3:545-565
- [11] Work et al., 2006, Mol Ther, 4:683-693
- [12] Shi et al., 2006, Hum Gene Ther, 17:353-361
- [13] US 2007/0172460 A1
- [14] Michelfelder et al., 2009, PLOS One, 4(4):e5122
- [15] Shi and Bartlett, 2003, Mol Ther, 7:515-525
- [16] Loiler et al., 2003, Gene Ther, 10:1551-1558
- [17] Rabinowitz et al., 1999, Virology, 265:274-285
- [18] Wu et al., 2000, J Virol, 74:8635-8647
- [19] Shi et al., 2001, Hum Gene Ther, 12:1697-1711
- [20] Warrington et al., 2004, J Virol, 78:6595-6609
- [21] Girod et al., 1999, Nat Med, 5:1052-1056
- [22] Grifman et al., 2001, Mol Ther, 3:964-975
- [23] Opie et al., 2003, J Virol, 77:6995-7006
- [24] Kern et al., 2003, J Virol, 77:11072-11081
- [25] Russell et al., 1998, J Virol, 72:309-319)
- [26] Müller et al., 2003, Nat Biotechnol 21, 1040 - 1046
- [27] Waterkamp, et al., 2006, J Gene Med 8, 1307-1319
- [28] Xiao et al., 1998, Journal of Virology 72, 2224 - 2232
- [29] Zolotukhin, et al., 1999, Gene Ther 6, 973 - 985
- [30] McCarty et al., 2001, Gene Ther 8, 1248 - 1254
- [31] Michelfelder, et al., 2007, Exp Hematol 35, 1766 - 1776
- [32] Rohr et al., 2005, J Virol Methods 127, 40 - 45

**PATENTANSPRÜCHE**

1. Peptid, Polypeptid oder Protein, das spezifisch an Zellen der Lunge bindet, dadurch gekennzeichnet, dass es die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 umfasst.
2. Peptid, Polypeptid oder Protein nach Anspruch 1, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst oder eine Variante davon, die sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 durch Modifikation von mindestens einer der beiden N-terminalen Aminosäure unterscheidet.
3. Protein, das nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich um ein Kapsid-Protein eines viralen Vektors handelt.
4. Protein nach Anspruch 3, wobei es sich um ein Kapsid-Protein eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) handelt.
5. Protein nach Anspruch 4, wobei es sich um ein Kapsid-Protein eines AAV von einem Serotyp ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den 2, 4, 6, 8 und 9 handelt.
6. Protein nach Anspruch 5, wobei es sich um ein Kapsid-Protein eines AAV vom Serotyp 2 handelt.
7. Protein nach Anspruch 6, wobei es sich um das VP1-Protein eines AAV vom Serotyp 2 handelt.
8. Protein nach einem der Ansprüche 1-7, wobei das Peptid im Bereich der Aminosäuren 550-600 des Kapsids vorliegt.
9. Protein nach einem der Ansprüche 1-8, das folgendes umfasst:
  - (a) die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:9;
  - (b) eine Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Identität zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:9 aufweist; oder

- 38 -

- (c) ein Fragment von einer der in (a) oder (b) definierten Aminosäuresequenzen.
10. Virales Kapsid, das ein Peptid, Polypeptid oder Protein nach einem der Ansprüche 1-9 umfasst.
  11. Nukleinsäure, die für ein Peptid, Polypeptid oder Protein nach einem der Ansprüche 1-9 kodiert.
  12. Plasmid, das eine Nukleinsäure nach Anspruch 11 umfasst.
  13. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Kapsid und ein darin verpacktes Transgen umfasst, wobei das Kapsid mindestens ein Kapsid-Protein umfasst, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder eine Variante davon umfasst, die sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 durch Modifikation von mindestens einer der beiden N-terminalen Aminosäure unterscheidet.
  14. Rekombinanter viraler Vektor nach Anspruch 13, wobei es sich um einen rekombinanten AAV-Vektor handelt.
  15. Rekombinanter AAV-Vektor nach Anspruch 14, wobei es sich um einen AAV-Vektor eines Serotyps ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Serotypen 2, 4, 6, 8 und 9 handelt.
  16. Rekombinanter AAV-Vektor nach Anspruch 15, wobei es sich um einen AAV-Vektor vom Serotyp 2 handelt.
  17. Rekombinanter AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 13-16, wobei das Transgen für eine Stickstoffmonoxidsynthase oder für den Bone-Morphogenic-Protein-Rezeptor 2 (BMP2) kodiert.
  18. Rekombinanter AAV-Vektor nach Anspruch 17, wobei das Transgen für die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase



- 39 -

(eNOS) oder die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) kodiert.

