



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 34 585 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 904 380 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 34 585.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/02294**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 906 594.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/031115**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.02.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **28.08.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/49** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**12082 P**                      **22.02.1996**                      **US**

**9607293**                      **09.04.1996**                      **GB**

(73) Patentinhaber:

**Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., US**

(74) Vertreter:

**Abitz & Partner, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SHIVER, W., John, Rahway, US; DAVIES,  
Mary-Ellen, Rahway, US; FREED, C., Daniel,  
Rahway, US; LIU, A., Margaret, Rahway, US;  
PERRY, C., Helen, Rahway, US**

(54) Bezeichnung: **SYNTHETISCHE HIV-GENE**

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**

Querverweis auf zugehörige Anmeldungen

**[0001]** Dies ist eine nicht-vorläufige Anmeldung bezüglich der U.S. Serial Nr. 60/012 082, eingereicht am 22. Februar 1996.

Gebiet der Erfindung

HIV-Vakzine

Hintergrund der Erfindung

1. HIV-Infektion:

**[0002]** Das Human-Immunschwäche-Virus-1 (HIV-1) ist das ätiologische Agens des erworbenen Human-Immunschwäche-Syndroms (AIDS) und verwandter Störungen. HIV-1 ist ein RNA-Virus der Retroviridae-Familie und zeigt die 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3'-Organisation aller Retroviren. Darüber hinaus umfasst HIV-1 eine Handvoll Gene mit regulatorischen oder unbekanntenen Funktionen, einschließlich der tat- und rev-Gene. Das env-Gen codiert für das virale Hüll-Glycoprotein, das als ein Vorläufer von 160 Kilodalton (kD) (gp160) translatiert und dann von einer zellulären Protease gespalten wird, um das äußere 120-kD-Hüll-Glycoprotein (gp120) und das 41-kD-Transmembran-Hüll-Glycoprotein (gp41) zu ergeben. gp120 und gp41 bleiben assoziiert und werden auf den viralen Partikeln und der Oberfläche von HIV-infizierten Zellen präsentiert. gp120 bindet an den CD4-Rezeptor, der auf der Oberfläche von Helfer-T-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Zielzellen vorliegt. Nachdem gp120 an CD4 gebunden hat, vermittelt gp41 das Fusionsereignis, das für den Viruseintritt verantwortlich ist.

**[0003]** Die Infektion beginnt, wenn gp120 auf dem viralen Partikel an den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche von T4-Lymphozyten oder anderen Zielzellen bindet. Das gebundene Virus verschmilzt mit der Zielzelle und transkribiert sein RNA-Genom revers in die doppelsträngige DNA der Zelle. Die virale DNA wird in das genetische Material des Kerns der Zelle inkorporiert, wo die virale DNA die Bildung neuer viraler RNA, viraler Proteine und neuer Viruspartikel steuert. Diese neuen Partikel treten durch Knospung aus der Zielzellmembran aus und infizieren andere Zellen.

**[0004]** Die Zerstörung von T4-Lymphozyten, welche für die Immunverteidigung kritisch sind, ist eine Hauptursache der progressiven Immunstörung, welche die HIV-Infektion kennzeichnet. Der Verlust von Zielzellen beeinträchtigt die Fähigkeit des Körpers zur Bekämpfung der meisten Invasoren erheblich, hat jedoch eine besonders schwerwiegende Auswirkung auf die Verteidigung gegen Viren, Pilze, Parasiten und bestimmte Bakterien, einschließlich Mykobakterien.

**[0005]** HIV-1 tötet die Zellen, die es infiziert, durch Replikation, Knospung aus den Zellen und Zerstörung der Zellmembran. HIV-1 kann Zielzellen indirekt mittels des viralen gp120 abtöten, welches auf der Oberfläche einer infizierten Zelle präsentiert wird. Nachdem der CD4-Rezeptor auf T-Zellen eine starke Affinität für gp120 besitzt, können gesunde Zellen, die CD4-Rezeptor exprimieren, an gp120 binden und mit infizierten Zellen fusionieren, um ein Syncytium zu bilden. Ein Syncytium kann nicht überleben.

**[0006]** HIV-1 kann auch normale zelluläre Immunverteidigungen gegen infizierte Zellen hervorrufen. Zytotoxische Verteidigungszellen können mit oder ohne Hilfe von Antikörpern eine infizierte Zelle zerstören, welche virale Proteine auf ihrer Oberfläche präsentiert. Schließlich kann freies gp120 im Blut von Individuen zirkulieren, die mit HIV-1 infiziert sind. Das freie Protein kann an den CD4-Rezeptor von nicht-infizierten Zellen binden, was sie als infiziert erscheinen lässt und eine Immunreaktion hervorrufft.

**[0007]** Die Infektion mit HIV-1 ist fast immer tödlich und derzeit gibt es keine Heilung für eine HIV-1-Infektion. Effektive Vakzine zur Verhütung einer HIV-1-Infektion sind noch nicht verfügbar. Aufgrund der Gefahr einer Reversion oder Infektion kann lebender abgeschwächter Virus wahrscheinlich nicht als Vakzin verwendet werden. Die meisten Untereinheits-Vakzin-Ansätze waren hinsichtlich der Verhütung einer HIV-Infektion nicht erfolgreich. Behandlungen für eine HIV-1-Infektion haben schwerwiegende Nebenwirkungen, obwohl sie das Leben einiger infizierter Personen verlängern. Somit besteht ein großer Bedarf für effektive Behandlungen und Vakzine zur Bekämpfung dieser tödlichen Infektion.

## 2. Vakzine

**[0008]** Impfung ist eine wirksame Form von Krankheitsverhütung und hat sich gegen verschiedene Typen einer viralen Infektion als wirksam erwiesen. Die Feststellung von Wegen, um HIV-1-Antigene dem humanen Immunsystem zu präsentieren, um eine schützende humorale und zelluläre Immunität hervorzurufen, ist eine schwierige Aufgabe. Bisher waren Versuche zur Herstellung eines effektiven HIV-Vakzins nicht erfolgreich. Bei AIDS-Patienten ist freies Virus nur auf niedrigen Niveaus vorhanden. Die Übertragung von HIV-1 wird durch Zell-zu-Zell-Wechselwirkung mittels Fusion und Syncytienbildung erhöht. Somit sind Antikörper, die gegen freies Virus oder virale Untereinheiten erzeugt wurden, im Allgemeinen bei der Eliminierung von virus-infizierten Zellen unwirksam.

**[0009]** Vakzine nutzen die Fähigkeit des Körpers, sich an ein Antigen "zu erinnern". Nach ersten Begegnungen mit einem gegebenen Antigen erzeugt das Immunsystem Zellen, welche eine immunologische Erinnerung an das Antigen für die Lebensspanne eines Individuums behalten. Eine anschließende Exposition gegenüber dem Antigen stimuliert die Immunreaktion und führt zu einer Eliminierung oder Inaktivierung des Pathogens.

**[0010]** Das Immunsystem behandelt Pathogene auf zwei Weisen: durch humorale und durch zell-vermittelte Reaktionen. Bei der humoralen Reaktion erzeugen Lymphozyten spezifische Antikörper, welche an das Antigen binden und somit das Pathogen inaktivieren. Die zell-vermittelte Reaktion beinhaltet zytotoxische und Helfer-T-Lymphozyten, welche infizierte Zellen spezifisch angreifen und zerstören.

**[0011]** Eine Vakzin-Entwicklung für das HIV-1-Virus ist problematisch, da HIV-1 einige der gleichen Zellen infiziert, die das Vakzin im Immunsystem aktivieren muss (d.h. T4-Lymphozyten). Es wäre von Vorteil, ein Vakzin zu entwickeln, das HIV inaktiviert, bevor eine Beeinträchtigung des Immunsystems eintritt. Ein besonders geeigneter Typ von HIV-Vakzin würde eine Anti-HIV-Immunreaktion hervorrufen, welche HIV-Varianten erkennt und welche bei HIV-positiven Individuen wirkt, welche am Beginn ihrer Infektion stehen.

**[0012]** Eine große Herausforderung für die Entwicklung von Vakzinen gegen Viren, insbesondere solche mit einer hohen Mutationsrate, wie z.B. das Human-Immunschwäche-Virus, gegen welche eine Hervorrufung neutralisierender und schützender Immunreaktionen wünschenswert ist, ist die Vielfältigkeit der viralen Hüllproteine bei verschiedenen viralen Isolaten oder Stämmen. Nachdem zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) bei sowohl Mäusen als auch Menschen in der Lage sind, Epitope zu erkennen, die von konservierten internen Virusproteinen stammen, und man annimmt, dass sie bei der Immunreaktion gegen Viren von Bedeutung sind, wurden Anstrengungen auf die Entwicklung von CTL-Vakzinen gerichtet, welche in der Lage sind, einen heterologen Schutz gegen unterschiedliche Virusstämme zu bieten.

**[0013]** Es ist bekannt, dass CD8<sup>+</sup>-CTLs virus-infizierte Zellen abtöten, wenn deren T-Zellrezeptoren virale Peptide erkennen, die mit MHC-Klasse I-Molekülen assoziiert sind. Die viralen Peptide stammen von endogen synthetisierten viralen Proteinen, unabhängig von dem Ort oder der Funktion des Proteins innerhalb des Virus. Somit können CTLs durch Erkennung von Epitopen von konservierten viralen Proteinen einen stammübergreifenden Schutz bieten. Peptide, die zur Assoziation mit MHC Klasse I für die CTL-Erkennung in der Lage sind, stammen von Proteinen, welche im Zytoplasma oder endoplasmatischen Retikulum vorhanden sind oder es passieren. Im Allgemeinen sind exogene Proteine, welche den endosomalen Prozessierungsweg einschlagen (wie im Falle von Antigenen, die von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden), nicht wirksam zur Hervorrufung von CD8<sup>+</sup>-CTL-Reaktionen.

**[0014]** Die meisten Versuche zur Hervorrufung von CTL-Reaktionen verwendeten replizierende Vektoren, um das Protein-Antigen innerhalb der Zelle zu bilden, oder konzentrierten sich auf die Einführung von Peptiden in das Zytosol. Diese Ansätze haben Beschränkungen, welche deren Brauchbarkeit als Vakzine einschränken können. Retrovirale Vektoren weisen Beschränkungen hinsichtlich der Größe und Struktur von Polypeptiden auf, welche unter Erhaltung des Vermögens des rekombinanten Virus zur Replikation als Fusionsproteine exprimiert werden können, und die Wirksamkeit von Vektoren wie Vaccinia für nachfolgende Immunisierungen kann durch Immunreaktionen gegen die Vektoren selbst beeinträchtigt werden. Auch weisen virale Vektoren und modifizierte Pathogene inhärente Risiken auf, welche deren Einsatz bei Menschen verhindern können. Ferner ist die Selektion von zu präsentierenden Peptid-Epitopen abhängig von der Struktur der MHC-Antigene eines Individuums und deshalb können Peptid-Vakzine aufgrund der Unterschiedlichkeit von MHC-Haplotypen in Populationen nicht verwandter Individuen eine begrenzte Wirksamkeit aufweisen.

## 3. DNA-Vakzine

**[0015]** Benvenisty, N., und Reshef, L., [PNAS 83, 9551–9555, (1986)] zeigten, dass CaCl<sub>2</sub>-präzipitierte DNA, die intraperitoneal (i.p.), intravenös (i.v.) oder intramuskulär (i.m.) in Mäuse eingeführt wurde, exprimiert werden konnte. Die intramuskuläre Injektion von DNA-Expressionsvektoren ohne CaCl<sub>2</sub>-Behandlung in Mäusen führte zur Aufnahme von DNA durch die Muskelzellen und Expression des von der DNA codierten Proteins. Die Plasmide wurden episomal aufrecht erhalten und repliziert nicht. Später wurde eine dauerhafte Expression nach intramuskulärer Injektion in Skelettmuskel von Ratten, Fischen und Primaten und Herzmuskel von Ratten beobachtet. Die Technik der Verwendung von Nukleinsäuren als Therapeutika wurde in WO90/11092 (4. Oktober 1990) berichtet, worin nackte Polynukleotide zur Impfung von Vertebraten verwendet wurden.

**[0016]** Für den Erfolg des Verfahrens ist es nicht erforderlich, dass die Immunisierung intramuskulär erfolgt. Die Einführung von Gold-Mikroprojektilen, die mit DNA, codierend für Rinderwachstumshormon (BGH) beschichtet waren, in die Haut von Mäusen führte zur Bildung von Anti-BGH-Antikörpern in den Mäusen. Ein Jet-Injektor wurde zur Transfektion von Haut-, Muskel-, Fett- und Brustdrüsengewebe von lebenden Tieren verwendet. Verschiedene Verfahren zur Einführung von Nukleinsäure wurden untersucht. Von Zhu et al. wurde gezeigt, dass die intravenöse Injektion eines DNA:kationisches Liposom-Komplexes in Mäusen zur systemischen Expression eines klonierten Transgens führte [Science 261: 209–211 (9. Juli 1993)]. Ulmer et al., [Science 259: 1745–1749, (1993)] berichteten über den heterologen Schutz gegen eine Influenzavirus-Infektion durch intramuskuläre Injektion von DNA, die für Influenzavirus-Proteine codierte.

**[0017]** Der Bedarf für spezifische therapeutische und prophylaktische Mittel, welche in der Lage sind, gewünschte Immunreaktionen gegen Pathogene und Tumorantigene hervorzurufen, wird von der vorliegenden Erfindung gestillt. Von besonderer Bedeutung bei diesem therapeutischen Ansatz ist das Vermögen zur Induktion von T-Zell-Immunreaktionen, die Infektionen oder eine Krankheit verhindern können, welche sogar von Virusstämmen verursacht werden, die zu dem Stamm, aus dem das Antigen-Gen erhalten wurde, heterolog sind. Dies ist von besonderer Bedeutung in Hinblick auf HIV, nachdem erkannt wurde, dass dieses Virus schnell mutiert, und viele virulente Isolate identifiziert wurden [siehe beispielsweise LaRosa et al., Science 249: 932–935 (1990), welche 245 separate HIV-Isolate identifizierten]. Als Reaktion auf diese erkannte Unterschiedlichkeit versuchten Forscher CTLs auf Basis einer Peptid-Immunisierung zu erzeugen. So berichteten Takahashi et al. [Science 255: 333–336 (1992)] über die Einführung von breit kreuzreaktiven zytotoxischen T-Zellen, die eine HIV-Hüll(gp160)-Determinante erkannten. Diese Forscher erkannten jedoch die Schwierigkeit bei der Erzielung einer wirklich kreuzreaktiven CTL-Reaktion und postulierten, dass es eine Dichotomie zwischen dem Priming oder der erneuten Stimulation von T-Zellen, welche(s) sehr stringent ist, und der Hervorrufung einer Effektorfunktion, einschließlich Zytotoxizität, von bereits stimulierten CTLs gibt.

**[0018]** Wang et al. berichteten über die Hervorrufung von Immunreaktionen bei Mäusen gegen HIV durch intramuskuläre Impfung mit einem klonierten, genomischen (ungespleißten) HIV-Gen. Jedoch war das Niveau der Immunreaktionen, das bei diesen Studien erzielt wurde, sehr niedrig. Darüber hinaus wurde bei dem DNA-Konstrukt von Wang et al. ein im Wesentlichen genomisches Stück von HIV verwendet, das für zusammenhängende Tat/REV-gp160-Tat/REV-Codierungssequenzen codierte. Wie detailliert im folgenden beschrieben, ist dies ein suboptimales System für den Erhalt einer hohen Expression des gp160. Es ist auch potentiell gefährlich, da die Expression von Tat zum Fortschritt des Kaposi-Sarkoms beiträgt.

**[0019]** WO 93/17706 beschreibt ein Verfahren zur Impfung eines Lebewesens gegen ein Virus, wobei Trägerpartikel mit einem Gen-Konstrukt beschichtet wurden und die beschichteten Partikel unter Beschleunigung in Zellen eines Lebewesens eingebracht wurden. Bezüglich HIV wurde im Wesentlichen das gesamte Genom, abzüglich der langen terminalen Repeats, für die Verwendung vorgeschlagen. Das Verfahren repräsentiert erhebliche Risiken für die Empfänger. Es wird allgemein angenommen, dass Konstrukte von HIV weniger als etwa 50% des HIV-Genoms enthalten sollten, um die Sicherheit des Vakzins zu gewährleisten; dies stellt sicher, dass enzymatische Gruppierungen und virale regulatorische Proteine, von denen viele unbekannt oder schlecht verstandene Funktionen aufweisen, eliminiert wurden. Somit bleibt eine Anzahl von Problemen, wenn ein brauchbares humanes HIV-Vakzin aus der Gen-Transporttechnologie entwickelt werden soll.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung berücksichtigt jedes der bekannten Verfahren zur Einführung von Polynukleotiden in lebendes Gewebe, um die Expression von Proteinen zu induzieren. Jedoch stellt diese Erfindung ein neues Immunogen zur Einführung von HIV- und anderen Proteinen in den Antigen-Prozessierungsweg bereit, um effizient HIV-spezifische CTLs und Antikörper zu erzeugen. Das Pharmazeutikum ist wirksam als Vakzin zur Induktion sowohl zellulärer als auch humoraler Anti-HIV- und HIV-neutralisierender Immunreaktionen. In der vorliegenden Erfindung werden die oben angesprochenen Probleme angegangen und gelöst durch die

Bereitstellung von Polynukleotid-Immunogenen, welche, bei Einführung in ein Lebewesen, die effiziente Expression von HIV-Proteinen und -Epitopen steuern, ohne die begleitenden Risiken, die mit jenen Verfahren verbunden sind. Die so hervorgerufenen Immunreaktionen sind wirksam bei der Erkennung von HIV, der Inhibierung der HIV-Replikation, der Identifizierung und Abtötung von Zellen, die mit HIV infiziert sind, und weisen Kreuzreaktivität gegenüber vielen HIV-Stämmen auf.

#### 4. Codon-Verwendung und Codon-Kontext

**[0021]** Die Codon-Paarungen von Organismen sind in hohem Maße nicht-statistisch und unterscheiden sich von Organismus zu Organismus. Diese Information wird dazu verwendet, um veränderte oder synthetische Gene mit gewünschten Niveaus an Translationseffizienz zu konstruieren und exprimieren, um festzustellen, welche Regionen in einem Genom protein-codierende Regionen sind, um translationale Unterbrechungsstellen in heterologe Gene einzuführen und um die Beziehung oder den verwandtschaftlichen Ursprung von Nukleotidsequenzen zu ermitteln.

**[0022]** Die Expression fremder heterologer Gene in transformierten Organismen ist nun allgemein bekannt. Eine große Anzahl von Säugergenen, einschließlich beispielsweise Maus- und Humangene, wurde erfolgreich in einzellige Organismen eingeführt. Die Standardtechniken in dieser Hinsicht umfassen die Einführung des zu exprimierenden fremden Gens in einen Vektor, wie z.B. ein Plasmid oder einen Phagen, und die Verwendung des Vektors zur Einführung des Gens in einen Organismus. Die nativen Promotoren für solche Gene werden gewöhnlich durch starke Promotoren ersetzt, welche mit dem Wirt, in den das Gen eingeführt wird, kompatibel sind. Eine Proteinsequenzierungsapparatur erlaubt die Aufklärung der Aminosäuresequenzen von sogar winzigen Mengen an nativem Protein. Anhand dieser Aminosäuresequenzen können DNA-Sequenzen, welche für jene Proteine codieren, abgeleitet werden. Die DNA-Synthese ist ebenfalls ein sich schnell entwickelndes Gebiet und synthetische Gene, die diesen abgeleiteten DNA-Sequenzen entsprechen, können unschwer konstruiert werden.

**[0023]** Trotz der wachsenden Kenntnis von Expressionssystemen und rekombinanter DNA verbleiben erhebliche Hindernisse, wenn man versucht, ein fremdes oder synthetisches Gen in einem Organismus zu exprimieren. Viele native aktive Proteine sind beispielsweise in einer Weise glycosyliert, die sich von derjenigen unterscheidet, welche auftritt, wenn sie in einem fremden Wirt exprimiert werden. Aus diesem Grund können eukaryotische Wirte, wie z.B. Hefe, gegenüber bakteriellen Wirten zur Expression vieler Säugergene bevorzugt sein. Das Glycosylierungsproblem ist Gegenstand fortgesetzter Forschung.

**[0024]** Ein weiteres Problem ist schlechter verstanden. Oft geschieht die Translation eines synthetischen Gens, selbst in Kopplung mit einem starken Promotor, viel weniger effizient als man erwarten würde. Das gleiche gilt häufig für exogene Gene, die für den Expressionsorganismus fremd sind. Selbst wenn das Gen in einer ausreichend effizienten Weise transkribiert wird, dass gewinnbare Mengen des Translationsprodukts gebildet werden, ist das Protein oft inaktiv oder unterscheidet sich auf andere Weise in seinen Eigenschaften von dem nativen Protein.

**[0025]** Es ist bekannt, dass das letztere Problem gewöhnlich auf Unterschiede bei der Proteinfaltung in verschiedenen Organismen zurückzuführen ist. Die Lösung für dieses Problem war schwer zu finden und die Mechanismen, welche die Proteinfaltung kontrollieren, sind schlecht verstanden.

**[0026]** Die mit der Translationseffizienz verbundenen Probleme sind mutmaßlich auf Codon-Kontext-Effekte zurückzuführen. Die protein-codierenden Regionen von Genen in allen Organismen sind einer großen Vielfalt von funktionellen Beschränkungen unterworfen, von denen einige von dem Erfordernis zur Codierung eines richtig funktionierenden Proteins sowie geeigneten translationalen Start- und Stoppsignalen abhängen. Jedoch wurden mehrere Merkmale von protein-codierenden Regionen beobachtet, welche in den Begriffen dieser Beschränkungen nicht ohne weiteres verstanden werden. Zwei wichtige Klassen solcher Merkmale sind diejenigen, welche die Codon-Verwendung und den Codon-Kontext betreffen.

**[0027]** Es ist bekannt, dass es bei der Codon-Verwendung starke Bevorzugungen gibt und diese zwischen unterschiedlichen Organismen beträchtlich variiert. Es wurde gezeigt, dass Codon-Verwendungsmuster in Bezug zur relativen Häufigkeit von tRNA-Isoakzeptoren stehen. Gene, die für Proteine mit hoher Häufigkeit codieren, zeigen gegenüber denen für Proteine mit niedriger Häufigkeit Unterschiede in ihrer Codon-Bevorzugung. Die Möglichkeit, dass Bevorzugungen der Codon-Verwendung die Peptidverlängerungsraten ändern, wurde ausgiebig erörtert. Obwohl Unterschiede der Codon-Verwendung mit Unterschieden in den Translationsraten assoziiert sind, war es schwierig, direkte Effekte der Codon-Auswahl auf die Translation zu demonstrieren.

trieren. Andere postulierte Beschränkungen hinsichtlich der Codon-Verwendungsmuster beinhalten die Maximierung der Translationsgenauigkeit und Optimierung der kinetischen Effizienz der Proteinsynthese.

**[0028]** Abgesehen von der nicht-statistischen Verwendung von Codons haben sich beträchtliche Indizien angesammelt, dass die Codon/Anticodon-Erkennung durch Sequenzen außerhalb des Codons selbst beeinflusst wird, ein Phänomen, das als "Codon-Kontext" bezeichnet wird. Es gibt einen starken Einfluss benachbarter Nukleotide auf die Wirksamkeit der Suppression von Nonsense-Codons sowie Missense-Codons. Offensichtlich erfordert die Häufigkeit der Suppressoraktivität in natürlichen Bakterienpopulationen sowie die Verwendung von "Terminations"-Codons zur Codierung von Selenocystein und Phosphoserin, dass die Termination kontext-abhängig ist. Von ähnlichen Kontext-Effekten wurde gezeigt, dass sie die Translationsgenauigkeit sowie die Effizienz der Translationsinitiation beeinflussen.

**[0029]** Statistische Analysen von protein-codierenden Regionen von *E. coli* demonstrierten eine weitere Manifestation des "Codon-Kontexts". Die Anwesenheit eines speziellen Codons an einer Position beeinflusst stark die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Nukleotide in benachbarten Codons und diese Kontext-Beschränkungen unterscheiden sich bei Genen mit einem hohen Expressionsniveau deutlich von denen mit einem niedrigen Expressionsniveau. Obwohl der Kontext-Effekt erkannt wurde, ist der Voraussagewert der statistischen Regeln bezüglich bevorzugter Nukleotide neben Codons relativ gering. Dies beschränkte die Brauchbarkeit solcher Nukleotid-Bevorzugungsdaten für die Auswahl von Codons, um gewünschte Niveaus an Translations-effizienz zu bewirken.

