



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 34 583 T2** 2007.10.04

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 084 252 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 34 583.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/12298**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 955 295.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/063095**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.06.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.12.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/40 (2006.01)**
A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
87908 P 04.06.1998 US

(73) Patentinhaber:
**The Government of the United States of America,
as represented by the Secretary of the Department
of Health and Human Services, Atlanta, Ga., US**

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, NL

(72) Erfinder:
CHANG, J., Gwong-Jen, Ft. Collins, CO 80526, US

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄURE-IMPfstoffe zur Verhinderung der FLAVIVIREN-Infektion**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Vakzinen für Flaviviren. Die Vakzinen sind insbesondere rekombinante Nucleinsäuren, die Gene für Strukturproteine von Flaviviren enthalten, wie z.B. das Japanische Encephalitis-Virus (JEV). Diese Vakzinen dienen bei Verabreichung in vivo als Transkriptionseinheit für die Biosynthese der Virusprotein-Antigene.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Flaviviren sind Vertreter des Genus Flavivirus, der als Teil der Familie der Flaviviridae klassifiziert ist. Flaviviren sind für Menschen und andere Säugetiere großteils pathogen. Flaviviren, die bei Menschen zu Erkrankungen führen, umfassen das Gelbfieber-Virus, das JEV, das Dengue-Virus (umfassend die vier Serotypen Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 und Dengue 4), das durch Zecken übertragene Encephalitis-Virus, das St.-Louis-Encephalitis-Virus (SLEV) und andere. Insgesamt gibt es zurzeit etwa 70 identifizierte Spezies (Kuno et al., J. of Virol. 72, 73–83 (1998)).

[0003] Die Flaviviren enthalten im Allgemeinen drei Strukturproteine: M, das Matrix- oder Membranprotein; E, das Hüllprotein; und C, das Kapsidprotein. (Monath, Virology, 763–814, Fields (Hrsg.), Raven Press, New York (1990); Heinz und Roehrig, Immunochemistry of Viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines, 289–305, van Regenmortel und Neurath (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam (1990)). M besitzt ein Molekulargewicht (MW) von etwa 7–8 kDa; und E besitzt ein MW von etwa 55–60 kDa. M wird als größerer Vorläufer mit der Bezeichnung prM synthetisiert. M und E befinden sich in der Membran oder der Hülle des Flavivirus-Partikels und wurden daher lange als wichtige immunogene Bestandteile der Viren angesehen.

[0004] Flaviviren sind RNA-Viren, deren einzelsträngige RNA unter den verschiedenen Spezies eine Länge von etwa 10 kb aufweist. Das Protein C, dessen MW bei 12–14 kDa liegt, komplexiert mit der RNA, um einen Nucleokapsid-Komplex zu bilden. Im RNA-Genom sind ebenso einige nichtstrukturelle Proteine kodiert; sie werden als NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 bezeichnet. Das Genom wird innerhalb der Wirtszelle als Polyprotein translatiert und anschließend durch viren- oder wirtsspezifische Proteasen co- oder post-translational zu den einzelnen Genprodukten verarbeitet ([Fig. 1](#)).

[0005] Die Nucleotidsequenzen der Genome mehrerer Flaviviren sind bekannt, wie im US-Patent Nr. 5.494.671 zusammengefasst wird. Jene für JEV wird von Sumiyoshi et al. (Virology 161, 497–510 (1987)) und Hashimoto et al. (Virus Genes 1, 305–317 (1988)) bereitgestellt. Die Nucleotidsequenzen des virulenten Stamms SA-14 von JEV und des abgeschwächten Stamms SA-14-14-2, der in der Volksrepublik China als Vakzine verwendet wird, werden in der Arbeit von Nitayaphan et al. (Virology 177, 541–552 (1990)) verglichen.

[0006] Nucleotidsequenzen, die für die Strukturproteine anderer Flavivirenspezies kodieren, sind ebenso bekannt. In vielen Fällen wurden die Sequenzen der vollständigen Genome berichtet. Die verfügbaren Sequenzen umfassen das Typ-1-Dengue-Virus (Mason et al., Virology 161, 262–267 (1987)), das Typ-2-Dengue-Virus (Deubel et al., Virology 155, 365–377 (1986); Gruenberg et al., J. Gen. Virol. 69, 1391–1398 (1988); Hahn et al., Virology 162, 167–180 (1988)), das Typ-3-Dengue-Virus (Osatomi et al., Virus Genes 2, 99–108 (1988)), das Typ-4-Dengue-Virus (Mackow et al., Virology 159, 217–228 (1987); Zhao et al., Virology 155, 77–88 (1986)) und das Gelbfieber-Virus (YFV) (Rice et al., Science 229, 726–733 (1985)).

[0007] Viele Flaviviren, unter anderem JEV, werden durch Stechmücken auf den Menschen und andere Wirtstiere übertragen. Sie treten daher weit verbreitet auf, und ihre Übertragung ist nicht leicht zu unterbrechen oder zu verhindern. JEV betrifft Erwachsene und Kinder und führt bei Kleinkindern, Kindern und älteren Menschen in den tropischen und subtropischen Gebieten Asiens zu einer hohen Sterblichkeitsrate (Tsai et al., Vaccines, 671–713, Plotkin (Hrsg.), W.B. Saunders, Philadelphia, Pa (1994)). Bei den Überlebenden gibt es schwerwiegende neurologische Folgen, die mit den Symptomen der Encephalitis in Verbindung stehen und die nach der Infektion weiter bestehen. In weiter entwickelten Ländern dieser Region, wie z.B. Japan, der Volksrepublik China und Korea, wurde JEV größtenteils durch die Verwendung einer Vakzine aus inaktiviertem JEV unter Kontrolle gebracht. Trotzdem ist die Krankheit in anderen Ländern der Region immer noch vorherrschend.

[0008] Die Dengue-Virus-Erkrankung wird ebenso durch Stechmücken übertragen und tritt global in Regionen mit tropischem und subtropischem Klima auf. Symptome umfassen Fieber, Ausschlag, schwere Kopf-

schmerzen und Gelenkschmerzen, die Sterblichkeit aufgrund von Dengue ist jedoch gering. Epidemien des Dengue-Virus sind häufig und ausreichend weit verbreitet, dass die Krankheit ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit darstellt. Trotz jahrzehntelanger Bemühungen gibt es jedoch keine sicheren und wirksamen Vakzinen, um Schutz vor Dengue zu gewährleisten. Es besteht daher ein großer Bedarf an einer Vakzine gegen Dengue.

[0009] Gelbfieber ist in den tropischen Regionen Südamerikas und im Afrika südlich der Sahara vorherrschend und wird durch Stechmücken übertragen. Eine Infektion führt zu Fieber, Schüttelfrost, schweren Kopfschmerzen sowie anderen Schmerzen, Anorexie, Übelkeit und Erbrechen sowie zum Auftreten von Gelbsucht. Eine Lebendvirus-Vakzine, 17D, gezüchtet in infizierten Hühnerembryos, wird als sicher und wirksam angesehen. Trotz allem besteht weiter ein Bedarf an einer Vakzine, die die Notwendigkeit der Verabreichung eines lebenden Virus bei gleichzeitiger Entwicklung leichter Symptome und Virämie vermeidet.

[0010] Die für die Verwendung gegen JEV vorhandenen Vakzinen umfassen lebende Viren, die durch Verfahren wie Formalinbehandlung inaktiviert wurden, sowie abgeschwächte Viren (Tsai et al.). Vollvirusvakzinen bringen, obwohl sie wirksam sind, gewisse Probleme und/oder Nachteile mit sich. Die Viren werden im Gehirn von Mäusen oder in Zellkultur unter Verwendung von Säugetierzellen als Wirt kultiviert. Solche Kulturverfahren sind mühsam durchzuführen und teuer. Weiters gibt es ein gleichzeitiges Risiko der Aufnahme von Antigenen aus den Wirtszellen, d.h. des Gehirns oder des anderen Wirts, in das finale Vakzinenprodukt, was potentiell zu unbeabsichtigten und unerwünschten allergischen Reaktionen bei den Rezipienten der Vakzine führen könnte. Auch existiert das Risiko einer versehentlichen Infektion unter den Arbeitern, die an der Vakzinenproduktion beteiligt sind. Weiters besteht das Risiko, dass das Virus nicht ganz oder vollständig inaktiviert oder abgeschwächt sein könnte und dass die Vakzine daher tatsächlich eine Erkrankung hervorrufen könnte.

[0011] In WO 93/06214 wird ein rekombinantes Flavivirus offenbart, das eine Chimäre zwischen zwei Flaviviren ist. Die Chimäre ist ein Konstrukt, das nichtstrukturelle Proteine eines „Typus“ oder Serotyps von Dengue-Viren oder eines Flavivirus mit Strukturproteinen eines anderen „Typus“ oder Serotyps eines Dengue-Virus oder eines anderen Flavivirus fusioniert. Das zweite Flavivirus kann JEV sein.

[0012] Einige rekombinante Untereinheits- und virale Vakzinen wurden während der letzten Jahre entwickelt. Das US-Patent Nr. 4.810.492 beschreibt die Produktion des E-Glykoproteins von JEV zur Verwendung als Antigen in einer Vakzine. Die entsprechend DNA wird in ein Expressionssystem kloniert, um das Antigen-Protein in einer geeigneten Wirtszelle, wie z.B. E. coli, Hefe oder einer Zellkultur eines höheren Organismus, zu exprimieren. Das US-Patent Nr. 5.229.293 offenbart das rekombinante Baculovirus, welches das Gen für das JEV-E-Protein in sich trägt. Der Virus wird verwendet, um Insektenzellen in Kultur zu infizieren, so dass das Protein E produziert und für die Verwendung als Vakzine gewonnen wird.

[0013] Das US-Patent Nr. 5.021.347 offenbart ein rekombinantes Vakziniavirus, in dessen Genom das Gen für das JEV-E-Protein eingebaut wurde. Das lebende rekombinante Vakziniavirus wird als Vakzine verwendet, um gegen JEV zu immunisieren. Rekombinante Vakziniaviren und Baculoviren, in denen die Viren ein Gen für eine C-Terminus-Trunkierung des E-Proteins von Typ-2-Dengue, Typ-4-Dengue und JEV aufnehmen, werden im US-Patent Nr. 5.494.671 offenbart. Das US-Patent Nr. 5.514.375 offenbart verschiedene rekombinante Vakziniaviren, die Teile des offenen Leserasters von JEV exprimieren, die sich von prM bis NS2B erstrecken. Diese Pockenviren induzierten die Bildung extrazellulärer Partikel, die das verarbeitete M-Protein und das E-Protein enthalten. Zwei Rekombinanten, die für diese JEV-Proteine kodieren, produzierten hohe Titer neutralisierender und hämagglutinin-inhibierender Antikörper sowie schützende Immunität bei Mäusen. Das Ausmaß dieser Wirkungen war nach zwei Immunisierungsbehandlungen höher als nach nur einer. Rekombinante Vakziniaviren, die Gene für die M- und E-Proteine von JEV enthielten, verliehen schützende Immunität, als sie Mäusen verabreicht wurden (Konishi et al., *Virology* 180, 401–410 (1991)). Von HeLa-Zellen, die mit rekombinanten vakziniavirustragenden Genen für prM und E aus JEV infiziert waren, wurde gezeigt, dass sie subvirale Partikel produzierten (Konishi et al., *Virology* 188, 714–720 (1992)). Dmitriev et al. berichten über die Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Vakziniavirus, das für strukturelle und gewisse nichtstrukturelle Proteine des durch Zecken übertragenen Encephalitis-Virus kodiert (*J. Biotechnol.* 44, 97–103 (1996)).

[0014] Rekombinante Virusvektoren wurden ebenfalls hergestellt, um als Virus-Vakzine für das Dengue-Fieber zu dienen. Zhao et al. (*J. Virol.* 61, 4019–4022 (1987)) stellten rekombinante vakziniavirustragende Strukturproteine und NS1 aus Typ-4-Dengue her und erzielten Expression nach Infizieren von Säugetierzellen mit der Rekombinante. Eine ähnliche Expression wurde unter Verwendung von rekombinantem Baculovirus zur Infektion von Target-Insektenzellen erzielt (Zhang et al., *J. Virol.* 62, 3027–3031 (1988)). Bray et al. (*J. Virol.* 63, 2853–2856 (1989)) berichten ebenso über eine rekombinante Vakzina-Dengue-Vakzine, die auf dem

E-Proteingen basiert, das Mäusen bei Immunitätstests zur Entwicklung der Dengue-Encephalitis schützende Immunität verleiht. Falgout et al. (J. Virol. 63, 1852–1860 (1989)) und Falgout et al. (J. Virol. 64, 4356–4363 (1990)) berichten über ähnliche Ergebnisse. Zhang et al. (J. Virol. 62, 3027–3031 (1988)) zeigten, dass rekombinantes Baculovirus, das für Dengue-E- und NS1-Proteine kodierte, Mäuse bei Immunitätstests ebenfalls gegen Dengue-Encephalitis schützen können. Andere Kombinationen, in denen strukturelle und nichtstrukturelle Gene in rekombinante Virus-Vakzinen miteinbezogen werden, erzeugen keine signifikante Immunität (Bray et al., J. Virol. 63, 2853–2856 (1989)). Bei Affen entwickelte sich ebenso keine vollständig schützende Immunität im Dengue-Virus-Immunitätstest, als sie mit rekombinantem Baculovirus immunisiert wurden, das das E-Protein exprimiert (Lai et al., Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS, 119–124, F. Brown, R.M. Chancock, H.S. Ginsberg und R. Lerner (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1990)).

[0015] Über eine Immunisierung unter Verwendung rekombinanter DNA-Präparate wurde für das St.-Louis-Encephalitis-Virus (SLEV) und das Dengue-2-Virus berichtet, und zwar unter Verwendung von entwöhnten Mäusen als Modell (Phillpotts et al., Arch. Virol. 141, 743–749 (1996); Kochel et al., Vaccine 15, 547–552 (1997)). Die Plasmid-DNA, die für die prM- und E-Gene von SLEV kodiert, bot in einer Einzel- oder Doppeldosis der DNA-Immunisierung einen partiellen Schutz im SLEV-Immunitätstest. In diesen Versuchen zeigten Kontrollmäuse eine Überlebensrate von etwa 25%, und es wurden keine schützenden Antikörper in den DNA-immunisierten Mäusen detektiert (Phillpotts et al.). In Mäusen, die drei intradermale Injektionen der rekombinanten Dengue-2-Plasmid-DNA erhielten, die prM enthielt, entwickelten 100% neutralisierende Anti-Dengue-2-Antikörper, und 92% derer, die das entsprechende E-Gen erhielten, entwickelten ebenso neutralisierende Antikörper (Kochel et al.). Immunitätsexperimente unter Verwendung eines Zwei-Dosen-Plans konnten jedoch keinen Schutz der Mäuse gegen die tödlichen Dengue-2-Virus-Challenge erzeugen.

[0016] Die bis heute entwickelten Vakzinen zur Immunisierung gegen JEV bringen eine Reihe von Nachteilen und Problemen mit sich, die mit ihrer Verwendung einhergehen. Inaktivierte Virus-Vakzinen sind kostspielig und kompliziert herzustellen. Zusätzlich tragen sie das Risiko einer allergischen Reaktion in sich, die auf Proteine des Wirts, der zur Herstellung des Virus verwendet wurde, zurückzuführen ist. Weiters stellen sie ein bedeutendes Risiko für die Arbeiter dar, die in ihrer Produktion involviert sind. Abgeschwächte Kandidaten-JEV-Vakzine werden klinischen Tests unterzogen, haben jedoch seit 1996 außerhalb der Volksrepublik China keine weit verbreitete Akzeptanz gefunden (Hennessy et al., Lancet 347, 1583–1586 (1996)). Rekombinante Vakzinen, die auf der biosynthetischen Expression von nur gewissen der Proteine des JEV-Genoms basieren, scheinen keine hohen Antikörper-Titer zu induzieren und tragen, wie bei den Vollviruspräparaten, je nach Fall, das Risiko einer schädlichen allergischen Reaktion auf Antigene des Wirtsorganismus oder auf den Vakziniavirus-Vektor in sich. Ähnliche Probleme begleiten die Herstellung von Vakzinen gegen YFV. Die Vakzin-Entwicklung gegen Dengue ist weniger weit fortgeschritten, und bei solchen virusbasierten oder auf rekombinantem Protein basierten Vakzinen steht man vor ähnlichen Problemen wie den eben angesprochenen.