19. Rekombinanter AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 13-18, wobei das Transgen in Form einer ssDNA oder einer dsDNA vorliegt.
20. Rekombinanter AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 13-19 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Lungenerkrankung in einem Subjekt.
21. Rekombinanter AAV-Vektor zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Lungenerkrankung eine pulmonale Hypertonie oder eine pulmonal-arterielle Hypertonie ist.
22. Rekombinanter AAV-Vektor zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 20-21, wobei das Subjekt ein Säugetier, vorzugsweise ein Mensch ist.
23. Rekombinanter AAV-Vektor zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 20-22, wobei der Vektor für die intravenöse Verabreichung formuliert ist.
24. Zelle, die ein Peptid, Polypeptid oder Protein nach einem der Ansprüche 1-9, ein virales Kapsid nach Anspruch 10, eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 11, ein Plasmid nach Anspruch 12, oder einen rekombinanten AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 13-19 umfasst.
25. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Peptid, Polypeptid oder Protein nach einem der Ansprüche 1-9, ein virales Kapsid nach Anspruch 10, eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 11, ein Plasmid nach Anspruch 12, oder einen rekombinanten AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 13-19 umfasst.

- 40 -

26. Verwendung eines Peptids, Polypeptids oder Proteins nach einem der Ansprüche 1-9, eines viralen Kapsids nach Anspruch 10, einer Nukleotidsequenz nach Anspruch 11, eines Plasmids nach Anspruch 12 oder eines rekombinanten AAV-Vektors nach einem der Ansprüche 13-19 zur Behandlung einer Lungenfunktionsstörung oder einer Lungenerkrankung in einem Subjekt.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei die Lungenerkrankung eine pulmonale Hypertonie oder eine pulmonal-arterielle Hypertonie ist.