**[0030]** Das Aufkommen von Geräten zur automatischen Nukleotidsequenzierung machte große Mengen an Sequenzdaten für eine große Vielfalt von Organismen verfügbar. Das Verständnis dieser Daten ist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Beispielsweise ist es wichtig, die codierenden Regionen des Genoms zu identifizieren, um die genetischen Sequenzdaten in Beziehung zu Proteinsequenzen zu setzen. Darüber hinaus ist die Herkunft des Genoms bestimmter Organismen von erheblichem Interesse. Es ist bekannt, dass die Genome einiger Organismen gemischter Herkunft sind. Einige Sequenzen, die viralen Ursprungs sind, sind nun stabil in das Genom eukaryotischer Organismen inkorporiert. Die viralen Sequenzen selbst könnten von irgendeiner anderen, im Wesentlichen nicht verwandten Spezies stammen. Ein Verständnis der Herkunft eines Gens beim Ziehen angemessener Analogien zwischen verwandten Genen und ihren Translationsprodukten in anderen Organismen kann von Bedeutung sein.

**[0031]** Es gibt einen Bedarf für ein besseres Verständnis von Codon-Kontext-Effekten auf die Translation und für ein Verfahren zur Feststellung der geeigneten Codons für irgendeinen gewünschten Translationseffekt. Es besteht auch Bedarf für ein Verfahren zur Identifizierung codierender Regionen des Genoms anhand von Nukleotidsequenz-Daten. Es gibt auch einen Bedarf für ein Verfahren zur Steuerung der Proteinfaltung und zur Gewährleistung, dass ein fremdes Gen bei der Expression in einem Wirt angemessen gefaltet wird. Gene, die entsprechend gewünschten Translationseffizienzen verändert oder konstruiert wurden, wären von beträchtlichem Wert.

**[0032]** Ein weiterer Aspekt der Praxis rekombinanter DNA-Techniken zur Expression von Proteinen von industriellem und pharmazeutischem Interesse durch Mikroorganismen ist das Phänomen der "Codon-Präferenz". Obwohl früher festgestellt wurde, dass die existierende Maschinerie zur Genexpression in genetisch transformierten Wirtszellen "arbeiten" wird, um ein gewünschtes Produkt zu ergeben, können die in einem Mikroorganismus erhaltenen Expressionsniveaus Gegenstand einer großen Variation sein, teilweise abhängig von spezifischen alternativen Formen des aminosäure-spezififizierenden genetischen Codes, der in einem inserierten exogenen Gen vorliegt. Ein "Triplet"-Codon von vier möglichen Nukleotid-Basen kann in 64 varianten Formen auftreten. Dass diese Formen die Message für nur 20 unterschiedliche Aminosäuren (sowie Transkriptionsinitiation und -termination) bereitstellen, bedeutet, dass einige Aminosäuren von mehr als einem Codon codiert werden können. In der Tat haben einige Aminosäuren bis zu sechs "redundante" alternative Codons, während einige andere ein einziges erforderliches Codon aufweisen. Aus nicht vollständig verstandenen Gründen liegen alternative Codons keineswegs gleichmäßig in der endogenen DNA unterschiedlicher Zelltypen vor und es erscheint eine variable natürliche Hierarchie oder "Präferenz" für bestimmte Codons in bestimmten Zelltypen zu geben.

**[0033]** Als ein Beispiel wird die Aminosäure Leucin durch irgendeines von sechs DNA-Codons, einschließlich CTA, CTC, CTG, CTT, TTA und TTG (welche jeweils den mRNA-Codons CUA, CUC, CUG, CUU, UUA und UUG entsprechen), spezifiziert. Eine erschöpfende Analyse von Genom-Codon-Häufigkeiten für Mikroorganismen offenbarte, dass die endogene DNA von *E. coli* am häufigsten das leucin-spezififizierende Codon CTG enthält, während die DNA von Hefen und Schleimpilzen am häufigsten ein leucin-spezififizierendes TTA-Codon ein-

schließt. In Anbetracht dieser Hierarchie wird allgemein angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit des Erhalts hoher Expressionsniveaus eines leucin-reichen Polypeptids durch einen *E. coli*-Wirt bis zu einem gewissen Grad von der Häufigkeit der Codon-Verwendung abhängen wird. Beispielsweise wird ein an TTA-Codons reiches Gen aller Wahrscheinlichkeit nach in *E. coli* schlecht exprimiert werden, wohingegen ein an CTG reiches Gen wahrscheinlich das Polypeptid stark exprimieren wird. Gleichmaßen würde, wenn Hefezellen die vorgesehenen Transformationswirtszellen zur Expression eines leucin-reichen Polypeptids sind, ein bevorzugtes Codon zur Verwendung in einer inserierten DNA TTA sein.

**[0034]** Die Implikationen von Codon-Präferenzphänomenen hinsichtlich rekombinanter DNA-Techniken sind offensichtlich und das Phänomen mag dazu dienen, viele frühere Fehlschläge bei der Erreichung hoher Expressionsniveaus von exogenen Genen in erfolgreich transformierten Wirtsorganismen zu erklären – ein weniger "bevorzugtes" Codon kann wiederholt im inserierten Gen vorliegen und die Wirtszellmaschinerie für die Expression kann nicht so effizient arbeiten. Dieses Phänomen legt nahe, dass synthetische Gene, welche konstruiert wurden, um die bevorzugten Codons einer vorgesehenen Wirtszelle einzuschließen, eine bevorzugte Form von fremdem genetischem Material zur Durchführung rekombinanter DNA-Techniken bereitstellen.

#### 5. Proteintransportverkehr

**[0035]** Die funktionelle Vielfalt, welche eukaryotische Zellen typischerweise kennzeichnet, hängt von der strukturellen Differenzierung ihrer Membrangrenzen ab. Zur Bildung und Aufrechterhaltung dieser Strukturen müssen Proteine von ihrem Synthesort im endoplasmatischen Retikulum an vorbestimmte Ziele in der ganzen Zelle transportiert werden. Dies erfordert, dass die transportierten Proteine Sortierungssignale aufweisen, welche von der für die Routenselektion verantwortlichen molekularen Maschinerie, die an den Zugangspunkten zu den Hauptverkehrswegen lokalisiert ist, erkannt werden. Sortierungsentscheidungen für die meisten Proteine müssen nur einmal getroffen werden, wenn sie ihre biosynthetischen Wege einschlagen, da ihre Endbestimmung, der zelluläre Ort, an dem sie ihre Funktion wahrnehmen, deren permanenter Aufenthaltsort wird.

**[0036]** Die Aufrechterhaltung der intrazellulären Integrität hängt teilweise von der selektiven Sortierung und dem akkuraten Transport von Proteinen an ihre korrekten Bestimmungsorte ab. Im Laufe der letzten wenigen Jahre wurde die Aufgliederung der molekularen Maschinerie für die Zielbestimmung und Lokalisierung von Proteinen eingehend untersucht. Definierte Sequenzmotive wurden auf Proteine identifiziert, welche als "Adressetiketten" dienen können. Von einer Reihe von Sortierungssignalen wurde festgestellt, dass sie mit den zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen assoziiert sind.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0037]** Es werden synthetische DNA-Moleküle bereitgestellt, die für HIV-env und Modifizierungen von HIV-env codieren. Die Codons der synthetischen Moleküle umfassen die bevorzugten Codons der vorgesehenen Wirtszelle. Die synthetischen Moleküle stellen bevorzugte Formen von fremdem genetischen Material bereit. Die synthetischen Moleküle können als Polynukleotid-Vakzin verwendet werden, welches eine effektive Immunprophylaxe gegen eine HIV-Infektion durch neutralisierende Antikörper und zellvermittelte Immunität bereitstellt. Diese Erfindung stellt Polynukleotide bereit, welche bei direkter Einführung in einen Vertebraten in vivo, einschließlich Säuger wie Primaten und Menschen, die Expression von codierten Proteinen innerhalb des Lebewesens induzieren.

**[0038]** Speziell wird ein synthetisches Polynukleotid wie in Anspruch 1 definiert bereitgestellt.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0039]** [Fig. 1](#) zeigt Expressionsstrategien auf Basis einer HIV-env-Kassette.

**[0040]** [Fig. 2](#) zeigt durch ein DNA-Vakzin vermittelte Anti-gp120-Reaktionen.

**[0041]** [Fig. 3](#) zeigt Anti-gp120-ELISA-Titer von Seren von Maus-DNA-Vakzinempfängern.

**[0042]** [Fig. 4](#) zeigt die relative Expression von gp120 nach einer HIV-env-PNV-Zellkulturtransfektion.

**[0043]** [Fig. 5](#) zeigt die mittleren Anti-gp120-ELISA-Reaktionen nach Impfung mit tPA-gp143/optA-DNA gegenüber -optB-DNA.

**[0044]** [Fig. 6](#) zeigt die Neutralisierung von HIV durch Seren von Maus-DNA-Vakzinempfängern.

**[0045]** [Fig. 7](#) zeigt die HIV-Neutralisation durch Seren von Maus-HIV-env-DNA-Vakzinempfängern.

**[0046]** [Fig. 8](#) ist eine Immunoblot-Analyse von optimierten HIV-env-DNA-Konstrukten.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0047]** Es werden synthetische DNA-Moleküle, die für HIV-env codieren, und synthetische DNA-Moleküle, die für modifizierte Formen von HIV-env codieren, bereitgestellt. Die Codons der synthetischen Moleküle sind so gestaltet, dass die von der vorgesehenen Wirtszelle bevorzugten Codons verwendet werden. Die synthetischen Moleküle können als Polynukleotid-Vakzin verwendet werden, welches eine effektive Immunprophylaxe gegen eine HIV-Infektion durch neutralisierenden Antikörper und zellvermittelte Immunität bereitstellt. Die synthetischen Moleküle können als immunogene Zusammensetzung verwendet werden. Diese Erfindung stellt Polynukleotide bereit, welche bei direkter Einführung in einen Vertebraten in vivo, einschließlich Säuger wie Primaten und Menschen, die Expression codierter Proteine innerhalb des Lebewesens induzieren.

**[0048]** Wie hier verwendet, ist ein Polynukleotid eine Kombination von Nukleinsäuren, welche solche regulatorischen Elemente enthalten, dass nach Einführung in eine lebende Vertebratenzelle das Polynukleotid in der Lage ist, die zelluläre Maschinerie zu steuern, um Translationsprodukte zu bilden, welche von den Nukleinsäuren, die das Polynukleotid umfasst, codiert werden. In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Polynukleotid eine Polydesoxyribonukleinsäure, die mindestens ein HIV-Gen in funktionsfähiger Verknüpfung mit einem transkriptionalen Promotor umfasst. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst das Polynukleotid-Vakzin (PNV) Polyribonukleinsäure, die für mindestens ein HIV-Gen codiert, welches einer Translation durch die eukaryotische zelluläre Maschinerie (Ribosomen, tRNAs und andere Translationsfaktoren) zugänglich ist. Wenn das von dem Polynukleotid codierte Protein eines ist, welches normalerweise in dem Lebewesen nicht vorkommt, außer unter pathologischen Zuständen (d.h. ein heterologes Protein), wie z.B. Proteine, die mit Human-Immunschwäche-Virus (HIV), dem ätiologischen Agens von erworbenem Immunschwäche-Syndrom (AIDS), assoziiert sind, wird das Immunsystem des Lebewesens aktiviert, um eine schützende Immunreaktion zu starten. Nachdem diese exogenen Proteine von den Geweben des Lebewesens gebildet werden, werden die exprimierten Proteine von dem Haupthistokompatibilitätssystem, MHC, analog zu der Weise beim Stattfinden einer tatsächlichen Infektion mit dem verwandten Organismus (HIV) prozessiert. Das Ergebnis ist die Induktion von Immunreaktionen gegen das zugehörige Pathogen.

**[0049]** Die Polynukleotide der vorliegenden Offenbarung induzieren bei Einführung in ein biologisches System die Expression von HIV-Proteinen und -Epitopen und die Erzeugung einer spezifischen Immunreaktion. Die induzierte Antikörperreaktion ist spezifisch für das exprimierte HIV-Protein und neutralisiert HIV. Darüber hinaus werden zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche HIV-infizierte Zellen spezifisch erkennen und zerstören, induziert.

**[0050]** Die vorliegende Offenbarung stellt Verfahren bereit zur Verwendung eines Polynukleotids, welches, nach Einführung in Säugergewebe, die Expression diskreter Genprodukte in einer einzigen Zelle in vivo induziert. Die Offenbarung stellt eine Lösung bereit, welche nicht mehrere Manipulationen von REV-abhängigen HIV-Genen, um REV-unabhängige Gene zu erhalten, erfordert. Das hier beschriebene REV-unabhängige Expressionssystem ist als solches an sich von Nutzen und ein System zur Demonstration der Expression eines einzelnen gewünschten Genprodukts in einer einzelnen Zelle in vivo.

**[0051]** Nachdem viele der Anwendungen der vorliegenden Erfindung eine antivirale Impfung betreffen, werden die Polynukleotide häufig als Polynukleotid-Vakzin(e) oder PNV bezeichnet. Dies bedeutet nicht, dass zusätzliche Anwendungen dieser Polynukleotide, bei der Immunstimulation oder in Antitumor-Therapien, als außerhalb des Rahmens der Erfindung betrachtet werden.

**[0052]** Gemäß der Erfindung wird ein Gen, das für ein HIV-Genprodukt codiert, in einen Expressionsvektor inkorporiert. Der Vektor enthält einen transkriptionalen Promotor, der von einer eukaryotischen RNA-Polymerase erkannt wird, und einen transkriptionalen Terminator am Ende der für das HIV-Gen codierenden Sequenz. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Promotor der Cytomegalovirus-Promotor mit der Intron A-Sequenz (CMV-intA), obwohl Fachleute auf dem Gebiet erkennen werden, dass irgendetwelche einer Reihe anderer bekannter Promotoren, wie z.B. der starke Immunglobulinpromotor oder andere eukaryotische Genpromotoren, verwendet werden können. Ein bevorzugter transkriptionaler Terminator ist der Rinderwachstumshormon-Terminator. Die Kombination von CMVintA-BGH-Terminator ist besonders bevorzugt.

**[0053]** Zur Unterstützung der Herstellung der Polynukleotide in prokaryotischen Zellen kann ein Antibiotikaresistenzmarker in dem Expressionsvektor eingeschlossen sein; der Marker kann sich unter der transkriptionalen Kontrolle eines prokaryotischen Promotors befinden, so dass die Expression des Markers nicht in eukaryotischen Zellen stattfindet. Ampicillinresistenzgene, Neomycinresistenzgene und andere pharmazeutisch annehmbare Antibiotikaresistenzmarker können verwendet werden. Zur Unterstützung der Produktion hoher Niveaus des Polynukleotids mittels Fermentation im prokaryotischen Organismen kann es vorteilhaft sein, dass der Vektor einen prokaryotischen Replikationsursprung enthält und eine hohe Kopienzahl aufweist. Eine Reihe von im Handel erhältlichen prokaryotischen Klonierungsvektoren bietet diese Vorteile. Es ist wünschenswert, nicht-essentielle DNA-Sequenzen zu entfernen und sicher zu stellen, dass die Vektoren nicht zur Replikation in eukaryotischen Zellen in der Lage sind. Dies minimiert das Risiko der Integration von Polynukleotid-Vakzin-Sequenzen in das Genom des Empfängers. Gewebespezifische Promotoren oder Enhancer können eingesetzt werden, wann immer es wünschenswert ist, die Expression des Polynukleotids auf einen speziellen Gewebetyp zu beschränken.

**[0054]** Beispiele von Vektoren umfassen V1, ein mutierter pBR322-Vektor, in welchen der CMV-Promotor und der BGH-Transkriptionsterminator kloniert wurden. Bei einem anderen Vektor wurden die Elemente von V1 und pUC19 kombiniert, um einen Expressionsvektor mit der Bezeichnung V1J zu bilden. In einer weiteren Verfeinerung wird das Ampicillinresistenzgen aus V1J entfernt und durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt, um V1J-neo zu erzeugen. In der Erfindung ist der Vektor V1Jns, welcher mit V1Jneo identisch ist, mit der Ausnahme, dass eine nur einmal vorkommende Sfi1-Restriktionsstelle in die einzige KpnI-Stelle an Position 2114 von V1J-neo eingeführt wurde. Das Auftreten von Sfi1-Stellen in humaner genomischer DNA ist sehr gering (etwa eine Stelle pro 100.000 Basen). Somit erlaubt dieser Vektor eine sorgfältige Überwachung der Expressionsvektor-Integration in Wirts-DNA einfach durch Sfi1-Verdauung von extrahierter genomischer DNA. In einer weiteren Verfeinerung ist der Vektor V1R. Bei diesem Vektor wurde möglichst viel nicht-essentielle DNA "weggeschnitten", um einen sehr kompakten Vektor zu erzeugen. Dieser Vektor ist ein Derivat von V1Jns. Dieser Vektor erlaubt die Verwendung größerer Inserts mit weniger Bedenken, dass unerwünschte Sequenzen codiert werden, und optimiert die Aufnahme durch Zellen.

**[0055]** Eine Ausführungsform dieser Erfindung inkorporiert Gene, die für HIV-gp160, -gp120, -gag und andere Genprodukte aus im Labor adaptierten Stämmen von HIV wie SF2, IIIB oder MN codieren. Fachleute auf dem Gebiet werden erkennen, dass die Verwendung von Genen aus HIV-2-Stämmen mit analoger Funktion zu den Genen von HIV-1 erwartungsgemäß Immunreaktionen hervorrufen wird, die den hier für HIV-1-Konstrukte beschriebenen analog sind. Die Klonierungs- und Manipulierungsverfahren für den Erhalt dieser Gene sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

**[0056]** Es ist bekannt, dass die Hervorrufung von Immunreaktionen gegen im Labor adaptierte Stämme von HIV nicht adäquat sein mag, um eine Neutralisierung von primären Feldisolaten von HIV zu ergeben. Somit sind in einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung Gene aus virulenten primären Feldisolaten von HIV in dem Polynukleotid-Immunogen inkorporiert. Dies wird erreicht durch Herstellung von cDNA-Kopien der viralen Gene und anschließende Subklonierung der individuellen Gene in das Polynukleotid-Immunogen. Sequenzen für viele Gene vieler HIV-Stämme sind nun öffentlich bei GENBANK verfügbar und solche primären Feldisolate von HIV sind vom National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) verfügbar, welches mit Quality Biological, Inc., [7581 Lindbergh Drive, Gaithersburg, Maryland 20879] einen Vertrag geschlossen hat, um diese Stämme verfügbar zu machen. Solche Stämme sind auch erhältlich von der World Health Organization (WHO) [Network for HIV Isolation and Characterization, Vaccine Development Unit, Office of Research, Global Programme on AIDS, CH-1211 Genf 27, Schweiz]. Anhand dieser Arbeit werden Fachleute auf dem Gebiet erkennen, dass eine der Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung eines Systems für sowohl in vivo- als auch in vitro-Tests und -Analyse ist, so dass eine Korrelation der HIV-Sequenzvielfalt mit der Serologie einer HIV-Neutralisation sowie anderen Parametern durchgeführt werden kann. Die Inkorporation von Genen aus primären Isolaten von HIV-Stämmen ergibt ein Immunogen, welches Immunreaktionen gegen klinische Isolate des Virus induziert und somit einen bisher nicht gestillten Bedarf auf dem Gebiet stillt. Ferner kann, wenn sich die virulenten Isolate verändern, das Immunogen modifiziert werden, um erforderlichenfalls neue Sequenzen zu reflektieren.

**[0057]** Um die Terminologie einheitlich zu halten, wird der folgenden Konvention zur Beschreibung von Polynukleotid-Immunogen-Konstrukten gefolgt: "Vektorbezeichnung-HIV-Stamm-Genzusätzliche Elemente". Somit ist die hier verliehene Bezeichnung eines Konstrukts, bei dem das gp160-Gen des MN-Stammes in den Expressionsvektor V1Jneo kloniert ist, wie folgt: "V1Jneo-MN-gp160". Die zusätzlichen Elemente, die dem Konstrukt hinzugefügt werden, sind detaillierter im folgenden beschrieben. Wenn sich der ätiologische Stamm des Virus verändert, kann das bestimmte Gen, welches für die Inkorporation in das Pharmazeutikum optimal

ist, verändert werden. Jedoch ist, wie im folgenden demonstriert, die Stammvariabilität bei dem Immunogen und den Vakzinen dieser Erfindung im Vergleich mit den Gesamtvirus-Vakzinen oder Vakzinen auf Untereinheitspolypeptid-Basis weniger kritisch, da CTL-Reaktionen induziert werden, welche zum Schutz gegen heterologe Stämme in der Lage sind. Da das Pharmazeutikum leicht für die Einführung eines neuen Gens manipuliert wird, ist dies darüber hinaus eine Einstellung, welche unschwer mit den Standardtechniken der Molekularbiologie durchgeführt werden kann.

**[0058]** Der Begriff "Promotor" wie hier verwendet, bezieht sich auf eine Erkennungsstelle auf einem DNA-Strang, an welche die RNA-Polymerase bindet. Der Promotor bildet einen Initiationskomplex mit RNA-Polymerase, um die transkriptionale Aktivität zu initiieren und zu steuern. Der Komplex kann durch aktivierende Sequenzen, als "Enhancer" bezeichnet, oder durch inhibierende Sequenzen, als "Silencer" bezeichnet, modifiziert werden.

**[0059]** Der Begriff "Leader" wie hier verwendet, bezieht sich auf eine DNA-Sequenz am 5'-Ende eines Strukturgens, welche zusammen mit dem Gen transkribiert wird. Der Leader führt gewöhnlich dazu, dass das Protein eine N-terminale Peptidverlängerung aufweist, manchmal als Prosequenz bezeichnet. Für Proteine, die entweder für die Sekretion in das extrazelluläre Medium oder für eine Membran bestimmt sind, steuert diese Signalsequenz, welche im Allgemeinen hydrophob ist, das Protein in das endoplasmatische Retikulum, von dem aus es zum entsprechenden Bestimmungsort transportiert wird.

**[0060]** Der Begriff "Intron", wie hier verwendet, bezieht sich auf einen Abschnitt von DNA, der in der Mitte eines Gens vorkommt, welcher nicht für eine Aminosäure in dem Genprodukt codiert. Die Vorläufer-RNA des Introns wird ausgeschnitten und wird deshalb nicht in mRNA transkribiert oder in Protein translatiert.

**[0061]** Der Begriff "Kassette" bezieht sich auf die Sequenz der vorliegenden Erfindung, welche die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz enthält. Die Kassette ist dem Konzept nach einem Kassettenband ähnlich. Jede Kassette wird ihr eigene Sequenz aufweisen. So wird der Vektor durch Austausch der Kassette eine unterschiedliche Sequenz exprimieren. Aufgrund der Restriktionsstellen an den 5'- und 3'-Enden kann die Kassette leicht inseriert, entfernt oder durch eine andere Kassette ersetzt werden.

**[0062]** Der Begriff "3-untranslatierte Region" oder "3'-UTR" bezieht sich auf die Sequenz am 3'-Ende eines Strukturgens, welche gewöhnlich mit dem Gen transkribiert wird. Diese 3'-UTR-Region enthält gewöhnlich die Poly-A-Sequenz. Obwohl die 3'-UTR von der DNA transkribiert wird, wird sie vor der Translation in das Protein ausgeschnitten.

**[0063]** Der Begriff "nicht-codierende Region" oder "NCR" bezieht sich auf die Region, welche an die 3'-UTR-Region des Strukturgens angrenzt. Die NCR-Region enthält ein transkriptionales Terminationssignal.

**[0064]** Der Begriff "Restriktionsstelle" bezieht sich auf eine sequenz-spezifische Spaltstelle von Restriktionsendonukleasen.

**[0065]** Der Begriff "Vektor" bezieht sich auf einige Mittel, mit denen DNA-Fragmente in einen Wirtsorganismus oder ein Wirtsgewebe eingeführt werden können. Es gibt verschiedene Typen von Vektoren, einschließlich Plasmid, Bakteriophagen und Cosmide.

**[0066]** Der Begriff "wirksame Menge" bedeutet, dass ausreichend PNV zur Bildung der adäquaten Niveaus des Polypeptids injiziert wird. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass dieses Niveau variieren kann.