[0017] Es besteht daher ein Bedarf an Vakzinen, die gegen Flaviviren, wie z.B. Gelbfieber, Dengue, JEV und SLEV, gerichtet sind, die kostengünstig herzustellen sind, für die in ihrer Herstellung involvierten Arbeiter ein geringes Risiko darstellen, ein minimales Risiko nachteiliger immunologischer Reaktionen aufgrund von Verunreinigungen oder zufällig auftretenden immunogenen Komponenten in sich tragen, und hochwirksam bei der Erzeugung neutralisierender Antikörper und schützender Immunität sind. Es besteht weiters ein Bedarf an einer Vakzine gegen JEF und verwandte Flaviviren, die die Anzahl an erforderlichen immunisierenden Dosen minimiert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt ein Nucleinsäuremolekül bereit, das eine Transkriptionseinheit (TU) für immunogene Flavivirus-Antigene, M-Protein und E-Protein und die Consensus-Kozak-Ribosombindungssequenz GCCGCCGCC umfasst. Die TU bringt eine Wirtszelle nach Inkorporation in die Zelle zur Synthese der Antigene. In einem wichtigen Aspekt der Erfindung ist das Flavivirus entweder ein Gelbfieber-Virus (YFV), ein Typ-1-Dengue-Virus, ein Typ-2-Dengue-Virus, ein Typ-3-Dengue-Virus, ein Typ-4-Dengue-Virus, ein St.-Louis-Encephalitis-Virus (SLEV) oder ein Japanisches Encephalitis-Virus (JEV). Die Wirtszelle sekretiert subvirale Partikel, die die M- und die E-Antigene enthalten. In einem weiteren wichtigen Aspekt der Erfindung ist die Nucleinsäure ein DNA-Molekül. Die Nucleinsäure-TU umfasst eine Kontrollsequenz, die auf geeignete Art und Weise angeordnet ist, so dass sie die Expression der M- und der E-Antigene operabel steuert; diese Kontrollsequenz kann vorteilhafterweise der unmittelbare frühe Promotor von Cytomegalievirus sein. In einer zusätzlichen Ausführungsform umfasst die Transkriptionseinheit auch einen Poly-A-Terminator.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt weiters eine Wirtszelle bereit, die ein Nucleinsäuremolekül in sich trägt, das die Transkriptionseinheit umfasst. Das Flavivirus kann YFV, Typ-1-Dengue-Virus, Typ-2-Dengue-Virus, Typ-3-Dengue-Virus, Typ-4-Dengue-Virus, SLEV oder JEV sein. Die Zelle sekretiert subvirale Partikel, die die M- und die E-Antigene enthalten.

[0020] Zusätzlich stellt die Erfindung eine Zusammensetzung zur Impfung eines Individuums gegen ein Flavivirus bereit, die ein Nucleinsäuremolekül enthält, das die Transkriptionseinheit umfasst. Die Transkriptionseinheit bringt eine Zelle im Körper des Individuums nach Aufnahme in diesen zur Synthese der immunogenen Antigene. Die Zusammensetzung umfasst weiters einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. In signifikanten Ausführungsformen kann das Flavivirus das Gelbfieber-Virus, das Typ-1-Dengue-Virus, das Typ-2-Dengue-Virus, das Typ-3-Dengue-Virus, das Typ-4-Dengue-Virus, SLEV oder JEV sein. Die Zelle sekretiert subvirale Partikel, die die M- und die E-Flavivirus-Antigene enthalten. In wichtigen Ausführungsformen ist das Nucleinsäuremolekül ein DNA-Molekül. In weiteren signifikanten Ausführungsformen enthält die Transkriptionseinheit zusätzlich eine Kontrollsequenz, die auf geeignete Art und Weise angeordnet ist, so dass sie die Expression der M- und der E-Antigene operabel steuert, wenn die Nucleinsäure in die Zelle des Individuums eingeführt wurde; die Kontrollsequenz ist vorteilhafterweise der unmittelbare frühe Promotor von Cytomegalievirus. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Transkriptionseinheit auch einen Poly-A-Terminator.

[0021] Die Erfindung stellt weiters eine Möglichkeit der Verwendung der TU bei der Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines Individuums gegen eine Infektion durch einen Flavivirus bereit. Die Transkriptionseinheit bringt, nachdem sie von der Zelle aufgenommen wurde, eine Zelle im Körper des Individuums dazu, das immunogene Antigen zu synthetisieren. Die Zusammensetzung umfasst zusätzlich einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. In signifikanten Ausführungsformen kann das Flavivirus das Gelbfieber-Virus, das Typ-1-Dengue-Virus, das Typ-2-Dengue-Virus, das Typ-3-Dengue-Virus, das Typ-4-Dengue-Virus, SLEV oder JEV sein. Die Zelle im Körper des Individuums sekretiert, nachdem sie die Nucleinsäure aufgenommen hat, subvirale Partikel, die das flavivirale M- und E-Antigen enthalten. Zusätzlich kann in signifikanten Ausführungsformen die Impfung eine zur Verabreichung an das Subjekt in einer Einzeldosis sein und kann zur Verabreichung auf parenteralem Weg bestimmt sein. In einem weiteren Aspekt ist die Nucleinsäure ein DNA-Molekül. Die Transkriptionseinheit umfasst weiters eine Kontrollsequenz, die auf geeignete Art und Weise angeordnet ist, so dass sie die Expression des M- und des E-Antigens operabel steuert; in einem signifikanten Aspekt dieser Ausführungsform ist die Kontrollsequenz der unmittelbare frühe Promotor von Cytomegalievirus. Weiters kann die Transkriptionseinheit auch einen Poly-A-Terminator umfassen.

[0022] Diese Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung sind die Basis für ihre charakteristischen Eigenschaften und Vorteile. Die Nucleinsäure-TU-hältige Vakzine ist vollkommen lebensunfähig, da es sich um ein Nucleinsäurekonstrukt handelt, das nur Teile des Flavivirus-Genoms umfasst, anstatt der das ganze Genom umfassenden Sequenz. Sie stellt daher keine Gefahr für eine Infektion mit dem Flavivirus gegenüber jenen dar, die in ihre Herstellung involviert sind, und gegenüber jenen Individuen, die die Vakzine erhalten. Die Nucleinsäure-Vakzine ist leicht herzustellen und zu verabreichen und ist vor der Verwendung stabil für die Lagerung. Es wurde unerwarteterweise herausgefunden, dass die Nucleinsäurevakzine der Erfindung im Wesentlichen zu 100% erfolgreich beim Verleihen von schützender Immunität in Säugetieren ist, und das schon nach der Verabreichung von nur einer Einzeldosis. Ein weiteres unerwartetes Resultat ist, dass die Nucleinsäure-TU in der Lage ist, in einem weiblichen Säugetier Immunität gegen ein Flavivirus zu erzeugen, die über die Milch an ihre Nachkommen weitergegeben werden kann. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie beschränken zu wollen, nimmt der Erfinder an, dass ein möglicher Mechanismus für den Erfolg der Nucleinsäure beim Verleihen von schützender Immunität darauf beruht, dass eine Wirtszelle, die die Nucleinsäure in sich trägt, wie z.B. die Zelle eines Individuums, dem die Vakzine verabreicht wird, subvirale Partikel erzeugt, die die flaviviralen M- und E-Antigene enthalten. Diese Partikel können die immunogenen Eigenschaften der virulenten Flaviviren selbst gut imitieren.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0023] **Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung der flaviviralen Polyproteinverarbeitung. Die zentrale horizontale Region stellt eine schematische Darstellung des viralen Genoms dar. Die Linien bezeichnen die nicht-translatierten 5'- und 3'-Regionen, und die eingerahmten Regionen stellen den offenen Leseraster für strukturelle (links und oben) und nichtstrukturelle (rechts und unten) Proteine dar. Die Spaltung durch die Wirtszellen-Signalase erfolgt gleichzeitig mit der Translation am E-Protein-C-Terminus, der strukturelle und nichtstrukturelle Regionen trennt. Ein subtilase-ähnliches zelluläres Enzym, nämlich Furin, kann für die prM-Spaltung verantwortlich sein. Potentielle Transmembrandomänen viraler Polyproteine werden durch die schraffierten Bereiche dargestellt.

[0024] [Fig. 2](#) zeigt eine Karte des JEV-Genoms (oben) und die DNA-Sequenz von Oligonucleotiden, die in einer Umkehr-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet wird (Mitte), um die Transkriptionseinheit für die Expression der prM-E-Protein-kodierenden Regionen (unten) zu konstruieren. Potentielle Transmembrandomänen vitaler Polyproteine werden durch die schraffierten Bereiche dargestellt.

[0025] [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Darstellung der Plasmidvektoren pCDNA3, pCBamp und pClBamp sowie die Beziehung zwischen ihnen. Diese Plasmide umfassen das CMV-(Cytomegalievirus-)Promotor/Enhancer-Element, BGHp(A) (Rinder-Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal und die Transkriptionsterminationssequenz), das Ampicillinresistenz-Gen und den ColE1-Replikationsstartpunkt zur Selektion und Aufrechterhaltung in *E. coli*. Der f1-Replikationsstartpunkt zur einzelsträngigen Rettung in *E.-coli*-Zellen, der SV40-Replikationsstartpunkt (SV40 ORI), die neomycinresistenz-kodierende Region und SV40p(A)-Sequenzen wurden aus pCDNA3 deletiert, um pCBamp zu erzeugen. Es wurde eine Intronsequenz in die NcoI-KpnI-Stelle von pCBamp inseriert, um Plasmid-pClBamp zu erzeugen. Die Mehrfachklonierungsstelle zur Insertion von Genen für flavivirale Strukturproteine, angeordnet zwischen der TATA-Box des CMV-Promotor/Enhancers und BGHp(A), ist dargestellt.

[0026] [Fig. 4](#) zeigt SDS-PAGE-Immunoblot-Analysen der saccharosegradient-gereinigten subviralen Partikel aus JE-4B-COS-1-Kulturflüssigkeit (4B, rechte Spur jedes Paars). Das dichtegradient-gereinigte JE-Virion aus JEV-infizierter C6/36-Zellkultur wurde als positive Kontrolle verwendet (JEV, linke Spur jedes Paars). JE-HIAF (hyperimmune Aszitesflüssigkeit); 4G2, monoklonaler Anti-E-Antikörper; JM01, monoklonaler Anti-M-Antikörper, NMAF (normale Maus-Aszitesflüssigkeit).

[0027] [Fig. 5](#) zeigt ein Profil des E-Antigens in einer Rate-Zonal-Saccharosegradient-Analyse, hergestellt aus dem PEG-Präzipitat des JE-4B-Zellkulturmediums mit oder ohne Triton-X-100-Behandlung.

[0028] [Fig. 6](#) zeigt eine Karte des Gelbfieber-Virus-(YFV-)Genoms (oben) und die DNA-Sequenz von Oligonucleotiden (Mitte), die in einer Umkehr-Transkriptase-PCR verwendet werden, um die Transkriptionseinheit für die Expression von YFV-prM-Protein-E-kodierenden Regionen zu konstruieren (unten). Potentielle Transmembrandomänen viraler Polyproteine sind durch die schraffierten Bereiche dargestellt.

[0029] [Fig. 7](#) zeigt eine Karte des St.-Louis-Encephalitis-Virus-(SLEV-)Genoms (oben) und die DNA-Sequenz von Oligonucleotiden (Mitte), die in einer Umkehr-Transkriptase-PCR verwendet werden, um die Transkriptionseinheit für die Expression von SLEV-prM-Protein-E-kodierenden Regionen zu konstruieren (unten). Potentielle Transmembrandomänen viraler Polyproteine sind durch die schraffierten Bereiche dargestellt.

[0030] [Fig. 8](#) zeigt Fotos von viralen YF- oder SLE-Proteinen, die durch einen indirekten immunfluoreszierenden Antikörper-Test (IFA) unter Verwendung von entweder YFV- oder SLEV-HIAF detektiert werden. Die viralen Proteine prM und E wurden in COS-1-Zellen exprimiert, die mit pCDYF2 bzw. pCDSLE4-3 transformiert wurden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0031] Die Erfindung umfasst Nucleinsäure-Transkriptionseinheiten, die für flavivirale antigene Proteine, das M- und das E-Protein-Antigen, kodieren. Die Nucleinsäuren funktionieren so, dass sie die M- und E-Protein-Antigene exprimieren, wenn die Nucleinsäure von einer geeigneten Wirtszelle aufgenommen wird, speziell, wenn die Wirtszelle die Zelle eines Individuums ist. Die Erfindung umfasst auch eine Vakzine, deren Wirkstoff die Nucleinsäure-Transkriptionseinheit (TU) ist. Die Erfindung umfasst weiters die kultivierten Wirtszellen, wenn diese in sich eine Nucleinsäure-TU enthalten. Die Erfindung ermöglicht zusätzlich die Immunisierung eines Individuums gegen eine flavivirale Infektion durch Verabreichung einer wirksamen Menge einer Vakzine an das Individuum, die die Nucleinsäure-TU-Moleküle enthält.

[0032] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Nucleinsäure-Transkriptionseinheit“ oder „Nucleinsäure-Transkriptionseinheitsmolekül“ auf eine Nucleinsäure, die für ein oder mehrere spezifizierte Gene kodiert. Die TU besitzt die biologische Aktivität, dass, nach dem Einführen in eine geeignete Wirtszelle, die Nucleinsäure die Biosynthese eines oder mehrerer spezifizierter Genprodukte induziert, für die die spezifizierten Gene kodieren. Das/die Gen-Produkt(e) ist/sind andere biologische Makromoleküle, wie z.B. Proteine, die chemisch nicht mit der TU verwandt sind. Die Nucleinsäure-TU induziert die Zelle zur Verwertung ihrer Zellkomponenten, um das/die spezifische(n) Gen-Produkt(e) zu produzieren, deren Gen(e) in der TU enthalten ist/sind. Obwohl eine beliebige Nucleinsäure als TU dienen kann, ist die TU in einer bevorzugten Ausführungsform die DNA eines Plasmids oder eines ähnlichen Vektors, worin das Plasmid oder der Vektor zusätzlich kodierende Sequenzen

für Marker-Gene oder andere Sequenzkonstruktionen umfasst, die das Experimentieren und die Biosynthese der TU erleichtern.

[0033] Wie hierin verwendet, ist eine „Kontrollsequenz“ eine Regulations-Nucleotidsequenz, die in eine Nucleinsäure-TU inkorporiert ist und mit geeigneten Zellkomponenten der Wirtszelle wechselwirkt, um zu verbesserter oder aktivierter Biosynthese der Genprodukte zu führen, für die die TU kodiert. Daher ist eine geeignete Kontrollsequenz eine, mit der die Komponenten der Wirtszelle in der Lage sind wechselzuwirken, was zu stimulierter Synthese des Genprodukts führt. Bei einer operablen Anordnung in einer Nucleinsäure im Hinblick auf ein spezifiziertes Gen kontrolliert eine Kontrollsequenz wirksam die Expression des spezifizierten Gens.

[0034] Wie hierin verwendet, ist ein „Promotor“ eine Nucleotidsequenz in einer Nucleinsäure-TU, die als Kontrollsequenz dient.

[0035] Wie hierin verwendet, ist ein „Terminator“ eine längere Nucleotidsequenz, deren Wirkung Polyadenylierung am 3'-Ende einer reifen mRNA induziert. Eine Terminatorsequenz ist nach oder stromab einer bestimmten kodierenden Sequenz anzutreffen.