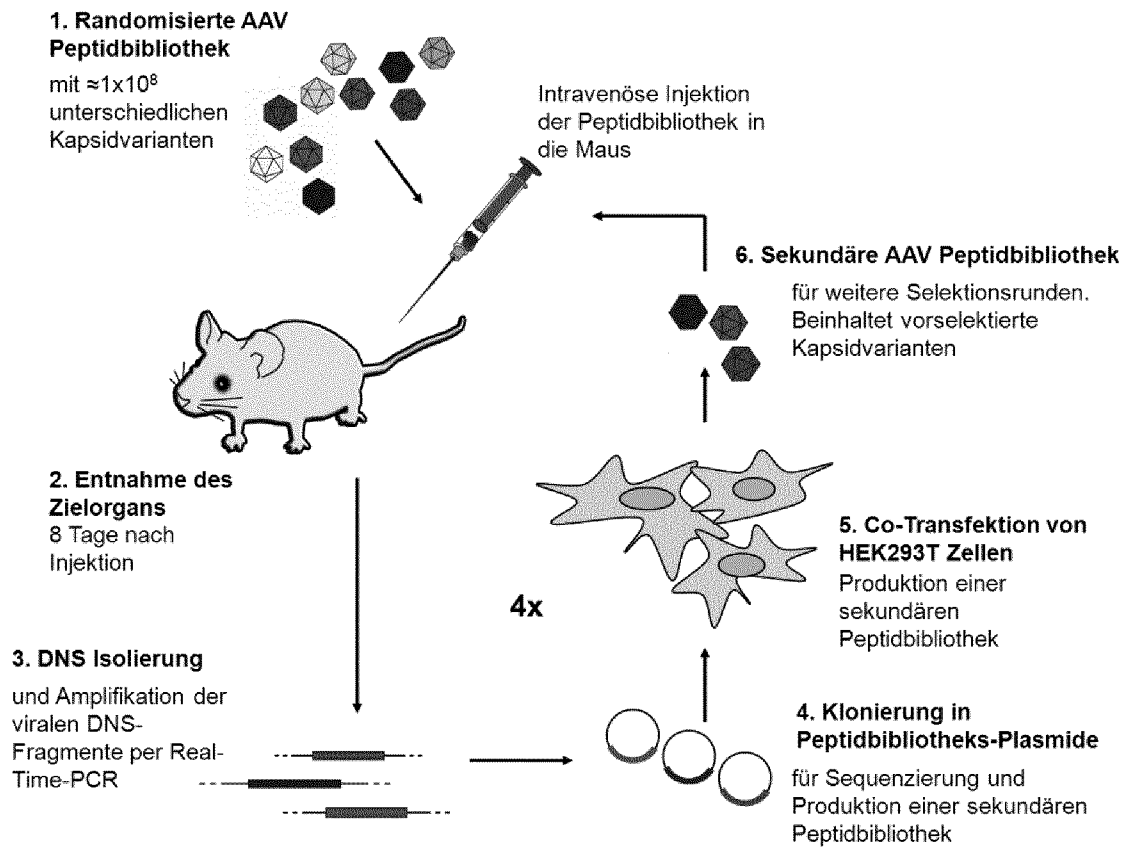


Fig. 1

<u>1. Runde</u>	<u>2. Runde</u>	<u>3. Runde</u>	<u>4. Runde</u>
GQIGGSA	NDVRAVS	ADGVMWL	ADGVMWL
GQIGGSA	NDVRAVS	EGRLGAG	ADGVMWL
LTRAAGV	NQVGSXS	EGRLGAG	ESGHGYF
VPWSPSV	NSVAATA	EGRLGAG	ESGHGYF
	NSVAATA	ESGHGYF	ESGHGYF
	PRTLAEI	GGRPMHE	ESGHGYF
	TLREQSP	NSVNDRS	ESGHGYF
		PRSDLS	GEVYVSF
		RGDVTKE	NNVRTSE
		QDGLGLS	