**[0067]** Zur Bereitstellung einer Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird der folgende Hintergrund bezüglich HIV bereitgestellt. Das Human-Immunschwäche-Virus hat ein Ribonukleinsäure (RNA)-Genom, dessen Struktur in [Fig. 1](#) präsentiert wird. Dieses RNA-Genom muss nach im Stand der Technik bekannten Verfahren revers transkribiert werden, um eine cDNA-Kopie zur Klonierung und Manipulation nach den hier gelehnten Verfahren zu erzeugen. An jedem Ende des Genoms befindet sich ein langes terminales Repeat, welches als Promotor wirkt. Zwischen diesen Termini codiert das Genom, in verschiedenen Leserahmen, gag-pol-env als hauptsächliche Genprodukte: gag ist das gruppenspezifische Antigen; pol ist die reverse Transkriptase oder Polymerase, ebenfalls von dieser Region codiert, in einem alternativen Leserahmen, wird die virale Protease, welche für die posttranslationale Prozessierung verantwortlich ist, beispielsweise von gp160 in gp120 und gp41; env ist das Hüllprotein; vif ist der Virion-Infektivitätsfaktor; REV ist der Regulator der Virion-Protein-Expression; neg ist der negative Regulationsfaktor; vpu ist der Virion-Produktivitätsfaktor "u"; tat ist der Transaktivator der Transkription; vpr ist das virale Protein r. Die Funktion jedes dieser Elemente wurde be-

schrieben.

**[0068]** In einer Ausführungsform dieser Erfindung ist ein Gen, welches für ein HIV- oder SIV-Protein codiert, direkt mit einem transkriptionalen Promotor verknüpft. Das env-Gen codiert für ein großes membran-gebundenes Protein, gp160, welches posttranslational zu gp41 und gp120 modifiziert wird. Das gp120-Gen kann zur Expression unter die Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors gestellt werden. Jedoch ist gp120 nicht membran-gebunden und kann deshalb nach Expression aus der Zelle sekretiert werden. Nachdem HIV dazu neigt, in infizierten Zellen ruhend zu verbleiben, ist es wünschenswert, dass Immunreaktionen, die gegen zell-gebundene HIV-Epitope gerichtet sind, ebenfalls erzeugt werden. Zusätzlich ist es wünschenswert, dass ein Vakzin membran-gebundenes, oligomeres ENV-Antigen mit ähnlicher Struktur wie das durch virale Infektion erzeugte produziert, um die wirksamsten Antikörperreaktionen zur viralen Neutralisierung hervorzurufen. Dieses Ziel wird hier erreicht durch Expression des zellmembran-assoziierten Epitops gp160 in vivo, um das Immunsystem zu primen. Jedoch ist die Expression von gp160 in Abwesenheit von REV aufgrund mangelnden Exports aus dem Zellkern von nicht-gespleißten Genen unterdrückt. Zur Verständnis dieses Systems muss der Lebenszyklus von HIV detaillierter beschrieben werden.

**[0069]** Im Lebenszyklus von HIV wird nach Infektion einer Wirtszelle das HIV-RNA-Genom revers in eine provirale DNA transkribiert, welche in die genomische Wirts-DNA als eine einzige transkriptionale Einheit integriert wird. Das LTR liefert den Promotor, welcher HIV-Gene in 5'- zu 3'-Richtung transkribiert (gag, pol, env), um ein ungespleißtes Transkript des gesamten Genoms zu bilden. Das ungespleißte Transkript fungiert als die mRNA, von der gag und pol translatiert werden, während ein begrenztes Spleißen für die Translation der env-codierten Gene stattfinden muss. Für das zu exprimierende regulatorische Genprodukt REV muss mehr als ein Spleißereignis stattfinden, da im genomischen Rahmen REV und env überlappen, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Damit die Transkription von env stattfinden kann, muss die REV-Transkription aufhören und umgekehrt. Darüber hinaus ist die Anwesenheit von REV für den Export von ungespleißter RNA aus dem Zellkern erforderlich. Damit REV in dieser Weise funktionieren kann, muss jedoch ein REV-Response-Element (RRE) auf dem Transkript vorhanden sein [Malim et al., Natur 338: 254–257 (1989)].

**[0070]** In dem Polynukleotid-Vakzin dieser Erfindung ist das obligatorische Spleißen bestimmter HIV-Gene ausgeschaltet durch die Bereitstellung vollständig gespleißter Gene (d.h. die Bereitstellung eines vollständigen offenen Leserahmens für das gewünschte Genprodukt ohne das Erfordernis von Umschaltungen im Leserahmen oder Eliminierung nicht-codierender Regionen; Durchschnittsfachleute auf dem Gebiet würden erkennen, dass sich beim Spleißen eines bestimmten Gens eine gewisse Variationsbreite in der resultierenden genauen Sequenz ergibt; solange jedoch eine funktionelle codierende Sequenz erhalten wird, ist dies akzeptabel). Somit wird in einer Ausführungsform die gesamte codierende Sequenz für gp160 so gespleißt, dass keine unterbrochene Expression eines jeden Genprodukts erforderlich ist.

**[0071]** Die zweifachen humoralen und zellulären Immunreaktionen, welche gemäß dieser Erfindung hervorgerufen werden, sind besonders bedeutsam für die Inhibierung der HIV-Infektion, aufgrund der Neigung von HIV zur Mutation innerhalb der Population sowie innerhalb infizierter Individuen. Zur Formulierung eines effektiven schützenden Vazins gegen HIV ist es wünschenswert, sowohl eine multivalente Antikörperreaktion gegen beispielsweise gp160 (env ist zu etwa 80% bei verschiedenen HIV-1-Klasse B-Stämmen konserviert, welche die vorherrschenden Stämme in humanen US-Populationen sind), das prinzipielle Neutralisationsziel auf HIV, als auch zytotoxische T-Zellen, welche mit den konservierten Abschnitten von gp160 und viralen inneren Proteinen, die von gag codiert werden, reagieren können, hervorzurufen. Wir haben ein HIV-Vakzin hergestellt, umfassend gp160-Gene, die aus üblichen Laborstämmen, aus vorherrschenden primären viralen Isolaten, die innerhalb der infizierten Population gefunden wurden, aus mutierten gp160, die zur Demaskierung von stammübergreifenden neutralisierenden Antikörper-Epitopen konstruiert worden sind, und anderen repräsentativen HIV-Genen, wie z.B. den gag- und pol-Genen (~95% konserviert bei HIV-Isolaten), ausgewählt wurden.

**[0072]** Praktisch alle HIV-seropositiven Patienten, welche noch nicht bis zu einem Immunschwäche-Status fortgeschritten sind, beherbergen Anti-gag-CTLs, während etwa 60% dieser Patienten stammübergreifende gp160-spezifische CTLs zeigen. Die Menge von HIV-spezifischen CTLs, welche in infizierten Individuen, die zu dem als AIDS bekannten Krankheitszustand fortgeschritten sind, gefunden wird, ist jedoch viel niedriger, welches die Bedeutung unserer Befunde, dass wir stammübergreifende CTL-Reaktionen induzieren können, demonstriert.

**[0073]** Immunreaktionen, welche von unseren env- und gag-Polynukleotid-Vakzin-Konstrukten induziert werden, werden in Mäusen und Primaten demonstriert. Die Überwachung der Antikörperproduktion gegen env in Mäusen erlaubt die Bestätigung, dass ein gegebenes Konstrukt in geeigneter Weise immunogen ist, d.h. ein

hoher Anteil geimpfter Tiere eine Antikörperreaktion zeigt. Mäuse bieten auch das einfachste Tiermodell, welches zum Testen der CTL-Induktion durch unsere Konstrukte geeignet ist, und werden deshalb zur Ermittlung, ob ein spezielles Konstrukt zur Hervorrufung einer solchen Aktivität in der Lage ist, verwendet. Affen (Afrikanische Grüne Meerkatze, Rhesus, Schimpansen) bieten weitere Spezies, einschließlich Primaten, zur Antikörperbewertung in größeren Nicht-Nagetieren. Diese Spezies sind auch für Antiseren-Neutralisierungsassays aufgrund der hohen Niveaus endogener neutralisierender Aktivitäten gegen Retroviren, die in Mausseren beobachtet werden, gegenüber Mäusen bevorzugt. Diese Daten demonstrieren, dass unsere Vakzine eine ausreichende Immunogenität verleihen, um in Experimenten in einem Schimpansen/-HIV<sub>III</sub>-Herausforderungsmodell, basierend auf bekannten schützenden Niveaus neutralisierender Antikörper für dieses System, einen Schutz zu erreichen. Jedoch bewegt sich die gegenwärtig entwickelnde und zunehmend akzeptierte Definition von Schutz in der wissenschaftlichen Gemeinschaft weg von der sog. "sterilisierenden Immunität", welche einen vollständigen Schutz vor einer HIV-Infektion zur Verhütung der Krankheit anzeigt. Eine Anzahl Korrelate dieses Ziels beinhalten verringerte Virustiter im Blut, wie gemessen durch entweder reverse HIV-Transkriptase-Aktivität, durch Infektivität von Serumproben, mittels eines ELISA-Assays von p24- oder einer anderen HIV-Antigen-Konzentration im Blut, erhöhte CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Konzentration und durch verlängerte Überlebensraten [siehe beispielsweise Cohen, J., Science 262: 1820–1821, 1993, hinsichtlich einer Erörterung der sich entwickelnden Definition von Anti-HIV-Vakzin-Wirksamkeit]. Die Immunogene der vorliegenden Erfindung rufen auch neutralisierende Immunreaktionen gegen infektiöse Isolate (klinische Isolate, primäre Feldisolate) von HIV hervor.

## Immunologie

### A. Antikörperreaktionen auf env

1. gp160 und gp120. Ein ELISA-Assay wird verwendet, um festzustellen, ob Vakzinvektoren, die entweder sekretiertes gp120 oder membran-gebundenes gp160 exprimieren, zur Produktion von env-spezifischen Antikörpern wirksam sind. Eine erste in vitro-Charakterisierung der env-Expression durch unsere Vakzinierungsvektoren wird bereitgestellt durch Immunoblot-Analyse von Lysaten von mit gp160 transfizierten Zellen. Diese Daten bestätigen und quantifizieren die gp160-Expression unter Verwendung von monoklonalen Anti-gp41- und Anti-gp120-Antikörpern, um die gp160-Expression von Transfektantenzellen sichtbar zu machen. In einer Ausführungsform dieser Erfindung wird gp160 gegenüber gp120 aus den folgenden Gründen bevorzugt: (1) ein erster gp120-Vektor ergab eine inkonsistente Immunogenität bei Mäusen und reagierte sehr schlecht oder gar nicht bei Afrikanischen Grünen Meerkatzen; (2) gp160 liefert zusätzliche neutralisierende Antikörper- sowie CTL-Epitope durch Bereitstellung von zusätzlichen etwa 190 Aminosäureresten aufgrund des Einschusses von gp41; (3) die gp160-Expression ist viralem env bezüglich der Tetramer-Anordnung und Gesamtkonformation ähnlicher, was oligomer-abhängige Neutralisierungsepitope ergeben könnte; und (4) wir finden, dass, ähnlich wie der Erfolg von membran-gebundenen Influenza-HA-Konstrukten zur Hervorrufung neutralisierender Antikörperreaktionen bei Mäusen, Frettchen und nicht-humanen Primaten, die Anti-gp160-Antikörperbildung der Anti-gp120-Antikörperbildung überlegen ist. Die Wahl, welcher Typ von env oder ob eine Mischung von env-Subfragmenten bevorzugt ist, wird mit den im folgenden ausgeführten Experimenten getroffen.

2. Anwesenheit und Breite neutralisierender Aktivität. ELISA-positive Antiseren von Affen werden getestet und es wird von ihnen gezeigt, dass sie sowohl homologe als auch heterologe HIV-Stämme neutralisieren.

3. V3-neutralisierende Antikörper gegenüber nicht-V3-neutralisierenden Antikörpern. Ein Hauptziel für env-PNVs ist die Erzeugung breit neutralisierender Antikörper. Es ist nun gezeigt worden, dass gegen V3-Schleifen gerichtete Antikörper sehr stammspezifisch sind und die Serologie dieser Reaktion ist zur Definierung von Stämmen verwendet worden.

a. Nicht-V3-neutralisierende Antikörper scheinen primär unzusammenhängende strukturelle Epitope innerhalb von gp120 zu erkennen, welche für die CD4-Bindung verantwortlich sind. Antikörper gegen diese Domäne sind polyklonal und breiter kreuz-neutralisierend, mutmaßlich aufgrund von Mutationsbeschränkungen, welche durch die Notwendigkeit des Virus, seinen zellulären Liganden zu binden, verursacht sind. Ein in vitro-Assay wird zum Testen der Blockierung der gp120-Bindung an CD4, immobilisiert auf 96-Mulden-Platten, durch Seren aus immunisierten Tieren verwendet. Ein zweiter in vitro-Assay weist eine direkte Antikörperbindung an synthetische Peptide nach, die ausgewählte V3-Domänen repräsentieren, immobilisiert auf Kunststoff. Diese Assays sind kompatibel mit Antiseren aus irgendwelchen der in unseren Studien verwendeten Tiertypen und definieren die Typen von neutralisierenden Antikörpern, die unsere Vakzine hervorgerufen haben, und bieten auch eine in vitro-Korrelation zur Virus-Neutralisierung.

b. gp41 beherbergt mindestens eine hauptsächliche Neutralisierungsdeterminante, entsprechend dem stark konservierten linearen Epitop, welches von dem breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 (im Handel erhältlich von Viral Testing Systems Corp., Texas Commerce Tower, 600 Travis Street, Suite

4750, Houston, TX 77002-3005 (USA), oder Waldheim Pharmazeutika GmbH, Boltzmannngasse 11, A-1091 Wien, Österreich) erkannt wird, sowie andere potentielle Stellen, einschließlich der wohlkonservierten "Fusionspeptid"-Domäne, die sich am N-Terminus von gp41 befindet. Neben dem Nachweis von gegen gp41 gerichteten Antikörpern mittels Immunoblot wie oben beschrieben, wird ein in vitro-Assay-Test für Antikörper verwendet, die an synthetische Peptide, welche diese Domänen repräsentieren, immobilisiert auf Kunststoff, binden.

4. Reifung der Antikörperreaktion. Bei HIV-seropositiven Patienten erweitern sich die neutralisierenden Antikörperreaktionen von hauptsächlich Anti-V3-Reaktionen, um breiter neutralisierende Antikörper, umfassend die oben beschriebenen (# 3) strukturellen gp120-Domänen-Epitope, einschließlich gp41-Epitope, einzuschließen. Diese Typen von Antikörperreaktionen werden sowohl im Verlauf der Zeit als auch im Verlauf von anschließenden Impfungen überprüft.

#### B. T-Zell-Reaktivitäten gegen env und gag

1. Hervorrufung von CTL-Reaktionen. Virale Proteine, welche innerhalb von Zellen synthetisiert werden, führen zu MHC I-beschränkten CTL-Reaktionen. Jedes dieser Proteine ruft CTL in seropositiven Patienten hervor. Unsere Vakzine sind auch in der Lage, CTL in Mäusen hervorzurufen. Die Immunogenetik von Mausstämmen eignet sich für solche Studien, wie mit Influenza-NP demonstriert. Mehrere Epitope wurden für die HIV-Proteine env, REV, nef und gag in Balb/c-Mäusen definiert, wodurch in vitro-CTL-Kultur- und -Zytotoxizitäts-Assays erleichtert werden. Es ist von Vorteil, syngene Tumormlinien zu verwenden, wie z.B. die Maus-Mastozytomlinie P815, die mit diesen Genen transfiziert wurde, um Targets für CTL sowie für eine antigen-spezifische in vitro-Restimulation zu ergeben. Verfahren zur Definition von Immunogenen, welche zur Hervorrufung von MHC-Klasse 1-beschränkten zytotoxischen T-Lymphozyten in der Lage sind, sind bekannt. Ein Peptid, welches die Aminosäuren 152–176 umfasst, wurde auch befunden, HIV-neutralisierende Antikörper zu induzieren, und diese Verfahren können dazu eingesetzt werden, immunogene Epitope zum Einschluss in das PNV dieser Erfindung zu identifizieren. Alternativ könnte das vollständige Gen, welches für gp160, gp120, Protease oder gag codiert, verwendet werden. Wie hier verwendet, ist die T-Zell-Effektorfunktion assoziiert mit dem reifen T-Zell-Phänotyp, beispielsweise Zytotoxizität, Zytokin-Sekretion für die B-Zell-Aktivierung und/oder Induktion oder Stimulation von Makrophagen und Neutrophilen.

2. Messung von  $T_H$ -Aktivitäten. Von geimpften Tieren erhaltene Milzzellkulturen werden hinsichtlich der Erinnerung an spezifische Antigene durch Zugabe von entweder rekombinantem Protein oder Peptid-Epitopen getestet. Die Aktivierung von T-Zellen durch solche Antigene, präsentiert von begleitenden antigen-präsentierenden Milzzellen, APCs, wird durch Proliferation dieser Kulturen oder mittels Zytokin-Produktion überprüft. Das Muster der Zytokin-Produktion erlaubt auch eine Klassifizierung der  $T_H$ -Reaktion als Typ 1 oder Typ 2. Nachdem dominante  $T_H$ -2-Reaktionen mit dem Ausschluss zellulärer Immunität bei immungeschwächten seropositiven Patienten korreliert zu sein scheinen, ist es möglich, den Typ einer Reaktion, welcher durch ein gegebenes PNV in Patienten hervorgerufen wird, festzustellen, was eine Manipulation der resultierenden Immunreaktionen erlaubt.

#### 3. Hypersensitivität vom verzögerten Typ („Delayed Type Hypersensitivity“; DTH)

**[0074]** Die DTH für ein virales Antigen nach i.d. Injektion zeigt eine zelluläre, primär MHC II-beschränkte Immunität an. Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit rekombinanter HIV-Proteine und synthetischer Peptide für bekannte Epitope werden DTH-Reaktionen in geimpften Wirbeltieren unter Verwendung dieser Reagenzien unschwer bestimmt und liefern somit eine zusätzliche in vivo-Korrelation für die Induktion einer zellulären Immunität.

#### Schutz

**[0075]** Auf Grundlage der obigen immunologischen Studien ist es vorhersagbar, dass unsere Vakzine in Vertebraten gegenüber einer Herausforderung durch virulentes HIV wirksam sind. Diese Studien werden in einem HIV<sub>III<sub>B</sub></sub>/Schimpansen-Herausforderungsmodell nach ausreichender Impfung dieser Tiere mit einem PNV-Konstrukt oder einer Mischung von PNV-Konstrukten, umfassend gp160<sub>III<sub>B</sub></sub>, gag<sub>III<sub>B</sub></sub>, nef<sub>III<sub>B</sub></sub> und REV<sub>III<sub>B</sub></sub>, durchgeführt. Der III<sub>B</sub>-Stamm ist in dieser Hinsicht nützlich, da der Schimpansentiter von tödlichen Dosen dieses Stammes festgestellt wurde. Jedoch werden dieselben Studien unter Verwendung eines beliebigen Stammes von HIV und der für den gegebenen Stamm spezifischen oder heterologen Epitope in Betracht gezogen. Ein zweites Impf/Herausforderungsmodell neben Schimpansen ist die scid-hu-PBL-Maus. Dieses Modell erlaubt das Testen des humanen Lymphozyten-Immunsystems und unseres Vakzins mit einer nachfolgenden HIV-Herausforderung in einem Maus-Wirt. Dieses System ist vorteilhaft, da es leicht zur Verwendung mit irgendeinem HIV-Stamm adaptiert wird und einen Nachweis des Schutzes gegen mehrere Stämme von primären Feldiso-

laten von HIV liefert. Ein drittes Herausforderungsmodell verwendet hybride HIV/SIV-Viren (SHIV), von denen bei einigen demonstriert wurde, dass sie Rhesusaffen infizieren und zu einer Immunschwächeerkrankung führen, die zum Tod führt [siehe Li, J., et al., J. AIDS 5: 639–646, 1992]. Die Impfung von Rhesusaffen mit unseren Polynukleotid-Vakzin-Konstrukten schützt gegen eine nachfolgende Herausforderung mit tödlichen Dosen an SHIV.

#### PNV-Konstrukt-Zusammenfassung

**[0076]** HIV-Gene und andere Gene werden in einen Expressionsvektor ligiert, der für Polynukleotid-Impfungen optimiert wurde. Im wesentlichen die gesamte Fremd-DNA ist entfernt, was die essentiellen Elemente von transkriptionalem Promotor, immunogenen Epitopen, transkriptionalem Terminator, bakteriellem Replikationsursprung und Antibiotikaresistenzgen übrig lässt.

**[0077]** Die Expression von späten HIV-Genen wie env und gag ist REV-abhängig und erfordert, dass das REV-Response-Element (RRE) auf dem Transkript des viralen Gens vorliegt. Eine sekretierte Form von gp120 kann in Abwesenheit von REV erzeugt werden durch Ersatz des gp120-Leaderpeptids durch einen heterologen Leader, wie z.B. aus tPA (Gewebe-Plasminogenaktivator), und vorzugsweise durch ein Leaderpeptid wie es in hoch exprimierten Säugerproteinen gefunden wird, wie z.B. Immunglobulin-Leaderpeptide. Wir haben ein chimäres tPA-gp120-Gen in V1Jns eingeführt, welches effizient sekretiertes gp120 in transfizierten Zellen (RD, eine Human-Rhabdomyosarkomlinie) exprimiert. Monocistronisches gp160 produziert keinerlei Protein nach Transfektion ohne die Addition eines REV-Expressionsvektors.

**[0078]** Repräsentative Konstruktbestandteile umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf):

1. tPA-gp120<sub>MN</sub>;
3. gp160<sub>IIIb</sub>;
10. gag<sub>IIIb</sub>: für Anti-gag-CTL;
11. tPA-gp120<sub>IIIb</sub>;
12. gp160 mit strukturellen Mutationen: V1-, V2- und/oder V3-Schleifen-Deletionen oder -Substitutionen
20. Gene, codierend für Antigene, die vor anderen Pathogenen als HIV exprimiert werden, wie z.B., jedoch nicht beschränkt auf, Influenzavirus-Nukleoprotein, Hämagglutinin, Matrix, Neuraminidase und andere antigene Proteine; Herpes simplex-Virus-Gene; Human-Papillomavirus-Gene; Tuberkulose-Antigene; Hepatitis A-, B- oder C-Virus-Antigene.

**[0079]** Die Schutzwirksamkeit von Polynukleotid-HIV-Immunogenen gegen eine nachfolgende virale Herausforderung wird demonstriert durch Immunisierung mit der nicht-replizierenden Plasmid-DNA dieser Erfindung. Dies ist von Vorteil, da kein infektiöses Agens involviert ist, die Assemblierung von Viruspartikeln nicht erforderlich ist und eine Determinanten-Selektion ermöglicht wird. Ferner wird, da die Sequenz von gag und Protease und mehreren der anderen viralen Genprodukte bei verschiedenen Stämmen von HIV konserviert ist, ein Schutz gegen eine nachfolgende Herausforderung durch sowohl einen virulenten Stamm von HIV, der homolog zu dem Stamm sind, aus dem das klonierte Gen erhalten wurde, als auch durch heterologe Stämme ermöglicht.

**[0080]** Die intramuskuläre Injektion eines DNA-Expressionsvektors, codierend für gp160, führt zur Erzeugung einer signifikanten schützenden Immunität gegen eine nachfolgende virale Herausforderung. Insbesondere werden gp160-spezifische Antikörper und primäre CTLs gebildet. Immunreaktionen, gerichtet gegen konservierte Proteine, können trotz der antigenen „Shift“ und „Drift“ der variablen Hüllproteine wirksam sein. Nachdem jedes der HIV-Genprodukte einen gewissen Grad an Konservierung zeigt und nachdem CTL als Reaktion auf eine intrazelluläre Expression und MHC-Prozessierung gebildet werden, ist es voraussagbar, dass viele Virusgene zu analogen Reaktionen wie den für gp160 erhaltenen führen werden. So wurden viele dieser Gene kloniert, wie gezeigt durch die klonierten und sequenzierten Verbindungsstellen in dem Expressionsvektor (siehe unten), so dass diese Konstrukte immunogene Agenzien in verfügbarer Form darstellen.

**[0081]** Die Erfindung bietet ein Mittel zur Induktion einer stammübergreifenden schützenden Immunität ohne die Notwendigkeit selbstreplizierender Agenzien oder Adjuvantien. Darüber hinaus bietet eine Immunisierung mit den vorliegenden Polynukleotiden eine Reihe anderer Vorteile. Dieser Ansatz für eine Impfung sollte für Tumore ebenso wie für infektiöse Agenzien anwendbar sein, da die CD8<sup>+</sup>-CTL-Reaktion für beide pathophysiologischen Prozesse von Bedeutung ist [K. Tanaka et al., Annu. Rev. Immunol. 6, 359 (1988)]. Deshalb könnte die Hervorrufung einer Immunreaktion gegen ein Protein, welches für den Transformationsprozess essentiell ist, ein effektives Mittel zum Schutz vor Krebs oder für eine Immuntherapie sein. Die Erzeugung von Antikörpern mit hohem Titer gegen exprimierte Proteine nach Injektion von DNA für virales Protein und Hu-

man-Wachstumshormon legt nahe, dass dies eine bequeme und hocheffiziente Weise zur Herstellung von antikörper-basierten Vakzinen, entweder separat oder in Kombination mit zytotoxischen T-Lymphozyten-Vakzinen, die gegen konservierte Antigene gerichtet sind, darstellt.