[0036] Wie hierin verwendet, ist eine „Wirtszelle“ eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle, die eine Nucleinsäure-TU in sich trägt, die für eine oder mehrere Genprodukte kodiert, oder in die solch eine TU eingeführt wurde. Eine Wirtszelle trägt daher eine fremde oder heterologe Substanz in sich, nämlich die TU, die nicht natürlich oder indigen darin als Komponente zu finden ist. Eine geeignete Wirtszelle ist eine, die die Fähigkeit für die Biosynthese der Genprodukte als Konsequenz der Einführung der TU besitzt. Insbesondere ist eine geeignete Wirtszelle eine, die auf eine Kontrollsequenz und auf eine Terminatorsequenz, sofern vorhanden, reagiert, die in die TU inkludiert sein können. In wichtigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Wirtszelle eine Säugetierzelle. In besonders wichtigen Ausführungsformen dieser Erfindung ist die Wirtszelle eine natürlich vorkommende Zelle im Körper eines Menschen oder eines anderen Individuums als eines Menschen, dem die TU als Komponente einer Vakzine verabreicht wurde. Alternativ dazu kann die Säugetierzelle in analytischen oder diagnostischen Anwendungen oder für demonstrative Zwecke eine in vitro gezüchtete menschliche oder nicht menschliche Zelle sein.

[0037] Wie hierin verwendet, bezieht sich eine „Vakzine“ oder eine „Zusammensetzung zur Impfung eines Individuums“, die für ein bestimmtes Pathogen spezifisch ist, auf ein Präparat, das bei Verabreichung an ein Individuum zu einer immunogenen Reaktion in einem Individuum führt. Wie hierin verwendet, ist eine „immunogene“ Reaktion eine, die dem Individuum eine schützende Immunität gegen das Pathogen verleiht. Ohne sich dabei auf eine bestimmte Theorie beschränken zu wollen, wird davon ausgegangen, dass eine immunogene Reaktion von der Produktion von neutralisierenden Antikörpern oder aus zytotoxischen Zellen des Immunsystems oder beidem herrühren kann. Wie hierin verwendet, ist ein „immunogenes Antigen“ ein Antigen, das zu einer immunogenen Reaktion führt, wenn es in ein Individuum eingeführt wird oder, wie im Fall der vorliegenden Erfindung, wenn es innerhalb der Zellen eines Wirts oder eines Individuums synthetisiert wird. Wie hierin verwendet, ist eine „wirksame Menge“ einer Vakzine oder einer Impfungszusammensetzung eine Menge, die bei Verabreichung an ein Individuum ausreicht, um ihm schützende Immunität zu verleihen. Historisch wurde davon ausgegangen, eine Vakzine würde als aktiven Stoff eine oder mehrere spezifische molekulare Komponenten oder Strukturen enthalten, die das Pathogen umfassen, insbesondere dessen Oberfläche. Solche Strukturen können Oberflächenkomponenten, wie z.B. Proteine, komplexe Kohlenhydrate und/oder komplexe Lipide umfassen, die häufig in pathogenen Organismen zu finden sind.

[0038] Wie hierin verwendet, muss jedoch betont werden, dass die Begriffe „Vakzine“ oder „Zusammensetzung zur Impfung eines Individuums“ die herkömmliche, im vorhergehenden Absatz zusammengefasste Bedeutung ausweiten. Wie hierin verwendet, beziehen sich diese Begriffe auch auf das Nucleinsäure-TU-Molekül der vorliegenden Erfindung oder auf Zusammensetzungen, die die TU enthalten. Die TU induziert die Biosynthese eines oder mehrerer spezifizierter Genprodukte, für die die TU innerhalb der Zellen des Individuums kodiert, worin die Genprodukte spezifizierte antigene Proteine des Pathogens sind. Die biosynthetischen Antigene dienen dann als das Immunogen. Wie bereits erwähnt, kann die TU, und daher auch die Vakzine, eine beliebige Nucleinsäure sein, die spezifizierte Gene für die spezifizierten immunogenen Antigene trägt. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist die TU der Vakzine eine DNA. Die TU kann ein Plasmid oder ein Vektor sein, das/der zusätzliche Gene oder spezifische Sequenzen zum Nutzen des ausgebildeten Fachmanns auf dem Gebiet der Molekularbiologie, der Zellbiologie und der viralen Immunologie umfasst (siehe Sambrook, Fritsch und Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) und Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1987) (vierteljährlich ergänzt), die hierin durch Verweis aufgenommen sind).

[0039] Die Nucleinsäure-TU-Moleküle der vorliegenden Erfindung bezeichnen Nucleinsäuren oder Derivate von Nucleinsäuren, deren Nucleotidsequenzen für spezifische Genprodukte kodieren, die mit antigenen Proteinen von Flaviviren verwandt sind, wie z.B. JEV, Dengue, das Gelbfieber-Virus und das St.-Louis-Encephalitis-Virus. Obwohl jede Nucleinsäure als TU dienen kann, ist in einer wichtigen Ausführungsform die TU eine DNA. Alternativ dazu können die Nucleinsäuren RNA-Moleküle sein. Sie können auch ein beliebiges verschiedener Derivate von DNA oder RNA sein, deren Rückgrat-Phosphodiesterbindungen chemisch modifiziert wurden, um die Stabilität der TU als ein pharmazeutisches Agens zu erhöhen. Die so ins Auge gefassten Modifikationen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Thiophosphat-Derivate oder Phosphonat-Derivate; diese und andere Beispiele für Derivate sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Nucleinsäurechemie geläufig.

[0040] JEV ist ein RNA-Virus, dessen Genom charakterisiert und sequenziert wurde (siehe [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)). Das Gen für das M-Strukturgen umfasst eine M-Präsequenz (prM), die intrazellulär translatiert wird. Diese Sequenz ermöglicht intrazellulär die Assemblierung von JEV-Partikeln. Die M-Präsequenz wird anschließend vom Genprodukt gespalten, um Viruspartikel zu ergeben, die vor der Sekretion reife M-Proteine enthalten. Verwandte Flaviviren, wie z.B. YFV, Dengue und SLEV, weisen ähnliche genomische Strukturen und Funktionen auf (siehe z.B. [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#)).

[0041] Eine wichtige TU für flavivirale M- und E-Proteine in der vorliegenden Erfindung ist DNA. Gemäß der im vorangehenden Absatz angeführten Diskussion kodiert diese DNA für das Gen für M, das auch die M-Präsequenz umfasst; sie kodiert auch für das Gen für das E-Protein. Auf diese Art und Weise wird es den beabsichtigten Genprodukten ermöglicht, subvirale Partikel innerhalb der Wirtszelle zu bilden. Die Wirtszelle kann dann die M-Präsequenz auf eine Art und Weise, analog zu jener, die bei vollen Virionen auftritt, spalten.

[0042] Um in vivo wirksam als Vakzine funktionieren zu können, ist es von Vorteil, innerhalb der Nucleinsäure-TU eine Kontrollsequenz vorzusehen, die die Verstärkung oder Förderung der Translation der für die Antigene kodierenden Sequenzen bewirkt. Die Verwendung solcher Promotoren ist dem Fachmann auf den Gebieten der Molekularbiologie, der Zellbiologie und der viralen Immunologie wohlbekannt (siehe Sambrook, Fritsch und Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) und Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1987) (vierteljährlich ergänzt)). Da die Nucleinsäure-TU zur Verwendung als Vakzine in einem Säugetierwirt gedacht ist, ist der zu verwendende Promotor vorzugsweise einer, der in Säugetierzellen wirksam arbeitet. Solch ein Promotor ist, im Hinblick auf die Gene, deren Translation gefördert werden soll, an einer Position angeordnet, an der er diese Translation operabel fördern kann. In einer signifikanten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist dieser Promotor der frühe Promotor des Cytomegalievirus. Zusätzlich werden in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Gene in der TU-Nucleinsäure von einer Terminatorsequenz gefolgt (Sambrook et al.). Besondere Ausführungsformen der Erfindung beziehen sich sowohl auf prokaryotische als auch auf eukaryotische Wirtszellen. Viele Promotorsequenzen sind bekannt, die entweder in prokaryotischen oder in eukaryotischen Wirtszellen nützlich sind (siehe Sambrook et al.).

[0043] Die Herstellung der Nucleinsäure-TU der Erfindung ist mittels Verfahren, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie wohlbekannt sind, leicht durchzuführen. Die involvierten Verfahren sind z.B. in Sambrook, Fritsch und Maniatis, *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)* und Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1987) (vierteljährlich ergänzt) dargelegt. Das flavivirale RNA-Molekül kann aus einer Probe von lebendem Virus durch Verfahren isoliert werden, die unter Virologen, die z.B. mit Flaviviridae und auch mit anderen Gruppen an Viren vertraut sind, bekannt sind. Bei JEV angewandte Verfahren werden in Kuno et al. (1990) zusammengefasst. Die RNA wird unter Verwendung von reverser Transkriptase als Matrize für die Synthese von cDNA verwendet. Aus der cDNA kann ein Fragment, das das Prä-M- bis E-Gen enthält (siehe [Fig. 2](#)), durch Verdau mit Restriktionsnucleasen erhalten werden, von denen bekannt ist, dass sie die cDNA auf geeignete Art und Weise spalten, um solche Fragmente zu erhalten. Beispiele für Restriktionsverdau von JEV sind z.B. bei Nitayaphan et al. (1990) und Konishi et al. (1991) zu finden. Der Einbau von Promotoren, wie z.B. des Cytomegalievirus-Promotors, und des Polyadenylierungssignals ist dem Fachmann der Molekularbiologie und der DNA-Rekombinationsmodifikation ebenso bekannt. Wird ein Nucleinsäuremolekül hergestellt, das eine TU in sich trägt, die die gewünschten Gene und Kontrollsequenzen enthält, so kann es in größeren Mengen durch Verfahren erhalten werden, die ein Nucleinsäurefragment amplifizieren. Solche Verfahren sind dem Fachmann der Molekularbiologie und der DNA-Rekombinationsmodifikation wohlbekannt. Beispiele für diese Verfahren umfassen das Miteinbeziehen des Nucleinsäurefragments in ein Plasmid zur Replikation durch Züchten in einer Zelle, wie z.B. einer prokaryotischen Zelle, und durch Ernten des Plasmids nach Fertigstellung der Kultur, sowie die Amplifikation des Nucleinsäurefragments durch Verfahren unter Verwendung von Polymerasekettenreaktion. Diese Beispiele sollen die Art und Weise, auf die die TU enthaltende Nucleinsäure erhalten werden kann, nicht einschränken.

[0044] Die TU-enhaltenden Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung können auf viele Arten, die dem Fachmann auf den Gebieten der Molekularbiologie und der viralen Immunologie wohlbekannt sind, in geeignete Wirtszellen eingeführt werden. Als Beispiel umfassen diese, sind jedoch nicht beschränkt auf den Einbau in ein Plasmid oder einen ähnlichen Nucleinsäurevektor, der von der Wirtszelle aufgenommen wird, oder die Einkapselung in Vesikularlipidstrukturen, wie z.B. Liposomen, insbesondere Liposomen, die kationische Lipide umfassen, oder die Adsorption an Partikeln, die durch Endozytose in die Wirtszelle eingeführt werden.

[0045] Im Allgemeinen ist eine Wirtszelle eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle, die eine Nucleinsäure-TU in sich trägt oder in die sich ein TU-Molekül eingeführt wurde. Die TU der vorliegenden Erfindung induziert die intrazelluläre Biosynthese der kodierten E- und M-Antigene. Eine geeignete Wirtszelle ist eine, die als Konsequenz der Einführung der Nucleinsäure die Fähigkeit zur Biosynthese der Genprodukte aufweist. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung ist eine geeignete Wirtszelle eine, die auf eine Kontrollsequenz und eine Terminatorsequenz, sofern vorhanden, reagiert, die in die TU eingeschlossen sein können. Um auf diese Art und Weise zu reagieren, enthält solch eine Wirtszelle in sich Komponenten, die mit einer Kontrollsequenz und einem Terminator wechselwirken und wirksam die jeweiligen Promotor- und Terminationsfunktionen erfüllen. Wird die Wirtszelle in vitro gezüchtet, so kann sie ein Prokaryot, ein einzelliger Eukaryot oder eine Säugetierzelle sein. In speziellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Wirtszelle eine Säugetierzelle. In diesen Fällen stehen die synthetisierten E- und M-Protein-Genprodukte zur Verwendung in analytischen oder diagnostischen Anwendungen oder für demonstrative Zwecke zur Verfügung.

[0046] Unter positiven Bedingungen, z.B. wenn die Wirtszelle eine gezüchtete Säugetierzelle ist, werden die E- und M-Antigene in Form von subviralen Partikeln sekretiert. Dies sind Aggregate der E- und M-Proteine, die dem lebenden Virus bezüglich der Oberflächen-Ultrastrukturmorphologie und der immunogenen Eigenschaften ähneln. Da die Nucleinsäure-TU der Erfindung den Rest des flaviviralen Genoms jedoch nicht enthält, ist kein Kapsid enthalten und, was am wichtigsten ist, keine infektiöse virale RNA.

[0047] In einer anderen wichtigen Ausführungsform dieser Erfindung ist die Wirtszelle eine natürliche Zellkomponente des Individuums, dem die TU als Vakzine verabreicht wurde. Es wird davon ausgegangen, dass die Nucleinsäure-TU, wenn sie so verabreicht wird, von den Zellen des Individuums aufgenommen wird, wodurch jene Zellen zu den hierin verwendeten Wirtszellen werden. Die Zellen des Individuums besitzen die Fähigkeit, auf jede beliebige Promotorsequenz und, falls vorhanden, den Terminator zu reagieren. Auf jeden Fall induziert die TU-Nucleinsäure die Zellen des Individuums zur Synthese von flaviviralen E- und M-Genprodukten. Ohne sich auf eine Theorie einschränken zu wollen, wird angenommen, dass die Wirtszellen des Individuums in vivo subvirale Partikel produzieren, die aus den M- und den E-Antigenen bestehen, genau wie dies in vitro bei gezüchteten Säugetier-Wirtszellen entdeckt wurde. Diese subviralen Partikel dienen dann, so nimmt man an, als In-vivo-Immunogen, das das Immunsystem des Individuums zu immunologischen Reaktionen stimuliert, die dem Individuum eine schützende Immunität verleihen. Ohne sich erneut auf eine Theorie einschränken zu wollen, kann die resultierende schützende Immunität entweder durch humorale oder durch zelluläre Immunität erreicht werden, d.h. entweder durch MHC-Klasse-II- oder -Klasse-I-beschränkte Mechanismen oder durch beide.

[0048] Individuen können gegen eine Infektion mit Flaviviren, wie z.B. JEV, YFV, Dengue und SLEV, durch Verabreichung einer wirksamen Menge einer Nucleinsäure-TU, die für Gene der M- und E-Antigene kodiert, immunisiert werden. Die Nucleinsäure führt, nachdem sie in die Zellen des Individuums eingeführt wurde, zur Synthese der flaviviralen M- und E-Antigene.

[0049] Um die Nucleinsäure-TU dem Individuum zu verabreichen, wird sie in eine Zusammensetzung miteinbezogen, die auch einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. Solche Träger sind dem Fachmann der pharmazeutischen Wissenschaft wohlbekannt. Sie umfassen Wasser zur Injektion sowie häufig verwendete physiologische Puffer (Remington, Pharmaceutical Sciences). Sie können ebenso Vesikel- oder Liposom-Strukturen umfassen, besonders jene, die kationische Lipide enthalten, wie dem Fachmann auf den Gebieten der pharmazeutischen Wissenschaft und der Immunologie wohlbekannt ist.

