



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 07 888 T2 2005.12.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 133 997 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 07 888.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 103 580.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **20.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.09.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **22.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 48/00**

A61P 37/00

(30) Unionspriorität:

00440053	23.02.2000	EP
246089 P	07.11.2000	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Transgene S.A., Straßburg/Strasbourg, FR

(72) Erfinder:

Braun, Serge, 67120 Dorlisheim, FR

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **Beta-Interferon zur Behandlung von Immunerkrankungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Verwendung einer Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Verabreichung an einen Patienten, der an einer Immunerkrankung leidet.

[0002] Immunerkrankungen betreffen überwiegend Erkrankungen des Immunsystems und/oder seiner Funktionen. Sie umfassen zum Beispiel allergische Erkrankungen (wie Asthma, Rhinitis, Dermatitis), Immuninsuffizienzen, Entzündungen (einschließlich akute oder chronische Entzündung, Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ), demyelinisierende Erkrankungen, die mit einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort assoziiert sind, und Autoimmunerkrankungen.

[0003] Autoimmunisierung bezieht sich auf eine Immunreaktion (entweder durch die Bildung von Antikörpern oder von immunkompetenten Zellen), die der Körper spezifisch gegen Antigene von Geweben des eigenen Körpers entwickelt. Autoimmunerkrankungen sind die Folge dieser unpassenden Autoimmunisierung, die sich gegen Antigene entwickelt, welche normalerweise in dem betroffenen Patienten anwesend sind. Beispiele für Autoimmunerkrankungen schließen entweder zellvermittelte Erkrankungen wie zum Beispiel multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und systemischen Lupus erythematodes oder Antikörper vermittelte Erkrankungen wie zum Beispiel insulinabhängigen Diabetes mellitus oder Myasthenia gravis ein (für eine allgemeine Übersicht vgl. "Fundamental Immunology", 2. Auflage, William E. Paul, Hrsg., Raven Press, New York (1989)).

[0004] Ein Beispiel für Autoimmunerkrankungen ist multiple Sklerose. Multiple Sklerose ist die bedeutendste neurologische Erkrankung von jungen Erwachsenen, die eine körperliche Behinderung hervorruft. Sie ist eine erworbene, primäre, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der das Myelin das Ziel eines zellulären entzündlichen Autoimmunprozesses ist, der eine beeinträchtigte Nervenerregungsleitung zur Folge hat (für eine Übersicht vgl. z. B. Thompson, Clin. Immunother. 5 (1996), 1–11). Die klinischen Manifestationen sind unterschiedlich, aber sind üblicherweise durch einen anfänglich rezidivierend-remittierenden Verlauf mit einer akuten Verschlechterung, gefolgt durch Perioden von klinischer Stabilität, gekennzeichnet. Mit der Zeit erfolgt eine ständige Verschlechterung der neurologischen Funktionen, wenn die Erkrankung in eine chronische progressive Phase übergeht. Diese Verschlechterung ist für körperliche Behinderungen hervorrufoende Komplikationen und Nebenwirkungen verantwortlich, die die Lebensqualität stark beeinträchtigen und das Sterblichkeitsrisiko von betroffenen Patienten erhöhen.

[0005] Da multiple Sklerose eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung ist, haben mehrere Gruppen eine klinische Behandlung basierend auf der Verwendung von verschiedenen immunmodulatorischen Polypeptiden vorgeschlagen. Tatsächlich konzentrierten sich jüngste Untersuchungen auf die Entwicklung von wirksamen Methoden unter Verwendung eines rekombinanten menschlichen Beta-Interferons als ein therapeutischer Wirkstoff und stellten eine Standardbehandlung für Komplikationen und durch Nebenwirkungen bedingte Krankheiten, die mit multipler Sklerose assoziiert sind, sowohl in Beziehung mit dem zeitlichen Verlauf als auch mit der Intensität der Symptome bereit (für eine Übersicht vgl. z. B. Arnason, Biomed & Pharmacother. 53 (1999), 344–350).

[0006] Beta-Interferon (IFN- β) ist ein natürlich vorkommendes Glycoprotein (MW 22 kDa), umfassend 166 Aminosäurereste in Assoziation mit 21 Aminosäuren, die für die Sekretion verantwortlich sind (vgl. z. B. US 4,738,931), das vorwiegend durch diploide Fibroblasten und in geringeren Mengen durch lymphoblastoide Zellen (zum Beispiel bei einer Mikroorganismus/Immunzellen-Interaktion) synthetisiert wird. Dieses Protein spielt im Organismus aufgrund seiner Vielzahl von biologischen Wirkungen eine wichtige Rolle. IFN- β zeigt antivirale Eigenschaften, hemmt die Zellproliferation und moduliert die Cytokinproduktion (für eine Übersicht vgl. z. B. Gresser I., J. Leukoc. Biol. 61 (1997), 567–774). Seine Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen sind zuerst durch Houghton et al. (Nucleic Acids Research 8 (1980), 2885–2894) und Tanigushi et al. (Gene 10 (1980), 11–15) im Jahr 1980 beschrieben worden. Außerdem sind effiziente Rekombinationstechniken für die Herstellung von rekombinantem Beta-Interferon in Bakterienzellen oder in Ovarzellen des Chinesischen Hamsters entwickelt worden (Sburlati et al., Biotechnol. Prog. 14 (1998), 189–192).

[0007] Im Jahr 1993 wurde BetaseronTM durch die Food and Drug Administration für die Behandlung von multipler Sklerose zugelassen. Zwei weitere vergleichbare Arzneimittel, AvonexTM (β -IFN-1a) und RebifTM (β -IFN-1a), sind nun im Handel erhältlich. Die Behandlungen umfassen die Verabreichung von rekombinantem Beta-Interferon, entweder subkutan (die Dosierung beträgt üblicherweise 0,25 mg (8×10^6 IU) rekombinantes β -IFN-1b, jeden Tag injiziert) oder intramuskulär (6×10^6 IU β -IFN-1a, wöchentlich injiziert). Sie sind überwiegend für die Behandlung von ambulanten Patienten mit rezidivierend-remittierender multipler Sklerose ange-

zeigt und werden für chronisch-progressive Patienten noch ausgewertet (European Study Group, veröffentlicht 1998, Lancet 352, 1491–1497). Bei rezidivierend-remittierender multipler Sklerose verringert die Verabreichung von rekombinantem β -IFN die Häufigkeit und Intensität von klinischen Verschlechterungen und hält die Progression der körperlichen Behinderung sowie die Krankheitsaktivität auf (zusammengefaßt durch Rudick et al., New England Journal of Medicine 337 (1997), 1604–1611).

[0008] Jedoch ist gezeigt worden, daß die Verabreichung eines rekombinanten Interferon-Proteins an Säuger unerwünschte systemische Nebenwirkungen hervorruft, wie zum Beispiel erythematöse Reaktionen an der Injektionsstelle oder grippeähnliche Symptome. Obwohl diese Nebenwirkungen im Allgemeinen während der ersten paar Monate der Behandlung überwunden werden können, sind sie im Hinblick auf die Dosis, die verabreicht werden könnte, sehr restriktiv. Außerdem entwickelt bis zu einem Drittel der Patienten, die ein Beta-Interferon-Protein erhalten, neutralisierende Antikörper gegen das Protein, welche die Wirksamkeit der Behandlung beeinträchtigen können. Zusätzlich zeigen pharmakokinetische Studien zu Betaferon™, veröffentlicht durch die European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, daß kein Beta-Interferon-Spiegel im Blut von Patienten, die mit einer Proteindosis von 8×10^6 IU behandelt wurden, nachweisbar war. Das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung der doppelten Dosis erhalten, jedoch wurden nur 40 IU/ml im Blut der Patienten während der ersten 8 Stunden nach der Injektion nachgewiesen werden, wobei der Spiegel dann auf einen nicht nachweisbaren Wert abfiel (Rebif®, Produktmonographie, Serono).

[0009] Obwohl die Wirksamkeit der exogenen Verabreichung eines rekombinanten Beta-Interferons an einen Patienten bestätigt worden ist, erfordert die Behandlung auf Protein-Basis immer noch, daß das rekombinante Beta-Interferon wiederholt alle 48 Stunden während der gesamten Lebensdauer des Patienten verabreicht wird. Diese wiederholte Behandlung kann daher das Risiko für die Entwicklung einer Immunität, die speziell gegen das Beta-Interferon gerichtet ist und die den klinischen Zustand des betroffenen Patienten verschlechtern würde, erhöhen. Bei Croxford et al., J. Immunol. 160 (1998), 5181–5187, ist eine Behandlung für eine experimentelle allergische Encephalomyelitis mit einem Komplex aus β -IFN-DNA und kationischen Liposomen offenbart.

[0010] Demgemäß wird gemäß dem Stand der Technik keine zufriedenstellende Behandlung von Immunerkrankungen, besonders Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel multiple Sklerose, bereitgestellt. Folglich ist das technische Problem, das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, die Bereitstellung eines Mittels für eine zufriedenstellende Behandlung solcher Immunerkrankungen.