**[0082]** Die Leichtigkeit der Herstellung und Reinigung von DNA-Konstrukten ist günstig im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren der Proteinreinigung und erleichtert somit die Herstellung von Kombinations-Vakzinen. Demgemäß können Mehrfachkonstrukte, beispielsweise codierend für gp160, gp120, gp41 oder irgendein anderes HIV-Gen, hergestellt, gemischt und gemeinsam verabreicht werden. Nachdem die Proteinexpression nach DNA-Injektion aufrecht erhalten wird, kann die Dauer der B- und T-Zell-Erinnerung erhöht werden, wodurch eine langfristige humorale und zellvermittelte Immunität verliehen wird.

**[0083]** Standardtechniken der Molekularbiologie zur Herstellung und Reinigung von DNA-Konstrukten ermöglichen die Herstellung der DNA-Immunogene dieser Erfindung. Obwohl Standardtechniken der Molekularbiologie deshalb zur Herstellung der Produkte dieser Erfindung ausreichend sind, stellen die hier offenbarten speziellen Konstrukte neue Polynukleotid-Immunogene bereit, welche überraschenderweise eine stammübergreifende und Primär-HIV-Isolat-Neutralisierung ergeben, ein Ergebnis, das bisher mit Standard-Vakzinen auf der Basis von inaktiviertem ganzen Virus oder Untereinheitsprotein nicht erreichbar war.

**[0084]** Die Menge an exprimierbarer DNA oder transkribierter RNA, die in einen Vakzin-Empfänger eingeführt werden soll, wird von der Stärke der verwendeten transkriptionalen und translationalen Promotoren und der Immunogenität des exprimierten Genprodukts abhängen. Im Allgemeinen wird eine immunologisch oder prophylaktisch wirksame Dosis von etwa 1 ng bis 100 mg und vorzugsweise etwa 10 µg bis 300 µg direkt in Muskelgewebe verabreicht. Subkutane Injektion, intradermale Einführung, Impression durch die Haut und andere Verabreichungsweisen, wie z.B. intraperitoneale, intravenöse Abgabe oder Abgabe mittels Inhalation, werden ebenfalls in Betracht gezogen. Es wird auch in Betracht gezogen, dass Booster-Impfungen vorzusehen sind. Nach der Impfung mit HIV-Polynukleotid-Immunogen wird ein Boosting mit HIV-Protein-Immunogenen wie den Genprodukten gp160, gp120 und gag ebenfalls in Betracht gezogen. Eine parenterale Verabreichung, wie z.B. intravenöse, intramuskuläre, subkutane oder anderweitige Verabreichung von Interleukin-12-Protein, gleichzeitig mit der oder anschließend an die parenterale Einführung des PNV dieser Erfindung ist ebenfalls von Vorteil.

**[0085]** Das Polynukleotid kann nackt sein, d.h. nicht assoziiert mit irgendwelchen Proteinen, Adjuvantien oder anderen Mitteln, welche einen Einfluss auf das Immunsystem des Empfängers haben. In diesem Fall ist es wünschenswert, dass das Polynukleotid in einer physiologisch annehmbaren Lösung vorliegt, wie z.B., jedoch nicht beschränkt auf, sterile Salzlösung oder sterile gepufferte Salzlösung. Alternativ kann die DNA mit Liposomen, wie z.B. Lecithin-Liposomen oder anderen im Stand der Technik bekannten Liposomen, als DNA-Liposom-Mischung assoziiert sein oder die DNA kann mit einem im Stand der Technik bekannten Adjuvans assoziiert sein, um Immunreaktionen zu verstärken, wie z.B. ein Protein oder ein anderer Träger. Agenzien, welche die zelluläre Aufnahme von DNA fördern, wie z.B., jedoch nicht beschränkt auf, Calciumionen, können ebenfalls vorteilhaft eingesetzt werden. Diese Agenzien werden hier allgemein als transfektionserleichternde Reagenzien und pharmazeutisch annehmbare Träger bezeichnet. Techniken zur Beschichtung von Mikroprojekten, die mit Polynukleotid beschichtet sind, sind im Stand der Technik bekannt und in Zusammenhang mit dieser Erfindung ebenfalls von Nutzen.

**[0086]** Die folgenden Beispiele dienen nur zur Erläuterung und sollen die Erfindung in keiner Weise beschränken.

#### BEISPIEL 1

##### Materialbeschreibungen

**[0087]** Vektoren pF411 und pF412: Diese Vektoren wurden aus dem Vektor pSP62 subkloniert, der im Labor von R. Gallo konstruiert wurde. pSP62 ist ein erhältliches Reagens von Biotech Research Laboratories, Inc. pSP62 weist ein 12,5-kb-XbaI-Fragment des HXB2-Genoms, subkloniert aus Lambda HXB2, auf. Eine Sall- und XbaI-Verdauung von pSP62 ergibt HXB2-Fragmente: 5'-XbaI/Sall, 6,5 kb, und 3'-Sall/XbaI, 6 kb. Diese Inserts wurden in pUC18 an SmaI- und Sall-Stellen subkloniert, was pF411 (5'-XbaI/Sall) und pF412 (3'-XbaI/Sall) ergab. pF411 enthält gag/pol und pF412 enthält tat/rev/env/nef.

## Repligen-Reagenzien:

rekombinantes rev (IIIB), # RP1024-10  
 rek. gp120 (IIIB), # RP1001-10  
 monoklonaler Anti-rev-Antikörper, # RP1029-10  
 Anti-gp120-mAB, # 1C1, # RP1010-10

## AIDS-Research-and-Reference-Reagent-Program:

Anti-gp41-mAB-Hybridom, Chessie 8, # 526

**[0088]** Die Strategien wurden entwickelt, um sowohl zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)-Reaktionen als auch neutralisierende Antikörperreaktionen gegen HIV, hauptsächlich gegen die HIV-Genprodukte gag (~95% konserviert) und env (gp160 oder gp120; 70–80% konserviert) gerichtet, zu induzieren. gp160 enthält die einzigen bekannten neutralisierenden Antikörper-Epitope auf dem HIV-Partikel, während die Bedeutung der Anti-env- und Anti-gag-CTL-Reaktionen unterstrichen wird durch die bekannte Assoziation des Beginns dieser zellulären Immunitäten mit der Clearance der primären Virämie nach einer Infektion, welche vor dem Auftreten neutralisierender Antikörper stattfindet, sowie durch eine Rolle für CTL bei der Aufrechterhaltung eines krankheitsfreien Status. Nachdem HIV für seine genetische Unterschiedlichkeit notorisch bekannt ist, erhoffen wir durch den Einschluss von mehreren repräsentativen env-Genen, die aus klinischen Isolaten erhalten wurden, und von gp41 (~90% konserviert) eine größere Breite neutralisierender Antikörper zu erhalten, während das hoch konservierte gag-Gen breite stammübergreifende CTL-Reaktionen ergeben sollte.

## BEISPIEL 2

## Heterologe Expression von späten HIV-Genprodukten

**[0089]** HIV-Strukturgene, wie z.B. env und gag, erfordern die Expression des regulatorischen HIV-Gens, rev, um effizient Vollängenproteine zu produzieren. Wir haben festgestellt, dass die rev-abhängige Expression von gag niedrige Proteinniveaus ergab und dass rev selbst für Zellen toxisch sein kann. Obwohl wir relativ hohe Niveaus an rev-abhängiger Expression von gp160 in vitro erzielten, lief dieses Vakzin niedrige Niveaus an Antikörpern gegen gp160 nach einer in vivo-Immunisierung mit rev/gp160-DNA hervor. Dies kann auf den bekannten zytotoxischen Wirkungen von rev sowie einer erhöhten Schwierigkeit bei der Erhaltung der rev-Funktion in Myotubuli, die Hunderte von Kernen enthalten (das rev-Protein muss im selben Kern wie ein rev-abhängiges Transkript vorliegen, damit eine gag- oder env-Proteinexpression stattfinden kann), beruhen. Es war jedoch unter Verwendung ausgewählter Modifikationen des env-Gens und gag möglich, eine rev-unabhängige Expression zu erhalten. Eine Bewertung dieser Plasmide für Vakzin-Zwecke ist im Gange.

**[0090]** Im Allgemeinen wurde bei unseren Vakzinen primär HIV (IIIB)-env- und -gag-Gene für die Optimierung der Expression innerhalb unseres allgemeinen Vakzinierungsvektors V1Jns, umfassend einen CMV-"immediate-early" (IE)-Promotor, eine BGH-Polyadenylierungsstelle und ein pUC-Gerüst, eingesetzt. Variierende Effizienzen der rev-unabhängigen Expression, in Abhängigkeit davon, wie groß ein eingesetztes Gensegment ist (z.B. gp120 gegenüber gp160), können für env durch Ersatz seines nativen sekretorischen Leaderpeptids durch dasjenige aus dem Gen des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPA) und Expression des resultierenden chimären Gens hinter dem CMVIE-Promotor mit dem CMV-Intron A erzielt werden. tPA-gp120 ist ein Beispiel eines auf diese Weise konstruierten sekretierten gp120-Vektors, welcher gut genug funktioniert, um Anti-gp120-Immunreaktionen in geimpften Mäusen und Affen hervorzurufen.

**[0091]** Aufgrund von Berichten, dass membran-verankerte Proteine viel substantiellere (und vielleicht bezüglich der HIV-Neutralisierung spezifischere) Antikörperreaktionen im Vergleich zu sekretierten Proteinen induzieren könnten, sowie um zusätzliche Immunepitope zu erhalten, stellten wir V1Jns-tPA-gp160 und V1Jns-rev/gp160 her. Der Vektor tPA-gp160 produzierte nachweisbare Mengen an gp160 und gp120 ohne die Zugabe von rev, wie gezeigt durch Immunoblot-Analyse transfizierter Zellen, obwohl die Expressionsniveaus viel niedriger waren als diejenigen, welche für rev/gp160, ein rev-abhängiges gp160-exprimierendes Plasmid, erhalten wurden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass inhibitorische Regionen (als INS bezeichnet), welche dem gp160-Transkript rev-Abhängigkeit verleihen, an mehreren Stellen innerhalb von gp160, einschließlich des COOH-Terminus von gp41, auftreten (siehe Schema unten). Ein Vektor wurde für eine am COOH-Terminus verkürzte Form von tPA-gp160, tPA-gp143, hergestellt, welche entwickelt wurde, um die Gesamtexpressionsniveaus von env durch Eliminierung dieser inhibitorischen Sequenzen zu erhöhen. Der Vektor gp143 eliminiert auch intrazelluläre gp41-Regionen, welche Peptidmotive enthalten (wie z.B. Leu-Leu), von denen bekannt

ist, dass sie eine Umleitung von Membranproteinen zu den Lysosomen statt zur Zelloberfläche verursachen. Somit kann erwartet werden, dass gp143 im Vergleich zu Vollängen-gp160 sowohl die Expression des env-Proteins erhöht (durch Verringerung der rev-Abhängigkeit) als auch die Effizienz des Proteintransports zur Zelloberfläche, wo diese Proteine besser in der Lage sein könnten, Anti-gp160-Antikörper nach DNA-Impfung hervorzurufen. tPA-gp143 wurde weiter modifiziert durch umfangreiche stille Mutagenese der rev-Response-Element (RRE)-Sequenz (350 bp), um zusätzliche inhibitorische Sequenzen für die Expression zu eliminieren. Dieses Konstrukt, gp143/mutRRE, wurde in zwei Formen hergestellt: entweder unter Eliminierung (Form A) oder Erhaltung (Form B) proteolytischer Spaltstellen für gp120/41. Aufgrund von Literaturberichten, dass die Impfung von Mäusen unter Verwendung von nicht-spaltbarem gp160, exprimiert in Vaccinia, viel höhere Niveaus an Antikörpern gegen gp160 als spaltbare Formen hervorrief, wurden beide Formen hergestellt.

**[0092]** Ein quantitativer ELISA für die gp160/gp120-Expression in Zell-Transfektanten wurde entwickelt, um die relativen Expressionsvermögen für diese Vektoren festzustellen. In vitro-Transfektion von 293-Zellen, gefolgt von einer quantitativen Bestimmung von zellassoziertem gegenüber sekretiertem/freigesetztem gp120 ergab die folgenden Ergebnisse: (1) tPA-gp160 exprimierte 5–10× weniger gp120 als rev/gp160, mit ähnlichen Verhältnissen von intrazellulär zurückgehaltenem Protein gegenüber zur Zelloberfläche transportiertem Protein; (2) tPA-gp143 ergab eine 3–6× höhere Sekretion von gp120 als rev/gp160, mit nur niedrigen Niveaus an zellassoziertem gp143, was bestätigt, dass das zytoplasmatische Ende von gp160 eine intrazelluläre Retention von gp160 verursacht, welche durch partielle Deletion dieser Sequenz überwunden werden kann; und (3) tPA-gp143/mutRRE-A und -B ergaben ~10× höhere Expressionsniveaus an Protein als das Ausgangs-tPA-gp143, während eine Eliminierung der proteolytischen Prozessierung für die Form A bestätigt wurde.

**[0093]** Somit führte unsere Strategie zur Erhöhung der rev-unabhängigen Expression zu stufenweisen Erhöhungen der Gesamtexpression sowie zu einer Umleitung von membran-verankertem gp143 zur Zelloberfläche, weg von den Lysosomen. Es ist wichtig anzumerken, dass es möglich sein sollte, gp120-Sequenzen, die von verschiedenen viralen Isolaten erhalten wurden, in eine Vektorkassette, welche diese Modifikationen enthält, die entweder am NH<sub>2</sub>-Terminus (tPA-Leader) oder COOH-Terminus (gp41) vorliegen, wo wenig antigene Unterschiede zwischen verschiedenen Virusstämmen vorliegen, einzuführen. Mit anderen Worten, dies ist ein generisches Konstrukt, welches leicht durch Insertion von gp120, das von verschiedenen primären viralen Isolaten erhalten wurde, modifiziert werden kann, um klinisch relevante Vakzine zu erhalten.

**[0094]** Für die Anwendung dieser Expressionsstrategien bei Viren, welche für Vakzin-Zwecke von Bedeutung sind, und zur Bestätigung der allgemeinen Gültigkeit unserer Ansätze stellten wir auch einen tPA-gp120-Vektor her, der von einem primären HIV-Isolat erhalten wurde (enthaltend die Nordamerikanische Consensus-V3-Peptid-Schleife; makrophagen-tropische und nicht-syncytien-induzierende Phänotypen). Dieser Vektor ergab eine hohe Expression/-Sekretion von gp120 mit transfizierten 293-Zellen und rief Anti-gp120-Antikörper in Mäusen hervor, was demonstriert, dass er in einer funktionellen Form kloniert worden war. Auch gp160-Gene eines primären Isolats werden zur Expression auf dieselbe Weise wie gp160, das aus Laborstämmen erhalten wurde, verwendet werden.

### BEISPIEL 3

#### Immunreaktionen auf HIV-1-env-Polynukleotid-Vakzine:

**[0095]** Afrikanische Grüne Meerkatzen (AGM) und Rhesusaffen („rhesus monkeys“; RHM), welche gp120-DNA-Vakzine erhielten, zeigten niedrige Niveaus an neutralisierenden Antikörpern nach 2–3 Impfungen, welche durch eine zusätzliche Impfung nicht erhöht werden konnten. Diese Ergebnisse sowie eine zunehmende Erkenntnis auf dem Gebiet der HIV-Vakzine, dass das oligomere gp160 wahrscheinlich ein relevanteres Ziel-Antigen für die Hervorrufung neutralisierender Antikörper als gp120-Monomere darstellt (Moore und Ho, J. Virol. 67: 863 (1993)), führte uns zur Konzentration auf den Erhalt einer wirksamen Expression von Vektoren auf gp160-Basis (siehe oben). Mäuse und AGM wurden auch mit dem aus einem primären Isolat erhaltenen tPA-gp120-Vakzin geimpft. Diese Tiere zeigten (bei Verwendung einer homologen Sequenz) reziproke Endpunkt-Antikörpertiter gegen V3-Peptid im Bereich von 500–5000, welches demonstriert, dass diese Vakzin-Konstruktion bei klinisch relevanten Virusisolaten funktionell ist.

**[0096]** Die auf gp160 basierenden Vakzine, rev-gp160 und tPA-gp160, waren nicht in der Lage, beständig Antikörperreaktionen in Mäusen und nicht-humanen Primaten hervorzurufen, oder ergaben niedrige Antikörpertiter. Unsere ersten Ergebnisse mit dem Plasmid tPA-gp143 ergaben geometrische Mittelwert-Titer > 10<sup>3</sup> in Mäusen und AGM nach zwei Impfungen. Diese Daten zeigen, dass wir die Immunogenität von gp160-artigen Vak-

zinen durch Erhöhung der Expressionsniveaus signifikant verbessert haben. Dieses Konstrukt sowie die Vektoren tPA-gp143/mutRRE-A und -B werden hinsichtlich Antikörperreaktionen, insbesondere zur Virusneutralisierung, weiter charakterisiert werden.

**[0097]** Signifikanterweise ergab die gp120-DNA-Impfung potente Helfer T-Zell-Reaktionen in allen getesteten lymphatischen Kompartimenten (Milz, Blut, inguinale, mesenterische und iliakale Knoten) mit  $T_H1$ -ähnlichen Zytokin-Sekretionsprofilen (d.h. Gamma-Interferon- und IL-2-Produktion mit wenig oder keinem IL-4). Diese Zytokine fördern allgemein eine starke zelluläre Immunität und wurden mit der Aufrechterhaltung eines krankheitsfreien Zustands für HIV-seropositive Patienten in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass Lymphknoten primäre Stellen für die HIV-Replikation sind und große Reservoirs an Virus beherbergen, selbst wenn das Virus nicht ohne weiteres im Blut nachgewiesen werden kann. Ein Vakzin, welches Anti-HIV-Immunreaktionen an einer Vielzahl von Lymphstellen hervorrufen kann, wie z.B. von uns mit unserem DNA-Vakzin gezeigt, könnte eine erfolgreiche Kolonisierung der Lymphknoten nach der ursprünglichen Infektion verhindern helfen.

**[0098]** Wie zuvor festgestellt, betrachten wir die Realisierung der folgenden Ziele als essentiell zur Maximierung unserer Chancen für einen Erfolg mit diesem Programm: (1) env-basierte Vektoren, die in der Lage sind, stärkere neutralisierende Antikörperreaktionen in Primaten hervorzurufen; (2) gag- und env-Vektoren, welche starke T-Lymphozyten-Reaktionen hervorrufen, wie charakterisiert durch CTL- und Helfer-Effektor-Funktionen in Primaten; (3) Verwendung von env- und gag-Genen aus klinisch relevanten HIV-1-Stämmen in unseren Vakzinen und Charakterisierung der immunologischen Reaktionen, insbesondere Neutralisierung primärer Isolate, die sie hervorrufen; (4) Demonstration von Schutz in einem Tier-Herausforderungsmodell, wie z.B. Schimpanse/HIV (IIIB) oder Rhesus/SHIV, bei Verwendung geeigneter optimierter Vakzine; und (5) Feststellung der Dauer von Immunreaktionen, die für den klinischen Einsatz geeignet sind. Ein signifikanter Fortschritt wurde bezüglich der ersten drei dieser Ziele gemacht und Experimente sind im Gang, um festzustellen, ob unsere jüngsten Vakzin-Konstrukte für gp160 und gag diese ersten Ergebnisse verbessern werden.

#### BEISPIEL 4

##### Vektoren für die Vakzin-Produktion

###### A. Expressionsvektor V1Jneo

**[0099]** Es war erforderlich, das für die Antibiotikaselektion von Bakterien, die V1J beherbergen, verwendete  $amp^r$ -Gen zu entfernen, da Ampicillin in großmaßstäblichen Fermentern nicht verwendet werden mag. Das  $amp^r$ -Gen aus dem pUC-Gerüst von V1J wurde durch Verdauung mit den Restriktionsenzymen SspI und Eam1105I entfernt. Das verbleibende Plasmid wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und dann mit alkalischer Kalbsdarmphosphatase behandelt. Das im Handel erhältliche  $kan^r$ -Gen, abgeleitet von dem Transposon 903 und in dem Plasmid pUC4K enthalten, wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym PstI ausgeschnitten, mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht. Dieses Fragment wurde mit dem V1J-Gerüst ligiert und Plasmide mit dem  $kan^r$ -Gen in jeder Orientierung wurden erhalten, welche als V1Jneo # 1 und 3 bezeichnet wurden. Jedes dieser Plasmide wurde durch Restriktionsenzymverdauungsanalyse, DNA-Sequenzierung der Verbindungsbereiche verifiziert und von ihm gezeigt, dass es ähnliche Mengen an Plasmid wie V1J bildete. Die Expression heterologer Genprodukte für diese V1Jneo-Vektoren war ebenfalls vergleichbar mit V1J. V1Jneo # 3, hier im folgenden als V1Jneo bezeichnet, welcher das  $kan^r$ -Gen in der gleichen Orientierung wie das  $amp^r$ -Gen in V1J als Expressionskonstrukt enthält, wurde willkürlich von uns ausgewählt.

###### B) Expressionsvektor V1Jns:

**[0100]** Eine SfiI-Stelle wurde V1Jneo hinzugefügt, um Integrationsstudien zu erleichtern. Ein im Handel erhältlicher 13-Basenpaar-SfiI-Linker (New England BioLabs) wurde an der KpnI-Stelle innerhalb der BGH-Sequenz des Vektors hinzugefügt. V1Jneo wurde mit KpnI linearisiert, gelgereinigt, mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht und mit dem glattendigen SfiI-Linker ligiert. Klonale Isolate wurden mittels Restriktionskartierung ausgewählt und mittels Sequenzierung über den Linker verifiziert. Der neue Vektor wurde als V1Jns bezeichnet. Die Expression heterologer Gene in V1Jns (mit SfiI) war mit der Expression der gleichen Gene in V1Jneo (mit KpnI) vergleichbar.

## C) V1Jns-tPA:

**[0101]** Zur Bereitstellung einer heterologen Leader-Peptidsequenz für sekretierte Proteine und/oder Membranproteine wurde V1Jns modifiziert, um den Leader des für Humangewebe spezifischen Plasminogenaktivators (tPA) einzuschließen. Zwei synthetische komplementäre Oligomere wurden verschmolzen und dann in V1Jn ligiert, welcher mit BglII verdaut worden war. Die Sense- und Antisense-Oligomere waren 5'-GATC ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GA-3', SEQ-ID: 18, und 5'-GAT CTC GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA CAG CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT GGT-3'. Die Kozak-Sequenz ist in dem Sense-Oligomer unterstrichen. Diese Oligomere haben überhängende Basen, die für die Ligierung mit BglII-gespaltenen Sequenzen kompatibel sind. Nach der Ligierung ist die stromaufwärts gelegene BglII-Stelle zerstört, während die stromabwärts gelegene BglII-Stelle für nachfolgende Ligierungen erhalten bleibt. Sowohl die Verbindungsstellen als auch die gesamte tPA-Leader-Sequenz wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Um unseren konsensus-optimierten Vektor V1Jns (= V1Jneo mit einer SfiI-Stelle) konform zu gehen, wurde zusätzlich eine SfiI-Restriktionsstelle an der KpnI-Stelle innerhalb des BGH-Terminatorbereichs von V1Jn-tPA plziert, indem die KpnI-Stelle mit T4-DNA-Polymerase glattendig gemacht wurde, gefolgt von Ligierung mit einem SfiI-Linker (Katalog-Nr. 1138, New England BioLabs). Diese Modifizierung wurde durch Restriktionsverdauung und Agarosegelelektrophorese verifiziert.