[0050] Eine wirksame Menge einer Impf-Zusammensetzung ist von einem Fachmann auf dem Gebiet der viralen Immunologie leicht als eine Menge zu bestimmen, die bei der Verabreichung an ein Individuum diesem schützende Immunität verleiht. Um diese Bestimmung durchzuführen, kann der Fachmann die Fähigkeit zur Induktion von flaviviralen M- und E-spezifischen Antikörpern und/oder flaviviralen M- und E-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten bewerten, die im Blut eines Individuums vorhanden sind, dem die Vakzine verabreicht wurde. Zusätzlich kann man durch einen Immunitätstest mit lebendem JEV das Ausmaß der schützenden Immunität bestimmen, die einem Versuchstier verliehen wurde. Solche Immunitätstest-Experimente sind

dem Fachmann der viralen Immunologie wohlbekannt. Im Allgemeinen können Dosen von etwa 0,1 µg/kg Körpergewicht bis etwa 50 µg/kg Körpergewicht verwendet werden, um ein Individuum gegen eine Infektion durch JEV, YFV, Dengue oder SLEV gemäß der vorliegenden Erfindung und in Anbetracht der Tatsache, dass die in solchen Verfahren verwendeten Nucleinsäure-TU-Moleküle unterschiedliche Gesamtgrößen haben können, zu immunisieren.

[0051] Man fand unerwarteterweise heraus, dass eine TU der vorliegenden Erfindung, die eine DNA ist, nach der Verabreichung von nur einer einzigen wirksamen Dosis der TU in einem Ausmaß der Wirksamkeit von etwa 100% schützende Immunität verleiht. Dies steht in Gegensatz zu vielen Immunisierungsmethoden, die unter Verwendung herkömmlicher Vakzine verabreicht wurden (wie oben beschrieben), die oftmals eine oder mehrere Booster-Impfungen erfordern und die nicht in der Lage sind, eine schützende Immunität mit einer Wirksamkeit nahe 100% zu verleihen.

[0052] Es wurde weiters unerwarteterweise herausgefunden, dass die schützende Immunität von einem geimpften weiblichen Individuum auf die Nachkommen des Individuums übertragen werden kann. Von einem signifikanten Anteil neonataler Mäuse wurde gezeigt, dass sie gegen einen viralen Immunitätstest geschützt waren, nachdem ihre Mütter unter Verwendung der TU-DNA der Erfindung geimpft wurden. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie einschränken zu wollen, ist bekannt, dass passive Immunität aufgrund des Vorhandenseins neutralisierender Antikörper in der Muttermilch, die für verschiedene Pathogene spezifisch sind, auf neonatale Säugetiere übertragen werden kann. Es ist möglich, dass die schützende Immunität gegen JEV, die bei den Neugeborenen gefunden wurde, auf diese Weise auf sie übertragen wurde.

[0053] Spezielle Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind in den untenstehenden Beispielen angeführt. Diese Beispiele sollen den Umfang der Erfindung, wie er in dieser Beschreibung offenbart wird, nicht einschränken.

Beispiele

[0054] Allgemeine Verfahren unter Anwendung von Molekularbiologie und DNA-Rekombinationsverfahren zur Herstellung und Expression der Nucleinsäure-TU-Moleküle der Erfindung werden z.B. in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1987) (vierteljährlich ergänzt) und in Sambrook, Fritsch und Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), dargelegt.

Beispiel 1: Herstellung rekombinanter Plasmide, die die Transkriptionseinheit enthalten, die für JEV-prM- und E-Antigene kodiert

[0055] Genomische DNA wurde aus 150 µl des JEV-Stamm-SA-14-Virusaat unter Verwendung eines QI-Aamp™-Viral-RNA-Sets (Qiagen, Santa Clarita, CA) extrahiert, die aus Mäuse-Gehirn gezüchtet wurde. Die RNA, an eine Silicamembran adsorbiert, wurde in 80 µl nucleasefreiem Wasser eluiert und als Matrize für die Amplifikation der JEV-prM- und E-Gen-kodierenden Sequenzen verwendet. Es wurden Primersequenzen aus der Arbeit von Nitayaphan et al. (1990) erhalten. Ein einzelnes cDNA-Fragment, das die genomische Nucleotidregion 389–2478 enthielt, wurde durch reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert. Die Restriktionsstellen KpnI und XbaI, die ribosomale Consensus-Kozak-Bindungssequenz und die Translationsinitiationsstelle wurden am 5'-Terminus der cDNA durch Amplimer 14DV389 (Seq.-ID Nr. 1) gentechnisch verändert. Ein In-Frame-Translationsterminationscodon, gefolgt von einer NotI-Restriktionsstelle, wurde am 3'-Terminus der cDNA durch Amplimer c14DV2453 (Seq.-ID Nr. 2) eingeführt (siehe [Fig. 2](#)). Es wurde One-Tube-RT-PCR unter Verwendung eines Titan-RT-PCR-Sets durchgeführt (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Es wurden 10 µl viraler RNA mit 1 µl von je 14DV389 (50 µM) und c14DV2453 (50 µM) und 18 µl nucleasefreiem Wasser gemischt, und das Gemisch wurde bei 85°C 5 min lang erhitzt und schließlich auf 4°C abgekühlt. 75 µl Reaktionsgemisch (20 µl 5 × Puffer, 2 µl dNTP-Gemisch (je 10 mM), 5 µl Dithiothreitol (0,1 mM), 0,5 µl RNasin™ (40 U/µl; Boehringer Mannheim), 2 µl Polymerase-Gemisch und 45,5 µl nucleasefreies Wasser] wurden hinzugefügt, und RT-PCR wurde wie folgt durchgeführt: 1 Zyklus (50°C 30 min lang, 94°C 3 min lang, 50°C 30 s lang, 68°C 2,5 min lang), 9 Zyklen (94°C 30 s lang, 50°C 30 s lang, 68°C 2,5 min lang), 20 Zyklen (94°C 30 s lang, 50°C 30 s lang, 68°C 2,5 min lang im ersten Zyklus, mit einer Zunahme von 5 s pro Zyklus danach), sowie eine Endextension bei 68°C 15 min lang. Das RT-PCR-Produkt wurde mittels eines QI-Aquick™-PCR-Reinigungs-Sets (Qiagen) gereinigt und mit 50 µl 1-mM-Tris-HCl, pH 7,5, eluiert.

[0056] Alle Vektorkonstruktionen und Analysen wurden unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt (Sambrook et al. (1989)). Die RT-PCR-amplifizierte cDNA, verdaut mit KpnI- und NotI-Nucleasen, wurde

in die KpnI-NotI-Stelle eines eukaryotischen Expressionsplasmidvektors eingeführt (pCDNA3, Invitrogen, Carlsbad, CA). Elektroporationskompetente *Escherichia coli*-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA) wurden mittels Elektroporation (Gene Pulser™, Bio-Rad, Hercules, CA) transformiert und auf LB-Agar-Platten ausgeplattiert, die 100 µg/ml Carbenicillin enthielten (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Klone wurden ausgewählt und in 3 ml LB-Nährflüssigkeit, enthaltend 100 µg/ml Carbenicillin, inokuliert. Die Plasmid-DNA wurde aus einer 14-h-Kultur unter Verwendung eines QIAprep™-Spin-Miniprep-Sets (Qiagen) extrahiert. Wie empfohlen wurde automatisierte DNA-Sequenzierung durchgeführt (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA). Beide Stränge der cDNA wurden sequenziert, und es wurde gezeigt, dass sie mit der Sequenz für den ursprünglichen SA14-Stamm identisch waren (Nitayaphan et al. (1990)).

[0057] Das Fragment von Plasmid pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) von Nucleotid (nt) 1289 bis nt 3455, enthaltend fl ori, SV40 ori, das Neomycin-Resistenzgen, und SV40-Poly(A)-Elemente wurden mittels PvuII-Verdau deletiert und anschließend ligiert, um das pCBamp-Plasmid zu erzeugen. Der Vektor pCiBamp, enthaltend eine chimäre Introninsertion an der NcoI/KpnI-Stelle von pCBamp, wurde durch Entfernen der Intronsequenz aus pCi konstruiert (Promega, Madison, WI), und zwar durch Verdau mit NcoI und KpnI. Das resultierende 566-bp-Fragment wurde durch Verdau mit NcoI-KpnI in pCBamp kloniert, um dessen 289-bp-Fragment zu ersetzen. [Fig. 3](#) stellt die Beziehungen zwischen den Plasmiden pCDA3, pCBamp und pCiBamp dar.

[0058] Plasmide, die die Transkriptionseinheit enthalten, die für die JEV-prM- und E-Proteine kodiert, wurden aus diesen Plasmiden hergestellt. Das cDNA-Fragment, das die JEV-prM- und -E-kodierenden Regionen im rekombinanten Plasmid pCDJE2-7, abstammend vom pCDNA3-Vektor, enthält, wurde mittels Verdau mit NotI und KpnI oder XbaI ausgeschnitten und in die KpnI-NotI-Selle von pCBamp, pCiBamp, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) oder pREP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) oder in die SpeI-NotI-Stelle des pRc/RSV-Expressionsvektors (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert, um pCBJE1-14, pCiBES14, pCEJE, pREFE bzw. pRCJE zu erzeugen. Es wurden beide Stränge der cDNA aus Klonen von jedem Plasmid sequenziert, und die rekombinanten Klone mit der korrekten Nucleotidsequenz wurden identifiziert. Die Plasmid-DNA zur Verwendung in der In-vitro-Transformation von Säugetierzellen oder Maus-Immunisierungsexperimenten wurde mittels Anionen-Austauschchromatographie unter Verwendung eines EndoFree™-Plasmid-Maxi-Sets (Qiagen) gereinigt.

Beispiel 2: Evaluierung von JEV-prM- und -E-Proteinen, die von verschiedenen rekombinanten Plasmiden exprimiert werden, unter Verwendung eines indirekten immunfluoreszierenden Antikörpertests

[0059] Die Expression von JEV-spezifischen Genprodukten durch die verschiedenen rekombinanten Expressionsplasmide wurde in vorübergehend transfizierten Zelllinien von COS-1, COS-7 und SV-T2 (ATCC, Rockville MD, 1650-CRL, 1651-CRL bzw. 163.1-CCL) evaluiert, und zwar mittels eines indirekten immunfluoreszierenden Antikörper-Tests (IFA). Die SV-T2-Zelllinie wurde von weiteren Tests ausgeschlossen, da ein vorläufiges Resultat zeigte, dass nur 1–2% der transformierten SV-T2-Zellen JEV-Antigen-positiv waren. Für die Transformation wurden die Zellen auf 75% Konfluenz in 150-cm²-Kulturflaschen gezüchtet, trypsinisiert und bei 4°C in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine finale Zellanzahl von 5×10^6 pro ml resuspendiert. 10 µg Plasmid-DNA wurden in 300 µl Zellsuspension unter Verwendung eines BioRad Gene Pulse™ (Bio-Rad), eingestellt auf 150 V, 960 µF und 100 Ω Widerstand, elektroporiert. Fünf Minuten nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 25 ml frischem Medium verdünnt und in eine 75-cm²-Flasche überimpft. 48 Stunden nach der Transformation wurde das Medium von den Zellen entfernt, und die Zellen wurden trypsinisiert und in 5 ml PBS mit 3% normalem Ziegen Serum resuspendiert. Es wurden 10 µl Aliquoten auf Objektträger getupft, luftgetrocknet und mit Aceton bei –20°C 20 min lang fixiert. Ein IFA mit acetonfixierten, plasmidtransformierten Zellen wurde unter Verwendung von fluorescein-isothiocyanat-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin G (Sigma Chemical Co.) und JEV-HIAF durchgeführt.

[0060] Um den Einfluss von verschiedenen Promotor- und Poly(A)-Elementen auf die JEV-prM- und -E-Proteinexpression zu bestimmen, wurden COS-1- und COS-7-Zelllinien mit derselben Menge an pCDJE2-7-, pCEJE-, pREJE- oder pRCJE-Plasmid-DNA vorübergehend transformiert. JEV-Antigene wurden in beiden Zelllinien exprimiert, die mit allen vier rekombinanten Plasmiden transformiert waren, was daher bestätigt, dass der CMV- oder RSV- (Rous-Sarkoma-Virus-) Promotor und BGH- oder SV40-Poly(A)-Elemente funktionell aktiv waren. Der Prozentsatz der transformierten Zellen und die Menge der exprimierten JEV-Antigene, bestimmt anhand der Anzahl der IFA-positiven Zellen bzw. der IFA-Intensität, unterschieden sich jedoch unter den verschiedenen Plasmiden stark voneinander (siehe Tabelle 1). Ein signifikant hoher Prozentsatz an COS-1-Zellen, die mit pCDJE2-7, pCBJE1-14 und pCiBES14 transformiert waren, exprimierten die JEV-Antigene, und die Menge der exprimierten Proteine war mit JEV-inifizierten Zellen kompatibel. Mit pCEJE-, pREJE- oder pRCJE-Vektoren transformierte Zellen wiesen andererseits einen niedrigen Prozentsatz an antigenexprimierenden Zellen sowie eine geringe Intensität an Fluoreszenz auf, was auf geringe Expression der Antigene hin-

deutet.

[0061] Um sicherzustellen, ob die verstärkte Expression von JEV-Proteinen durch pCDJE2-7 durch den SV40-kodierten eukaryotischen Replikationsstartpunkt beeinflusst wird, wurde das Plasmid pCBE1-14 so konstruiert, dass ein 2166-bp-Fragment, enthaltend fl ori, SV40 ori, das Neomycin-Resistenzgen und SV40-Poly(a)-Elemente aus pCDJE2-7, deletiert wurde. Anschließend wurde ein chimäres Intron in pCBE1-14 inseriert, um pCIBJES14 zu erzeugen. Das pCIBJES14-Plasmid wurde verwendet, um zu bestimmen, ob die Expression von JEV-Proteinen durch die Intronsequenz verstärkt werden konnte. Nach der Transformation exprimierten Zellen, die sowohl pCBE1-14- als auch pCIBJES14-Vektoren enthielten, eine Menge an JEV-Antigenen, die jener ähnelte, die bei pCDJE2-7 beobachtet wurde (siehe Tabelle 1). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Expression von JEV-prM- und -E-Antigenen mittels rekombinanter Vektoren nur durch die Transkriptions-Regulationselemente beeinflusst wird. Weder der eukaryotische Replikationsstartpunkt noch die Intronsequenz verstärkten die JEV-Antigen-Expression in den verwendeten Zellen. Vektoren, die den CMV-Promotor und BGH-Poly(A) (siehe [Fig. 3](#)) enthielten, wurden für weitere Analysen ausgesucht.

Tabelle 1: Vorübergehende Expression von JE-prM- und -E-Proteinen durch verschiedene rekombinante Plasmide in zwei transferten Zelllinien

	Vektor			Rekombinantes Plasmid	IFA-Intensität/Prozentsatz von antigenpositiven Zellen*		
	Promotor	Intron	Poly (A)		ORI	COS-1	COS-7
pCDNA3	CMV	nein	BGH	SV40	pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	nein	BGH	nein	pCBJE1-14	3+/45	nd
pCIBamp	CMV	ja	BGH	nein	pCIBJES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	nein	SV40	OriP	pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	nein	SV40	OriP	pREJE	1+/3	1+/2
pRc/RSV	RSV	nein	BGH	SV40	pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	nein	BGH	SV40	pCDNA3/CAT	-	-

* Verschiedene Zelllinien wurden mit pCDNA3/CAT (negative Kontrolle), pCDJE2-7, pCBJE1-14, pCIBJES14, pCEJEm-pREJE oder pRCJE transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden später trypsinisiert und mittels eines indirekten Immunfluoreszenz-Antikörper-Tests (IFA) mit JE-Virus-spezifischer HIAF getestet. Die Daten werden als Intensität (Skala von 1+ bis 4+) und Prozentsatz von IFA-positiven Zellen dargestellt. Die pCDNA3/CAT-transformierten Zellen wurden als negative Kontrolle verwendet.