[0011] Seit der Entdeckung, daß der Skelettmuskel durch die transmuskuläre Injektion von Plasmid-DNA in vivo transfiziert werden kann, richtete sich die Aufmerksamkeit verstärkt auf dieses Organsystem als eine mögliche Quelle für sezernierte therapeutische Proteine. Jedoch ist die Wirksamkeit dieses Transfektionsverfahrens noch sehr gering, selbst bei der Induktion einer Muskeldegeneration und -regeneration durch die Injektion von myotoxischen Stoffen vor der DNA-Injektion. Demgemäß haben die meisten Studien bisher gezeigt, daß die Expression nicht ausreichend ist, um den Blutspiegel von zirkulierenden Proteinen zu erhöhen, besonders in dem Fall, wo der Spiegel hoch genug sein sollte, um eine Verbesserung des Gesundheitszustands zu ermöglichen. Tatsächlich ist diese auf Plasmid-DNA basierende Gentherapie noch immer auf Impfungsanwendungen begrenzt (MacGregor et al., J. Infec. Dis. 178 (1998), 92–100; Wang et al., Science 282 (1998), 476–480).

[0012] Es ist nun überraschend festgestellt worden, daß eine Nucleinsäure (DNA oder RNA), die zur Expression von Beta-Interferon (β -IFN) fähig ist, wenn sie einem Säuger injiziert wird, der an einer Immunerkrankung leidet, vorzugsweise einer solchen, die eine Demyelinisierung des Zentralnervensystems hervorruft, und genauer einer Autoimmunerkrankung (z. B. multiple Sklerose, etc.), eine unerwartete Verbesserung des Gesundheitszustands des behandelten Säugers im Vergleich zu einem unbehandelten Säuger herbeiführen kann. Dies ermöglicht die Behandlung der Immunerkrankung, während die Verwendung eines rekombinanten Polypeptids vermieden wird.

[0013] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Immunerkrankung.

[0014] Somit erfüllt die vorliegende Erfindung eine seit langem bestehende Forderung und Hoffnung auf dem Fachgebiet. Genauer stellt sie ein zufriedenstellendes Behandlungsverfahren bereit, das einen verträglichen Beta-Interferon-Spiegel in behandelten Patienten vorsieht und mit der Lebensqualität der Patienten vereinbar ist.

[0015] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "Immunerkrankung" eine Krankheit, die mit der Entwicklung einer Immunreaktion, entweder einer zellulären oder einer humoralen Immunreaktion oder beidem, assoziiert ist. Solche Terminologien werden auf dem Gebiet der Immunologie häufig verwendet und sind somit auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Beispiele für Immunerkrankungen sind entzündliche, allergische und autoimmune Erkrankungen.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Immunerkrankung eine demyelinisierende Erkrankung, die durch einen demyelinisierenden Prozeß des Zentralnervensystems gekennzeichnet ist, wie zum Beispiel multiple Sklerose, subakute sklerosierende Panencephalomyelitis (SSPE), metachromatische Leukodystrophie, entzündliche demyelinisierende Polyradiculoneuropathie, Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit und Guillain-Barré-Syndrom (vgl. Choudhary et al., *J. Neurol.* 242 (1995), 252–253; Créange et al., *The Lancet* 352 (1998), 368). Die Demyelinisierung ist ein pathologischer Endpunkt, den alle diese Erkrankungen gemeinsam haben, während die zellulären und molekularen Mechanismen, die ursprünglich für diesen pathologischen Befund verantwortlich sind, sehr verschieden sind. Diese reichen von Gendefekten, die den Lipidstoffwechsel bei den Leukodystrophien beeinflussen, cytophatischen Effekten einer Virusinfektion bei SSPE bis zur Wirkung von immunologischen Effektormechanismen bei multipler Sklerose und den viralen Encephalopathien. Ungeachtet der anfänglichen Ursache für den Myelinabbau sind diese Störungen mit einer Entzündung des Zentralnervensystems, mit einer lokalen Aktivierung der Mikroglia, der Rekrutierung von Makrophagen oder der intrathekalen Synthese von Immunglobulin assoziiert. Ähnlich ist gezeigt worden, daß es Beziehungen zwischen der Immunantwort im Zentralnervensystem und der Pathogenese von Erkrankungen wie zum Beispiel der Alzheimer-Krankheit oder einer HIV-Encephalopathie gibt (Bradl und Lington, *Brain Pathol.* 6 (1996), 303–11).

[0017] In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform ist die Immunerkrankung eine Autoimmunerkrankung. "Autoimmunerkrankung" verweist allgemein auf eine Immunerkrankung, bei der die Immunantwort gegen Antigene entwickelt wird, die normalerweise in dem betroffenen Patienten anwesend sind. Es kann eine organspezifische Autoimmunerkrankung (bei der die Immunantwort zum Beispiel spezifisch gegen das endokrine System, das hämopoetische System, die Haut, das Herz-Lungen-System, das neuromuskuläre System, das Zentralnervensystem, etc. gerichtet ist) oder eine systemische Autoimmunerkrankung (zum Beispiel systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Polymyositis, etc.) sein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Autoimmunerkrankung multiple Sklerose.

[0018] Im Einklang mit der Erfindung bedeutet "Behandlung einer Immunerkrankung", daß zumindest die Komplikationen und die durch Nebenwirkungen bedingten Störungen, die mit der Immunerkrankung assoziiert sind, bei dem behandelten betroffenen Säuger im Vergleich zu denjenigen, die bei den unbehandelten betroffenen Säugern beobachtet werden, verringert werden. "Betroffener Säuger" bezeichnet einen Säuger, der Symptome der in Betracht gezogenen Immunerkrankung und vorzugsweise solche, die durch eine nützliche und zugängliche Methode eindeutig diagnostiziert worden sind, zeigt. "Komplikationen und durch Nebenwirkungen bedingte Störungen, die mit der Immunerkrankung assoziiert sind, werden verringert" kann weitgehend dahin verstanden und vorzugsweise gedeutet werden, daß die Verabreichung der Behandlung an einen betroffenen Säuger die Häufigkeit und die Intensität von klinischen Verschlechterungen verringert und die Progression einer körperlichen Behinderung sowie die Krankheitsaktivität verzögert (vgl. z. B. Rudick et al., *New England Journal of Medicine* 337 (1997), 1604–1611). Diese Verringerungen können ohne weiteres durch einen Fachmann, z. B. einen Kliniker, mittels gewöhnlich bekannter und angewendeter Verfahren gemessen werden.

[0019] "Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist" bezeichnet eine Nucleinsäure, die eine Polynucleotidsequenz, codierend ein Beta-Interferon-Polypeptid, umfaßt, welche funktionell verbunden ist mit einer Transkriptionskontrollsequenz, um die Transkription in den Zielzellen sicherzustellen. Erfindungsgemäß kann die "Nucleinsäure" ein Fragment oder ein Teil einer Polynucleotidsequenz sein, ohne Größenbegrenzung, das/der entweder linear oder ringförmig, natürlich oder synthetisch, modifiziert oder unmodifiziert (vgl. US 5525711, US 4711955, US 5792608 oder EP 302175 für Modifikationsbeispiele) sein kann. Abhängig von der in Betracht gezogenen Sequenz kann die Nucleinsäure u.a. eine genomische DNA, eine cDNA, eine mRNA oder eine synthetische DNA sein. Erfindungsgemäß ist die Nucleinsäure nackt. "Nackt" bedeutet, daß die Nucleinsäure ungeachtet ihrer Natur (DNA oder RNA), ihrer Größe oder ihrer Form (zum Beispiel ein/doppelsträngig, ringförmig/linear) so definiert ist, daß sie nicht mit Viruspartikeln, Liposomenformulierungen, geladenen Lipiden, Peptiden oder Polymeren und Fällungsmitteln assoziiert ist, die eine Transfektion ermöglichen (Wolff et al., *Science* 247 (1990), 1465–1468; EP 465529). Im Gegensatz dazu bedeutet "nicht nackt", daß die Nucleinsäure assoziiert sein kann mit: (i) viralen Polypeptiden, die üblicherweise ein so genanntes Virus bilden (Adenovirus, Retrovirus, Pockenvirus, etc.) oder einen Komplex bilden, wobei die Nucleinsäure, obwohl damit assoziiert, nicht in ein virales Element wie ein Viruscapsid eingeschlossen wird (vgl. z. B. US 5,928,944 und WO 9521259), und (ii) mit irgendeiner Komponente, die am dem Transfer und/oder der Aufnahme der Nucle-

insäure in die Zellen beteiligt sein kann. Erfindungsgemäß kann die Nucleinsäuresequenz homolog oder heterolog zu den Wirtszellen sein. Vorzugsweise liegt die Nucleinsäure in Form einer Plasmid-DNA vor, und das Polynucleotid ist eine nackte Plasmid-DNA. Eine große Auswahl von Plasmiden ist im Handel erhältlich und dem Fachmann hinreichend bekannt. Diese erhältlichen Plasmide werden ohne weiteres durch übliche molekularbiologische Techniken modifiziert (z. B. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Plasmide, die aus pBR322 (Gibco-BRL), pUC (Gibco-BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) und auch pPoly (Lathe et al., *Gene* 57 (1987), 193–201) abgeleitet sind, sind für diese Modifikationen beispielhaft.