## BEISPIEL 5

## 1. HIV-env-Vakzin-Konstrukte:

Vakzine die sekretiertes env-abgeleitetes Antigen (gp120 und gp140) produzieren:

**[0102]** Die Expression des REV-abhängigen env-Gens als gp120 wurde wie folgt durchgeführt: gp120 wurde PCR-kloniert aus dem MN-Stamm von HIV mit entweder der nativen Leader-Peptidsequenz (V1Jns-gp120) oder als Fusion mit dem Leaderpeptid des Gewebeplasminogenaktivators (tPA), welches das native Leaderpeptid ersetzte (V1Jns-tPA-gp120). Es ist gezeigt worden, dass die tPA-gp120-Expression REV-unabhängig ist [B. S. Chapman et al., Nuc. Acids Res. 19, 3979 (1991); es sollte angemerkt werden, dass andere Leadersequenzen eine ähnliche Funktion zur Verleihung von REV-Unabhängigkeit an das gp120-Gen ausüben würden]. Dies wurde erreicht durch Herstellung der folgenden gp120-Konstrukte unter Verwendung der oben beschriebenen Vektoren:

## BEISPIEL 6

## ap120-Vakzin-Konstrukte:

A. V1Jns-tPA-HIV<sub>MN</sub> gp120:

**[0103]** Das HIV<sub>MN</sub>-gp120-Gen (Medimmune) wurde unter Verwendung von Oligomeren, welche zur Entfernung der ersten 30 Aminosäuren der Peptidleadersequenz und zur Erleichterung der Klonierung in V1Jns-tPA konstruiert worden waren, unter Schaffung eines chimären Proteins, bestehend aus dem tPA-Leaderpeptid, gefolgt von der verbleibenden gp120-Sequenz nach Aminosäurerest 30, PCR-amplifiziert. Diese Gestaltung erlaubt eine REV-unabhängige gp120-Expression und Sekretion von löslichem gp120 aus Zellen, welche dieses Plasmid beherbergen. Die verwendeten Sense- und Antisense-PCR-Oligomere waren 5'-CCC CGG ATC CTG ATC ACA GAA AAA TTG TGGGTC ACA GTC-3' und 5'-C CCC AGG AATC CAC CTG TTA GCG CTT TTC TCT CTG CAC CAC TCT TCT C-3'. Das Translationsstoppcodon ist unterstrichen. Diese Oligomere enthalten BamHI-Restriktionsenzymstellen an jedem Ende des offenen Translationsleserahmens, mit einer BclI-Stelle, die sich 3' der BamHI-Stelle des Sense-Oligomers befindet. Das PCR-Produkt wurde nacheinander mit BclI, gefolgt von BamHI, verdaut und in V1Jns-tPA ligiert, welcher mit BglII verdaut und anschließend mit alkalischer Kalbsdarmphosphatase behandelt worden war. Der resultierende Vektor wurde sequenziert, um eine Fusion im Leserahmen zwischen dem tPA-Leader und der für gp120 codierenden Sequenz zu bestätigen, und die gp120-Expression und -Sekretion wurde durch Immunoblot-Analyse transfizierter RB-Zellen verifiziert.

B. V1Jns-tPA-HIV<sub>III<sub>B</sub></sub>-gp120:

**[0104]** Dieser Vektor ist analog zu I. A., mit Ausnahme dessen, dass der HIV-III<sub>B</sub>-Stamm für die gp120-Sequenz verwendet wurde. Die verwendeten Sense- und Antisense-PCR-Oligomere waren: 5'-GGT ACA TGA TCA CA GAA AAA TTG TGG GTC ACA GTC-3' bzw. 5'-CCA CAT TGA TCA GAT ATC TTA TCT TTT TTC TCT

CTG CAC CAC TCT TC-3'. Diese Oligomere liefern BclI-Stellen an jedem Ende des Inserts sowie eine EcoRV-Stelle gerade stromaufwärts der BclI-Stelle am 3'-Ende. Die 5'-terminale BclI-Stelle erlaubt eine Ligierung in die BglII-Stelle von V1Jns-tPA, um ein chimäres tPA-gp120-Gen, codierend für die tPA-Leadersequenz und gp120 ohne dessen native Leadersequenz, zu erzeugen. Ligierungsprodukte wurden durch Restriktionsverdauung und DNA-Sequenzierung verifiziert.

## BEISPIEL 7

## gp140-Vakzin-Konstrukte:

**[0105]** Diese Konstrukte wurden mittels PCR ähnlich wie tPA-gp120 mit dem tPA-Leader anstelle des nativen Leaders hergestellt, jedoch gestaltet, um sekretiertes Antigen zu produzieren, indem das Gen unmittelbar NH<sub>2</sub>-terminal des Transmembranpeptids terminiert wurde (vorgesehene carboxyterminale Aminosäuresequenz = NH<sub>2</sub>-...TNWLWYIK-COOH). Im Gegensatz zu den gp120-produzierenden Konstrukten sollten gp140-Konstrukte oligomeres Antigen produzieren und die bekannten, in gp41 enthaltenen Antikörper-Neutralisierungsepitope wie ELDKWA, definiert durch den monoklonalen Antikörper 2F5, beibehalten.

**[0106]** Konstrukte wurden in zwei Formen (A oder B) hergestellt, in Abhängigkeit davon, ob die proteolytischen Spaltstellen von gp160 an der Verbindungsstelle von gp120 und gp41 erhalten (B) oder durch geeignete Aminosäuresubstitutionen wie von Kieny et al. (Prot. Eng. 2: 219–255 (1988)) beschrieben eliminiert (A) wurden (Wildtypsequenz = NH<sub>2</sub>-...KAKRRWQREKR...COOH und die mutierte Sequenz = NH<sub>2</sub>-...KAQNHWQ-NEHQ...COOH, wobei die mutierten Aminosäuren unterstrichen sind).

A. V1Jns-tPA-gp140/mutRRE-A/SRV-1-3'-UTR (basierend auf HIV-1<sub>IIIb</sub>):

**[0107]** Dieses Produkt wurde mittels PCR unter Verwendung der folgenden Sense- und Antisense-PCR-Oligomere erhalten: 5'-CT GAA AGA CCA GCA ACT CCT AGG GAAT TTG GGG TTG CTC TGG-3', SEQ-ID::, und 5'-CGC AGG GGA GGT GGT CTA GAT ATC TTA TTA TTT TAT ATA CCA CAG CCA ATT TGT TAT G-3', um ein AvrII/EcoRV-Segment aus dem Vektor IVB (enthaltend das optimierte RRE-A-Segment) zu erhalten. Der 3'-UTR, hergestellt als synthetisches Gensegment, das von dem Simian Retrovirus-1 (SRV-1, siehe unten) abgeleitet ist, wurde in eine SrfI-Restriktionsenzymstelle, unmittelbar 3'- des offenen Leserahmens für gp140 eingeführt, inseriert. Diese UTR-Sequenz wurde bereits zuvor als die rev-unabhängige Expression von HIV-env und -gag erleichternd beschrieben.

B. V1Jns-tPA-gp140/mutRRE-B/SRV-1-3'-UTR (basierend auf HIV-1<sub>IIIb</sub>):

**[0108]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIA, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen env-Spaltstellen durch Verwendung des Konstrukts IVC als Ausgangsmaterial erhalten wurden.

C. V1Jns-tPA-gp140/opt30-A (basierend auf HIV-1<sub>IIIb</sub>):

**[0109]** Dieses Konstrukt wurde von IVB durch Restriktionsenzymverdau mit AvrII und SrfI, gefolgt von Ligierung eines synthetischen DNA-Segments, entsprechend gp30, jedoch optimale Codons für die Translation umfassend (siehe gp32-opt unten), abgeleitet. Die gp30-opt-DNA wurde aus gp32-opt durch PCR-Amplifizierung unter Verwendung der folgenden Sense- und Antisense-Oligomere erhalten: 5'-GGT ACA CCT AGG CAT CTG GGG CTG CTC TGG-3' bzw. 5'-CCA CAT GAT ATC G CCC GGG C TTA TTA TTT GAT GTA CCA CAG CCA GTT GGT GAT G-3'. Dieses DNA-Segment wurde mit den Restriktionsenzymen AvrII und EcoRV verdaut und in V1Jns-tPA-gp143/opt32-A (IVD), das mit AvrII und SrfI verdaut worden war, um das entsprechende DNA-Segment zu entfernen, ligiert. Die resultierenden Produkte wurden mittels DNA-Sequenzierung der Ligierungsverbindungsstellen und Immunoblot-Analyse verifiziert.

D. V1Jns-tPA-gp140/opt30-B (basierend auf HIV-1<sub>IIIb</sub>):

**[0110]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIC, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen env-Spaltstellen erhalten wurden.

## E. V1Jns-tPA-gp140/opt all-A:

**[0111]** Das env-Gen dieses Konstrukts besteht vollständig aus optimalen Codons. Die konstanten Regionen (C1, C5, gp32) sind die in IVB, D, H beschriebenen, wobei ein zusätzliches synthetisches DNA-Segment, wel-

ches den variablen Regionen 1–5 entspricht, unter Verwendung eines synthetischen DNA-Segments, umfassend optimale Codons für die Translation, eingeführt wurde (siehe das Beispiel unten auf Basis von HIV-1-MN-V1–V5).

#### F. V1Jns-tPA-gp140/opt all-B:

**[0112]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIE, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen env-Spaltstellen erhalten wurden.

#### G. V1Jns-tPA-gp140/opt all-A (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0113]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIE oben, mit Ausnahme dessen, dass env-Aminosäuresequenzen aus anderen Stämmen als IIIB zur Feststellung der optimalen Codonverwendung in den variablen (V1–V5) Regionen verwendet wurden.

#### H. V1Jns-tPA-gp140/opt all-B (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0114]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIG, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen env-Spaltstellen erhalten wurden.

### BEISPIEL 8

#### gp160-Vakzin-Konstrukte:

**[0115]** Konstrukte wurden in zwei Formen (A oder B) hergestellt, in Abhängigkeit davon, ob die proteolytischen gp160-Spaltstellen wie oben beschrieben erhalten wurden.

#### A. V1Jns-rev/env:

**[0116]** Dieser Vektor ist eine Variation des in Abschnitt D oben beschriebenen, mit Ausnahme dessen, dass die gesamte tat-codierende Region im Exon 1 bis zum Beginn des offenen Leserahmens von REV deletiert ist. V1Jns-gp160<sub>IIIB</sub> (siehe Abschnitt A oben) wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und KpnI verdaut, um den 5'-Bereich des gp160-Gens zu entfernen. Eine PCR-Amplifizierung wurde eingesetzt, um ein DNA-Segment zu erhalten, das für das erste REV-Exon bis zu der KpnI-Stelle in gp160 aus dem genomischen Klon HXB2 codierte. Die Sense- und Antisense-PCR-Oligomere waren 5'-GGT ACA CTG CAG TCA CCG TCC T ATG GCA GGA AGA AGC GGA GAC-3' bzw. 5'-CCA CAT CA GGT ACC CCA TAA TAG ACT GTG ACC-3'. Diese Oligomere liefern Stellen für die Restriktionsenzyme PstI und KpnI am 5'- bzw. 3'-Terminus des DNA-Fragments. Die resultierende DNA wurde mit PstI und KpnI verdaut, aus einem elektrophoretischen Agarosegel gereinigt und mit V1Jns-gp160 (PstI/KpnI) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde durch Restriktionsenzymverdauung verifiziert.

#### B. V1Jns-gp160:

**[0117]** HIV<sub>IIIB</sub>-gp160 wurde durch PCR-Amplifizierung aus dem Plasmid pF412 kloniert, welches die 3'-terminale Hälfte des HIV<sub>IIIB</sub>-Gens, abgeleitet von dem HIV<sub>IIIB</sub>-Klon HXB2, enthält. Die PCR-Sense- und -Antisense-Oligomere waren 5'-GGT ACA TGA TCA ACC ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG C-3' bzw. 5'-CCA CAT TGA TCA GAT ATC CCC ATC TTA TAG CAA AAT CCT TTC C-3'. Die Kozak-Sequenz und das Translationstoppcodon sind unterstrichen. Diese Oligomere liefern BclI-Restriktionsenzymstellen außerhalb des offenen Translationsleserahmens an beiden Enden des env-Gens. (BclI-verdaute Stellen sind kompatibel für eine Ligierung mit BglII-verdauten Stellen mit einem anschließenden Verlust der Sensitivität für beide Restriktionsenzyme. BclI wurde für die PCR-Klonierung von gp160 gewählt, da dieses Gen sowohl interne BglII- als auch BamHI-Stellen enthält). Das Antisense-Oligomer inseriert auch eine EcoRV-Stelle gerade vor der BclI-Stelle wie oben für andere mittels PCR erhaltenen Gene beschrieben. Das amplifizierte gp160-Gen wurde agarosegelgereinigt, mit BclI verdaut und mit V1Jns, der mit BglII verdaut und mit alkalischer Kalbsdarmphosphatase behandelt worden war, ligiert. Das klonierte Gen hatte eine Größe von etwa 2,6 kb und jede Verbindungsstelle von gp160 mit V1Jns wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

#### C. V1Jns-tPA-gp160 (basierend auf HIV-1<sub>IIIB</sub>):

**[0118]** Dieser Vektor ist ähnlich wie Beispiel 1 (C) oben, mit Ausnahme dessen, dass das Vollängen-gp160

ohne die native Leadersequenz mittels PCR erhalten wurde. Das Sense-Oligomer war dasselbe wie in I. C. eingesetzt und das Antisense-Oligomer war 5'-CCA CAT TGA TCA GAT ATC CCC ATC TTA TAG CAA AAT CCT TTC C-3'. Diese Oligomere liefern BclII-Stellen an jedem Ende des Inserts sowie eine EcoRV-Stelle gerade stromaufwärts der BclI-Stelle am 3'-Ende. Die 5'-terminale BclI-Stelle erlaubt eine Ligierung in die BgIII-Stelle von V1Jns-tPA, um ein chimäres tPA-gp160-Gen, codierend für die tPA-Leadersequenz und gp160 ohne seine native Leadersequenz, zu erzeugen. Ligierungsprodukte wurden mittels Restriktionsverdauung und DNA-Sequenzierung verifiziert.

D. V1Jns-tPA-gp160/opt C1/opt41-A (basierend auf HIV-1<sub>IIIB</sub>):

**[0119]** Dieses Konstrukt basierte auf IVH, mit einem vollständig optimierten Codon-Segment für C5 und gp41 statt gp32 mit einem zusätzlichen optimierten Codon-Segment (siehe unten), das C1 am Aminoterminus von gp120 nach dem tPA-Leader ersetzte. Das neue C1-Segment wurde mit dem verbleibenden gp143-Segment mittels SOE-PCR unter Verwendung der folgenden Oligomere für eine PCR zur Synthetisierung des verknüpften C1/143-Segments verknüpft: 5'-CCT GTG TGT GAG TTT AAA C TGC ACT GAT TTG AAG AAT GAT ACT AAT AC-3'. Das resultierende gp143-Gen enthält eine optimale Codon-Verwendung, mit Ausnahme der V1-V5-Regionen, und besitzt eine nur einmal vorkommende PmeI-Restriktionsenzymstelle, platziert an der Verbindung von C1 und V1, für die Insertion variabler Regionen aus anderen HIV-Genen.

E. V1Jns-tPA-gp160/opt C1/opt41-B (basierend auf HIV-1<sub>IIIB</sub>):

**[0120]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIID, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

F. V1Jns-tPA-gp160/opt all-A (basierend auf HIV-1<sub>IIIB</sub>):

**[0121]** Das env-Gen dieses Konstrukts ist vollständig aus optimalen Codons wie oben beschrieben aufgebaut. Die konstanten Regionen (C1, C5, gp32) sind die in IIID, E beschriebenen, welches als Kasette eingesetzt wird (eingesetzt für alle vollständig optimierten gp160), während die variablen Regionen, V1-V5, von einem synthetischen DNA-Segment, das optimierte Codons umfasst, abgeleitet sind.

G. V1Jns-tPA-gp160/opt all-B:

**[0122]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIIF, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

H. V1Jns-tPA-gp160/opt all-A (nicht-IIIB-Stämme):

**[0123]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIIF oben, mit Ausnahme dessen, dass env-Aminosäuresequenzen von anderen Stämmen als IIIB zur Bestimmung der optimalen Codon-Verwendung in den variablen Regionen (V1-V5) verwendet wurden.

I. V1Jns-tPA-gp160/opt all-B (nicht-IIIB-Stämme):

**[0124]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IIIF, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

## BEISPIEL 9

### gp143-Vakzin-Konstrukte:

**[0125]** Diese Konstrukte wurden mittels PCR ähnlich wie andere oben beschriebene tPA-enthaltende Konstrukte (tPA-gp120, tPA-gp140 und tPA-gp160) mit dem tPA-Leader anstelle des nativen Leaders hergestellt, jedoch gestaltet, um COOH-terminiertes, membran-gebundenes env zu bilden (vorgesehene intrazelluläre Aminosäuresequenz = NH<sub>2</sub>-NRVRQGYSP-COOH). Dieses Konstrukt wurde mit dem Ziel der Kombination der erhöhten Expression von env, welche die tPA-Einführung begleitet, und Minimierung der Möglichkeit, dass ein Transkript oder eine Peptidregion, entsprechend dem intrazellulären Abschnitt von env, die Expression oder Proteinstabilität/Transport zur Zelloberfläche negativ beeinflussen könnte, konstruiert. Konstrukte wurden in zwei Formen (A oder B), in Abhängigkeit davon, ob die proteolytischen Spaltstellen von gp160 entfernt oder erhalten wurden wie oben beschrieben, hergestellt. Das restliche gp41-Fragment, resultierend aus einer Ver-

kürzung auf gp143, wird als gp32 bezeichnet.

#### A. V1Jns-tPA-gp143:

**[0126]** Dieses Konstrukt wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pF412 mit den folgenden Sense- und Antisense-PCR-Oligomeren: 5'-GGT ACA TGA TCA CA GAA AAA TTG TGG GTC ACA GTC-3', SEQ-ID::, und 5'-CCA CAT TGA TCA G CCC GGG C TTA GGG TGA ATA GCC CTG CCT CAC TCT GTT CAC-3' hergestellt. Das resultierende DNA-Segment enthält BclI-Restriktionsstellen an jedem Ende für die Klonierung in BglIII-verdauten V1Jns-tPA mit einer SrfI-Stelle, die sich unmittelbar 3' des offenen Leserahmens von env befindet. Konstrukte wurden verifiziert durch DNA-Sequenzierung von Ligierungsverbindungsstellen und Immunoblot-Analyse transfizierter Zellen.

#### B. V1Jns-tPA-gp143/mutRRE-A:

**[0127]** Dieses Konstrukt wurde abgeleitet von IVA durch Ausschneiden des DNA-Segments unter Verwendung der nur einmal vorkommenden MuniI-Restriktionsenzymstelle und der oben beschriebenen stromabwärts gelegenen SrfI-Stelle. Dieses Segment entspricht einem Abschnitt der gp120-C5-Domäne und der Gesamtheit von gp32. Ein synthetisches DNA-Segment, entsprechend ~350 bp des rev-Response-Elements (RRE A) von gp160, das optimale Codons für die Translation umfasste, wurde mit dem verbleibenden gp32-Segment durch Spleiß-Überlappungsverlängerung ("splice overlap extension"; SOE)-PCR verbunden, wobei eine AvrII-Restriktionsenzymstelle an der Verbindungsstelle der beiden Segmente geschaffen wurde (jedoch keine Veränderungen in der Aminosäuresequenz). Diese PCR-Reaktionen wurden durchgeführt unter Verwendung der folgenden Sense- und Antisense-PCR-Oligomere zur Bildung der gp32-enthaltenden Domäne: 5'-CT GAA AGA CCA GCA ACT CCT AGG GAT TTG GGG TTG CTG TGG-3' bzw. 5'-CCA CAT TGA TCA G CCC GGG C TTA GGG TGA ATA GCC CTG CCT CAC TCT GTT CAC-3' (welches als Antisense-Oligomer für IVA verwendet wurde). Das mutierte RRE-Segment (mutRRE-A) wurde mit der Wildtyp-Sequenz von gp32 mittels SOE-PCR unter Verwendung des folgenden Sense-Oligomers 5'-GGT ACA CAA TTG GAG GAG CGA GTT ATA TAA ATA TAA G-3' und des zur Herstellung des gp32-Segments verwendeten Antisense-Oligomers verknüpft. Das resultierende verknüpfte DNA-Segment wurde mit den Restriktionsenzymen MuniI und SrfI verdaut und in das MuniI/SrfI-verdaute gp143-Ausgangsplasmid ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde mittels DNA-Sequenzierung der Ligierungs- und SOE-PCR-Verbindungsstellen und Immunoblot-Analyse transfizierter Zellen verifiziert.

#### C. V1Jns-tPA-gp143/mutRRE-B:

**[0128]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IVB, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env durch Verwendung des synthetischen mutRRE-B-Gensegments anstelle von mutRRE-A erhalten wurden.

#### D. V1Jns-tPA-gp143/opt32-A:

**[0129]** Dieses Konstrukt wurde von IVB abgeleitet durch Restriktionsenzymverdau mit AvrII und SrfI, gefolgt von Ligierung eines synthetischen DNA-Segments, das gp32 entsprach, jedoch optimale Codons für die Translation umfasste (siehe gp32 opt unten). Die resultierenden Produkte wurden mittels DNA-Sequenzierung von Ligierungsverbindungsstellen und Immunoblot-Analyse verifiziert.

#### E. V1Jns-tPA-gp143/opt32-B:

**[0130]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IVD, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env durch Verwendung von IVC als Ausgangsplasmid erhalten wurden.

#### G. V1Jns-tPA-gp143/SRV-1-3'-UTR:

**[0131]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IVA, mit Ausnahme dessen, dass der aus dem Simian Retrovirus-1 (SRV-1, siehe unten) erhaltene 3'-UTR in die SrfI-Restriktionsenzymstelle, die unmittelbar 3' des offenen Leserahmens von gp143 eingeführt worden war, inseriert wurde. Diese UTR-Sequenz war zuvor als die rev-unabhängige Expression von HIV-env und -gag erleichternd beschrieben worden.

#### H. V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32A:

**[0132]** Dieses Konstrukt basierte auf IVD, mit einem vollständig optimierten Codon-Segment für C5 und gp32

mit einem zusätzlichen optimierten Codon-Segment (siehe unten), welches C1 am Aminoterminus von gp120 nach dem tPA-Leader ersetzte. Das neue C1-Segment wurde mit dem verbleibenden gp143-Segment mittels SOE-PCR unter Verwendung der folgenden Oligomere für eine PCR zur Synthese des verknüpften C1/143-Segments verknüpft: 5'-CCT GTG TGT GAG TTT AAA C TGC ACT GAT TTG AAG AAT GAT ACT AAT AC-3'. Das resultierende gp143-Gen enthält eine optimale Codon-Verwendung, mit Ausnahme für die V1–V5-Regionen, und besitzt eine nur einmal vorkommende PmeI-Restriktionsenzymstelle, platziert an der Verbindung von C1 und V1, für die Insertion variabler Regionen aus anderen HIV-Genen.

I. V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32B:

**[0133]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IVH, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

J. V1Jns-tPA-gp143/opt all-A:

**[0134]** Das env-Gen dieses Konstrukt besteht vollständig aus optimalen Codons. Die konstanten Regionen (C1, C5, gp32) sind die in 4B, D, H beschriebenen, mit einem zusätzlichen synthetischen DNA-Segment, entsprechend den variablen Regionen V1–V5, welches unter Verwendung eines synthetischen DNA-Segments, das optimale Codons für die Translation umfasst, inseriert wurde.

K. V1Jns-tPA-gp143/opt all-B:

**[0135]** Dieses Konstrukt ist ähnlich IVJ, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

L. V1Jns-tPA-gp143/opt all-A (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0136]** Dieses Konstrukt ist ähnlich III G oben, mit Ausnahme dessen, dass env-Aminosäuresequenzen aus anderen Stämmen als IIIB zur Bestimmung der optimalen Codon-Verwendung in den variablen Regionen (V1–V5) verwendet wurden.

M. V1Jns-tPA-gp143/opt all-B (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0137]** Dieses Konstrukt ist ähnlich III G oben, mit Ausnahme dessen, dass env-Aminosäuresequenzen aus anderen Stämmen als IIIB zur Bestimmung der optimalen Codon-Verwendung in den variablen Regionen (V1–V5) verwendet wurden.