Beispiel 3: Auswahl einer in-vitro-transformierten stabilen Zelllinie, die konstitutiv JEV-spezifische Genprodukte exprimiert

[0062] COS-1-Zellen wurden mit 10 µg pCDJE2-7-DNA durch Elektroporation, wie im vorangehenden Beispiel beschrieben, transformiert. Nach einer 24-Stunden-Inkubation in nichtselektivem Kulturmedium wurden die Zellen mit Neomycin (0,5 mg/ml, Sigma Chemical Co.) behandelt. Neomycinresistente Kolonien, die nach 2–3 Wochen sichtbar waren, wurden mittels Grenzverdünnung in neomycinhaltigem Medium kloniert. Die Expression von vektorkodierten JEV-Genprodukten wurde anfänglich mittels IFA unter Verwendung von JEV-HIAF gescreent. Ein JEV-IFA-positiver Klon (JE-4B) und ein negativer Klon (JE-5A) wurden für weitere Analysen ausgewählt und in Medium, das 200 µg/ml Neomycin enthielt, aufrechterhalten.

[0063] Die Authentizität des JEV-E-Proteins, exprimiert vom JE-4B-Klon, wurde durch Epitopkartierung mittels IFA unter Verwendung eines Panels JEV-E-spezifischer muriner monoklonaler Antikörper (Mab) gezeigt (Kimura-Kuroda et al., J. Virol. 45, 124–132 (1983); Kimura-Kuroda et al., J. Gen. Virol. 67, 2663–2672 (1986); Zhang et al., J. Med. Virol. 29, 133–138 (1989); und Roehrig et al., Virol. 128, 118–126 (1983)). JEV-HIAF und normales Maus-Serum wurden als positive bzw. negative Antikörper-Kontrollen verwendet. Vier JEV-spezifische, sechs Flavivirus-Subgruppen-spezifische und zwei Flavivirus-Gruppen-reaktive Mabs reagierten mit dem 4B-Klon und JEV-infizierten COS-1-Zellen ähnlich (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakterisierung von Proteinen, die von einem stabil transformierten pCDJE2-7-Klon (JE-4B) von COS-1-Zellen mit JE-Virus-reaktiven Antikörpern exprimiert wurden

Mab oder Antiserum	Biologische Aktivität von Mab		Immunfluoreszierende Intensität von Zellen	
	Spezifität	Biologische Funktion	JEV-infiziert	4B
Mab:				
MC3	JEV-spezifisch		2+	2+
2F2	JEV-spezifisch	HI.N	4+	4+
112	JEV-spezifisch		4+	4+
503	JEV-spezifisch	N	4+	3+
109	Untergruppe	HI	2+	1+
N.04	Untergruppe	HI.N	3+	4+
201	Untergruppe		1+	1+
203	Untergruppe		4+	3+
204	Untergruppe		2+	2+
301	Untergruppe	HI	2+	2+
504	Flavivirus		4+	4+
6B6C-1	Flavivirus		2+	2+
3B4C-4	VEE		-	-
H1AF:				
Anti-JEV			4+	3+
Anti-WEE			-	-
PBS			-	-

Beispiel 4: Antigene Eigenschaften und immunologische Detektion von subviralen Partikeln, die von der JE-4B-COS-1-Zelllinie sekretiert werden

a) Herstellung von subviralen Partikeln:

[0064] JE-4B-COS-1-Zellen wurden in einem Medium, das 200 µg/ml Neomycin enthielt, gezüchtet und aufrechterhalten. Das Zuchtmedium wurde routinemäßig geerntet und bei 4°C gelagert und zwei Mal pro Woche wieder aufgefüllt, und die Zellen wurden 1,5 alle 7–10 Tage geteilt. Das Kulturmedium wurde mittels Zentrifugation bei 10.000 U/min 30 min lang in einem Sorvall-F16/250-Rotor bei 4°C geklärt und weiters 4 Stunden lang bei 39.000 U/min in einem Sorvall-TH641-Rotor bei 4°C durch einen 5%-Saccharose-Polster (Gew.-%, hergestellt mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl (TN-Puffer)) zentrifugiert. Das Pellet, das die subviralen Partikel enthielt, wurde in TN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Alternativ dazu wurden 7% oder 10% PEG-8000 (Gew./Vol.) zum geklärten Kulturmedium zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 4°C für zumindest 2 Stunden gerührt, und die präzipitierten Partikel wurden mittels Zentrifugation bei 10.000 U/min 30 min lang gesammelt. Das Präzipitat wurde in TN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die subviralen Partikel wurden sowohl von pelletierten als auch von PEG-präzipitierten Präparaten mittels Rate-Zonal-Zentrifugation in einem kontinuierlichen 5–25%-Saccharosegradienten in TN bei 38.000 U/min bei 4°C 90 min lang gereinigt. Es wurden 1-ml-Fractionen vom oberen Teil des Gradienten gesammelt, mittels Antigen-Capture-ELISA (siehe unten) getestet, und die positiven Fractionen wurden auf einen 25–50%-Saccharosegradienten in TN geladen. Dieser wurde über Nacht in einer Gleichgewichts-Dichtezentrifugation bei 35.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Es wurden 0,9-ml-Fractionen aus den Gleichgewichtsgradienten vom unteren Teil gesammelt. Sie wurden mittels Antigen-Capture-ELISA getestet und auf Hämagglutinierungs-(HA-)Aktivität bei einem pH von 6,6 getestet. Es wurde eine Aliquote von 100 µl jeder Fraction genau eingewogen, um ihre Dichte zu bestimmen. Die ELISA-positiven Fractionen wurden gepoolt und bei 39.000 U/min bei 4°C 3–4 Stunden lang pelletiert, und das Pellet wurde in TN-Puffer resuspendiert. Anhand der pelletierten Proben wurden Antigen-Capture-ELISA- und HA-Titer bestimmt. JEV-infizierter COS-1-Zellüberstand wurde auch ähnlichen Reinigungsvorschriften unterzogen wie den oben beschriebenen und wurde als positive Kontrollgruppe für die Gradientenanalyse verwendet. JE-Virionen wurden ebenso 5–6 Tage nach der Infektion aus infizierten C6/36-Zellen mittels Sedimentation in einem Glycerin/Tartrat-Äquilibrium-Gradienten gereinigt.

b) Western-Blot-Tests subviraler Partikel:

[0065] Gradient gereinigte Proben der subviralen Partikel wurden mit Elektrophorese-Probenpuffer vermischt und auf 10 oder 12 5%-natriumdodecylsulfathaltigen Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) laufen gelassen, wie von Laemmli (Nature 277, 680–685 (1970)) beschrieben. Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immunchemisch mit polyklonaler JEV-HIAF, Flavivirus-kreuzreagierenden Anti-E-Mab 4G2 (Henchal et al., Amer. J. Trop. Med. Hyg. 31, 830–836 (1982)) oder Maus-Anti-prM-Peptid-Hyperimmunserum (JM01, Chiueh et al., unveröffentlichte Resultate) detektiert. [Fig. 4](#) zeigt einen Vergleich der M- und der E-Proteine, die von JEV-infizierten C6/36- und JE-4B-COS-1-Zellen produziert wurden. Etwas nichtspezifische Reaktivität auf E-Protein wurde in der normalen Maus-Azitesflüssigkeit und in Jm01-Anti-Peptid-Serum beobachtet. Proteine, die in der Größe mit M und E identisch waren, wurden in den subviralen Partikeln sekretiert und konnten mittels E-spezifischem Mab-4G2 bzw. prM-spezifischem JM01-Antiserum detektiert werden.

c) Dichtegradienten-Detektion von JEV-subviralen Partikeln in Kulturmedium:

[0066] Für ELISA wurde Antigen-Capture-Antikörper (4G2) in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6, verdünnt und verwendet, um 96-Well-Mikrotiterplatten (Immulon II, Dynatech, Chantilly, VA) mittels Übernacht-Inkubation bei 4°C zu überziehen. Nach dem Blockieren mit 3% normalem Ziegenserum in PBS wurden zweifach reihenverdünnte Proben zu der 4G2-überzogenen Platte hinzugefügt und 1,5 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Das eingefangene Antigen wurde mittels Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem 6B6C-1-Mag detektiert und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Enzymaktivität auf der Festphase wurde danach mit TMB- (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-) ELISA (Life Technologies, Grand Island, NY) detektiert.

[0067] Vier Tage nach dem Beimpfen der Zellen wurden etwa 500 ml Zellkulturmedium aus 15 × 150 cm² Flaschen an JE-4B-Zellen gesammelt. PEG-präzipitierte subvirale Partikel wurden in 2 ml TN-Puffer, pH 7,5, resuspendiert, eine 0,7-ml-Aliquote dieses resuspendierten Pellets wurde auf einen 5–25%- Saccharosegradienten geladen. Triton-X-100, das subvirale Partikel aufschließt, wurde zu einer anderen 0,7-ml-Aliquote in einer Endkonzentration von 0,1% hinzugefügt, und dies wurde anschließend auf einen 5–25%-Saccharosegradienten geladen, der in TN-Puffer hergestellt wurde, der 0,1% Triton-X-100 enthielt. Es wurde eine eindeutige trübe Bande etwa 2,5 cm vom oberen Teil des Gradienten beobachtet, der Triton-X-100 enthielt, jedoch nicht

im Gradienten ohne Detergens. Fraktionen (1 ml) wurden von oben nach unten für jeden Gradienten abgenommen und mittels Antigen-Capture-ELISA analysiert (Fig. 5). Antigen wurde in den Fraktionen 4–6 detektiert, was auf relativ schnelle Sedimentation von subviralen Partikeln hindeutet. Die Behandlung des PEG-Präzipitats aus JE-4B-Kulturmedium mit Triton-X-100 verschob die Position von ELISA-reaktivem Material zum oberen Teil des Gradienten hin. Daher erzeugt eine Behandlung mit Triton-X-100 nur langsam sedimentierende Moleküle. Ein ähnliches Resultat wurde von Konishi et al., *Viol.* 188, 714–720 (1992), angeführt. Diese Resultate zeigen, dass schnell sedimentierende subvirale Partikel, die prM/M und E enthalten, mittels Detergensbehandlung aufgeschlossen werden könnten.

[0068] Die HA-Aktivität wurde durch das Verfahren von Clarke und Casals im pH-Bereich von 6,1 bis 7,0 bestimmt (*Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561–573 (1958)). Das von den JE-4B-Zellen sekretierte subvirale Partikel und das von JEV-infizierten COS-1-Zellen produzierte Virionenpartikel wiesen ein ähnliches HA-Profil auf, wobei der optimale pH bei 6,6 bestimmt wurde.

Beispiel 5: Vergleich der Immunantwort bei Mäusen, die mit pCDJE2-7-Nucleinsäure-Vakzine der Erfindung und herkömmlicher JEV-Vakzine geimpft wurden

[0069] Gruppen von fünf 3 Wochen alten weiblichen, ICR-fremdgezüchteten Mäusen wurden intramuskulär 100 µg pCDJE2-7-Plasmid in 100 µl dH₂O in den linken und in den rechten Quadriceps injiziert, oder es wurden ihnen Dosen von JE-VAX (hergestellt von der Research Foundation for Microbial Disease of Osaka University und vertrieben von den Connaught Laboratories, Swiftwater, PA) subkutan verabreicht, die ein Fünftel jener Dosis ausmachten, die Menschen verabreicht wird. Das Plasmid pCDNA3/CAT, das für ein nicht verwandtes Protein kodiert und dieses exprimiert, (Invitrogen), wurde als negative Impfkontrolle verwendet. Außer einer Gruppe von pCDJE2-7-geimpften Mäusen erhielten alle Tiere 3 Wochen später eine Booster-Dosis durch eine zusätzliche Dosis des Plasmids oder von JE-VAX. Den Mäusen wurde 3, 6, 9, 23, 40 und 60 Wochen nach der Impfung Blut aus dem retroorbitalen Sinus abgenommen. JEV-Antikörper-Titer wurden mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) gegen gereinigte JEV oder durch Plaque-Reduktions-Neutralisierungstests (PRNT) bestimmt (Roehrig et al., *Viol.* 171, 49–60 (1989) und Hunt und Calisher, *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 740–749 (1979)).

[0070] Die pCDJE2-7-Nucleinsäure-Vakzine und JE-VAX boten in allen drei Gruppen von Mäusen 100% Serokonversion drei Wochen nach der ersten Impfung (Tabelle 3). Die JEV-ELISA- und PRNT-Antikörper-Titer erreichten das höchste Level in Woche 6 bzw. Woche 9 nach der Immunisierung. Mäuse, die 1 Dosis DNA-Impfung erhielten, zeigten ähnliche Antikörper-Reaktionen wie jene, die 2 Dosen erhielten. Vergleichbare ELISA-Antikörper-Titer wurden in den DNA-geimpften Gruppen bis zu 60 Wochen erhalten, wonach das Experiment schließlich beendet wurde. Nur eine von vier Mäusen in der JE-VAX-Gruppe war jedoch 60 Wochen nach der Impfung JEV-Antikörperpositiv. Die pCDNA3/CAT-Kontrollgruppe wies keine messbaren JEV-Antikörper auf. Diese Resultate demonstrieren, dass eine einzelne Dosis von JEV-spezifischer Nucleinsäure-Vakzine bei Mäusen wirksamer im Erhalt der JEV-Antikörper ist als die kommerzielle, von der FDA zugelassene JE-VAX-Vakzine.

Tabelle 3: Dauer der Immunantwort bei Mäusen, die mit pCDJE2-7 oder JE-VAX-Vakzine geimpft wurden

	ELISA Titer (\log_{10})									PRNT _{90%} Titer		
	3 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	23 Wochen	40 Wochen	60 Wochen*	3 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	3 Wochen	6 Wochen	9 Wochen
1 x pCDJE2-7	2,6-3,2	3,8-5,0	3,8-4,4	>3,2	>3,2	2,4; 2,4; 3,8; 4,4	<20	20	40-160			
2 x pCDJE2-7	2,6-3,8	4,4	3,8-4,4	>3,2	>3,2	2,6; 3,8; 3,8	<20	20-40	40-160			
2 x JE-VAX	2,6-3,8	4,4-5,0	3,8-5,6	>3,2	>3,2	<2; <2; 4,4	<20	20-40	20-160			
2 x pCDNA3/CAT	<2	<2	<2	ND	ND	<2	<20	<20	<20			

Die Mäuse wurden mit 1 oder 2 100- μ g/Dosis-Plasmid-DNA oder 1/5 der menschlichen Dosis von JE-VAX geimpft. Sera wurden zum Testen vor der zweiten Immunisierung gewonnen.

* einzelne Serumtiter

Beispiel 6: Vergleich verschiedener Nucleinsäure-Vakzinenkonstrukte der Erfindung und der herkömmlichen JEV-Vakzine bezüglich der Wirksamkeit der Impfung bei unterschiedlichen Altersgruppen

[0071] Ein ähnliches Level an JEV-Protein wurde von COS-1-Zellen exprimiert, die mit entweder pCDJE2-7, pCBBE1-14 oder pCIBJES14 transformiert wurden. Die JEV-Antikörper-Induktion durch diese Nucleinsäurekonstrukte wurde bei zwei verschiedenen Altersgruppen zum Zeitpunkt der Impfung mit der kommerziellen JE-VAX-Vakzine verglichen. Drei Tage alte (beide Geschlechter umfassende) oder 3 Wochen alte (weibliche) ICR-fremdgezüchtete Mäuse, 10 pro Gruppe, wurden intramuskulär mit 50 oder 100 µg Plasmid-DNA oder subkutan mit Dosen von JE-VAX geimpft, die einem Zehntel oder einem Fünftel der Dosis entsprechen, die Menschen verabreicht wird. Serum-Proben wurden 3 und 7 Wochen nach der Immunisierung abgenommen und in einer Verdünnung von 1:1600 mittels ELISA unter Verwendung von gereinigtem JEV als Antigen getestet. Die Resultate werden in Tabelle 4 gezeigt.