Fig. 2

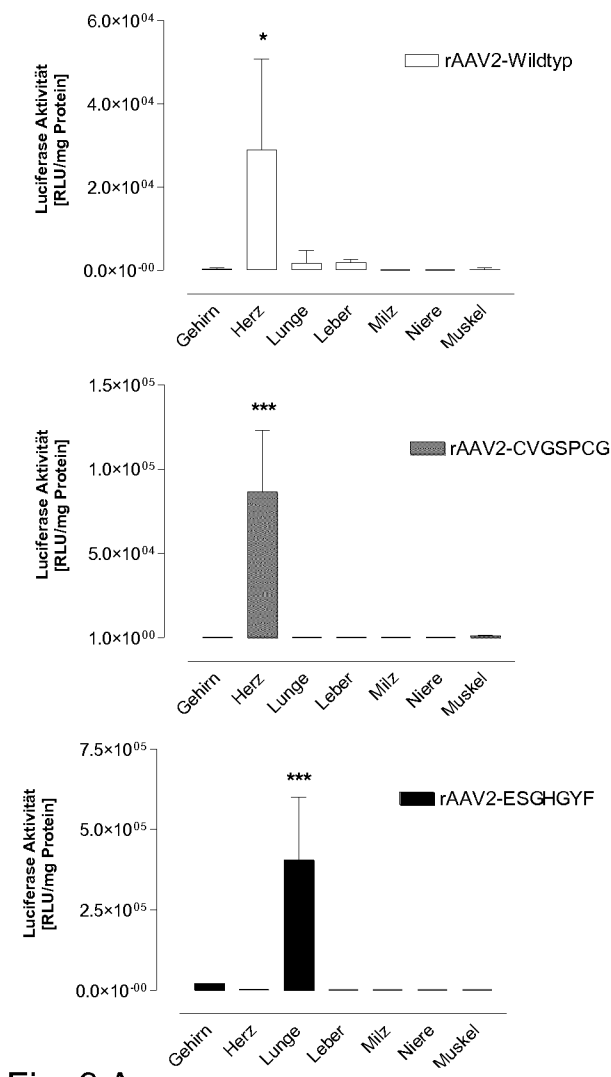


Fig. 3 A

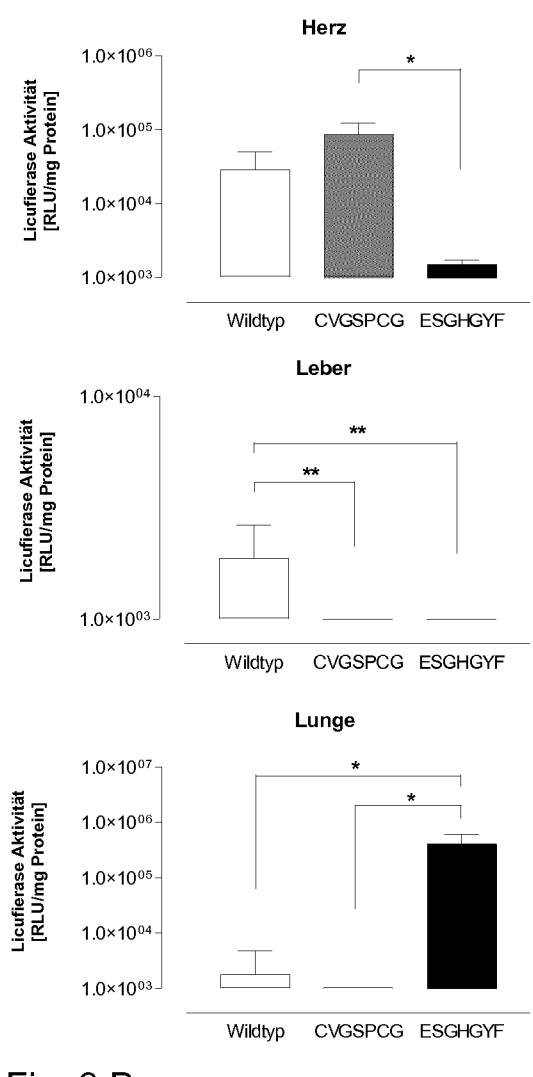


Fig. 3 B

3/4

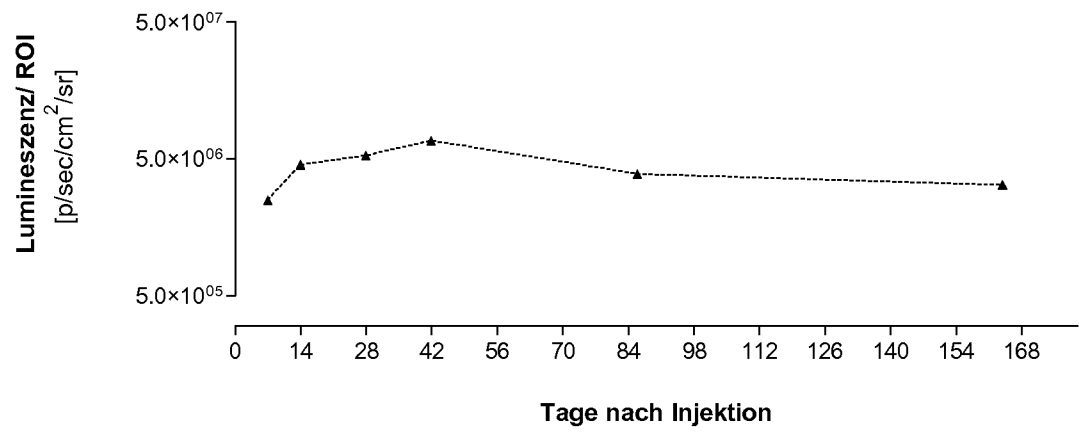


Fig. 4

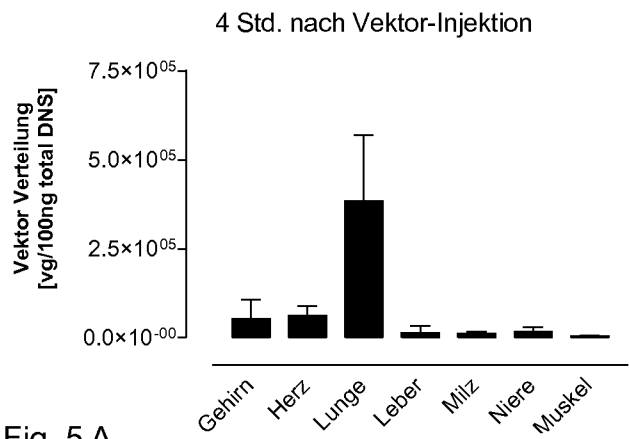


Fig. 5 A

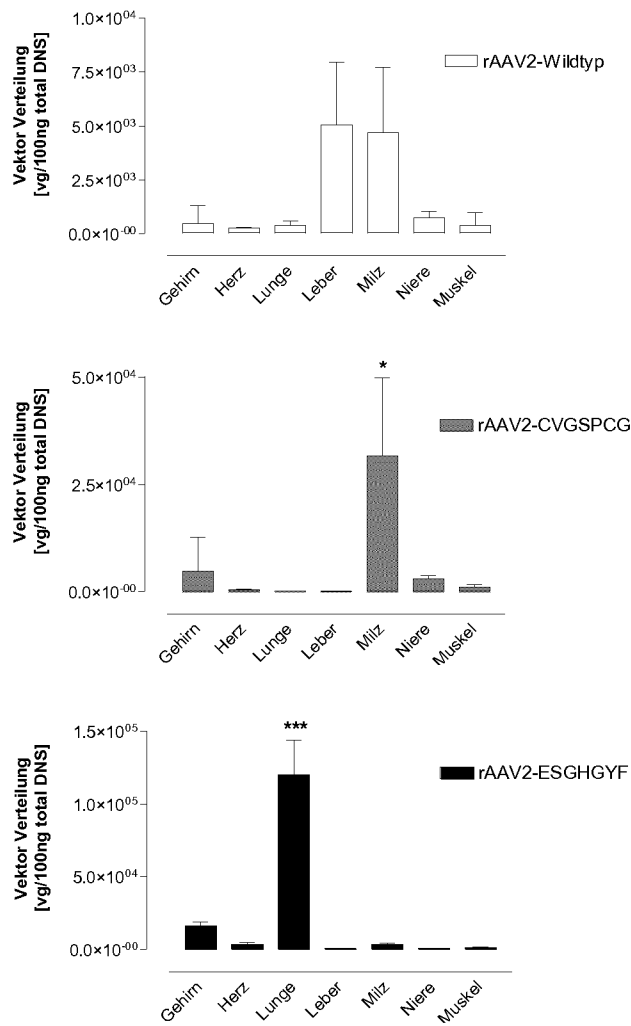


Fig. 5 B

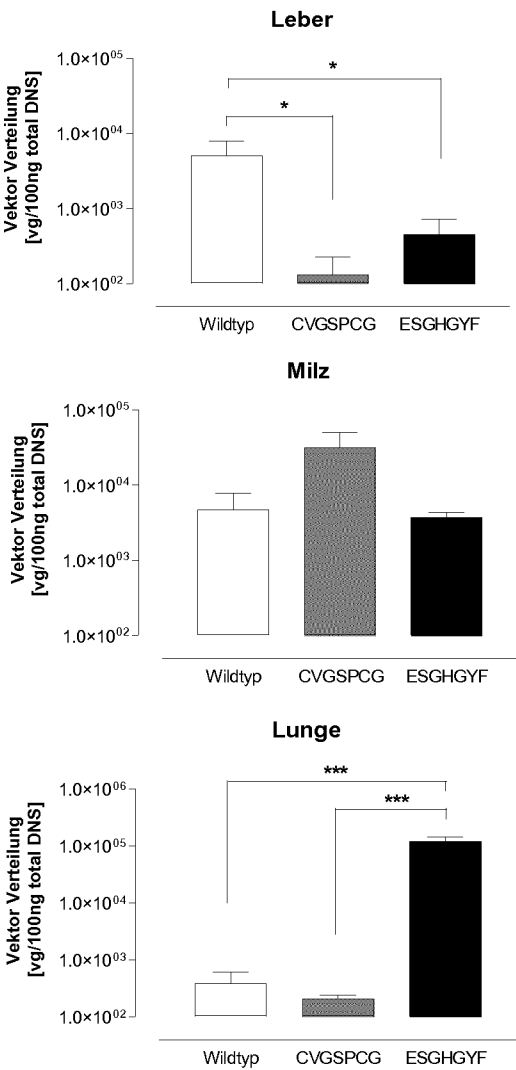


Fig. 5 C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/066892

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/066892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N15/86 C12N15/10  
ADD. A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>13 September 2005 (2005-09-13), "RecName: Full=Sugar fermentation stimulation protein homolog;", XP002731555, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q47W67 Database accession no. Q47W67 sequence</p> <p>----- -/--</p>	1,2,11, 12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2014