BEISPIEL 10

gp143/glyB-Vakzin-Konstrukte:

**[0138]** Diese Konstrukte wurden mittels PCR ähnlich wie andere oben beschriebene tPA-enthaltende Konstrukte (tPA-gp120, tPA-gp140, tPA-gp143 und tPA-gp160) mit dem tPA-Leader anstelle des nativen Leaders hergestellt, jedoch konstruiert zur Bildung eines COOH-terminierten, membran-gebundenen env wie bei gp143. gp143/glyB-Konstrukte unterscheiden sich jedoch von gp143 darin, dass von den 6 Aminosäuren, von denen angenommen wird, dass sie die intrazelluläre Peptidomäne ausmachen, die letzten vier dieselben sind wie am Carboxyterminus des Human-Glycophorin B (glyB)-Proteins (angenommene intrazelluläre Aminosäuresequenz = NH<sub>2</sub>-NRLIKA-COOH, wobei die unterstrichenen Reste glyB entsprechen und "R" sowohl env als auch glyB gemeinsam ist). Dieses Konstrukt wurde mit der Absicht konstruiert, eine zusätzliche env-Expression und einen gerichteten Transport zur Zelloberfläche zu erhalten, indem jedes Transkript oder jede Peptidregion, korrespondierend dem intrazellulären Abschnitt von env, welcher Expression oder Proteinstabilität/Transport zur Zelloberfläche negativ beeinflussen könnte, durch Ersatz dieser Region mit einer Peptidsequenz von einem häufig exprimierten Protein (glyB) mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (intrazelluläre Aminosäuresequenz = NH<sub>2</sub>-RRLIKA-COOH) vollständig eliminiert wurde. Konstrukte wurden in zwei Formen (A oder B), in Abhängigkeit davon, ob die proteolytischen Spaltstellen von gp160 entfernt oder erhalten wurden wie oben beschrieben, hergestellt.

A. V1Jns-tPA-gp143/opt32-A/glyB:

**[0139]** Dieses Konstrukt ist das gleiche wie IVD, mit Ausnahme dessen, dass das folgende Antisen-

se-PCR-Oligomer: 5'-CCA CAT GAT ATC G CCC GGG C TTA TTA GGC CTT GAT CAG CCG GTT CAC AAT GGA CAG CAC AGC-3' zum Ersatz der intrazellulären Peptidomäne von gp143 durch diejenige von Glycophorin B wie oben beschrieben eingesetzt wurde.

B. V1Jns-tPA-gp143/opt32-B/glyB:

**[0140]** Dieses Konstrukt ist ähnlich VA, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

C. V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32-A/glyB:

**[0141]** Dieses Konstrukt ist das gleiche wie VA, mit Ausnahme dessen, dass die erste konstante Region (C1) von gp120 durch optimale Codons für die Translation wie bei IVH ersetzt ist.

D. V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32-B/glyB:

**[0142]** Dieses Konstrukt ist ähnlich VC, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

E. V1Jns-tPA-gp143/opt all-A/glyB:

**[0143]** Das env-Gen dieses Konstrukt besteht vollständig aus optimalen Codons wie oben beschrieben.

F. V1Jns-tPA-gp143/opt all-B/glyB:

**[0144]** Dieses Konstrukt ist ähnlich VE, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

G. V1Jns-tPA-gp143/opt all-A/glyB (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0145]** Dieses Konstrukt ist ähnlich III G oben, mit Ausnahme dessen, dass env-Aminosäuresequenzen aus anderen Stämmen als IIIB zur Feststellung der optimalen Codon-Verwendung in den variablen Regionen (V1-V5) verwendet wurden.

H. V1Jns-tPA-gp143/opt all-B/glyB (Nicht-IIIB-Stämme):

**[0146]** Dieses Konstrukt ist ähnlich VG, mit Ausnahme dessen, dass die proteolytischen Spaltstellen von env erhalten wurden.

HIV-env-Vakzin-Konstrukte mit Deletionen variabler Schleifen:

**[0147]** Diese Konstrukte können alle oben aufgelisteten env-Formen (gp120, gp140, gp143, gp160, gp143/glyB) einschließen, jedoch wurden variable Schleifen innerhalb der gp120-Region während der Herstellung deletiert (z.B. V1, V2 und/oder V3). Der Zweck dieser Modifizierungen ist die Eliminierung von Peptidsegmenten, welche die Exposition konservierter Neutralisierungsepitope, wie z.B. die CD4-Bindungsstelle, ausschließen könnten. Beispielsweise wurde das folgende Oligomer in einer PCR-Reaktion verwendet, um eine V1/V2-Deletion zu schaffen, welche zur Verbindung der C1- und C2-Segmente führte: 5'-CTG ACC CCC CTG TGT GTG GGG GCT GGC AGT TGT AAC ACC TCA GTC ATT ACA CAG-3'.

## BEISPIEL 11

Konstruktion synthetischer Gensegmente für eine erhöhte env-Genexpression:

**[0148]** Gensegmente wurden in Sequenzen mit identischen translatierten Sequenzen (soweit nicht anders angegeben), jedoch mit einer alternativen Codon-Verwendung, wie definiert von R. Lathe in einem Forschungsartikel aus J. Molec. Biol. Bd. 183, S. 1-12 (1985) mit dem Titel "Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations", überführt. Die im folgenden beschriebene Methodik zur Erhöhung der rev-unabhängigen Expression von HIV-env-Gensegmenten basierte auf unserer Hypothese, dass das bekannte Unvermögen zur effizienten Expression dieses Gens in Säugerzellen eine Folge der Gesamttranskriptzusammensetzung ist. Somit könnte die Verwendung alternativer Codons,

welche für dieselbe Proteinsequenz codieren, die Beschränkungen der env-Expression in Abwesenheit von rev aufheben. Eine Untersuchung der Codon-Verwendung innerhalb von env offenbarte, dass sich ein hoher Prozentsatz an Codons unter denjenigen befand, welche von hoch exprimierten humanen Genen selten verwendet werden. Das angewandte Verfahren der spezifischen Codon-Ersatzes kann wie folgt unter Verwendung der Daten von Lathe et al. beschrieben werden:

1. Identifizierung der Platzierung von Codons für den richtigen offenen Leserahmen.
2. Vergleich des Wildtyp-Codons hinsichtlich der beobachteten Verwendungsfrequenz durch humane Gene (Bezug auf Tabelle 3 in Lathe et al.).
3. Falls das Codon nicht das am häufigsten eingesetzte Codon ist, Ersatz durch ein optimales Codon für hohe Expression auf Basis der Daten in Tabelle 5.
4. Überprüfung des dritten Nukleotids des neuen Codons und des ersten Nukleotids des benachbarten Codons unmittelbar 3' des ersten. Falls eine 5'-CG-3'-Paarung durch die neue Codon-Auswahl erzeugt wurde, Ersatz durch die in Tabelle 5 angegebene Wahl.
5. Wiederholung dieser Prozedur, bis das gesamte Gensegment ersetzt wurde.
6. Untersuchung der neuen Gensequenz auf unerwünschte Sequenzen, welche durch diese Codon-Ersetzungen erzeugt wurden (z.B. "ATTTA"-Sequenzen, unabsichtliche Schaffung von Intron-Spleißerkennungsstellen, unerwünschte Restriktionsenzymstellen etc.) und Ersatz durch Codons, welche diese Sequenzen eliminieren.
7. Zusammenbau synthetischer Gensegmente und Test auf verbesserte Expression.

**[0149]** Diese Verfahren wurden verwendet zur Erzeugung der folgenden synthetischen Gensegmente für HIV-env unter Schaffung eines Gens, das vollständig die optimale Codon-Verwendung für die Expression umfasste: (i) gp120-C1 (opt); (ii) V1-V5 (opt); (iii) RRE-A/B (mut oder opt) und (iv) gp30 (opt) mit Prozentsätzen der Codon-Ersetzungen/Nukleotidsubstitutionen von 56/19, 73/26, 78/28 bzw. 61/25, die für jedes Segment erhalten wurden. Jedes dieser Segmente mit den im folgenden aufgelisteten tatsächlichen Sequenzen wurde detailliert oben beschrieben.

gp120-C1 (opt)

**[0150]** Dies ist ein gp120-Gensegment der konstanten Region 1 (C1) vom reifen N-Terminus bis zum Beginn von V1, welches für eine optimale Codon-Verwendung zur Expression konstruiert wurde.

```

1  TGATCACAGA GAAGCTGTGG GTGACAGTGT ATTATGGCGT GCCAGTCTGG

51  AAGGAGGCCA CCACCACCTT GTTCTGTGCC TCTGATGCCA AGGCCTATGA

101 CACAGAGGTG CACAATGTGT GGGCCACCCA TGCCTGTGTG CCCACAGACC

151 CCAACCCCCA GGAGGTGGTG CTGGTGAATG TGA CTGAGAA CTTCAACATG

201 TGGAAGAACA ACATGGTGGG GCAGATGCAT GAGGACATCA TCAGCCTGTG

251 GGACCAGAGC CTGAAGCCCT GTGTGAAGCT GACCCCCCTG TGTGTGAGTT

301 TAAAC

```

MN-V1-V5 (opt)

**[0151]** Dies ist ein Gensegment mit einer optimalen Codon-Verwendung für die Expression, welches der abgeleiteten Proteinsequenz für HIV-MN-V1-V5 (1066BP) entspricht.

DE 697 34 585 T2 2006.08.10

1 AGTTTAAACT GCACAGACCT GAGGAACACC ACCAACACCA ACAACTCCAC  
51 AGCCAACAAC AACTCCAACCT CCGAGGGCAC CATCAAGGGG GGGGAGATGA  
101 AGAACTGCTC CTTCAACATC ACCACCTCCA TCAGGGACAA GATGCAGAAG  
151 GAGTATGCCC TGCTGTACAA GCTGGACATT GTGTCCATTG ACAATGACTC  
201 CACCTCCTAC AGGCTGATCT CCTGCAACAC CTCTGTCATC ACCCAGGCCT  
251 GCCCAAAAAT CTCCTTTGAG CCCATCCCCA TCCACTACTG TGCCCCTGCT  
301 GGCTTTGCCA TCCTGAAGTG CAATGACAAG AAGTTCTCTG GCAAGGGCTC

351 CTGCAAGAAT GTGTCCACAG TGCAGTGCAC ACATGGCATC AGGCCTGTGG  
 401 TGTCCACCCA GCTGCTGCTG AATGGCTCCC TGGCTGAGGA GGAGGTGGTC  
 451 ATCAGGTCTG AGAACTTCAC AGACAATGCC AAGACCATCA TCGTGCACCT  
 501 GAATGAGTCT GTGCAGATCA ACTGCACCAG GCCCAACTAC AACAAGAGGA  
 551 AGAGGATCCA CATTGGCCCT GGCAGGGCCT TCTACACCAC CAAGAACATC  
 601 ATTGGCACCA TCAGGCAGGC CCACTGCAAC ATCTCCAGGG CCAAGTGGAA  
 651 TGACACCCTG AGGCAGATTG TGTCCAAGCT GAAGGAGCAG TTCAAGAACA  
 701 AGACCATTTGT GTTCAACCAG TCCTCTGGGG GGGACCCTGA GATTGTGATG  
 751 CACTCCTTCA ACTGTGGGGG GGAGTTCTTC TACTGCAACA CCTCCCCCT  
 801 GTTCAACTCC ACCTGGAATG GCAACAACAC CTGGAACAAC ACCACAGGCT  
 851 CCAACAACAA CATCACCTC CAGTGCAAGA TCAAGCAGAT CATCAACATG  
 901 TGGCAGGAGG TGGGCAAGGC CATGTATGCC CCCCCATTG AGGGCCAGAT  
 951 CAGGTGCTCC TCCAACATCA CAGGCCTGCT GCTGACCAGG GATGGGGGA  
 1001 AGGACACAGA CACCAACGAC ACCGAAATCT TCAGGCCTGG GGGGGGGAC  
 1051 ATGAGGGACA ATTGG

## RRE.Mut (A)

**[0152]** Dies ist ein DNA-Segment, entsprechend dem rev-Response-Element (RRE) von HIV-1, welches die optimale Codon-Verwendung für die Expression umfasst. Bei der "A"-Form wurden auch die bekannten proteolytischen Spaltstellen an der gp120/gp41-Verbindungsstelle durch Verwendung der in Fettdruck angezeigten Nukleotide entfernt.

1 GACAATTGGA GGAGCGAGTT ATATAAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC  
 51 CCTGGGGGTG GCCCCAACAA AAGCTCAGAACCACGTGGTG CAGAACGAGC  
 101 ACCAGGCCGT GGGCATTGGG GCCCTGTTTC TGGGCTTTCT GGGGGCTGCT  
 151 GGCTCCACAA TGGGCGCCGC TAGCATGACC CTCACCGTGC AAGCTCGCCA  
 201 GCTGCTGAGT GGCATCGTCC AGCAGCAGAA CAACCTGCTC CGCGCCATCG  
 251 AAGCCCAGCA GCACCTCCTC CAGCTGACTG TGTGGGGGAT CAAACAGCTT  
 301 CAGGCCCGGG TGCTGGCCGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCCT  
 351 AGGC

## RRE.Mut (B)

**[0153]** Dies ist ein DNA-Segment, entsprechend dem rev-Response-Element (RRE) von HIV-1, welches die optimale Codon-Verwendung für die Expression umfasst. Die "B"-Form behält die bekannten proteolytischen Spaltstellen an der gp120/gp41-Verbindungsstelle.

1 GACAATTGGA GGAGCGAGTT ATATAAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC  
 51 CCTGGGGGTG GCCCCAACAA AAGCTAAGACAAGAGTGGTG CAGAGAGAGA  
 101 AGAGAGCCCGT GGGCATTGGG GCCCTGTTTC TGGGCTTTCT GGGGGCTGCT  
 151 GGCTCCACAA TGGGCGCCGC TAGCATGACC CTCACCGTGC AAGCTCGCCA  
 201 GCTGCTGAGT GGCATCGTCC AGCAGCAGAA CAACCTGCTC CGCGCCATCG  
 251 AAGCCCAGCA GCACCTCCTC CAGCTGACTG TGTGGGGGAT CAAACAGCTT  
 301 CAGGCCCGGG TGCTGGCCGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCCT  
 351 AGGC

## gp32 (opt)

**[0154]** Dies ist ein gp32-Gensegment von der AvriI-Stelle (unmittelbar am Ende des RRE beginnend) bis zum Ende von gp143, welches optimale Codons für die Expression umfasst.

1 CCTAGGCA TCTGGGGCTG CTCTGGCAAG CTGATCTGCA CCACAGCTGT  
 51 GCCCTGGAAT GCCTCCTGGT CCAACAAGAG CCTGGAGCAA ATCTGGAACA  
 101 ACATGACCTG GATGGAGTGG GACAGAGAGA TCAACAAC TA CACCTCCCTG  
 151 ATCCACTCCC TGATTGAGGA GTCCCAGAAC CAGCAGGAGA AGAATGAGCA  
 201 GGAGCTGCTG GAGCTGGACA AGTGGGCCTC CCTGTGGAAC TGGTTCAACA  
 251 TCACCAACTG GCTGTGGTAC ATCAAAATCT TCATCATGAT TGTGGGGGGC  
 301 CTGGTGGGGC TCGCGATTGT CTTTGCTGTG CTGTCCATTG TGAACCGGGT  
 351 GAGACAGGGC TACTCCCCCT AATAAGCCCG GCGATATC

## SRV-1-CTE (A)

**[0155]** Dies ist ein synthetisches Gensegment, entsprechend einem 3'-UTR aus dem Simian-Retrovirus-1-Genom. Diese DNA wird in der folgenden Orientierung am 3'-Terminus von HIV-Genen platziert, um die rev-unabhängige Expression zu erhöhen.

SrfI      EcoRV

5' -GCCC GGGC GATATC TA GACCACCTCC CCTGCGAGCT AAGCTGGACA  
 GCCAATGACG GGTAAGAGAG TGACATTTTT CACTAACCTA AGACAGGAGG  
 GCCGTCAGAG CTA CTACTGCCTA ATCCAAAGAC GGGTAAAAGT GATAAAAATG  
 TATCACTCCA ACCTAAGACA GCGCAGCTT CCGAGGGATT TGTCGTCTGT  
 TTTATATATA TTAAAAGGG TGACCTGTCC GGAGCCGTGC TGCCCGGATG  
 ATGTCTTGG GATATC GCCC GGGC -3'  
 EcoRV                      SrfI

## SRV-1-CTE (B)

**[0156]** Dieses synthetische Gensegment ist mit dem oben gezeigten SRV-1 CTE (A) identisch, mit Ausnahme dessen, dass eine einzelne Nukleotidmutation (durch Fettdruck angezeigt) zur Eliminierung einer ATTTA-Sequenz verwendet wurde. Diese Sequenz wurde mit einem erhöhten mRNA-Umsatz in Verbindung gebracht.

SrfI      EcoRV

5' -GCCC GGGC GATATC TA GACCACCTCC CCTGCGAGCT AAGCTGGACA

GCCAATGACG GGTAAGAGAG TGACATTTTT CACTAACCTA AGACAGGAGG

GCCGTCAGAG CTA CTACTGCCTA ATCCAAAGAC GGGTAAAAGT GATAAAAATG

TATCACTCCA ACCTAAGACA GGCGCAGCTT CCGAGGGATT TGTCGTCTGT

TTTATATATA TTAAAAAGGG TGACCTGTCC GGAGCCGTGC TGCCCGGATG

ATGTCTTGG GATATC GCCC GGGC -3'

EcoRV      SrfI

## BEISPIEL 12

In vitro-gp120-Vakzin-Expression:

**[0157]** Die in vitro-Expression wurde in transfizierten Human-Rhabdomyosarkom (RD)-Zellen für diese Konstrukte getestet. Die quantitative Bestimmung von sekretiertem tPA-gp120 aus transfizierten RD-Zellen zeigte, dass der Vektor V1Jns-tPA-gp120 sekretiertes gp120 produzierte.

In vivo-gp120-Impfung:

**[0158]** Siehe Fig. 12 (Maus-Daten):

V1Jns-tPA-gp120<sub>MN</sub>-PNV-induzierte gp120-spezifische klasse II-MHC-beschränkte T-Lymphozyten-Antigen-Reaktivitäten. Balb/c-Mäuse, welche 2 × mit 200 µg V1Jns-tPA-gp120<sub>MN</sub> geimpft worden waren, wurden getötet und deren Milzen für in vitro-Bestimmungen von Helfer-T-Lymphozyten-Reaktivitäten auf rekombinantes gp120 extrahiert. T-Zell-Proliferations-Assays wurden mit PBMC (peripheren mononukleären Blutzellen) unter Verwendung von rekombinantem gp120<sub>IIIB</sub> (Repligen, Katalog # RP1016-20) bei 5 µg/ml mit 4 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml durchgeführt. Grundniveaus der <sup>3</sup>H-Thymidin-Aufnahme durch diese Zellen wurden durch Kultivierung der Zellen in Medium allein erhalten, während eine maximale Proliferation mittels ConA-Stimulation mit 2 µg/ml induziert wurde. ConA-induzierte Reaktivitäten erreichen ihr Maximum nach ungefähr drei Tagen und wurden zu diesem Zeitpunkt mit Medium-Kontrollproben geerntet, während antigen-behandelte Proben nach fünf Tagen mit einer zusätzlichen Medium-Kontrolle geerntet wurden. Die Reaktionen geimpfter Mäuse wurden mit nativen syngenen Mäusen gleichen Alters verglichen. ConA-positive Kontrollen ergaben eine sehr hohe Proliferation für sowohl native als auch immunisierte Mäuse wie erwartet. Sehr starke Helfer-T-Zell-Erinnerungsreaktionen wurden mittels gp120-Behandlung in geimpften Mäusen erhalten, während die nativen Mäuse nicht ansprachen (der Schwellenwert für die spezifische Reaktivität ist ein Stimulationsindex (SI) von > 3–4; SI wird berechnet als das Verhältnis von Proben-CpM/Medium-CpM). SI-Werte von 65 und 14 wurden für die geimpften Mäuse erhalten, im Vergleich dazu Anti-gp120-ELISA-Titer von 5643 bzw. 11900 für diese Mäuse. Interessanterweise ergab bei diesen beiden Mäusen der stärkere Responder für Antikörper eine signifikant niedrigere T-Zell-Reaktivität als die Maus mit dem niedrigeren Antikörpertiter. Dieses Experiment demonstriert, dass der sekretierte gp120-Vektor effizient Helfer-T-Zellen in vivo aktiviert und auch starke Antikörperreaktionen erzeugt. Darüber hinaus wurde jede dieser Immunreaktionen unter Verwendung von heterologem Antigen im Vergleich zu dem von dem Impf-PNV codierten (IIIB gegenüber MN) bestimmt:

## BEISPIEL 13

gp160-Vakzine

**[0159]** Neben sekretierten gp120-Konstrukten stellten wir Expressionskonstrukte für membrangebundenes gp160 voller Länge her. Die Gründe für ein gp160-Konstrukt neben gp120 sind: (1) bei Einschluss von gp41, wogegen ein potenter HIV-neutralisierender monoklonaler Antikörper (2F5, siehe oben) gerichtet ist, sind mehr Epitope für sowohl die CTL-Stimulation als auch die Produktion neutralisierender Antikörper verfügbar; (2) es

kann eine natürlichere Proteinstruktur, bezogen auf virus-erzeugtes gp160, erhalten werden; und (3) der Erfolg von membran-gebundenen Influenza-HA-Konstrukten für die Immunogenität [Ulmer et al., *Science* 259: 1745–1749, 1993; Montgomery, D., et al., *DNA and Cell Biol.*, 12: 777–783, 1993]. gp160 behält sogar mit einer heterologen Leaderpeptidsequenz eine substantielle REV-Abhängigkeit, so dass weitere Konstrukte hergestellt wurden, um die Expression in Abwesenheit von REV zu erhöhen.

## BEISPIEL 14

Assay für HIV-zytotoxische T-Lymphozyten:

**[0160]** Die in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren erläutern den für geimpfte Mäuse verwendeten Assay. Ein im Wesentlichen ähnlicher Assay kann für Primaten verwendet werden, mit Ausnahme dessen, dass autologe B-Zelllinien zur Verwendung als Zielzellen für jedes Lebewesen etabliert werden müssen. Dies kann für Menschen unter Verwendung des Epstein-Barr-Virus und für den Rhesusaffen unter Verwendung des Herpes B-Virus erreicht werden.

**[0161]** Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) werden aus entweder frisch entnommenem Blut oder der Milz mittels Ficoll-Hypaque-Zentrifugation zur Abtrennung von Erythrozyten von Leukozyten erhalten. Für Mäuse können auch Lymphknoten verwendet werden. Effektor-CTLs können aus den PBMC hergestellt werden durch entweder in vitro-Kultur in IL-2 (20 E/ml) und Concanavalin A (2 µg/ml) für 6–12 Tage oder mittels eines spezifischen Antigens unter Verwendung einer gleichen Anzahl bestrahlter antigen-präsentierender Zellen. Spezifisches Antigen kann entweder aus synthetischen Peptiden (gewöhnlich 9–15 Aminosäuren), die bekannte Epitope für die CTL-Erkennung des MHC-Haplotyps der verwendeten Tiere sind, oder Vacciniavirus-Konstrukten, die zur Expression des geeigneten Antigens manipuliert wurden, bestehen. Zielzellen können entweder syngene oder im MHC-Haplotyp übereinstimmende Zelllinien sein, welche behandelt wurden, um das geeignete Antigen zu präsentieren, wie für die in vitro-Stimulation der CTLs beschrieben. Für Balb/c-Mäuse kann das P18-Peptid (ArgIleHisIleGlyProGlyArgAlaPheTyrThrThrLysAsn, SEQ-ID. 51, für den HIV-MN-Stamm) in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt werden, um CTL in vitro unter Verwendung bestrahlter syngener Splenozyten zu restimulieren, und kann zur Sensibilisierung von Zielzellen während des Zytotoxizitäts-Assays durch Inkubation mit 1–10 µM bei 37°C für etwa zwei Stunden vor dem Assay eingesetzt werden. Für diese H-2<sup>d</sup>-MHC-Haplotyp-Mäuse ergibt die Maus-Mastozytom-Zelllinie P815 gute Zielzellen. Antigen-sensibilisierte Zielzellen werden mit Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, welches aus dem Innern der Zielzellen nach Abtötung durch CTL freigesetzt wird, durch Inkubation der Zielzellen für 1–2 Stunden bei 37°C (0,2 mCi für 5 × 10<sup>6</sup> Zellen), gefolgt von mehreren Waschungen der Zielzellen, beladen. CTL-Populationen werden mit Zielzellen in variierenden Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen, wie z.B. 100:1, 50:1, 25:1 etc., gemischt, zusammen pelletiert und 4–6 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor die Überstände geerntet werden, welche dann mit einem Gammazähler hinsichtlich Freisetzung von Radioaktivität untersucht werden. Die Zytotoxizität wird berechnet als Prozentsatz der insgesamt freisetzbaren Zählimpulse aus den Zielzellen (erhalten mittels Behandlung mit 0,2% Triton X-100), wovon die spontane Freisetzung aus den Zielzellen subtrahiert wurde.