[0072] Das Plasmid pCBBE1-14 ergab das höchste Ausmaß an Serokonversion, d.h. einen Antikörper-Titer, der höher als 1:1600 war, bei beiden Impf-Altersgruppen wurden 80–100% erreicht. Die Verabreichung von pCDJE2-7 oder pCIBJES14 ergab nach 7 Wochen eine moderate Serokonversion, als 3 Tage alte Mäuse geimpft worden waren (je 60%), man erzielte jedoch eine schwächere Serokonversion (40% bzw. 10%), als 3 Wochen nach der Impfung gemessen wurde. Wurden diese Plasmide jedoch im Alter von 3 Wochen verabreicht, so wurden Serokonversionen von 90% oder 100% erreicht, sowohl 3 Wochen als auch 7 Wochen nach der Impfung. Im Gegensatz dazu verlieh die herkömmliche Vakzine, JE-VAX, keine Serokonversion, als sie im Alter von 3 Tagen verabreicht wurde und 100%, als sie im Alter von 3 Wochen verabreicht wurde. Daher boten die Nucleinsäure-TUs für JEV-prM- und -E ein besseres Ausmaß an Serokonversion, als eine sehr hohe Dosis der kommerziellen Vakzine sowie eine unerwartet hohe Serokonversion sowohl bei jungen als auch bei etwas reiferen Tieren.

Tabelle 4: Altersabhängiger Prozentsatz der seropositiven Rate bei Mäusen nach Impfung mit verschiedenen JEV-Vakzinen

	3 Tage alt		3 Wochen alt	
	3 Wochen PV	7 Wochen PV	3 Wochen PV	7 Wochen PV
JE-VAX	0	0	100	100
pCDNA3/CAT	0	0	0	0
pCDJE2-7	40	60	90	90
pCIBJES14	10	60	80	100
pCBBE1-14	80	100	100	100

Beispiel 7: Schützende Immunität, die durch die Nucleinsäure-Vakzine der Erfindung verliehen wurde

[0073] Drei Tage alte, geimpfte Gruppen aus Beispiel 6 wurden 7 Wochen nach der Impfung durch intraperitoneale Injektion von 50.000 pfu/100 µl des mausadaptierten JEV-Stamms SA14 einem Immunitätstest unterzogen und 3 Wochen lang beobachtet. Es wurde ein Schutz von 100% in jenen Gruppen erreicht, die bis zu 21 Tage lang verschiedene Nucleinsäure-TU-haltige Vakzinenkonstrukte erhielten (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu überlebten 60% der JE-VAX-geimpften Mäuse sowie 70% der pCDNA3/CAT-geimpften negativen Kontrolltiere den Immunitätstest um nicht mehr als 21 Tage. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Nucleinsäure-TUs der Erfindung den geimpften Mäusen einen unerwartet wirksamen Schutz verleiht. Dies deutet auf die Möglichkeit einer Verwendung der Nucleinsäure-Vakzine der Erfindung als Vakzine bei Menschen in der frühen Kindheit hin. Im Gegensatz dazu scheint JE-VAX, die im Moment verwendete, inaktivierte menschliche Vakzine, bei jungen Tieren nicht wirksam zu sein.

Tabelle 5: Schutz vor dem JEV-Immunitätstest bei 8 Wochen alten Mäusen nach Impfung mit verschiedenen JEV-Vakzinen im Alter von 3 Tagen

Vakzine	JEV-Serokonversion vor dem Immunitätstest	Tage nach dem Immunitätstest; Überlebensrate (%)				
		6	7	8	9	21
JE-VAX	0	100	100	60	40	40
pCDNA3/CAT	0	100	80	30	30	30
pCDJE2-7	60	100	100	100	100	100
pCIBJES14	60	100	100	100	100	100
pCBE1-14	100	100	100	100	100	100

Beispiel 8: Passiver Schutz neonataler Mäuse in Korrelation mit dem mütterlichen Antikörper-Titer

[0074] Drei Wochen alte, weibliche ICR-Mäuse wurden entweder mit einer Dosis oder mit zwei Dosen im Abstand von 2 Tagen an pCDJE2-7-Plasmid-DNA mit 100 µg/100 µl geimpft. Die negative Kontrollgruppe erhielt zwei Dosen mit 100 µg/100 µl des pCDNA-3/CAT-Plasmids. Der passive Schutz durch mütterliche Antikörper wurde bei Jungtieren evaluiert, die durch 9 Wochen nach der ersten Impfung oder 6 Wochen nach der zweiten Impfung erfolgten Kreuzung weiblicher Versuchstiere mit nicht immunisierten männlichen Mäusen entstanden. Die Jungtiere wurden 3–15 Tage nach der Geburt durch intraperitoneale Verabreichung von 5.000 pfu/100 µl mausadaptiertem SA14-Virus einem Immunitätstest unterzogen und 3 Wochen lang täglich beobachtet (siehe Tabelle 6). Die Überlebensraten korrelierten mit den neutralisierenden mütterlichen Antikörper-Titern. 100% der von Muttertieren mit einem PRNT von 1:80 gesäugten Jungtiere überlebten die virale Infektion, während keines der Jungtiere der Kontrollmuttertiere überlebte (Tabelle 6). Es wurde ein partieller Schutz von 45% und 75% bei älteren von Muttertieren mit einem PRNT-Titer von 1:20 bzw. 1:40 gesäugten Jungtieren beobachtet. Die Überlebensraten korrelierten auch mit der Länge der Zeitspanne, die die Jungtiere von der immunen Mutter gesäugt wurden. Wie eben angedeutet, gab es bei den 13–15 Tage alten Jungtieren hohe Überlebensraten. Keines der 3–4 Tage alten Jungtiere überlebte jedoch den Virus-Immunitätstest in jenen Fällen, in denen die Mutter einen PRNT-Titer von 1:20 oder 1:40 aufwies. Der mütterliche Antikörper sorgt daher für partielle bis vollständige schützende Immunität für die Nachkommen. Zusätzlich wurde der JEV-Antikörper durch ELISA in den Sera von 97% (29/30) der Jungtiere nach dem Immunitätstest detektiert.

Tabelle 6: Evaluierung der Fähigkeit von mütterlichen Antikörpern aus JEV-Nucleinsäure-geimpften weiblichen Mäusen, deren Jungtiere vor der tödlichen JEV-Encephalitis zu schützen.

Geimpftes Muttertier		JEV-immungetestete Jungtiere		
Vakzine	PRNT _{90%}	Alter beim Immunitätstest (Tage)	Anzahl der Überlebenden ¹	ELISA ²
1 x pCDJE2-7	40	4	0/11	
2 x pCDJE2-7	80	4	12/12	12/12
2 x JE-VAX	20	3	0/16	
2 x pCDNA-3/CAT	<10	5	0/14	
1 x pCDJE2-7	20	15	5/11	5/5
2 x pCDJE2-7	40	14	8/12	7/8
2 x JE-VAX	80	13	5/5	5/5
2 x pCDNA-3/CAT	<10	14	0/14	

[0075] Die Mäuse wurden intramuskulär mit 1 oder 2 100-µg-Dosis(Dosen) Plasmid-DNA geimpft oder subkutan mit zwei Dosen von 1/5 der menschlichen Dosis der JE-VAX-Vakzine geimpft. Die Sera wurden 9 Wochen nach der Impfung vor der Paarung mit dem nicht immunen Männchen zum Testen des PRNT abgenommen.

¹: Gesamtanzahl der Überlebenden pro Wurf

²: Anzahl der JEV-ELISA-Antikörper-positiven Tiere (Titer \geq 1:400)/Anzahl der Überlebenden: Sera wurden 12 Wochen nach dem Immunitätstest zum Testen abgenommen.

Beispiel 9: Herstellung rekombinanter Plasmide, die kodierende Sequenzen für die Gelbfieber-Virus- (YFV-) oder die St.-Louis-Encephalitis-Virus- (SLEV-) prM- und E-Proteine enthalten

[0076] Eine ähnliche Strategie wie bei der Konstruktion des rekombinanten pCDJE2-7-Plasmids wurde angewandt, um rekombinante YFV- und SLEV-Plasmide herzustellen. Genomische RNA wurde unter Verwendung des QIAampTM-Viral-RNA-Sets (Qiagen, Santa Clarita, CA) aus 150 µl YFV-Stamm-TRI-788379- oder SLE-Stamm-78V-6507-Virusaat extrahiert. Die virale RNA wurde als Matrize zur Amplifikation der kodierenden Regionen von YFV- oder SLEV-prM und -E verwendet. Primersequenzen und Strukturen der amplifizierten YFV- und SLEV-DNA-Produkte werden in den [Fig. 6](#) bzw. 7 dargestellt. RT-PCR-amplifizierte cDNA, verdaut mit KpnI- und NotI-Enzymen, wurde in die KpnI-NotI-Stelle eines eukaryotischen Expressionsplasmid-Vektors, pCDNA3 (Invitrogen), inseriert. Beide Stränge der cDNA wurden sequenziert und auf die Identität mit Sequenzen aus dem YFV-Stamm TRI-788379 oder dem SLE-Stamm 78V-6507 untersucht (unveröffentlicht; Chang (1998)). Die rekombinanten Plasmide pCDYF2 und pCDSLE4-3, die die Nucleotidsequenzen der prM- und E-kodierenden Regionen für YFV bzw. SLEV enthielten, wurden unter Verwendung eines EndoFreeTM-Plasmid-Maxi-Sets (Qiagen) gereinigt und für die In-vitro-Transformation oder die Maus-Immunsierung verwendet.

[0077] YFV- oder SLEV-spezifische Antigene wurden in COS-1-Zellen exprimiert, die mit pCDYF2 bzw. pCDSLE4-3 transformiert wurden ([Fig. 8](#)). Die Menge der exprimierten Proteine ähnelte einer YFV- oder SLEV-infizierten COS-1-Zellkontrolle. Wie beim JEV-Modell wurden COS-1-Zelllinien erhalten, die mit Vektoren transformiert wurden, die Gene für die viralen Antigene enthielten, die konstitutiv antigene YFV- oder SLEV-Proteine exprimierten. Epitop-Kartierung mittels IFA unter Verwendung eines Panels von YFV- oder SLEV-E-spezifischen Mabs deutete darauf hin, dass das authentische E-Protein von den pCDYF2- oder pCDSLE4-3-transformierten COS-1-Zellen exprimiert wurde. Eine vorläufige Studie deutete darauf hin, dass es bei 100 der drei Wochen alten weiblichen ICR-Mäuse nach einer intramuskulären Inokulation mit einer Einzeldosis 100 µg/100 µl pCDSLE4-3-Plasmid in entionisiertem Wasser zu Serokonversion kam.

Beispiel 10: Herstellung von Plasmiden, die kodierende Sequenzen für die Strukturproteine von Typ-2-Dengue enthalten

[0078] Die Vorgänge, wie sie für JEV durchgeführt wurden (siehe Beispiel 1), sind auch anzuwenden, um Vektoren herzustellen, die Nucleinsäure-TUs für Typ-2-Dengue-Antigene umfassen.

[0079] Ein Plasmid, das die Typ-2-Dengue-Genregion von prM bis E enthält, ist zu konstruieren. Die Typ-2-Dengue-prM- und E-Gene (Deubel et al., *Virology* 155, 365–377 (1986); Gruenberg et al., *J. Gen. Virol* 69, 1301–1398 (1988); Hahn et al., *Virology* 162, 167–180 (1988)) sind in ein Plasmid, wie z.B. pCDNA3, zu ligieren und anschließend auszuschneiden und in Vektoren, wie z.B. pCBamp, pCEP4, pREP4 oder pRc/RSV (bereitgestellt von Invitrogen, Carlsbad, CA) zu klonieren, um Expression zu ermöglichen. Falls notwendig, kann eine Typ-2-Dengue-Virus-spezifische Sequenz, für die eine cDNA-Sequenz kodiert, unter Anwendung eines Verfahrens wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Alternativ dazu kann, wenn virale RNA die Quelle der Genregion ist, eine DNA-Sequenz mittels eines reverse-Transkriptase-PCR-Verfahrens amplifiziert werden. Ein DNA-Fragment, das ein Initiationscodon am 5'-Ende und ein Terminationscodon am 3'-Ende umfasst, ist an einer geeigneten Restriktionsnuclease-spezifischen Stelle auf solch eine Art und Weise in einen Expressionsvektor zu klonieren, dass der unmittelbare frühe (IE) Promotor des Cytomegalievirus (CMV), ein Initiationscodon und ein Terminator operabel an die Typ-2-Dengue-Virus-Sequenz gebunden werden.

Beispiel 11: Impfung von Mäusen unter Verwendung einer Typ-2-Dengue-DNA-Vakzine

[0080] Die Typ-2-Dengue-Nuclein-TU-Vakzine, die für die Gen-Region aus prM bis E kodiert, hergestellt in Beispiel 10, ist in einem geeigneten pharmazeutischen Träger, wie z.B. Wasser zur Injektion oder gepufferte physiologische Salzlösung, zu suspendieren und Gruppen von entwöhnten Mäusen intramuskulär zu initiieren. Die Kontrollgruppen erhalten ein vergleichbares Plasmidpräparat, dem die Typ-2-Dengue-spezifischen Gene fehlen. Die Erzeugung Typ-2-Dengue-spezifischer Antikörper und/oder Typ-2-Dengue-spezifischer zytotoxischer Immunsystemzellen ist danach in festgelegten Zeitabständen, z.B. in wöchentlichen Zeitabständen, zu untersuchen. Etwa zwei bis vier Monate nach der Verabreichung der Nucleinsäure-TU-Vakzine sind die Mäuse einem Immunitätstest mit dem Typ-2-Dengue-Virus zu unterziehen. Die Virämie-Level sind nun danach in geeigneten Zeitabständen, wie z.B. jeden zweiten Tag, zu untersuchen. Passiver Schutz durch mütterliche Antikörper ist, wie in Beispiel 8 gezeigt, ebenso zu untersuchen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(I) ANMELDER: Gwong-Jen J Chang

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Nucleinsäure-Vakzine zur Prävention einer Flavivirus-Infektion

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADRESSAT: Fitch, Even, Tabin & Flannery
- (B) STRASSE: 135 South LaSalle Street, Suite 900
- (C) STADT: Chicago
- (D) BUNDESSTAAT: IL
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL: 60603-4277

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: Windows
- (D) SOFTWARE: FastSEQ für Windows Version 2.05

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
- (B) EINREICHDATUM:
- (C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
- (B) ANMELDUNGSDATUM:

(viii) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:

- (A) NAME: Richard A. Kaba
- (B) REGISTRATIONSNUMMER: 30.562
- (C) ZEICHEN/REGISTERNUMMER: 62202

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

- (A) TELEFON: 312 372 7842
- (B) TELEFAX: 312 372 7848
- (C) TELEX:

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Anderer

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Kodierende Sequenz
- (B) POSITION: 25...48
- (D) WEITERE INFORMATIONEN:

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Anderer
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Anderer
 - (B) POSITION: 1...41
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Amplimer cYFDV2452
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

TTTTCTTTTG CGGCCGCTCA CGCCCCAACT CCTAGAGAAA C 41

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Anderer
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Kodierende Sequenz
 - (B) POSITION: 25...54
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Anderer
 - (B) POSITION: 1...54
 - (D) WEITERE INFORMATIONEN: Amplimer SLEDV410
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

CTTGGTACCT CTAGAGCCGC CGCC ATG TCT AAA AAA AGA GGA GGG ACC AGA 51
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1 5

TCG 54
 Ser
 10

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Anderer
 (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Anderer
 (B) POSITION: 1...38
 (D) WEITERE INFORMATIONEN: Amplimer cSLEDV2449