[0020] Der Begriff "eine Polynucleotidsequenz, die ein Beta-Interferon-Polypeptid codiert" im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verweist auf eine Polynucleotidsequenz, die ein Beta-Interferon-Polypeptid, insbesondere ein Polypeptid mit den biologischen Aktivitäten von Beta-Interferon wie antiviralen oder immunmodulatorischen Eigenschaften codiert (vgl. z. B. Arnason B., 1999, a. a. O.).

[0021] Polynucleotidsequenzen, die ein Beta-Interferon-Polypeptid codieren, sind z. B. durch eine Reihe von Computerdatenbanken, zum Beispiel GenBank, EMBL und Swiss-Prot, ohne weiteres erhältlich. Unter Verwendung dieser Information kann ein Polynucleotid (DNA oder RNA)-Segment, welches das gewünschte Polypeptid codiert, chemisch synthetisiert werden, oder alternativ kann ein solches DNA-Segment mittels auf dem Fachgebiet üblicher Verfahren, z. B. mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung von spezifischen Primersequenzen, erhalten werden. Beispiele für solche Nucleinsäuresequenzen, die in der GenBank-Datenbank verfügbar sind, weisen die Hinterlegungsnummern M15477, M15478 oder M15479 für Rinder-IFN- β ; S41178 oder M86762 für Schweine-IFN- β ; X14029 oder X14455 für Maus-IFN- β ; M14546 für Pferde-IFN- β ; D87919 für Ratten-IFN- β ; und K03196, M25460, X04430, M16656 oder E00038 für menschliches IFN- β auf. Innerhalb des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung können auch Sequenzen verwendet werden, die Analoga von Beta-Interferon codieren; Beispiele für solche Sequenzen sind die Sequenzen, die unter den GenBank-Hinterlegungsnummern E00017, E00352, E00353 oder E00354 erhältlich sind. IFN- β codierende Sequenzen sind auch bei Houghton et al., *Nucleic Acids Research* 8 (1980), 2885–2894; Taniguchi et al., *Gene* 10 (1980), 11–15; und in US 4,738,931 offenbart. Vorzugsweise codiert die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäure ein Beta-Interferon-Protein mit der in SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ ID Nr.: 2 gezeigten Aminosäuresequenz. SEQ ID Nr.: 1 enthält eine sekretorische Signalsequenz von 21 Aminosäuren, welche die Sekretion des synthetisierten Proteins aus den exprimierenden Zellen ermöglicht. SEQ ID Nr.: 2 zeigt das Beta-Interferon-Protein ohne die sekretorische Signalsequenz. Eine Nucleinsäuresequenz, die ein Beta-Interferon-Protein codiert, das die native Signalsequenz davon aufweist, wird bevorzugt. Die native Signalsequenz kann jedoch durch heterologe Signalsequenzen ersetzt werden (mittels üblicher Genmanipulationstechniken; vgl. Nabel et al., *Nature* 362 (1993), 844). "Beta-Interferon oder IFN- β " im Einklang mit der vorliegenden Erfindung bezeichnet vorzugsweise ein Polypeptid mit der in SEQ ID Nr.: 1 gezeigten Aminosäuresequenz. Jedoch sind geringfügige Aminosäurevariationen, welche die IFN- β -Eigenschaften nicht beeinflussen, innerhalb der IFN- β -Polypeptidsequenz annehmbar. Demgemäß und im Hinblick auf die Degeneration des genetischen Codes kann der Fachmann die Polypeptidsequenz, die Beta-Interferon codiert, in Hinsicht auf diese geringfügigen Veränderungen ohne weiteres anpassen. Diese spezifischen Ausführungsformen sind durch die Erfindung eingeschlossen. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform codiert die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäuresequenz ein menschliches Beta-Interferon, und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt sie die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Nucleotidsequenz (menschliches IFN- β).

[0022] Im Einklang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet "funktionell verbunden mit einer Transkriptionskontrollsequenz", daß die codierende Polynucleotidsequenz und die Transkriptionskontrollsequenz in einer Beziehung zueinander vorliegen, die es ihnen ermöglicht, in der gewünschten Art und Weise wirksam zu sein. So ist zum Beispiel ein Promotor, der mit einer Polynucleotidsequenz funktionell verbunden ist, in einer solchen Weise ligiert, daß die Expression des Beta-Interferons unter Bedingungen erreicht wird, die mit der Transkriptionsaktivität des Promotors kompatibel sind. Diese Bedingungen werden auf dem technischen Gebiet der Erfindung häufig verwendet. "Transkriptionskontrollsequenz" bezeichnet die Polynucleotidsequenzen, welche z. B. die Initiation der Transkription und die Auswahl der Startposition kontrollieren, welche die Transkriptionsrate regulieren (Erhöhung oder Hemmung), welche den Polymerase-Typ bestimmen, der die Polymerisation der transkribierten mRNA steuert, welche die Transkriptionsrate, die Termination der Transkription, die Stelle der Termination, etc. kontrollieren. Diese Sequenzen sind umfassend untersucht, verwendet und in der Literatur beschrieben worden und können durch Fachleute ohne weiteres erhalten oder angepaßt werden.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Transkriptionskontrollsequenz ein Promotorelement. Vorzugsweise wird ein Promotor mit einer hohen Expressionsrate verwendet. Der Promotor kann zum Beispiel ausgewählt sein aus der Gruppe, bestehend aus viralen Promotoren und muskelspezifischen Promo-

toren oder einer Kombination davon. Beispiele für solche viralen Promotoren sind die frühen und späten Promotoren von SV40, der späte Adenovirus-Hauptpromotor, der Rous-Sarkom-Virus (RSV)-Promotor, der sehr frühe Cytomegalievirus (CMV)-Promotor, der Herpes-simplex-Virus (HSV)-Promotor, der MPSV-Promotor, der 7,5k-Promotor, der Vaccinia-Promotor und der mittelfrühe Haupt (MIE)-Promotor. Beispiele für muskelspezifische Promotoren sind der 22-Promotor der glatten Muskulatur (SM22), der Promotor der leichten Myosinkette, der Promotor der schweren Myosinkette, der Skelett-alpha-Actin-Promotor und der Dystrophin-Promotor. Der sehr frühe Cytomegalievirus (CMV)-Promotor wird jedoch bevorzugt. Der natürliche Promotor der Beta-Interferon codierenden Sequenz kann auch verwendet werden (US 4,738,931). Die Polynucleotidsequenz des Promotors kann eine natürlich vorkommende Promotorsequenz sein, die aus einem biologischen Nucleinsäurematerial isoliert wird, oder kann chemisch synthetisiert werden. Die Promotorsequenz kann auch synthetisch konstruiert werden durch das Zusammenstellen von Elementen, die zuvor auf eine Transkriptionsaktivität durchmustert wurden, wobei Wirksamkeiten erhalten werden, die solche von natürlich vorkommenden Promotorsequenzen übersteigen können (Li et al., Nature Biotech. 17 (1999), 241–245). Die aus einer codierenden Sequenz und einem Promotor bestehende Expressionskassette kann mittels üblicher Clonierungstechniken, die den Fachleuten bekannt sind (vgl. zum Beispiel Sambrook et al., 1989, a. a. O.), konstruiert werden. Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung umfaßt die Transkriptionskontrollsequenz weiterhin mindestens ein Enhancer-Element. Der Begriff "Enhancer" verweist auf ein regulatorisches Element, das die Transkription in einer positions- und orientierungsunabhängigen Weise aktiviert. Mehrere Enhancer-Elemente sind bis heute in vielen Genen identifiziert worden. Zum Beispiel kann das Enhancer-Element ein Enhancer der leichten Myosinkette sein. Mehr bevorzugt stammt der in der erfindungsgemäßen Expressionskassette verwendete Enhancer aus einem Wirbeltier und stärker bevorzugt aus einem Säuger. Der 1/3-Enhancer der leichten Myosinkette der Ratte (Donoghue et al., Gene & Dev. 2 (1988), 1779–1790) ist besonders nützlich. Das Enhancer-Element ist mit dem Promotor funktionell verbunden, kann entweder stromaufwärts oder stromabwärts des Promotors angeordnet sein und kann in beiden Orientierungen verwendet werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Transkriptionskontrollsequenz mehrere Enhancersequenzen, wobei die Sequenzen identisch sind oder unabhängig voneinander ausgewählt werden. Vorzugsweise umfaßt die Transkriptionskontrollsequenz ferner mindestens eine Sequenz, welche die Polyadenylierung der transkribierten RNA-Moleküle sicherstellt. Eine solche Sequenz kann ausgewählt sein aus der Gruppe, bestehend aus dem bGH (Rinderwachstumshormon)-Polyadenylierungssignal (EP 173552) dem SV40-Polyadenylierungssignal und dem Globin-Polyadenylierungssignal und ist im Allgemeinen am 3'-Ende der Beta-Interferon codierenden Sequenz angeordnet.