## BEISPIEL 15

Assay für HIV-spezifische Antikörper:

**[0162]** ELISA wurden entwickelt, um unter Verwendung von entweder spezifischem rekombinanten Protein oder synthetischen Peptiden als Substrat-Antigene gegen HIV gebildete Antikörper nachzuweisen. 96-Mulden-Mikrotiter-Platten wurden bei 4°C über Nacht mit rekombinantem Antigen mit 2 µg/ml in PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung) unter Verwendung von 50 µl/Mulde auf einer Schüttelplattform beschichtet. Antigene bestanden aus entweder rekombinantem Protein (gp120, rev: Repligen Corp.; gp160, gp41: American Bio-Technologies, Inc.) oder synthetischem Peptid (V3-Peptid, entsprechend Virusisolat-Sequenzen aus IIB, etc.: American Bio-Technologies, Inc.; gp41-Epitop für den monoklonalen Antikörper 2F5). Die Platten wurden 4× mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween 20) gespült, gefolgt von Zugabe von 200 µl/Mulde Blockierungspuffer (1% Carnation-Milchlösung in PBS/0,05% Tween-20) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Vorseren und Immunseren wurden in Blockierungspuffer auf den gewünschten Verdünnungsbereich verdünnt und 100 µl pro Mulde zugegeben. Die Platten wurden 1 h lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und dann 4× mit Waschpuffer gewaschen. Mit Meerrettichperoxidase konjugierte sekundäre Antikörper (Anti-Rhesus-Ig, Southern Biotechnology Associates; Antimaus- und Antikaninchen-Igs, Jackson Immuno Research), 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt, wurden dann jeder Probe mit 100 µl/Mulde zugegeben und 1 h lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkorporiert. Die Platten wurden 4× mit Waschpuffer gewaschen und dann durch Zugabe von 100 µl/Mulde einer Lösung von o-Phenylendiamin (o-PD, Calbiochem) mit 1 mg/ml

in 100 mM Citratpuffer bei pH 4,5 entwickelt. Die Platten wurden hinsichtlich Extinktion bei 450 nm sowohl kinetisch (die ersten 10 Reaktionsminuten) als auch an Endpunkten nach 10 und 30 Minuten abgelesen (Thermomax Mikroplattenleser, Molecular Devices).

## BEISPIEL 16

Assay für HIV-neutralisierende Antikörper:

**[0163]** Die in vitro-Neutralisierung-Assays von HIV-Isolaten unter Verwendung von Seren, die von geimpften Tieren stammten, wurden wie folgt durchgeführt. Testseren und Vorimmunseren wurden 60 Minuten lang bei 56°C vor der Verwendung hitzeinaktiviert. Eine titrierte Menge von HIV-1 wurde in 1:2-Reihenverdünnungen von Testseren zugegeben und vor der Zugabe zu  $10^5$  MT-4-Human-Lymphoidzellen in 96-Mulden-Mikrotiterplatten 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Virus/Zell-Mischungen wurden 7 Tage lang bei 37°C inkubiert und hinsichtlich virus-vermittelter Zelltötung durch Anfärbung von Kulturen mit Tetrazolium-Farbstoff untersucht. Die Neutralisation von Virus wird durch die Verhinderung von virus-vermitteltem Zelltod beobachtet.

## BEISPIEL 17

Isolation von Genen aus klinischen HIV-Isolaten:

**[0164]** HIV-Virusgene wurden aus infizierten PBMCs kloniert, welche durch ConA-Behandlung aktiviert worden waren. Das bevorzugte Verfahren zur Gewinnung der viralen Gene war mittels PCR-Amplifizierung aus infiziertem zellulärem Genom unter Verwendung spezifischer Oligomere, welche die gewünschten Gene flankierten. Ein zweites Verfahren zur Gewinnung viraler Gene war mittels Reinigung viraler RNA aus den Überständen infizierter Zellen und Herstellung von cDNA aus diesem Material mit anschließender PCR. Dieses Verfahren war sehr analog zu dem oben für die Klonierung des Maus-B7-Gens beschriebenen Verfahren, mit Ausnahme der verwendeten PCR-Oligomere und statistischen Hexamere, die statt spezifischer Primer-Oligomere zur Herstellung von cDNA verwendet wurden.

**[0165]** Genomische DNA wurde aus Pellets infizierter Zellen durch Lyse in STE-Lösung (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), wozu Proteinase K und SDS in Endkonzentrationen von 0,1 mg/ml bzw. 0,5% zugegeben worden waren, gereinigt. Diese Mischung wurde über Nacht bei 56°C inkubiert und mit 0,5 Volumina Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann durch Zugabe von Natriumacetat auf eine Endkonzentration von 0,3 M und zwei Volumina kaltem Ethanol präzipitiert. Nach Pelletierung der DNA aus der Lösung wurde die DNA in  $0,1 \times$  TE-Lösung ( $1 \times$  TE = 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde SDS bis 0,1% mit 2 E RNase A mittels Inkubation für 30 Minuten bei 37°C zugegeben. Diese Lösung wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und dann mit Ethanol wie zuvor präzipitiert. DNA wurde in  $0,1 \times$  TE suspendiert und durch Messung ihrer UV-Extinktion bei 260 nm quantitativ bestimmt. Proben wurden bis zur Verwendung für die PCR bei -20°C gelagert.

**[0166]** Eine PCR wurde unter Verwendung des Kits und Verfahrens von Perkin-Elmer Cetus unter Verwendung der folgenden Sense- und Antisense-Oligomere für gp160 durchgeführt: 5'-GA AAG AGC AGA AGA CAG TGG CAA TGA-3' bzw. 5'-GGG CTT TGC TAA ATG GGT GGC AAG TGG CCC GGG C ATG TGG-3'. Diese Oligomere fügen am 3'-Terminus des resultierenden DNA-Fragments eine SrfI-Stelle hinzu. PCR-abgeleitete Segmente werden entweder in die V1Jns- oder V1R-Vakzinierungsvektoren kloniert und V3-Regionen sowie Ligierungsverbindungsstellen durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

## BEISPIEL 18

T-Zell-Proliferations-Assays:

**[0167]** PBMCs werden erhalten und hinsichtlich Erinnerungs-Reaktionen auf spezifisches Antigen getestet, wie bestimmt durch Proliferation in der PBMC-Population. Die Proliferation wird unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -Thymidin überprüft, welche den Zellkulturen für die letzten 18–24 h Inkubation vor der Ernte zugegeben wird. Zellernter halten isotonenhaltende DNA auf Filter zurück, wenn die Proliferation stattgefunden hat, während ruhende Zellen das Isotop nicht inkorporieren, welches in freier Form nicht auf dem Filter zurückgehalten wird. Für entweder Nager- oder Primaten-Spezies werden  $4 \times 10^5$  Zellen in 96-Mulden-Mikrotiterplatten in insgesamt 200  $\mu\text{l}$  vollständigem Medium (RPMI/10%iges fötales Kalbsserum) ausplattiert. Hintergrund-Proliferationsreaktionen werden bestimmt unter Verwendung von PBMCs und Medium allein, während unspezifische Reaktionen

durch Verwendung von Lektinen wie Phytohämagglutinin (PHA) oder Concanavalin A (ConA) in Konzentrationen von 1–5 µg/ml hervorgerufen werden, um als positive Kontrolle zu dienen. Spezifisches Antigen besteht entweder aus bekannten Peptidpitopen, gereinigtem Protein oder inaktiviertem Virus. Antigenkonzentrationen liegen im Bereich von 1–10 µM für Peptide und 1–10 µg/ml für Protein. Die lektin-induzierte Proliferation erreicht ihr Maximum nach 3–5 Tagen Zellkulturinkubation, während antigen-spezifische Reaktionen ihr Maximum nach 5–7 Tagen erreichen. Eine spezifische Proliferation findet statt, wenn Strahlungszählimpulse erhalten werden, die mindestens dreifach über dem Mediumhintergrund liegen, und wird oft als Verhältnis zum Hintergrund oder Stimulationsindex (SI) angegeben. HIV-gp160 enthält bekanntermaßen mehrere Peptide, von denen bekannt ist, dass sie eine T-Zell-Proliferation von gp160/gp120-immunisierten oder HIV-infizierten Individuen verursacht. Die am häufigsten verwendeten von diesen sind:

T1 (LysGlnIlelleAsnMetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAla),

T2 (HisGluAspIlelleSerLeuTrpAspGlnSerLeuLys) und

TH4 (AspArgVallleGluValValGlnGlyAlaTyrArgAlalleArg).

**[0168]** Von diesen Peptiden wurde gezeigt, dass sie die Proliferation von PBMC aus antigen-sensibilisierten Mäusen, nicht-humanen Primaten und Menschen stimulieren.

#### BEISPIEL 19

##### Herstellung des Vektors V1R:

**[0169]** In einem Versuch zur Fortsetzung der Optimierung unseres Basis-Vakzinierungsvektors stellten wir ein Derivat von V1Jns, als V1R bezeichnet, her. Der Zweck dieser Vektorkonstruktion war der Erhalt eines Vakzinvektors minimaler Größe, d.h. ohne überflüssige DNA-Sequenzen, welcher immer noch die insgesamt optimierten Charakteristiken der heterologen Genexpression und hohen Plasmidausbeuten behielt, welche V1J und V1Jns liefern. Es wurde anhand der Literatur sowie durch Versuche von uns festgestellt, dass (1) Regionen innerhalb des pUC-Gerüsts, welche den E. coli-Replikationsursprung umfassen, entfernt werden konnten, ohne die Plasmidausbeute aus Bakterien zu beeinflussen; (2) die 3'-Region des kan<sup>r</sup>-Gens nach dem offenen Leserahmen von Kanamycin entfernt werden konnte, wenn statt dessen ein bakterieller Terminator inseriert wurde; und (3) ~300 bp von der 3'-Hälfte des BGH-Terminators ohne Beeinflussung seiner regulatorischen Funktion entfernt werden konnten (nach der ursprünglichen KpnI-Restriktionsenzymstelle innerhalb des BGH-Elements).

**[0170]** V1R wurde mit Hilfe von PCR konstruiert, um drei DNA-Segmente von V1Jns, repräsentierend den CMVintA-Promotor/BGH-Terminator, Replikationsursprung bzw. Kanamycinresistenzelemente, zu synthetisieren. Restriktionsenzyme, die für jedes Segment einmalig waren, wurden jedem Segmentende hinzugefügt unter Verwendung der PCR-Oligomere: SspI und XhoI für CMVintA/BGH; EcoRV und BamHI für das kan<sup>r</sup>-Gen und BclI und Sall für den ori<sup>r</sup>. Diese Enzymstellen wurden gewählt, da sie eine richtungsgesteuerte Ligation jedes der PCR-abgeleiteten DNA-Segmente mit einem anschließenden Verlust jeder Stelle erlauben: EcoRV und SspI hinterlassen glattendige DNAs, welche für die Ligation kompatibel sind, während BamHI und BclI komplementäre Überhänge zurücklassen, wie dies Sall und XhoI tun. Nach dem Erhalt dieser Segmente mittels PCR wurde jedes Segment mit den geeigneten, oben angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und dann in einer einzigen Reaktionsmischung, die alle drei DNA-Segmente enthielt, zusammenligiert. Das 5'-Ende des ori<sup>r</sup> war so gestaltet, dass die rho-unabhängige T2-Terminatorsequenz, die normalerweise in dieser Region gefunden wird, eingeschlossen war, so dass sie eine Terminationsinformation für das Kanamycinresistenzgen liefern konnte. Das ligierte Produkt wurde durch Restriktionsenzymverdauung (> 8 Enzyme) sowie DNA-Sequenzierung der Ligierungsverbindungsgebiete bestätigt. DNA-Plasmid-Ausbeuten und heterologe Expression unter Verwendung viraler Gene innerhalb von V1R scheinen ähnlich zu V1Jns zu sein. Die erreichte Nettoerhöhung der Vektorgröße war 1346 bp (V1Jns = 4,86 kb; V1R = 3,52 kb), siehe **Fig. 11**, SEQ-ID: 45.

**[0171]** PCR-Oligomersequenzen, welche zur Synthese von V1R verwendet wurden (Restriktionsenzymstellen sind unterstrichen und in Klammern nach der Sequenz angegeben):

(1) 5'-GGT ACA AAT ATT GG CTA TTG GCC ATT GCA TAC G-3' [SspI], SEQ-ID::,

(2) 5'-CCA CAT CTC GAG GAA CCG GGT CAA TTC TTC AGC ACC-3' [XhoI], SEQ-ID:: (für das CMVintA/BGH-Segment),

(3) 5'-GGT ACA GAT ATC GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA AAA TC-3' [EcoRV], SEQ-ID::,

(4) 5'-CCA CAT GGA TCC G TAA TGC TCT GCC AGT GTT ACA ACC-3' [BamHI], SEQ-ID:: (für das Kanamycinresistenz-Gensegment),

(5) 5'-GGT ACA TGA TCA CGT AGA AAA GAT CAA AGG ATC TTC TTG-3' [BclI], SEQ-ID::,

(6) 5'-CCA CAT GTC GAC CC GTA AAA AGG CCG CGT TGC TGG-3' [Sall], SEQ-ID:: (für den E. coli-Re-

plikationsursprung).

**[0172]** Ligierungsverbindungsstellen für V1R wurden unter Verwendung der folgenden Oligomere sequenziert:

5'-GAG CCA ATA TAA ATG TAC-3', SEQ-ID:: [CMVintA/kan<sup>r</sup>-Verbindung]

5'-CAA TAG CAG GCA TGC-3', SEQ-ID:: [BGH/ori-Verbindung]

5'-G CAA GCA GCA GAT TAC-3', SEQ-ID:: [ori/kan<sup>r</sup>-Verbindung]

## BEISPIEL 20

### Heterologe Expression später HIV-Genprodukte

**[0173]** HIV-Strukturgene wie env und gag erfordern die Expression des regulatorischen HIV-Gens rev, um effizient Vollängen-Proteine zu produzieren. Wir haben festgestellt, dass die rev-abhängige Expression von gag niedrige Proteinniveaus ergab und dass rev selbst für Zellen toxisch sein kann. Obwohl wir relativ hohe Niveaus einer rev-abhängigen Expression von gp160 in vitro erzielten, rief dieses Vakzin niedrige Niveaus an Antikörpern gegen gp160 nach einer in vivo-Immunisierung mit rev/gp160-DNA hervor. Dies kann auf bekannten zytotoxischen Wirkungen von rev beruhen, sowie einer erhöhten Schwierigkeit bei der Erhaltung der rev-Funktion in Myotubuli, die Hunderte von Kernen enthalten (das rev-Protein muss im selben Kern wie ein rev-abhängiges Transkript vorliegen, damit die gag- oder env-Proteinexpression stattfinden kann). Es war jedoch möglich, eine rev-unabhängige Expression unter Verwendung ausgewählter Modifikationen des env-Gens zu erhalten.

#### 1. rev-unabhängige Expression von env:

**[0174]** Im Allgemeinen wurden bei unseren Vakzinen primär HIV (IIIB)-env- und -gag-Gene für die Optimierung der Expression innerhalb unseres generalisierten Vakzinierungsvektors V1Jns verwendet, der einen "immediate-early (IE)"-CMV-Promotor, eine von BGH abgeleitete Polyadenylierungs- und Transkriptionsterminationssequenz und ein pUC-Gerüst umfasst. Variierende Effizienzen einer rev-unabhängigen Expression, in Abhängigkeit davon, ein wie großes Gensegment eingesetzt wird (z.B. gp120 gegenüber gp160), können für env durch Ersatz seines nativen sekretorischen Leaderpeptids durch dasjenige von dem Gen des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPA) und Expression des resultierenden chimären Gens hinter dem CMVIE-Promotor mit dem CMV-Intron A erhalten werden. tPA-gp120 ist ein Beispiel eines sekretierten gp120-Vektors, der auf diese Weise konstruiert wurde, welcher gut genug funktioniert, um Anti-gp120-Immunreaktionen in geimpften Mäusen und Affen hervorzurufen.

**[0175]** Da Berichten nach membran-verankerte Proteine viel substantiellere (und vielleicht bezüglich HIV-Neutralisierung spezifischere) Antikörperreaktionen im Vergleich zu sekretierten Proteinen induzieren können, sowie um zusätzliche Epitope zu gewinnen, stellten wir V1Jns-tPA-gp160 und V1Jns-rev/gp160 her. Der Vektor tPA-gp160 produzierte nachweisbare Mengen von gp160 und gp120 ohne die Zugabe von rev, wie gezeigt durch Immunoblot-Analyse transfizierter Zellen, obwohl die Expressionsniveaus viel niedriger waren als die für rev/gp160, ein rev-abhängiges gp160-Expressionsplasmid, erhaltenen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass inhibitorische Regionen, welche dem gp160-Transkript eine rev-Abhängigkeit verleihen, an mehreren Stellen innerhalb von gp160, einschließlich des COOH-Terminus von gp41, auftreten. Ein Vektor wurde hergestellt für eine COOH-terminal verkürzte Form von tPA-gp160 (tPA-gp143), welche dazu konstruiert war, die Gesamtexpressionsniveaus von env durch Eliminierung dieser inhibitorischen Sequenzen zu erhöhen. Der gp143-Vektor eliminiert auch intrazelluläre gp41-Regionen, welche Peptidmotive (wie z.B. Leu-Leu) enthalten, von denen bekannt ist, dass sie eine Umleitung von Membranproteinen zu den Lysosomen statt zur Zelloberfläche verursachen. Somit könnte erwartet werden, dass gp143 im Vergleich zu Vollängen-gp160 erhöhte Expressionsniveaus des env-Proteins (durch Abnahme der rev-Abhängigkeit) aufweist und eine größere Effizienz des Proteintransports zur Zelloberfläche, wo diese Proteine besser in der Lage sein könnten, Anti-gp160-Antikörper nach einer DNA-Impfung hervorzurufen. tPA-gp143 wurde weiter modifiziert durch umfangreiche stille Mutagenese der rev-Response-Element (RRE)-Sequenz (350 bp), um zusätzliche inhibitorische Sequenzen für die Expression zu eliminieren. Dieses Konstrukt, gp143/mutRRE, wurde in zwei Formen hergestellt: entweder Eliminierung (Form A) oder Erhaltung (Form B) proteolytischer Spaltstellen für gp120/41. Aufgrund von Literaturberichten, dass die Impfung von Mäusen unter Verwendung von nicht-spaltbarem gp160, exprimiert in Vaccinia, viel höhere Antikörperniveaus gegen gp160 als spaltbare Formen hervorrief, wurden beide Formen hergestellt.

**[0176]** Ein quantitativer ELISA für die gp160/gp120-Expression in Zelltransfektanten wurde entwickelt, um die

relativen Expressionsvermögen für diese Vektoren zu bestimmen. Eine in vitro-Transfektion von 293-Zellen, gefolgt von quantitativer Bestimmung von zellassoziertem gegenüber sekretiertem/freigesetztem gp120, ergab die folgenden Resultate: (1) tPA-gp160 exprimierte 5–10× weniger gp120 als rev/gp160, wobei ähnliche Anteile intrazellulär zurückgehalten bzw. von der Zelloberfläche freigesetzt wurden; (2) tPA-gp143 ergab eine 3–6× größere Sekretion von gp120 als rev/gp160, mit nur geringen Niveaus an zellassoziertem gp143, was bestätigt, dass das zytoplasmatische Ende von gp160 eine intrazelluläre Retention von gp160 verursacht, welche durch partielle Deletion dieser Sequenz überwunden werden kann; und (3) tPA-gp143/mutRRE-A und -B ergaben ~10× größere Expressionsniveaus an Protein als Ausgangs-tPA-gp143, während eine Eliminierung der proteolytischen Prozessierung für die Form A bestätigt wurde.

**[0177]** Somit ergab unsere Strategie zur Erhöhung der rev-unabhängigen Expression stufenweise Erhöhungen der Gesamtexpressionsniveaus sowie eine Umleitung von membran-verankertem gp143 zu der Zelloberfläche weg von den Lysosomen. Es ist wichtig festzustellen, dass dies ein generisches Konstrukt ist, in welches es möglich sein sollte, gp120-Sequenzen aus verschiedenen primären viralen Isolaten innerhalb einer Vektor-kassette, welche diese Modifikationen enthält, die am NH<sub>2</sub>-Terminus (tPA-Leader) oder COOH-Terminus (gp41) vorliegen, zu inserieren, wo wenig antigene Unterschiede zwischen verschiedenen viralen Stämmen bestehen.

## 2. Expression von gp120, das aus einem klinischen Isolat erhalten wurde:

**[0178]** Zur Anwendung dieser Expressionsstrategien auf Viren, welche für Vakzin-Zwecke relevant sind, und zur Bestätigung der Allgemeingültigkeit unserer Ansätze stellten wir auch einen tPA-gp120-Vektor her, der von einem primären HIV-Isolat (enthaltend die V3-Peptid-Schleife des Nordamerikanischen Konsensus; makrophagen-tropische und nicht-syncytien-induzierende Phänotypen) abgeleitet war. Dieser Vektor ergab eine hohe Expression/Sekretion von gp120 mit transfizierten 293-Zellen und rief Anti-gp120-Antikörper in Mäusen hervor und demonstrierte so, dass er in funktioneller Form kloniert worden war. gp160-Gene primärer Isolate werden auch zur Expression auf dieselbe Weise wie aus Laborstämmen abgeleitetes gp160 verwendet werden.

## B. Immunreaktionen auf HIV-1-env-Polynukleotid-Vakzine

**[0179]** Wirkung der Impfroute auf die Immunreaktionen in Mäusen: Während Versuche zur Verbesserung der Expression von gp160 noch stattfinden, verwendeten wir das tPA-gp120-DNA-Konstrukt zur Beurteilung von Immunreaktionen und Wegen zu deren Verstärkung. Intramuskuläre (i.m.) und intradermale (i.d.) Impfrouten wurden für diesen Vektor bei Dosen von 100, 10 und 1 µg in Mäusen verglichen. Die Impfung auf jeder Route rief Antikörperreaktionen (GMTs = 10<sup>3</sup> – 10<sup>4</sup>) in allen Empfängern nach 2–3 Impfungen bei allen drei Dosierungsniveaus hervor. Jede Route rief ähnliche Anti-gp120-Antikörpertiter mit klaren dosisabhängigen Reaktionen hervor. Wir beobachteten jedoch eine größere Variabilität der Reaktionen für die intradermale Impfung, insbesondere bei den niedrigeren Dosen nach der ersten Impfung. Darüber hinaus waren Helfer-T-Zell-Reaktionen, wie bestimmt durch antigen-spezifische in vitro-Proliferation und Zytokin-Sekretion, nach intramuskulärer Impfung höher als nach intradermaler. Wir schlossen daraus, dass die intradermale Impfung im Vergleich zur intramuskulären Impfung für dieses Vakzin keinerlei Vorteile bot.

## 2. gp120-DNA-Vakzin-vermittelte Helfer-T-Zell-Immunität in Mäusen:

**[0180]** Eine gp120-DNA-Impfung produzierte potente Helfer-T-Zell-Reaktionen in allen getesteten lymphatischen Kompartimenten (Milz, Blut, inguinale, mesenterische und iliakale Knoten) mit T<sub>H</sub>1-ähnlichen Zytokin-Sekretionsprofilen (z.B. Gamma-Interferon und IL-2-Produktion mit wenig oder keinem IL-4). Diese Zytokine fördern allgemein eine starke zelluläre Immunität und wurden mit der Aufrechterhaltung eines krankheitsfreien Zustands für HIV-seropositive Patienten in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass Lymphknoten primäre Stellen für die HIV-Replikation sind und große Reservoirs an Virus beherbergen, selbst wenn das Virus nicht ohne weiteres im Blut nachgewiesen werden kann. Ein Vakzin, welches Anti-HIV-Immunreaktionen bei einer Vielfalt von Lymphstellen hervorrufen kann, wie wir mit unserem DNA-Vakzin gezeigt haben, könnte zur Verhinderung einer erfolgreichen Kolonisierung der Lymphgefäße nach einer anfänglichen Infektion beitragen.

## 3. env-DNA-Vakzin-vermittelte Antikörperreaktionen:

**[0181]** Afrikanische Grüne Meerkatzen (AGM) und Rhesusaffen (RHM), welche gp120-DNA-Vakzine erhielten, zeigten niedrige Niveaus an neutralisierenden Antikörpern nach 2–3 Impfungen, welche durch eine zusätzliche Impfung nicht erhöht werden konnten. Diese Ergebnisse, sowie eine zunehmende Erkenntnis auf dem

Gebiet der HIV-Vakzine, dass oligomeres gp160 wahrscheinlich ein relevanteres Target-Antigen für die Hervorrufung neutralisierender Antikörper als gp120-Monomere darstellt, veranlassten uns dazu, uns auf den Erhalt einer effektiven Expression von gp160-basierten Vektoren zu konzentrieren (siehe oben). Mäuse und AGM wurden auch mit dem von einem primären Isolat abgeleiteten tPA-gp120-Vakzin geimpft. Diese Tiere zeigten (bei Verwendung der homologen Sequenz) reziproke Anti-V3-Peptid-Endpunkt-Antikörpertiter im Bereich von 500–5000, welches demonstriert, dass diese Vakzingestaltung für klinische relevante virale Isolate funktionell ist.