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

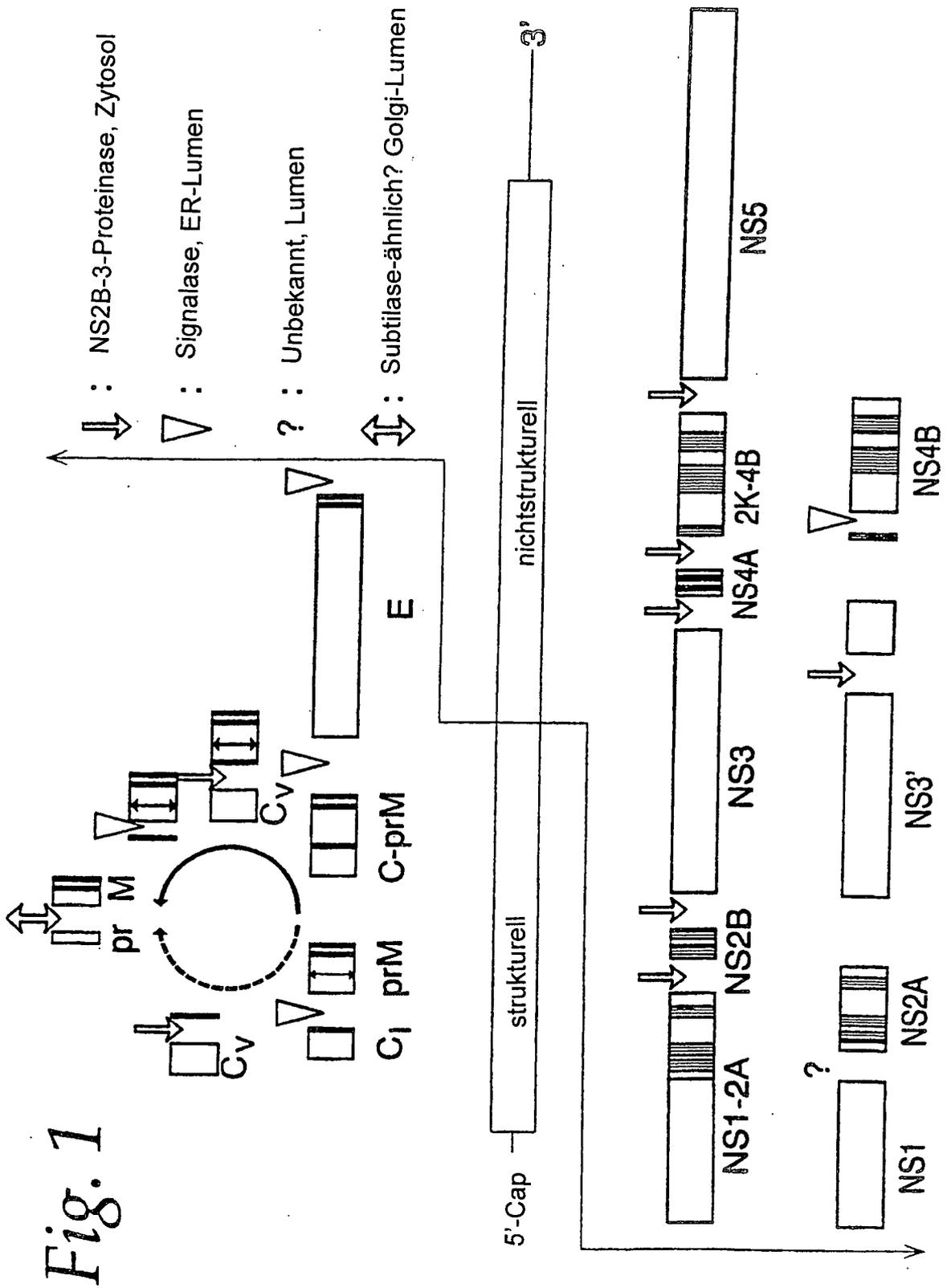
TTTTCTTTTG CGGCCGCTTA GGCTTGCACG CTGGTTGC

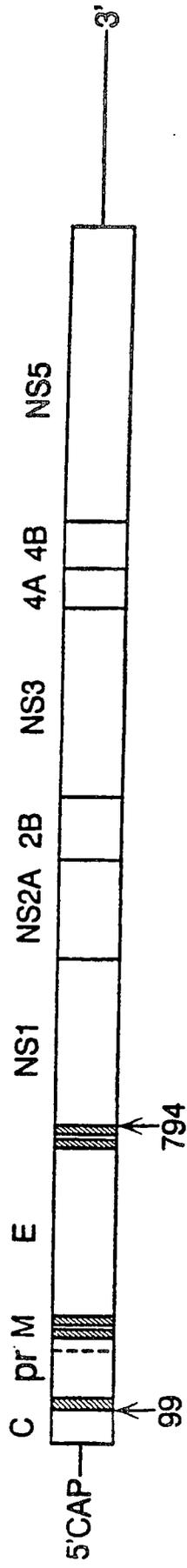
38

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das eine Transkriptionseinheit für die immunogenen Flavivirus-Antigene M-Protein und E-Protein umfasst, worin die Transkriptionseinheit die Struktur K-pr-M-E aufweist, worin K die ribosomale Konsensus-Kozak-Bindungssequenz GCCGCCGCC ist, pr-M ein flavivirales M-Strukturgen ist, das eine Prä-M-Sequenz umfasst, die aus einer Signalpeptidsequenz und einer für M-Protein kodierenden Sequenz besteht, und E eine für E-Protein kodierende Sequenz ist und worin die Transkriptionseinheit weiters eine Kontrollsequenz umfasst, die geeigneterweise so angeordnet ist, dass sie die Expression des M-Proteins und des E-Proteins operabel steuert, worin die Transkriptionseinheit eine Wirtszelle steuert, nachdem sie in diese inkorporiert wurde, um die immunogenen Flavivirus-Antigene zu synthetisieren und um subvirale Partikel zu sekretieren, die die immunogenen Flavivirus-Antigene M-Protein und E-Protein umfassen.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin das Flavivirus aus der aus dem Gelbfieber-Virus, dem Typ-1-Dengue-Virus, dem Typ-2-Dengue-Virus, dem Typ-3-Dengue-Virus, dem Typ-4-Dengue-Virus und dem Japanischen-Encephalitis-Virus (JEV) bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin das Flavivirus das St.-Louis-Encephalitis-Virus ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das ein DNA-Molekül ist.
5. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin die Kontrollsequenz der unmittelbare frühe Promotor des Zytomegalievirus ist.
6. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die Transkriptionseinheit weiters einen Poly-A-Terminator umfasst.
7. Wirtszelle, die in vitro ein Nucleinsäuremolekül in sich beherbergt, das eine Transkriptionseinheit nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umfasst.
8. Zusammensetzung zum Impfen eines Individuums gegen ein Flavivirus, umfassend ein Nucleinsäuremolekül, das eine Transkriptionseinheit nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umfasst, worin die Transkriptionseinheit eine Zelle im Körper des Patienten steuert, nachdem sie darin inkorporiert wurde, um die immunogenen Antigene zu synthetisieren und um subvirale Partikel zu sekretieren, die das Flavivirus-M-Protein und -E-Protein umfassen, und worin die Zusammensetzung weiters einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.
9. Verwendung einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 bei der Herstellung eines Medikaments zur Immunisierung eines Individuums gegen eine Infektion durch ein Flavivirus.
10. Verwendung nach Anspruch 9, worin das Medikament zur Verabreichung an das Individuum in einer Einzeldosis vorliegt.
11. Verwendung nach Anspruch 9, worin das Medikament zur Verabreichung auf parenteralem Weg vorliegt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen





99 ↓
 KpnI XbaI Kozak seq M G R K Q N K R
 14DV389: 5' CTT GGTACC TCTAGA GCCGCCGCC ATG GGC AGA AAG CAA AAC AAA AGA

794 ↓

F L A T N V H A #
 TTC TTA GCG ACC AAT GTG CAT GCT TAA NotI
 c14DV2453: AAG AAT CGC TGG TTA CAC GTA CGA ATT CAAACT CGCCGGCG TTTTCITTT 5'

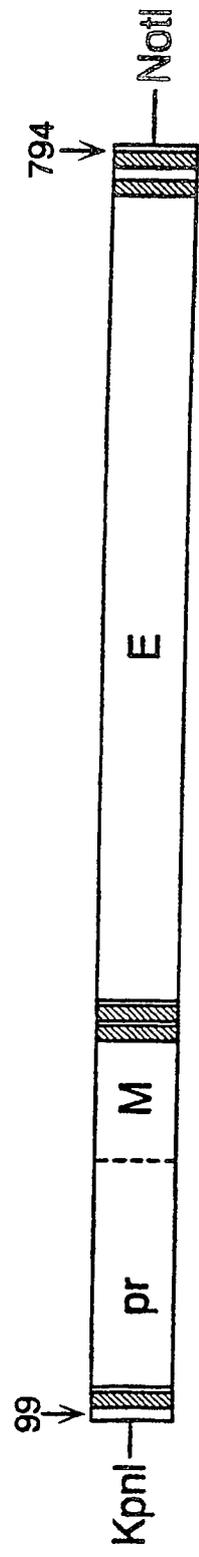
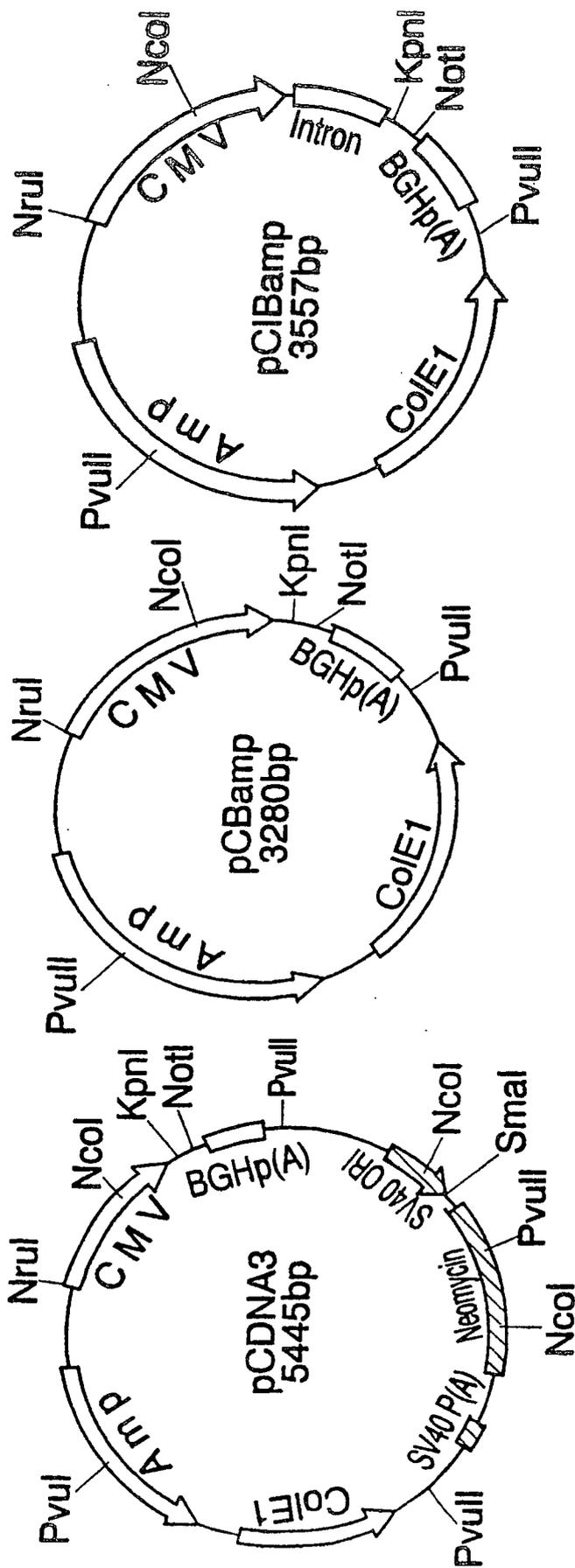


Fig. 2



TATA box KpnI BamHI EcoRI EcoRV NotI
TATATAA...(92NT)...GGTACCGAGCTGGGATCCACTAGTAACGGCCGAGTGTGCTGGAATTCGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGC...BHG-POLY(A)