[0024] In einer bevorzugten Ausführungsform kann die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäure ferner eine Polynucleotidsequenz umfassen, die mindestens ein Polypeptid von Interesse codiert, das von Beta-Interferon verschieden ist, wobei das Polypeptid von Interesse zusammen mit dem Beta-Interferon in der Zielzelle exprimiert wird. In einer anderen Ausführungsform ist es auch möglich, daß die zweite Polynucleotidsequenz ein Teil einer zweiten Nucleinsäure ist, die gleichzeitig mit der Beta-Interferon codierenden Sequenz verabreicht wird. Das Polypeptid von Interesse kann z. B. ein selektierbarer Marken wie ein Antibiotikaresistenz-Polypeptid, ein immunmodulatorisches Polypeptid (zum Beispiel IL4, IL6, IL6, IL10 oder TGF-beta), ein neurotropher Faktor (zum Beispiel NGF, Neurotrophin, BDNF oder Cardiotrophin), ein Wachstumsfaktor (z. B. IGF-1), der gesamte oder ein Teil eines Antikörpers (zum Beispiel ein anti-Idiotyp-Antikörper oder ein anti-TNF-Antikörper), ein Hormon (zum Beispiel LH, FSH oder Adrenokortikotropin-Hormon), ein entzündungshemmendes Polypeptid oder ein hybrides Polypeptid davon sein.

[0025] Außerdem kann die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäure ferner mindestens eine Nucleotidsequenz einschließen, die eine Zielsequenz, eine Transportsequenz, eine Sequenz, die an der Replikation oder Integration beteiligt ist, oder eine Sequenz, codierend einen selektierbaren Marker, zum Beispiel für eine Antibiotikaresistenz (Ampicillin, Phleomycin, Chloramphenicol, etc.), die für die Selektion einer Zelle, in welche die Nucleotidsequenz eingeschleust worden ist, nützlich ist, enthält oder exprimiert. Beispiele für solche Sequenzen sind in der Literatur beschrieben worden und können durch Fachleute ohne weiteres erhalten werden. Die Nucleinsäure kann auch modifiziert werden, so daß sie mit spezifischen Komponenten wie Spermin stabilisiert ist.

[0026] Das vorstehend beschriebene Arzneimittel kann über einen geeigneten Weg verabreicht werden. Die Verabreichung an Zielgewebe in Wirbeltieren und genauer in den Muskel kann durch verschiedene Verabreichungsweisen erfolgen (systemische Freisetzung und zielgerichtete Abgabe). Erfindungsgemäß wird das Arzneimittel vorzugsweise in den Skelettmuskel verabreicht, jedoch kann die Verabreichung auch in andere Gewebe des Wirbeltierkörpers erfolgen, einschließlich solchen des nicht skelettalen Muskels, der Haut, des Gehirns, der Lunge, der Leber, der Milz, des Knochenmarks, des Thymus, des Herzens, der Lymphe, des Knorpels, der Bauchspeicheldrüse, der Niere, der Gallenblase, des Magens, des Darms, der Ho-

den, des Eierstocks, der Gebärmutter, des Enddarms, des Nervensystems, des Auges, der Drüsen, des Bindegewebes, des Bluts, des Tumors, etc. Das Beta-Interferon kann auf diese Weise in Körperflüssigkeiten (z. B. Blut) sezerniert werden, wodurch die Abgabe davon an die Organe des Patienten ermöglicht wird. In ähnlicher Weise kann die Nucleinsäure mit Zielmolekülen assoziiert sein, die fähig sind, die Aufnahme der Nucleinsäure in Zielzellen zu steuern. Die Gentherapie-Literatur liefert viele Mechanismen für eine wirksame und zielgerichtete Freisetzung und Expression von genetischer Information innerhalb der Zellen eines lebenden Organismus. Die Verabreichung des Arzneimittels kann durch intradermale, subdermale, intravenöse, intramuskuläre, intranasale, intracerebrale, intratracheale, intraarterielle, intraperitoneale, intravesikuläre, intrapleurale, intrakoronare oder intratumorale Injektion mit einer Spritze oder anderen Vorrichtungen erfolgen. Die transdermale Verabreichung ist ebenso eingeschlossen, wie auch Inhalations- und Aerosol-Wege. Die Injektion und genauer die intramuskuläre Injektion werden bevorzugt.

[0027] Das Arzneimittel kann für wiederholte Verabreichungen an den Patienten ausgelegt sein oder verwendet werden, ohne daß ein bedeutendes Risiko besteht, daß das verabreichte Arzneimittel eine signifikante Immunreaktion hervorruft. Die Verabreichung kann durch eine Einzeldosis oder durch wiederholte Dosen einmal oder mehrmals nach einem bestimmten Zeitraum erfolgen. Die wiederholte Verabreichung ermöglicht eine Verringerung der einmalig verabreichten Dosis der Nucleinsäure. Die Verabreichungsweise und die geeignete Dosis variieren als Funktion mehrerer Parameter, zum Beispiel des einzelnen Patienten, der Nebenwirkungen der Erkrankung oder des Albuminspiegels vor der Behandlung.

[0028] Vorzugsweise beträgt die Konzentration der Nucleinsäure in dem Arzneimittel etwa 0,1 µg/ml bis etwa 20 mg/ml.

[0029] Die wirksame Dosis oder die Menge an Nucleinsäure, die zum Erhalt eines zufriedenstellenden Beta-Interferon-Spiegels injiziert werden sollte, beträgt vorzugsweise etwa 1 µg bis 1 g, mehr bevorzugt etwa 1 mg bis 1 g, am meisten bevorzugt etwa 1 mg bis 100 mg. Die wirksame Dosis kann in einer einmaligen Verabreichung oder in mehreren Verabreichungen verteilt über einen oder mehrere Tage verabreicht werden. Vorzugsweise beträgt die maximale Einzeldosis 10 mg verabreichte DNA. Die separaten Verabreichungen können durch verschiedene Verabreichungsweisen (zum Beispiel systemische Freisetzung und zielgerichtete Freisetzung oder zielgerichtete Freisetzung) erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform sollte jede Freisetzung in das gleiche Zielgewebe und am meisten bevorzugt per Injektion erfolgen.

[0030] Das verabreichte Volumen variiert vorzugsweise von etwa 10 µl bis 500 ml, am meisten bevorzugt von etwa 100 µl bis 100 ml. Das verabreichte Volumen kann abhängig von der Verabreichungsweise, dem behandelten Patienten und dem Gewicht des Patienten angepaßt werden.

[0031] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit, umfassend eine Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, und ein Freisetzungshilfsmittel. Vorzugsweise liegt die Nucleinsäure in einer Lösung in einem pharmazeutisch verträglichen Träger vor. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nucleinsäure eine, wie sie vorstehend im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung beschrieben ist. Der Kit ist für den Gentransfer, besonders für die Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers und insbesondere für die Behandlung einer Immunerkrankung bestimmt. Im Hinblick auf bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits gelten die gleichen Anforderungen, wie sie bereits vorstehend in Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung dargelegt worden sind.

[0032] So wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "wirksame Menge" eine ausreichende Menge einer Nucleinsäure, die an die Zellen des behandelten Säugers abgegeben wird, um einen hinreichenden Beta-Interferon-Spiegel bereitzustellen, d. h. einen Spiegel, der in Lage ist, eine Verbesserung des Gesundheitszustands des behandelten Säugers herbeizuführen. Folglich ist der wichtige Aspekt der exprimierte Proteinspiegel. Demgemäß können mehrere Transkripte verwendet werden oder man kann das Beta-Interferon codierende Gen unter die Kontrolle eines Promotors bringen, der hohe Expressionsraten ergibt. In einer anderen Ausführungsform kann das Gen unter die Kontrolle eines Faktors gebracht werden, der sehr hohe Expressionsraten ergibt, z. B. tat und das entsprechende tar-Element. Im Hinblick auf bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens gelten die gleichen Anforderungen, wie sie bereits vorstehend in Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung dargelegt worden sind.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel, das eine Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

[0034] Ein "pharmazeutisch verträglicher Träger" ermöglicht die Verwendung des Arzneimittels in einem Ver-

fahren zur therapeutischen Behandlung von Menschen oder Tieren. In diesem besonderen Fall kann der Träger ein pharmazeutisch geeigneter(s), injizierbarer(s) Träger oder Verdünnungsmittel sein (vgl. zum Beispiel Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, 1980, Mack Publishing Co.). Ein solcher(s) Träger oder Verdünnungsmittel ist pharmazeutisch verträglich, d. h. er (es) ist für einen Empfänger in der verwendeten Dosierung und Konzentration nicht toxisch. Er (es) ist vorzugsweise isotonisch, hypotonisch oder schwach hypotonisch und besitzt eine relativ geringe Ionenstärke, so wie sie durch eine Saccharoselösung bereitgestellt wird. Außerdem kann er (es) beliebige relevante Lösungsmittel, wässrige oder teilweise wässrige, flüssige Träger, umfassend steriles, pyrogenfreies Wasser, Dispersionsmedien, Überzüge und Gegenstücke oder Verdünnungsmittel (z. B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), Emulgiermittel, Lösungsvermittler oder Adjuvantien enthalten. Der pH-Wert des Arzneimittels wird geeignet eingestellt und gepuffert, um bei in vivo-Anwendungen nützlich zu sein. Das Arzneimittel kann entweder als eine flüssige Lösung oder als eine feste Form (z. B. gefriergetrocknet), die in einer Lösung vor der Verabreichung suspendiert werden kann, hergestellt werden. Repräsentative Beispiele für Träger oder Verdünnungsmittel für eine injizierbare Formulierung schließen Wasser, isotonische Salzlösungen, die vorzugsweise bei einem physiologischen pH-Wert gepuffert sind (wie phosphatgepufferte Salzlösung oder Tris-gepufferte Salzlösung), Mannit, Dextrose, Glycerin und Ethanol sowie Polypeptide oder ein Protein wie menschliches Serumalbumin ein. Zum Beispiel umfassen solche Formulierungen das gemäß der erfindungsgemäßen Verwendung hergestellte Arzneimittel in 10 mg/ml Mannit, 1 mg/ml HSA, 20 mM Tris, pH 7,2, und 150 mM NaCl.