**[0182]** Die Vakzine auf gp160-Basis, rev-gp160 und tPA-gp160, waren nicht in der Lage, beständig Antikörperreaktionen in Mäusen und nicht-humanen Primaten hervorzurufen, oder ergaben niedrige Antikörpertiter. Unsere ersten Ergebnisse mit dem tPA-gp143-Plasmid ergaben geometrische Mittelwerte der Titer (GMT)  $> 10^3$  in Mäusen und AGM nach zwei Impfungen. Diese Daten weisen darauf hin, dass wir die Immunogenität von gp-160-artigen Vakzinen durch Erhöhung der Expressionsniveaus und durch einen effizienteren intrazellulären Transport von env an die Zelloberfläche signifikant verbessert haben. Dieses Konstrukt sowie die Vektoren tPA-gp143/mutRRE-A und -B werden weiter hinsichtlich Antikörperreaktionen, insbesondere zur Virusneutralisierung, charakterisiert werden.

#### 4. env-DNA-Vakzin-vermittelte CTL-Reaktionen in Affen:

**[0183]** Wir setzten die Charakterisierung von CTL-Reaktionen von RHM, die mit gp120- und gp160/IRES/rev-DNA geimpft worden waren, fort. Alle vier Affen, die dieses Vakzin erhielten, zeigten signifikante MHC-Klasse I-beschränkte CTL-Aktivitäten (20–35% spezifische Abtötung bei einem Verhältnis Effektor/Target = 20) nach zwei Impfungen. Nach einer vierten Impfung erhöhten sich diese Aktivitäten auf 50–60% Abtötung unter ähnlichen Testbedingungen, was anzeigt, dass eine zusätzliche Impfung die Reaktionen signifikant steigerte. Die CTL-Aktivitäten dauerten für mindestens 7 Monate nach der letzten Impfung an, mit etwa 50% ihrer Gipfelniveaus, was anzeigt, dass eine Langzeiterinnerung etabliert wurde.

### Patentansprüche

1. Synthetisches Polynukleotid, umfassend eine DNA-Sequenz, die für HIV-env-Protein kodiert, wobei die DNA-Sequenz Codons umfasst, welche für die Expression in einem Säugerwirt optimiert sind, wobei das Polynukleotid ausgewählt ist aus:

V1Jns-tPA-gp140/mutRRE-A/SRV-1-3'-UTR;  
 V1Jns-tPA-gp140/mutRRE-B/SRV-1-3'-UTR;  
 V1Jns-tPA-gp140/opt30-A;  
 V1Jns-tPA-gp140/opt30-B;  
 V1Jns-tPA-gp140/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gp140/opt all-B (Nicht-IIIB-Stämme);  
 V1Jns-tPA-gp140/opt all-A (Nicht-IIIB-Stämme);  
 V1Jns-tPA-gp140/opt all-B;  
 V1Jns-tPA-gp143/mutRRE-A;  
 V1Jns-tPA-gp143/mutRRE-B;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt32-A;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt32-B;  
 V1Jns-tPA-gp143/SRV-1-3'-UTR;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32A;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32B;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-B;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-B;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt32-A/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt32-B/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32-A/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt C1/opt32-B/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-A/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-B/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-A/glyB;  
 V1Jns-tPA-gp143/opt all-B/glyB; (wie hier in den Beispielen 1–11 beschrieben);  
 und Kombinationen davon.

2. Verwendung des Polynukleotids nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Verhütung oder Behandlung einer HIV-Infektion bei einem Vertebraten.

3. Vakzin gegen eine HIV-Infektion, welches das Polynukleotid nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

4. Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Medikament eine antigen-präsentierende Zelle zur Stimulation der Proliferation von zytotoxischen und Helfer-T-Zellen und zur Stimulation von Effektor-Funktionen, einschließlich für HIV-Antigene spezifischer Lymphokin-Sekretion, veranlasst.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

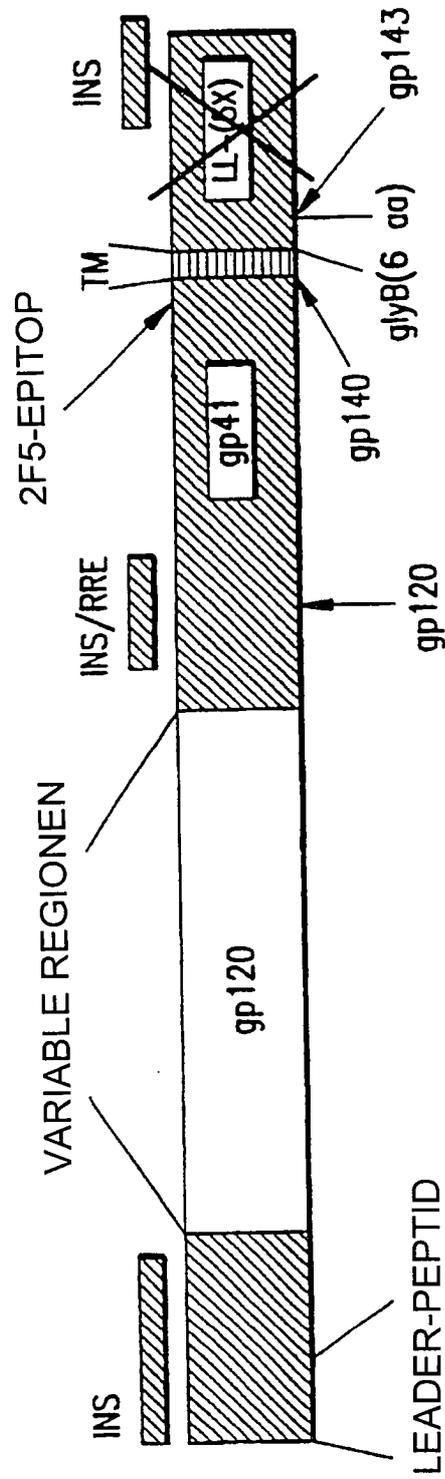


FIG.1

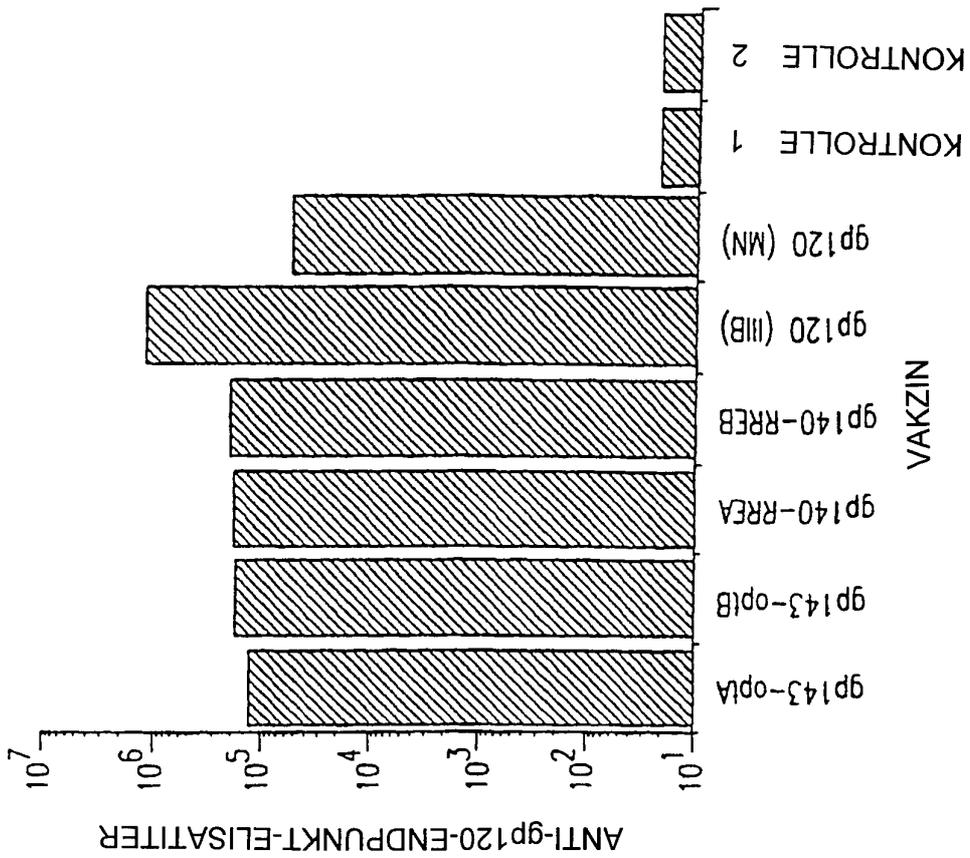


FIG.3

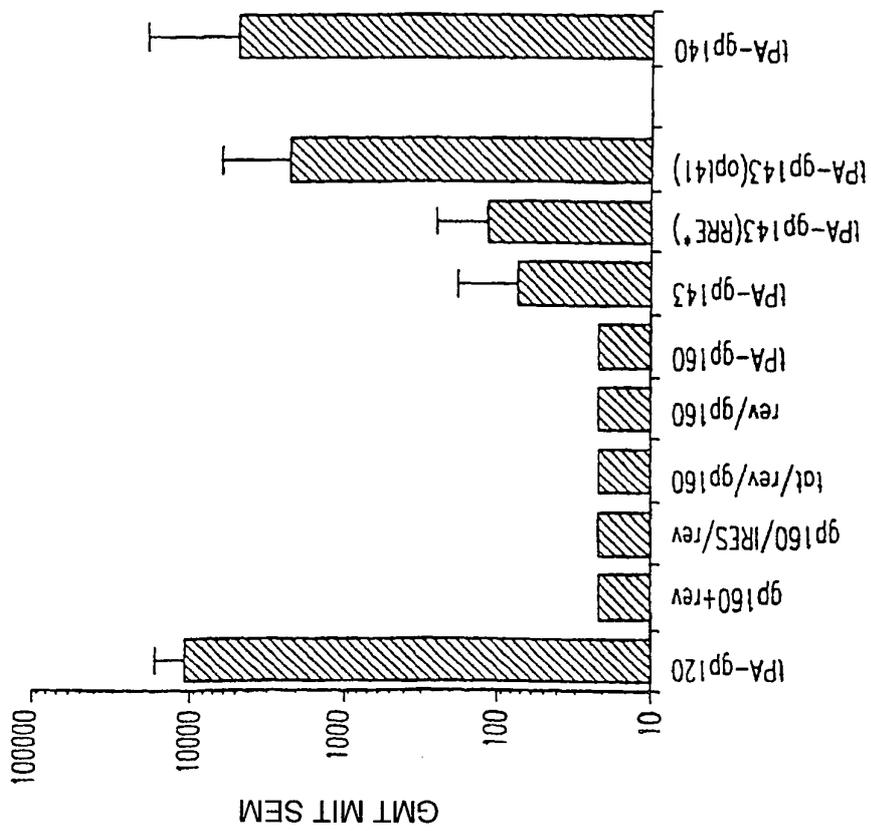


FIG.2

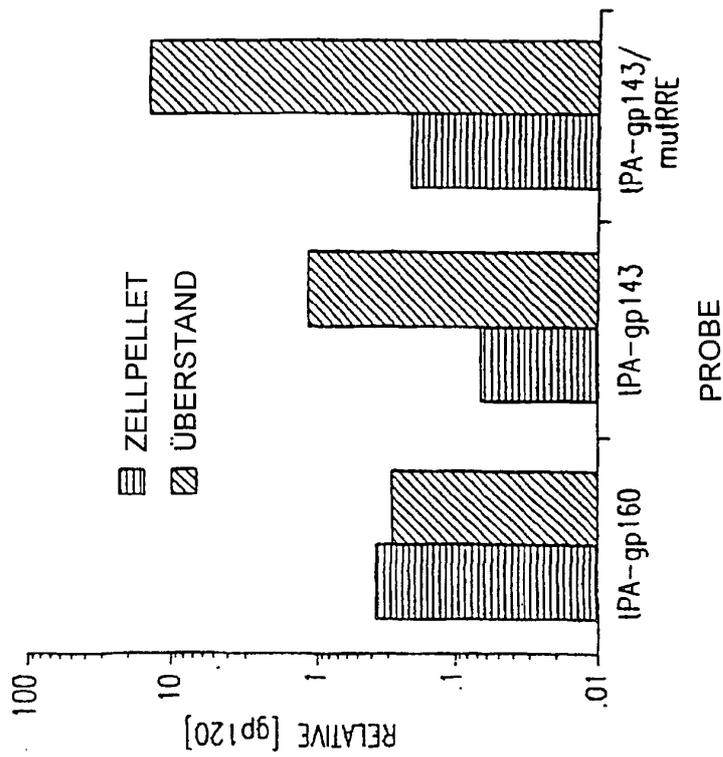


FIG.4

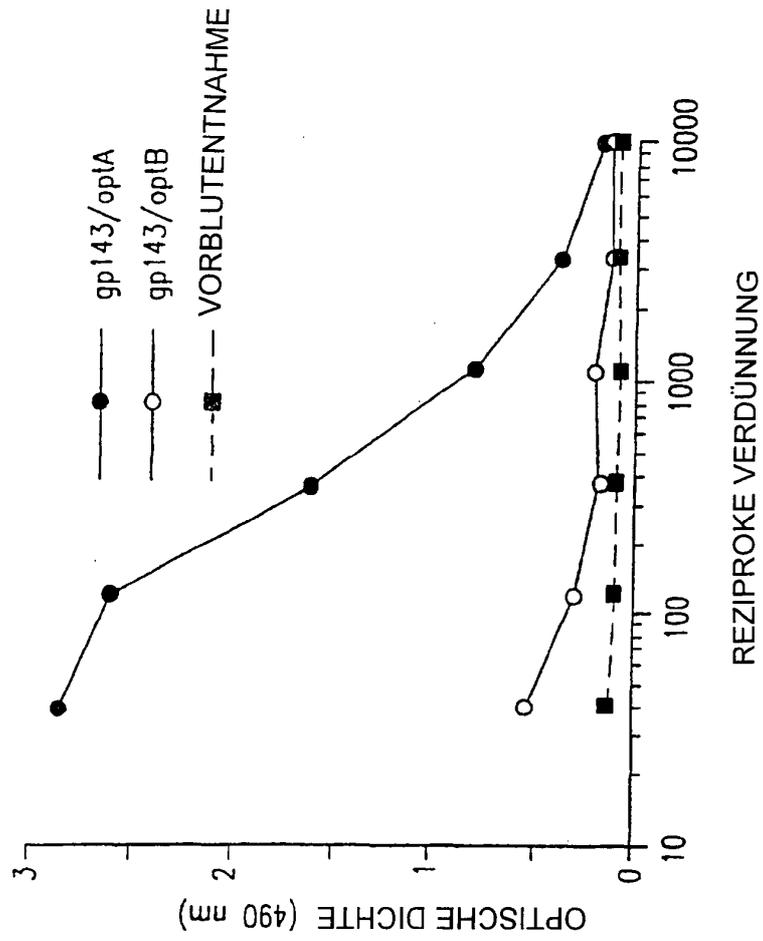


FIG.5

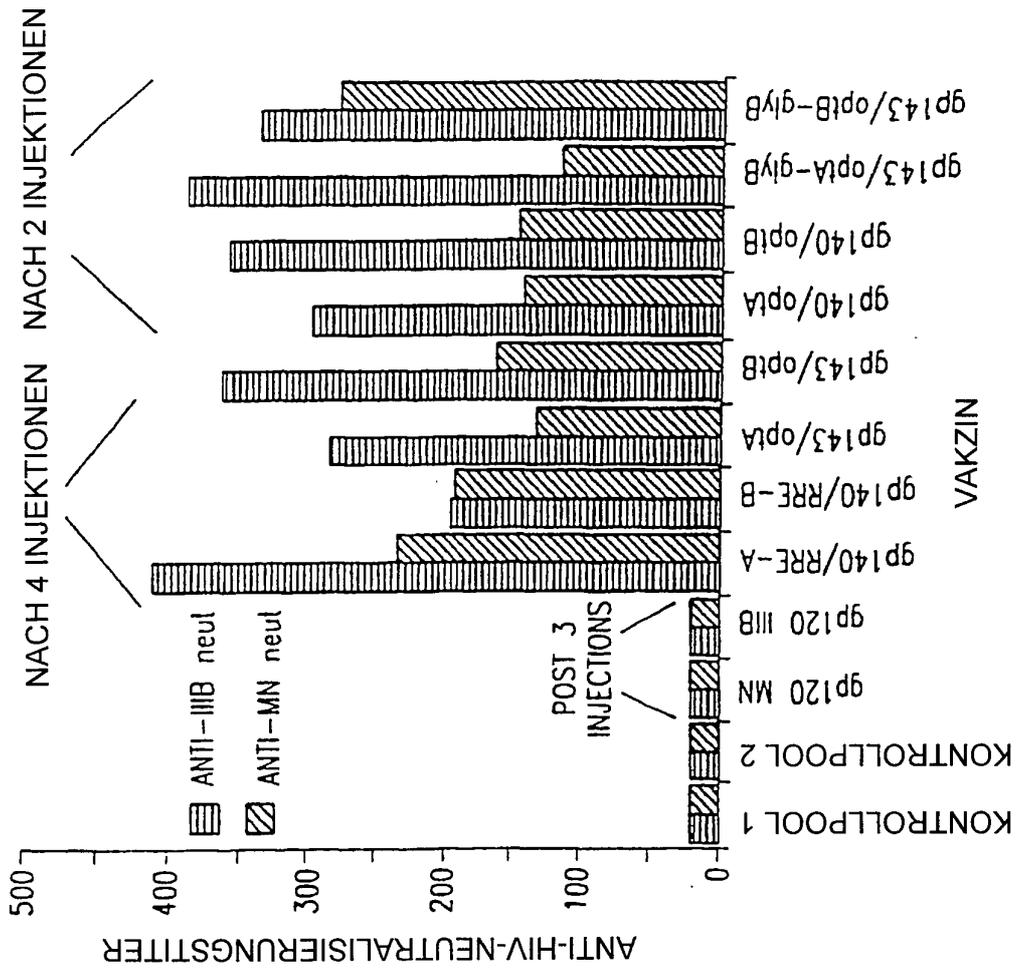


FIG.7

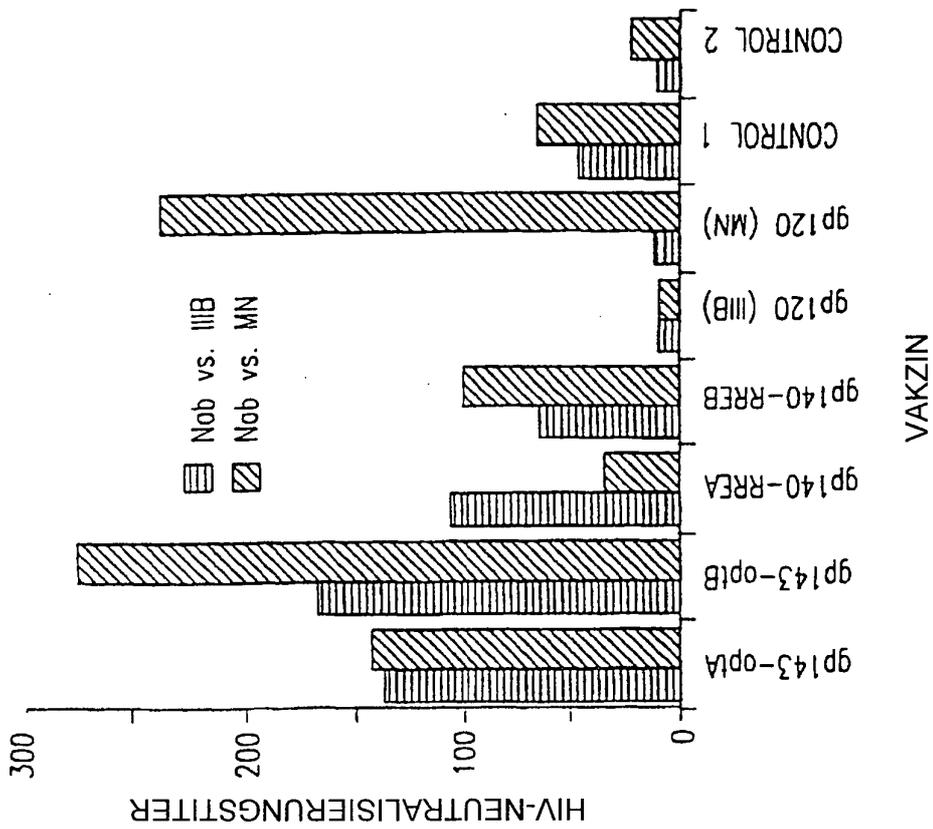


FIG.6

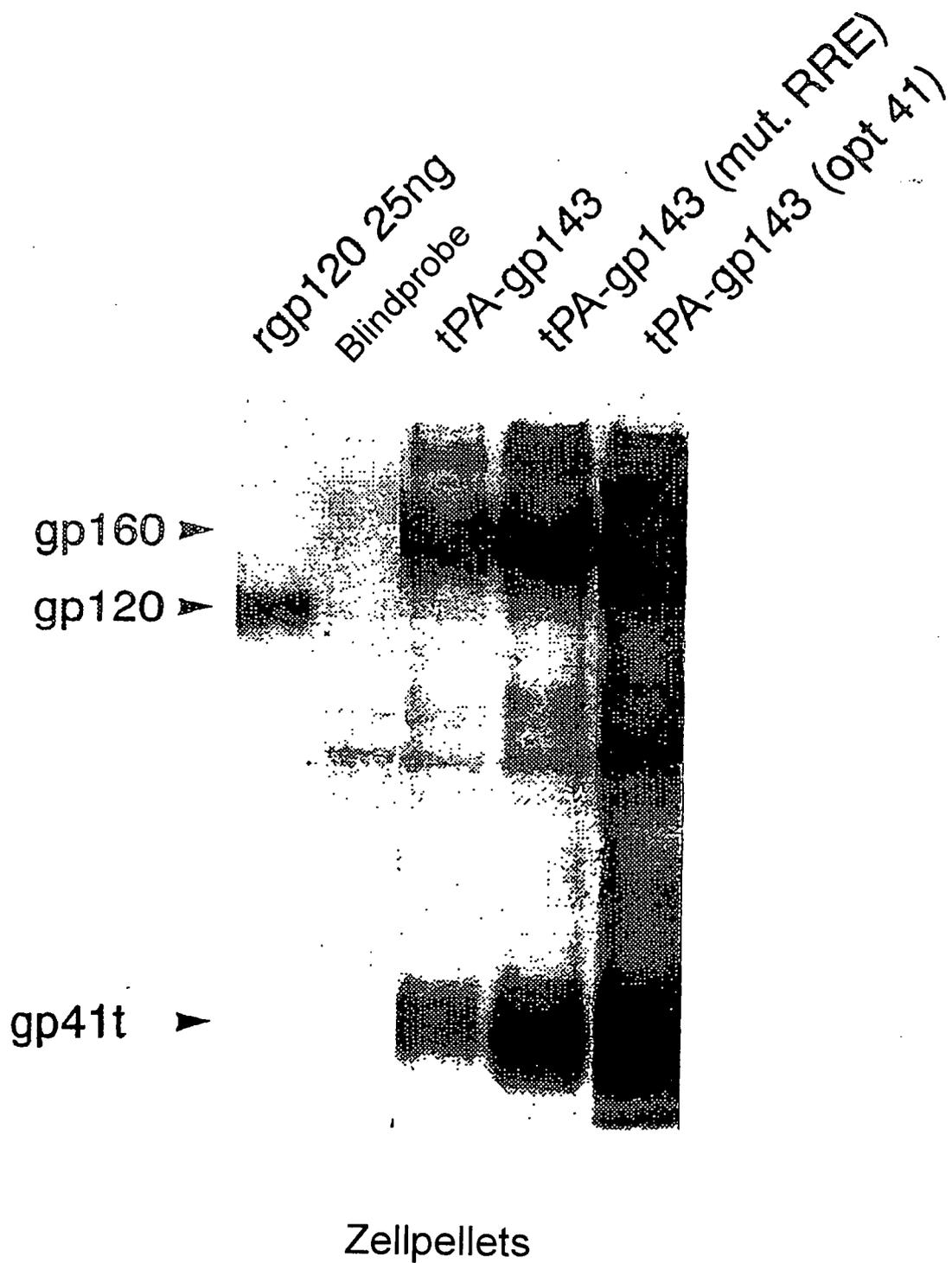


FIG.8