Fig. 3

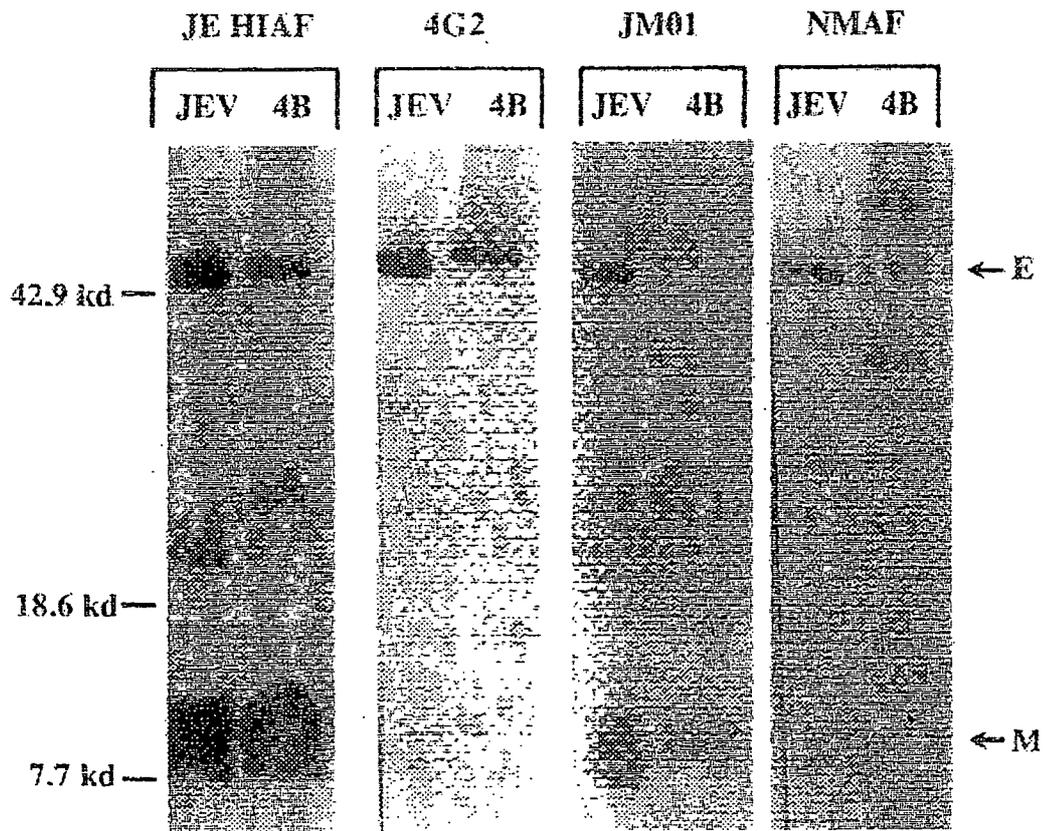


Fig. 4

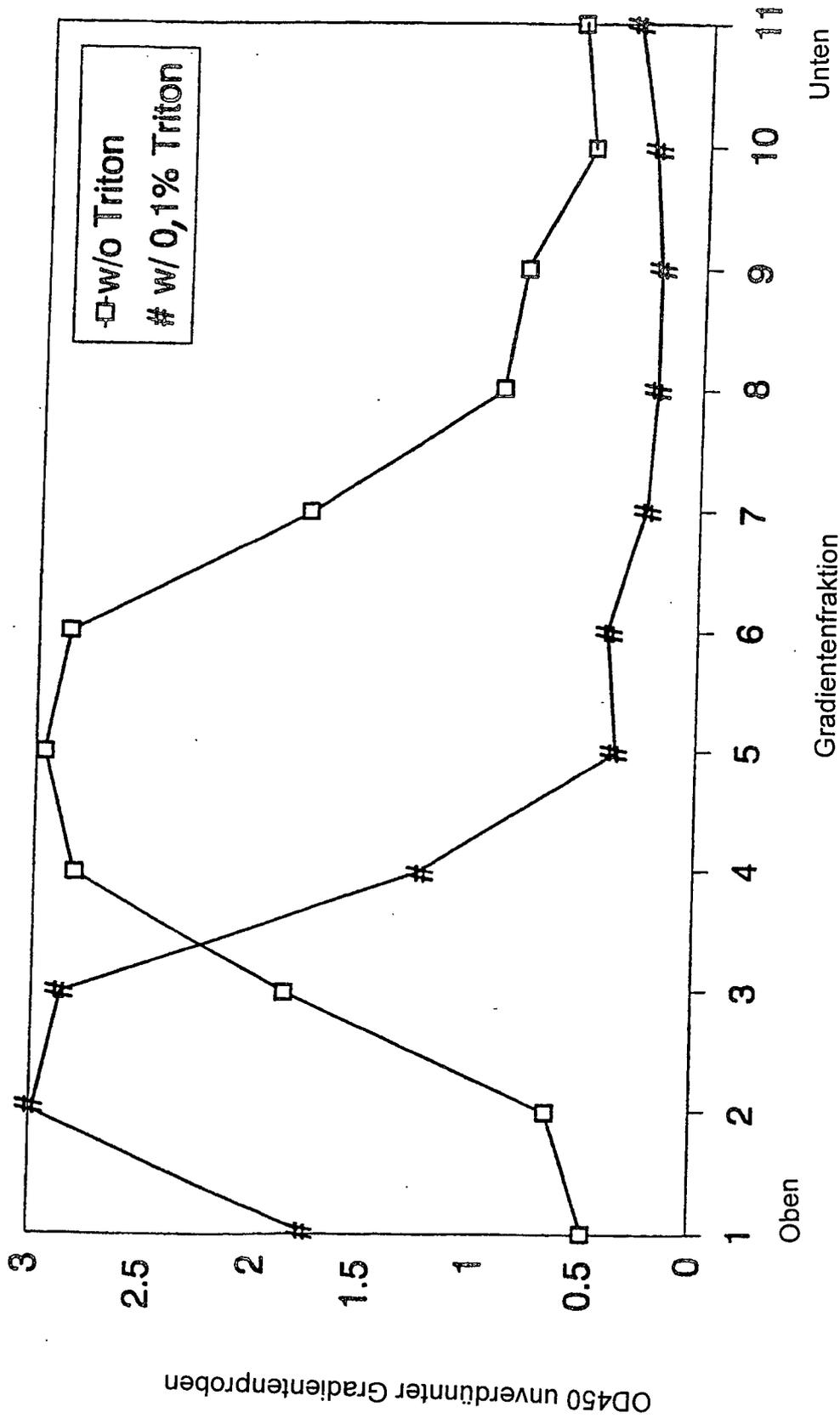


Fig. 5

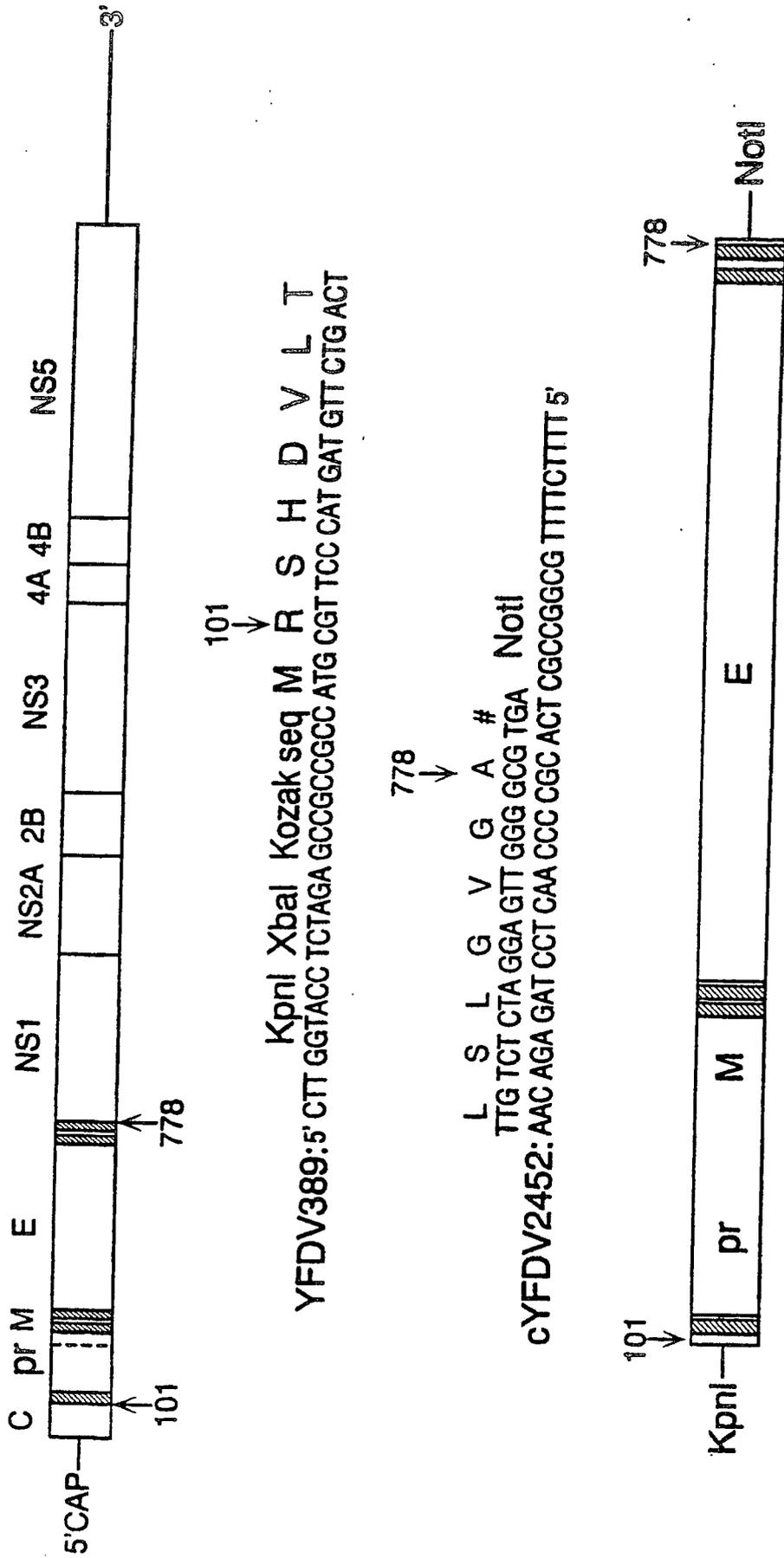


Fig. 6

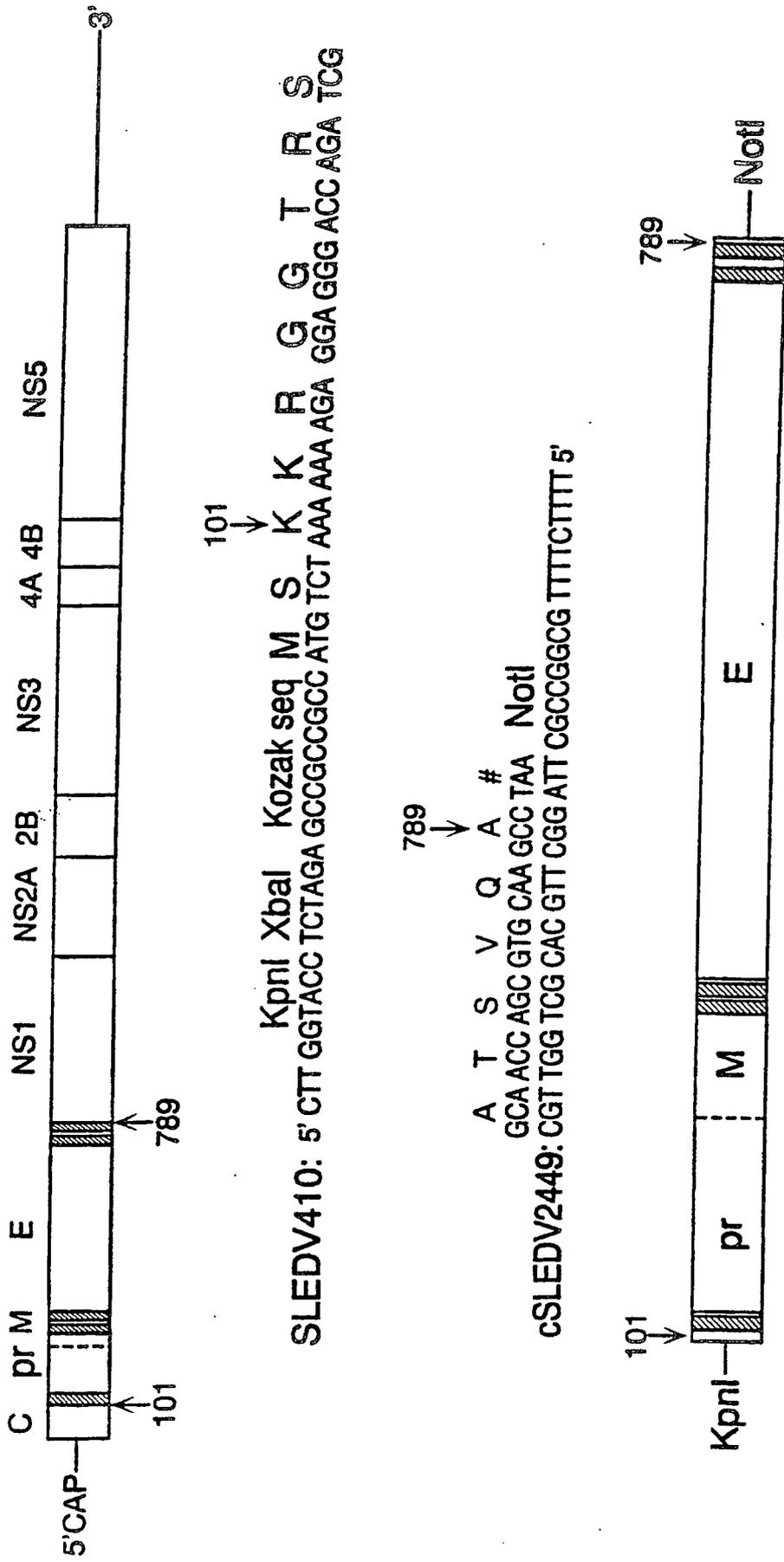


Fig. 7

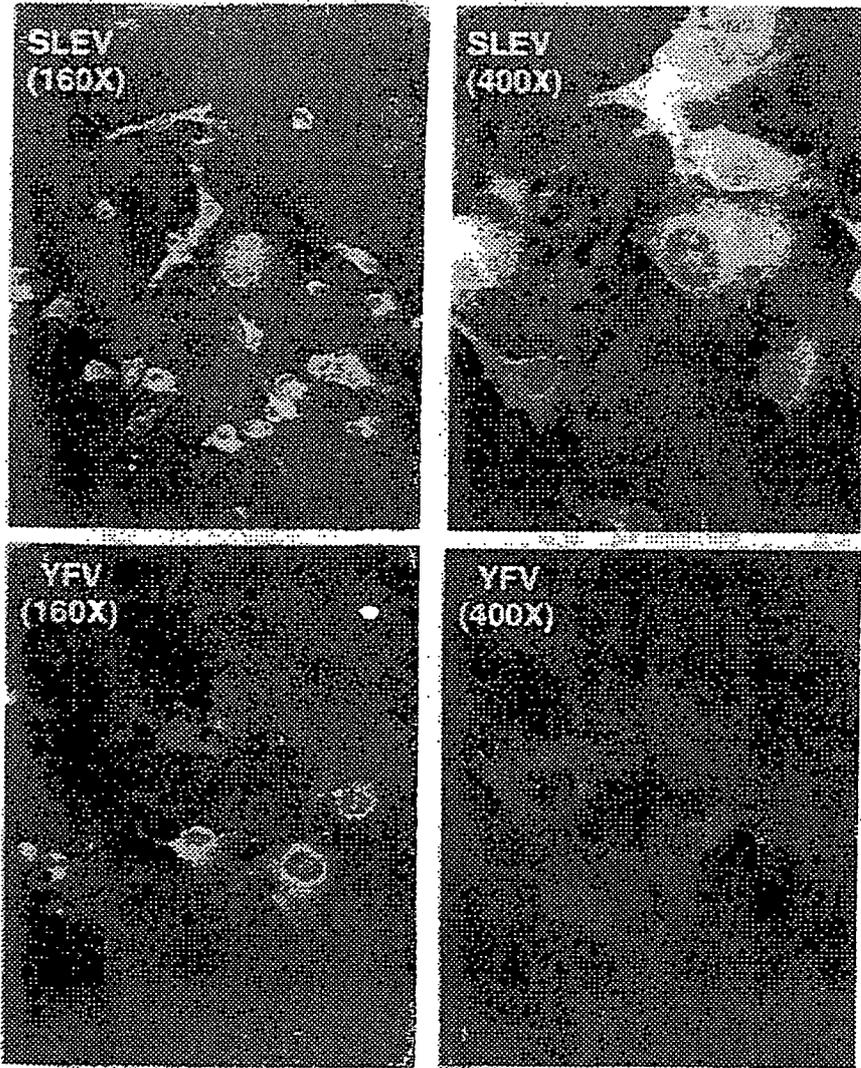


Fig. 8

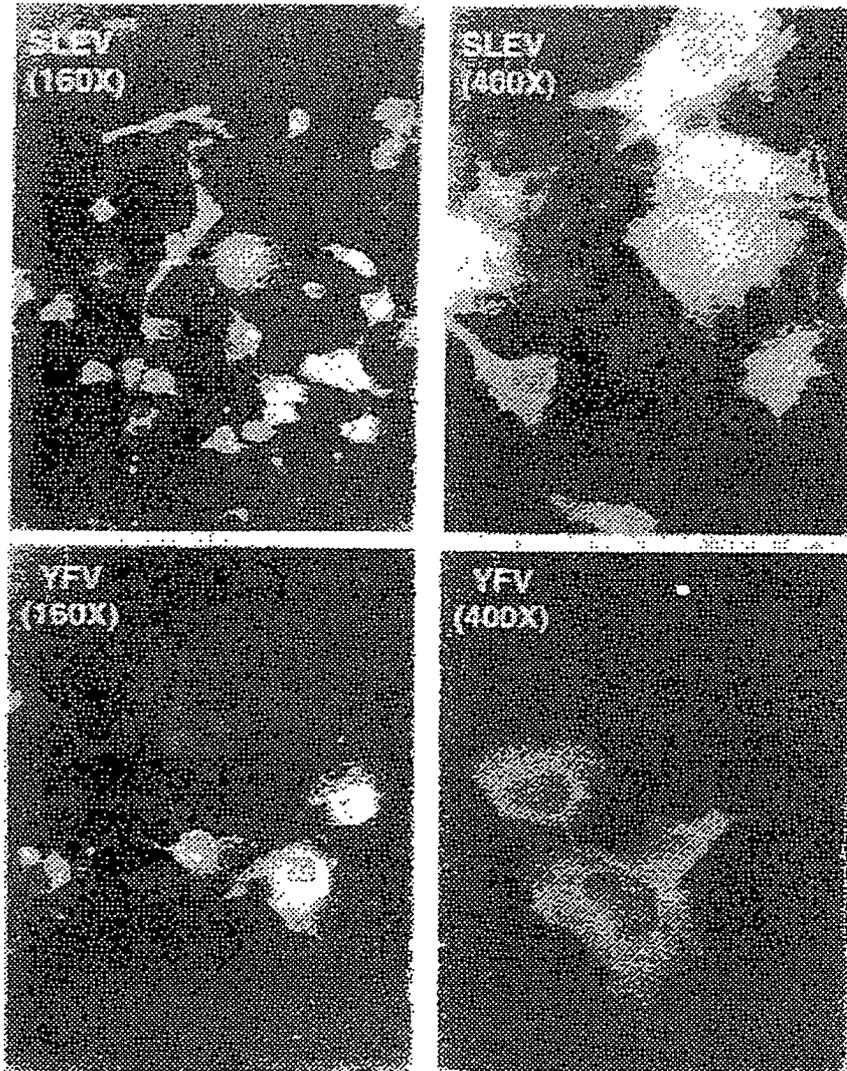


Fig. 8