[0035] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, umfassend mindestens eine Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, wie vorstehend beschrieben, und mindestens ein Adjuvans, das in der Lage ist, die Transfektionskapazität der Nucleinsäure (nackt oder nicht nackt) oder die Genexpression in der Zelle zu verbessern. Ein solches Adjuvans kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Chloroquin, protischen Verbindungen wie Propylenglykol, Polyethylenglykol, Glycerin, Ethanol, 1-Methyl-L-2-pyrrolidon oder Derivate davon sowie aprotischen Verbindungen wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Diethylsulfoxid, Di-n-propylsulfoxid, Dimethylsulfon, Sulfolan, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, Tetramethylharnstoff, Acetonitril oder Derivate davon. Die Zusammensetzung kann auch vorteilhafterweise eine Quelle für ein Cytokin umfassen, das in Form eines Polypeptids oder als ein das Cytokin codierendes Polynucleotid eingebracht wird. Vorzugsweise ist das Cytokin Interleukin-10 (IL-10) (EP-A-967 289). Das Arzneimittel kann ferner einen Nuclease-Inhibitor wie G-Actin oder spezifische Magnesium- oder Lithiumkonzentrationen umfassen.

[0036] Die Erfindung betrifft ferner eine Wirtszelle, die mit einer Nucleinsäure transformiert ist, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist. Die Wirtszelle ist vorzugsweise eine Säugerzelle und mehr bevorzugt eine menschliche Muskelzelle. Diese Zelle kann aus verschiedenen Geweben stammen, einschließlich solchen von Muskel, Haut, Nase, Lunge, Leber, Milz, Knochenmark, Thymus, Herz, Lymphe, Knochen, Knorpel, Bauchspeicheldrüse, Niere, Gallenblase, Magen, Darm, Hoden, Eierstock, Gebärmutter, Enddarm, Nervensystem, Auge, Drüsen, Bindegewebe, Blut, Tumoren, etc.

[0037] Erfindungsgemäß verweist "transformiert" auf entweder eine Transfektion oder eine Infektion und allgemeiner auf einen Transferschritt, der die Einschleusung der Nucleinsäure in die Wirtszelle zur Folge hat. Der Transferschritt kann durch irgendeinen einer großen Vielzahl von Wegen ausgeführt werden, einschließlich eines Verfahrens ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Adenovirus-Infektion, Transfektion mit Nucleinsäure beschichteten Partikeln wie Lipoplexe (kationisches Lipid/Nucleinsäure-Komplexe) oder Polyplexe (kationisches Polymer/Nucleinsäure-Komplexe) oder dergleichen, Calciumphosphat-Transfektion eines Plasmids, Transfektion mit einer nackten Nucleinsäure, einem Elektroporationsverfahren oder einer Kombination davon. Jedoch ist das einzelne Verfahren zur Einschleusung der fremden Nucleinsäuresequenz für die Erfindung nicht entscheidend.

[0038] Gemäß einer spezifischen Ausführungsform ist die transformierte Wirtszelle außerdem eine menschliche Muskelzelle, die weiterhin eingekapselt ist. Die Zelleinkapselungsmethode ist bereits beschrieben worden. Sie ermöglicht die Transplantation von eingekapselten Zellen bei der Behandlung der Parkinson-Krankheit (Tresco et al., *ASAIO J.* 38 (1992), 17–23) oder amyotropher lateraler Sklerose (Aebischer et al., *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 851–860). Gemäß dieser spezifischen Ausführungsform werden transformierte Zellen durch Verbindungen eingekapselt, die eine mikroporöse Membran bilden, und die eingekapselten Zellen können weiterhin in vivo implantiert werden. Kapseln, zum Beispiel mit einer Länge von ungefähr 1 cm, welche die Zellen von Interesse enthalten, können unter Verwendung einer hohlen mikroporösen Membran, hergestellt aus Polyethersulfon (PES) (Akzo Nobel Faser AG, Wuppertal, Deutschland; Déglon et al., *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 2135–2146), hergestellt werden. Diese Membran weist einen Molekulargewichtsausschluss von größer als 1.000.000 Da auf, was den freien Durchgang von Proteinen und Nährstoffen zwischen dem Innenraum und

der Außenseite der Kapsel ermöglicht, während der Kontakt von transplantierten Zellen mit den Wirtszellen verhindert wird. Die eingeschlossenen Zellen können durch intradermale, subdermale, intravenöse, intramuskuläre, intranasale, intracerebrale, intratracheale, intraarterielle, intraperitoneale, intravesikuläre, intrapleurale, intrakoronare oder intratumorale Wege implantiert werden. In dem Fall, in dem die transformierte Wirtszelle ein Myoblast ist, kann diese von der Injektionsstelle zu den Muskeln wandern, wo die Expression von Beta-Interferon erfolgen kann.

[0039] Obwohl die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen und spezifische Beispiele beschrieben worden ist, ist ein Fachmann nach der Lektüre der vorstehenden Beschreibung in der Lage, verschiedene Veränderungen, Substitutionen von Äquivalenten und andere Änderungen bei den hierin dargelegten Verfahren und erzeugten Zellen vorzunehmen. Es ist daher beabsichtigt, daß der hierauf beanspruchte Schutz nur durch die Definition begrenzt wird, die in den beigefügten Patentansprüchen enthalten ist.

[0040] Diese und andere Ausführungsformen sind offenbart und werden aus der Beschreibung und den Beispielen der vorliegenden Erfindung offensichtlich und sind darin umfaßt. Weitergehende Literatur, die eines) der Verfahren, Verwendungen und Verbindungen zur Verwendung im Einklang mit der vorliegenden Erfindung betrifft, kann aus öffentlichen Bibliotheken, zum Beispiel unter Verwendung von elektronischen Einrichtungen, wieder beschafft werden. Zum Beispiel kann die öffentliche Datenbank "Medline" verwendet werden, die über das Internet, z. B. unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>, zugänglich ist. Weitere Datenbanken und Adressen wie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.infobiogen.fr>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html oder <http://www.tigr.org> sind dem Fachmann bekannt und können auch z. B. unter Verwendung von <http://www.lycos.com> erhalten werden. Ein Überblick über Patentinformationen in der Biotechnologie und eine Übersicht über relevante Quellen für Patentinformationen, die für eine rückblickende Suche und für das gegenwärtige Bewußtsein nützlich sind, ist bei Berks, TIBTECH 12 (1994), 352–364, angegeben.

[0041] Die Erfindung ist in einer illustrativen Weise beschrieben worden, und es ist selbstverständlich, daß die Terminologie, die verwendet worden ist, in der Art von beschreibenden Worten anstatt als Begrenzung gedacht ist. Es ist offensichtlich, daß viele Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung im Hinblick auf die vorstehenden Lehren möglich sind.

Erklärung der Zeichnungen

[0042] **Fig. 1** zeigt die Menge an menschlichem IFN- β (Hu IFN- β), die in den Kulturmedien der transformierten Zellen gefunden wurde. Die Balken sind Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) aus vier Bestimmungen. D1, 2, 3, 6: Tage nach der Transfektion.

[0043] **Fig. 2:** Nachweis von menschlichem IFN- β in dem Blut von Mäusen, denen pTG13102 injiziert wurde. Die Balken sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Bestimmungen (3 Mäuse pro Gruppe). Weiße Balken: Nach Injektion des in 0,9% NaCl hergestellten Plasmids. Schwarze Balken: Nach Verabreichung des Plasmids mit Adjuvantien, wie im Text beschrieben. A: Injektionen in SCID-Mäuse. B: in immunkompetente C57BL/10-Mäuse.

[0044] **Fig. 3:** Die Behandlung mit einem Maus-IFN- β -Plasmid beugt vor klinischen Symptomen einer EAE vor. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Durchgezogene Linie/Einkerbungen: klinische Beurteilungen; gestrichelte Linie/Kreise: Körpergewicht. Ausgefüllte Symbole: Mäuse behandelt mit pTG13114. Unausgefüllte Symbole: Mäuse nicht mit pTG13114 behandelt.

[0045] **Fig. 4:** Die Behandlung mit einem Maus-IFN- β -Plasmid beugt vor klinischen Symptomen einer EAE vor. Die Ergebnisse werden über 50 Tage gemessen. Quadrate: klinische Beurteilungen; Kreise: Körpergewicht. Unausgefüllte Markierungen: unbehandelte immunisierte Mäuse. Vollständig schwarze Markierungen: mit dem pCMV-Maus-IFN-beta-Plasmid behandelte immunisierte Mäuse. Die Daten sind Mittelwerte von 3 Mäusen pro Gruppe, täglich protokolliert.