Date of mailing of the international search report

05/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lewis, Birgit



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/066892

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEFAN MICHELFELDER ET AL: "Peptide Ligands Incorporated into the Threefold Spike Capsid Domain to Re-Direct Gene Transduction of AAV8 and AAV9 In Vivo", PLOS ONE, vol. 6, no. 8, 5 August 2011 (2011-08-05), page e23101, XP055147101, DOI: 10.1371/journal.pone.0023101 figure 1 page e23101, left-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>Y YING ET AL: "Heart-targeted adeno-associated viral vectors selected by in vivo biopanning of a random viral display peptide library", GENE THERAPY, vol. 17, no. 8, 15 April 2010 (2010-04-15), pages 980-990, XP055147105, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2010.44 the whole document</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>STEFAN MICHELFELDER ET AL: "Successful Expansion but Not Complete Restriction of Tropism of Adeno-Associated Virus by In Vivo Biopanning of Random Virus Display Peptide Libraries", PLOS ONE, vol. 4, no. 4, 9 April 2009 (2009-04-09), page e5122, XP055147203, DOI: 10.1371/journal.pone.0005122 abstract page e5122, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>WO 2004/083441 A2 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; KLEINSC) 30 September 2004 (2004-09-30) figure 1 page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 1 page 7, paragraph 2 - page 8, paragraph 1 page 9, last paragraph - page 10, paragraph 1 examples 1-4; table 4</p> <p>-----</p>	1-27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/066892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004083441 A2	30-09-2004	US 2007172460 A1 WO 2004083441 A2	26-07-2007 30-09-2004
-----			

**Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)**

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a. (Form)
- ☐ in Papierform
- ☒ in elektronischer Form
- b. (Zeitpunkt)
- ☒ in der eingereichten internationalen Anmeldung
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
- ☐ bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12N15/86 C12N15/10

ADD. A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12N A61K C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>13. September 2005 (2005-09-13),  "RecName: Full=Sugar fermentation  stimulation protein homolog;",  XP002731555,  gefunden im EBI accession no.  UNIPROT:Q47W67  Database accession no. Q47W67  Sequenz</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1,2,11, 12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Oktober 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lewis, Birgit

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>STEFAN MICHELFELDER ET AL: "Peptide Ligands Incorporated into the Threefold Spike Capsid Domain to Re-Direct Gene Transduction of AAV8 and AAV9 In Vivo", PLOS ONE, Bd. 6, Nr. 8, 5. August 2011 (2011-08-05), Seite e23101, XP055147101, DOI: 10.1371/journal.pone.0023101 Abbildung 1 Seite e23101, linke Spalte, letzter Absatz</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>Y YING ET AL: "Heart-targeted adeno-associated viral vectors selected by in vivo biopanning of a random viral display peptide library", GENE THERAPY, Bd. 17, Nr. 8, 15. April 2010 (2010-04-15), Seiten 980-990, XP055147105, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2010.44 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>STEFAN MICHELFELDER ET AL: "Successful Expansion but Not Complete Restriction of Tropism of Adeno-Associated Virus by In Vivo Biopanning of Random Virus Display Peptide Libraries", PLOS ONE, Bd. 4, Nr. 4, 9. April 2009 (2009-04-09), Seite e5122, XP055147203, DOI: 10.1371/journal.pone.0005122 Zusammenfassung Seite e5122, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>WO 2004/083441 A2 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]; UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]; KLEINSC) 30. September 2004 (2004-09-30) Abbildung 1 Seite 3, Absatz 2 - Seite 4, Absatz 1 Seite 7, Absatz 2 - Seite 8, Absatz 1 Seite 9, letzter Absatz - Seite 10, Absatz 1 Beispiele 1-4; Tabelle 4</p> <p>-----</p>	1-27

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2014/066892

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (April 2005)