[0046] **Fig. 5:** Die Behandlung mit pCMV-Maus-IFN-beta schützt vor EAE. Kreise: kumulierte klinische Beurteilungen; Dreiecke: Körpergewicht. Unausgefüllte Markierungen: Kontrolle. Vollständig schwarze Markierungen: mit Maus-IFN-beta-Plasmid-(pTG13114) behandelte Mäuse. Die Daten sind Mittelwerte aus drei (Kontroll-Mäuse) oder vier (mit pTG13114 behandelte Mäuse) Bestimmungen.

Beispiele

Beispiel 1: Konstruktion und Wirksamkeit eines Plasmids, das menschliches IFN- β codiert

[0047] Das Gerüstplasmid pTG11022 ist bei Braun et al., FEBS Letters 454 (1999), 277–282, beschrieben. Es ist ein *E. coli*-Plasmid, das auf dem ColE1-Replikationsursprung basiert. Es enthält das Kanamycin-Resistenzgen, das Maus-HMGCR-Intron und den menschlichen Cytomegalievirus-IE1-Promotor (aus pCEP4, InVirogen, Abingdon, GB).

[0048] Die menschliche IFN- β -cDNA wurde mittels PCR-Amplifikation einer menschlichen DNA, die aus der menschlichen T-Zelllinie CEM A 3.01 (NIH Research and Reference Reagent Program, # 166) extrahiert worden war, erhalten und sequenziert. Es wurde bestätigt, daß die Aminosäuresequenz davon eine Ähnlichkeit mit der veröffentlichten Sequenz aufweist (Tanigushi et al., 1980, a. a. O.). Die Expressionskassette wurde aus einem dazwischengeschalteten Plasmid, M13TG2449, erhalten. Das Gerüstplasmid pTG11022 wurde mit PvuII geschnitten. M13TG2449 wurde mit SmaI und EcoRV geschnitten. Die gereinigte, 605 bp große IFN- β -Insertion wurde in das geöffnete pTG11022 ligiert, wobei das endgültige Plasmid, bezeichnet als pTG13102, erhalten wurde. Die Orientierung wurde mittels PstI-Verdau und einer Gelelektrophorese auf 1%iger Agarose überprüft.

[0049] Das Plasmid pTG13102 wurde in dem *E. coli*-Stamm MC1061 durch eine Übernachtskultur in LB-Medium amplifiziert und durch eine zweifache Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation nach alkalischer Lyse gemäß den Standardtechniken (vgl. Sambrook et al., 1989, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) gereinigt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 0,9% NaCl + Lösung auf 1 mg/ml konzentriert.

In vitro-Wirksamkeit

[0050] Die Expression des menschlichen IFN- β wurde in dem Kulturüberstand der Maus-Myoblastenzelllinie C2C12 (ATCC CRL-1772) nach einer Calciumphosphat-Transfektion mit pTG13102 gemessen. Die Calciumphosphat-Transfektion wurde gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt. Die IFN- β -Freisetzung in das Kulturmedium wurde bis zu 6 Tage nach der Transfektion mit pTG13102 regelmäßig gemessen.

[0051] Zu diesem Zweck wurden 15 μ g pTG13102-Plasmid in Platten mit 6 Vertiefungen transfiziert, die mit 10^5 C2C12-Zellen/Vertiefung, gezüchtet in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), enthaltend 10% fötales Kälberserum, beimpft worden waren. Vier Vertiefungen wurden mit pTG13102 transfiziert und zwei Vertiefungen mit pTG11033, einem auf pTG11022 basierenden Plasmid mit einer Leuchtkäfer-Luciferase-Expressionskassette (das Plasmid wurde als negative Kontrolle für IFN- β verwendet). Das Kulturmedium wurde gesammelt und für die IFN- β -Messung eingefroren und durch frisches Medium ersetzt. Die Gewinnung des Mediums erfolgte bei Tag 0 (direkt vor der Transfektion; dies entspricht der Kontrolle aus nicht-transfizierten Zellen), 24 h nach der Transfektion, 48 h nach der Transfektion (dies entspricht einem Sekretionszeitraum von 24 h zwischen Tag + 1 und Tag + 2, da das Kulturmedium bei 24 h ersetzt wurde), 3 Tage nach der Transfektion (Sekretionszeitraum von 24 h zwischen Tag + 2 und Tag + 3) und 6 Tage nach der Transfektion (Sekretionszeitraum von 3 Tagen zwischen Tag + 3 und Tag + 6). Der Gehalt an menschlichem IFN- β in dem Kulturmedium wurde unter Verwendung eines ELISA-Kits für den Nachweis von menschlichem IFN- β (Fujirebio, Tokio, Japan) gemessen und als IU/ml ausgedrückt ([Fig. 1](#)).

[0052] In den zwei Überständen (zwei verwendete Vertiefungen) der Zellen, die mit pTG11033 (dem als Kontrolle verwendeten irrelevanten Plasmid) transfiziert worden waren, und in dem Kulturmedium, das vor der Transfektion (bei Tag 0) gesammelt worden war, wurde kein menschliches IFN- β nachgewiesen.

Überprüfung der biologischen Aktivität des hergestellten menschlichen IFN- β

[0053] Die biologische Aktivität des menschlichen IFN- β wurde mittels eines herkömmlichen Tests auf einen Cytopathischen Effekt (CPE) untersucht. Das Prinzip des Tests basiert auf der antiviralen Aktivität von Interferonen. Die Messungen werden mit Verdünnungsreihen der gesammelten Kulturmedien aus Plasmidtransfizierten C2C12-Kulturen durchgeführt. Die Verdünnungen werden mit menschlichen amniotischen WISH-Zellen inkubiert, die mit dem vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) infiziert worden sind. Der cytopathische Effekt des VSV führt zum Zelltod, der durch eine mikroskopische Beurteilung nachgewiesen wird. Die Menge an menschlichem IFN- β wird aus der Verdünnung der Testprobe, die 50% der Zellen vor dem durch VSV induzierten Tod schützt, bestimmt (z. B. eine 10fache Verdünnung = 10 IU/ml). Standardkontrollen waren das menschliche

IFN- β -NIH und der menschliche IFN- β -Standard des ELISA-Kits von Fujirebio.

[0054] Zu diesem Zweck wurden WISH-Zellen in DMEM + 10% FCS in Platten mit 96 Vertiefungen überimpft (5×10^4 Zellen/Vertiefung). Verdünnungsreihen des menschlichen IFN- β -Standards oder der zu testenden C2C12-Kulturmedien wurden in DMEM + 10% FCS hergestellt und unmittelbar nach dem Überimpfen zu den WISH-Zellen zugegeben (Vertiefungen in doppelter Ausfertigung). Die Zellen wurden dann mit VSV infiziert (MOI = 2; entsprechend 2 viralen infektiösen Einheiten pro Zelle). Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde 24 h nach der Infektion beurteilt.

[0055] Tabelle I zeigt einen Vergleich der ELISA/CPE-IFN- β -Titer von C2C12-Proben.

Tabelle I
Überstände von C2C12-Kulturen, transfiziert mit pTG13102 (pCMV-IFN- β)

Probe	Gemessen mittels ELISA	Gemessen mittels CPE
Tag 0 (negative Kontrolle)	0	< 1,5
Tag 1 nach der Transfektion	47324	63100 +/- 3000
Tag 3 nach der Transfektion	6404	8000 +/- 1610

[0056] Anmerkung: +/- ist keine Standardabweichung, sondern bezieht sich auf den verwendeten Verdünnungsfaktor.

[0057] Die IFN-Titer waren zwischen den ELISA- und CPE-Tests äquivalent, was zeigt, daß das menschliche IFN- β -pTG13102-Plasmid die Herstellung eines biologisch funktionellen IFN- β ermöglichte.

Expression von IFN- β nach intramuskulärer Injektion des pTG13102-Plasmids (pCMV-menschliches IFN- β) in Mäuse

[0058] Das Plasmid pTG13102 wurde in 6–8 Wochen alte C57Bl/10- und SCID-Mäuse injiziert ($4 \times 25 \mu\text{g}$ Plasmid in die rechten und linken Tibialis- und Quadrizepsmuskeln). Die Muskeln wurden 3 Tage vor der Plasmidverabreichung durch die Injektion von 3 ng/25 μl Notexin behandelt, um eine Muskelregeneration zu induzieren (welche auf die durch Notexin induzierte Nekrose folgt). pTG13102 wurde entweder in 0,9% NaCl allein oder in 0,9% NaCl plus 10 μg G-Actin, 0,1 mM MgCl_2 und 10% DMSO, Endkonzentration, zubereitet. Das Plasmid-Injektionsvolumen betrug 35 μl .

[0059] Aus den Maus-Blutproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Plasmidinjektion gesammelt worden waren, wurden die Seren gewonnen. Die Kontrollseren entsprachen den Proben, die bei Tag 0 vor der Plasmidinjektion gesammelt worden waren, oder den Proben von Mäusen, denen kein pTG13102 injiziert worden war.

[0060] Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten getötet (7 und 14 Tage nach der Plasmidinjektion), und die per Injektion behandelten Muskeln wurden gewonnen und eingefroren. Die eingefrorenen Muskeln wurden in PBS-Puffer zermahlen (600 μl und 400 μl Volumen für Tibialis bzw. Quadrizeps). Die Zubereitungen wurden zentrifugiert, und Aliquots der Überstände wurden für eine hIFN- β -Messung (unter Verwendung des ELISA-Kits von Fujirebio) verwendet.

[0061] Die in [Fig. 2](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß nachweisbare menschliche IFN- β -Spiegel nach der direkten intramuskulären Injektion der Plasmidzubereitungen erhalten werden können.

[0062] Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, wurde menschliches IFN- β für mindestens 2 Wochen in den Seren von sowohl SCID- ([Fig. 2A](#)) als auch C57BL/10-Mäusen ([Fig. 2B](#)) nachgewiesen. Ähnliche Blutspiegel von menschlichem IFN- β wurden sowohl bei SCID- als auch immunkompetenten C57BL/10-Mäusen gefunden.

[0063] Weder in dem Blut der Kontrollmäuse, die keine Injektion erhielten, noch in den bei Tag 0 gesammelten Blutproben der Mäuse, denen das Plasmid injiziert worden war, wurde menschliches IFN- β nachgewiesen.

[0064] Tabelle II zeigt die menschlichen IFN- β -Spiegel, die in den Muskeln und in dem Serum jeder einzelnen

Maus gemessen wurden.

Maus # (Tag nach d. Injektion)	Injektion	UI/ Muskel				UI/ ml Serum	
		TA links	TA rechts	Q rechts	Q links	Tag 7	Tag 14
SCID							
1	pTG13102	5	4	1,2		0,3	
2	pTG13102	1	2			0,15	
3	pTG13102	8	1			0,35	
(Tag 7)	Mittelwert	4,67	2,33	1,20		0,27	
	Standardabweichung	2,03	0,88			0,06	
4	pTG13102 + Adjunvanzien	27	36	1,02		2,3	
5	pTG13102 + Adjunvanzien	0	24		3,9	3,4	
6	pTG13102 + Adjunvanzien	23	11		1,2	1	
(Tag 7)	Mittelwert	16,67	23,67	1,02	2,55	2,23	
	Standardabweichung	8,41	7,22			0,69	
7	pTG13102 + Adjunvanzien	6	36	1		3,6	1,33
8	pTG13102 + Adjunvanzien	9	2			0,6	0,35
9	pTG13102 + Adjunvanzien	20	0	0	1,62	1,6	0,9
(Tag 14)	Mittelwert	11,67	12,67	0,50	1,62	1,93	0,86
	Standardabweichung	4,26	11,68			0,88	0,28
C57BL10							
13	pTG13102 + Adjunvanzien	9	7			1,2	
14	pTG13102 + Adjunvanzien	0	22			3,3	
15	pTG13102 + Adjunvanzien	47	4			1,5	
(Tag 7)	Mittelwert	18,67	11,00			2,00	
	Standardabweichung	14,40	5,57			0,66	
16	pTG13102 + Adjunvanzien	17	69	2,1		15	5,7
17	pTG13102 + Adjunvanzien	18	0			1,5	1,4
18	pTG13102 + Adjunvanzien	0	1			0,3	0
(Tag 14)	Mittelwert	11,67	23,33	2,10		5,60	2,37
	Standardabweichung	5,84	22,84			4,71	1,71
	Muskel ohne Injektion	0	0				
	Muskel ohne Injektion	0	0				
	Mittelwert	0	0				
	Standardabweichung	0	0				

[0065] Es ist eine gute Korrelation hinsichtlich der menschlichen IFN- β -Spiegel zwischen den per Injektion behandelten Muskeln und den entsprechenden Seren zu beobachten.

Beispiel 2: Gentherapie an einem EAE-Mausmodell durch intramuskuläre Verabreichung eines Maus-IFN- β -Plasmids

Konstruktion eines Maus-IFN- β -Plasmids

[0066] Die codierende Sequenz der Maus-IFN- β -cDNA (Higashi et al., The Journal of Biological Chemistry 258 (1983), 9522–9529) weist eine Homologie von 63% auf der Nucleotidebene und von 48% auf der Aminosäureebene mit der menschlichen IFN- β -cDNA auf (Tanigushi et al., 1980, a. a. O.). Die ersten 21 Aminosäuren werden als die Signalsequenz angesehen. Diese wurde aus dem Plasmid pM β 3 (Maus-IFN- β -cDNA inseriert in ein pBR322-Plasmid; Higashi et al., 1983, a. a. O.) erhalten.

[0067] Das konstruierte Plasmid mit der Bezeichnung pTG13114 ist identisch mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Vektor, außer daß hierin die Maus-IFN- β -cDNA enthalten ist.

In vitro-Wirksamkeit von pTG13114

[0068] Das pCMV-Maus-IFN- β -Plasmid wurde durch einen ähnlichen Ansatz, so wie in Beispiel 1 beschrie-

ben, mittels Calciumphosphat transfizierten C2C12-Zellen bewertet. Die Menge des in das Kulturmedium freigesetzten Maus-IFN- β wurde bis zu 6 Tage nach der Transfektion mit pTG13114 regelmäßig gemessen. 15 μ g Plasmid wurden in Platten mit 6 Vertiefungen transfiziert, die mit 10^5 Zellen/Vertiefung, gezüchtet in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), enthaltend 10% fötales Kälberserum, beimpft worden waren.

[0069] Die Menge an Maus-IFN- β wurde mittels eines CPE-Tests unter Verwendung von Maus-3T3-Fibroblastenzellen gemessen, die in DMEM + 10% FCS in Platten mit 96 Vertiefungen gezüchtet und mit VSV (MOI = 0,3) infiziert wurden. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde 48 h nach der Infektion beurteilt.

Tabelle III: Maus-IFN- β -Spiegel von Kulturüberständen nach einer Transfektion oder Transduktion

Vektoren	Zeitraum nach der Transfektion/Transduktion	IFN- β (IU/ml)
Plasmid pTG13114	24 h	$4,5 \times 10^5$

	48 h	$2,2 \times 10^5$
	96 h	$5,6 \times 10^4$
Kontrolle	24 h	Nicht nachgewiesen

[0070] Die Tabelle zeigt, daß nach der in vitro-Transfektion eine hohe Maus-IFN-Expression erhalten wurde. Gemäß dem CPE-Test ist das hergestellte Protein biologisch aktiv.

Gentherapie von EAE

[0071] Die Experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) bei Mäusen und Ratten weist klinische und immunologische Übereinstimmungen mit der Erkrankung beim Menschen auf und diente daher als wichtigstes experimentelles Ersatzmodell für multiple Sklerose. Sie kann durch die Injektion des basischen Myelinproteins (MBP) oder des Proteolipids (PLP), die ein Hauptbestandteil von Myelin sind, oder von Peptiden solcher Komponenten, emulgiert in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA), und abgetöteter Zellen von Mycobacterium tuberculosis hervorgerufen werden.

[0072] Es ist gezeigt worden, daß das wichtigste pathologische Merkmal einer akuten EAE eine perivaskuläre Entzündung in Verbindung mit einer begrenzten Demyelinisierung ist. Eine akute EAE ist vergleichbar mit einer Verschlechterung der multiplen Sklerose und erlaubt die Untersuchung der Mechanismen, die für das Auftreten von klinischen Symptomen verantwortlich sind, sowie von möglichen Behandlungen für multiple Sklerose.

[0073] Die bei Tieren beobachteten klinischen Symptome werden im Allgemeinen durch Etablierung einer Skala im Bereich von 0 bis 6 beurteilt, wobei: 0 = keine Schwäche; 1 = Schwäche im distalen Teil des Schwanzes; 2 = Lähmung des gesamten Schwanzes; 2 = leichte Lähmung einer oder von beiden hinteren Gliedmaßen; 3 = mäßige Paraparese oder schwere Ataxie; 4 = schwere Paraparese; 5 = totale schlaffe Paraplegie mit Inkontinenz; und 6 = im Sterben liegend.

[0074] Eines der charakteristischen Merkmale von EAE ist der progressive Gewichtsverlust während der klinischen Phase der Erkrankung, der sich rasch umkehrt, wenn sich die Tiere erholen. Im Allgemeinen ist eine gute Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Größenordnung der Gewichtsreduktion zu beobachten.

[0075] Die Erfinder wählten das EAE-Tiermodell aufgrund von veröffentlichten Daten aus, die zeigen, daß die Tiere auf rekombinantes IFN- β ansprachen (Yu et al., J. Neuroimmunol. 64 (1996), 90–100).

Induktion von EAE

[0076] Insgesamt erhielten 6 weibliche SJL (H-2^s)-Mäuse (IFFA CREDO, Frankreich) mit einem Alter > 8 Wochen eine subkutane Injektion mit dem PLP 139–151-Peptid. Das Antigen wurde in 10%iger Essigsäure und dann in Wasser (50/50) gelöst. Die Peptidlösung wurde mit CFA emulgiert, das zusammen mit 4 mg/ml Myco-

bacterium tuberculosis (H37Ra) zugegeben wurde (Peptidkonzentration: 0,5 mg/ml).

[0077] Eine Lösung des Pertussistoxins (1 µg/ml PBS, 0,15 M, pH 7,2) wurde am Tag 0 und 3 nach der Immunisierung intravenös (300 µl) injiziert.

Klinische Beobachtungen

[0078] Die Mäuse wurden täglich sowohl im Hinblick auf das Körpergewicht als auch auf klinische Symptome unter Verwendung der folgenden Skala begutachtet: 0 = keine Schwäche; 0,5 = nur Schwäche des distalen Teils des Schwanzes; 1 = Lähmung des gesamten Schwanzes; 2 = leichte Paraparese einer oder von beiden hinteren Gliedmaßen; 3 = mäßige Paraparese oder schwere Ataxie; 4 = schwere Paraparese; 5 = totale schlaffe Paraplegie mit Inkontinenz; 6 = im Sterben liegend.

pCMV-IFN-β-Behandlung

[0079] Eine Gruppe von 3 Mäusen erhielt intramuskuläre Injektionen mit pTG13114 (pCMV-Maus-IFN-β), hergestellt in 0,9% NaCl, ergänzt mit 1 mM (Endkonzentration) MgCl₂, in sowohl die rechten als auch linken Tibialis anterior- und Quadrizeps-Muskeln (mit 30 µg bzw. 60 µg Plasmid). Am Tag 4 wurde die einer Injektion unterzogenen Mäuse mit 3 ng/25 µl Notexin behandelt. Am Tag 7 erhielten die Mäuse eine neue Serie von Plasmidinjektionen, so wie vorstehend beschrieben. Die restlichen 3 Mäuse wurden nicht mit pTG13114 behandelt.

[0080] Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) dargestellt. Die mit pTG13114 behandelten Mäuse zeigten kein Anzeichen einer EAE. Die anfängliche Abnahme des Körpergewichts ist höchstwahrscheinlich die Folge der Pertussistoxin-Intoxikation. In dieser Gruppe von Mäusen wurde kein weiterer Gewichtsverlust beobachtet, während bei den EAE-Mäusen, die nicht mit pTG13114 behandelt worden waren, der typische Gewichtsverlust beobachtet wurde.

[0081] Die behandelten Tiere wurden bis zu 50 Tage nach der Immunisierung beobachtet. Die Daten sind in [Fig. 4](#) dargestellt und zeigen, daß keine klinischen Symptome einer Lähmung bei den Tieren beobachtet wurden, die mit dem Maus-IFN-beta-Plasmid behandelt worden waren, während die unbehandelten immunisierten Mäuse zwei hinreichend charakterisierte (klinische Beurteilungen und Körpergewicht) Rückfälle zeigten.

Beispiel 3

Genbehandlung von EAE

(i) Die Induktion der EAE erfolgte, wie in Beispiel 2 beschrieben

[0082] Weibliche SJL (H-2^s)-Mäuse (IFFA CREDO, Frankreich) mit einem Alter > 8 Wochen erhielten eine subkutane Injektion mit dem PLP 139-151-Peptid. Das Antigen wurde in 10%iger Essigsäure und dann in Wasser (50/50) gelöst. Die Peptidlösung wurde mit CFA emulgiert, das zusammen mit 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) zugegeben wurde (Peptidkonzentration: 0,5 mg/ml).

[0083] Eine Lösung des Pertussistoxins (1 µg/ml PBS, 0,15 M, pH 7,2) wurde am Tag 0 und 3 nach der Immunisierung intravenös (300 µl) injiziert.

(ii) Behandlung mit Plasmiden

[0084] 5 Tage vor der Immunisierung erhielten die Mäuse intramuskuläre Injektionen mit 3 ng/25 µl Notexin in sowohl die rechten als auch linken Tibialis anterior- und Quadrizeps-Muskeln. Die Behandlung umfaßte zwei aufeinanderfolgende Injektionen (48 h bzw. 24 h vor der Immunisierung) mit 75 µg/30 µl und 125 µg/50 µl von entweder pTG13114 (pCMV-Maus-IFN-beta) oder pTG11022 (leeres Plasmid), hergestellt in 0,9% NaCl, ergänzt mit 1 mM (Endkonzentration) MgCl₂, in die rechten und linken Tibialis anterior- bzw. Quadrizeps-Muskeln.

[0085] Die Mäuse wurden in 3 Gruppen eingeteilt:

- Kontroll-EAE-Mäuse (immunisiert, aber keine Injektion mit dem Plasmid) (6 Mäuse)
- Plasmid-IFN (immunisiert, behandelt mit pTG13114) (5 Mäuse)
- Leeres Plasmid (immunisiert, behandelt mit pTG11022) (6 Mäuse)

[0086] Die Parameter waren das Körpergewicht und die kumulierten klinischen Beurteilungen (Addition der täglich protokollierten klinischen Beurteilungen pro Maus).

[0087] Wie in [Fig. 5](#) dargestellt, zeigten die mit Plasmid-IFN (pTG13114) behandelten Mäuse im Hinblick auf die beschriebenen Zustände eine Verringerung der Symptome und eine geringe Verzögerung des Ausbruchs der EAE. 5 von 6 Mäusen der Gruppe mit dem leeren Plasmid erlagen wahrscheinlich der Krankheit, da sie alle am Tag 9 nach der Immunisierung starben. Wenn ein früher Tod eintritt, steht dies mit dem folgenschweren Immunisierungsverfahren in Beziehung (besonders der Pertussistoxin-Intoxikation, die benutzt wurde, um die Hirn-Blut-Schranke zu überwinden). In der Kontroll-EAE-Gruppe starben 3 Mäuse, während nur eine Maus in der mit Plasmid-IFN behandelten Gruppe starb, was auf einen vorteilhaften Einfluß der Behandlung mit dem Plasmid-IFN hinweist.

[0088] Die mit pTG13114 behandelten Mäuse zeigten einen viel besseren Zustand als die anderen zwei Gruppen: ein schönes, glänzendes Fell bei der mit pTG13114 behandelten Gruppe gegenüber einem struppigen Fell (Anzeichen für einen unnormalen erkrankten Zustand) in den zwei anderen Gruppen (unbehandelte und mit dem leeren Plasmid behandelte Gruppen).

[0089] In diesem Beispiel war die Auswirkung auf das Körpergewicht mäßiggroß.

Sequenzprotokoll

<110> Transgene S.A.

<120> Immunerkrankungen

<130> E 1241 EP

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1           5           10           15
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
      20           25           30
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
      35           40           45
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
      50           55           60
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
      65           70           75           80
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
      85           90           95
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
      100          105          110
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
      115          120          125
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
      130          135          140
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
      145          150          155          160
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
      165          170          175
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
      180          185

```

<210> 2
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 3
 <211> 564
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60
 tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag 120
 ctctgtggc aattgaatgg gaggcttgaa tattgctca aggacaggat gaactttgac 180
 atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240
 tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300
 aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360
 acagtctgg aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaact catgagcagt 420
 ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480
 cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540
 cttacacggt acctccgaaa ctga 564

Patentansprüche

1. Verwendung einer nackten Nucleinsäure, die zur Expression von Beta-Interferon fähig ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Krankheit ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus multipler Sklerose, subakuter sklerosierender Panencephalomyelitis, metachromatischer Leukodystrophie, ent-

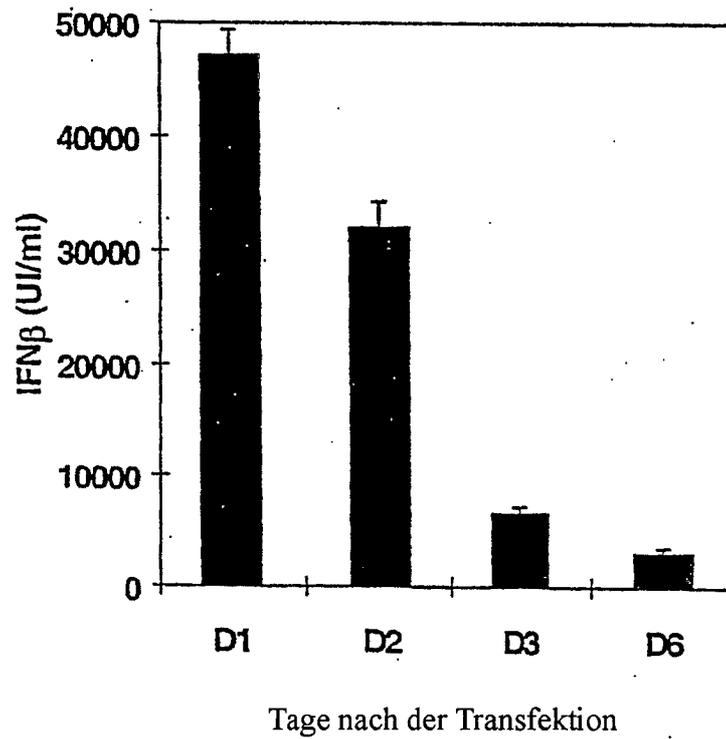
zündlicher demyelinisierender Polyradiculoneuropathie, Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit, Guillain-Barré-Syndrom, systemischem Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis und Polymyositis.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Krankheit multiple Sklerose ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nucleinsäure DNA ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Beta-Interferon menschliches Beta-Interferon ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Beta-Interferon eine sekretorische Signalsequenz umfasst.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Arzneimittel zur Verabreichung per Injektion geeignet ist.

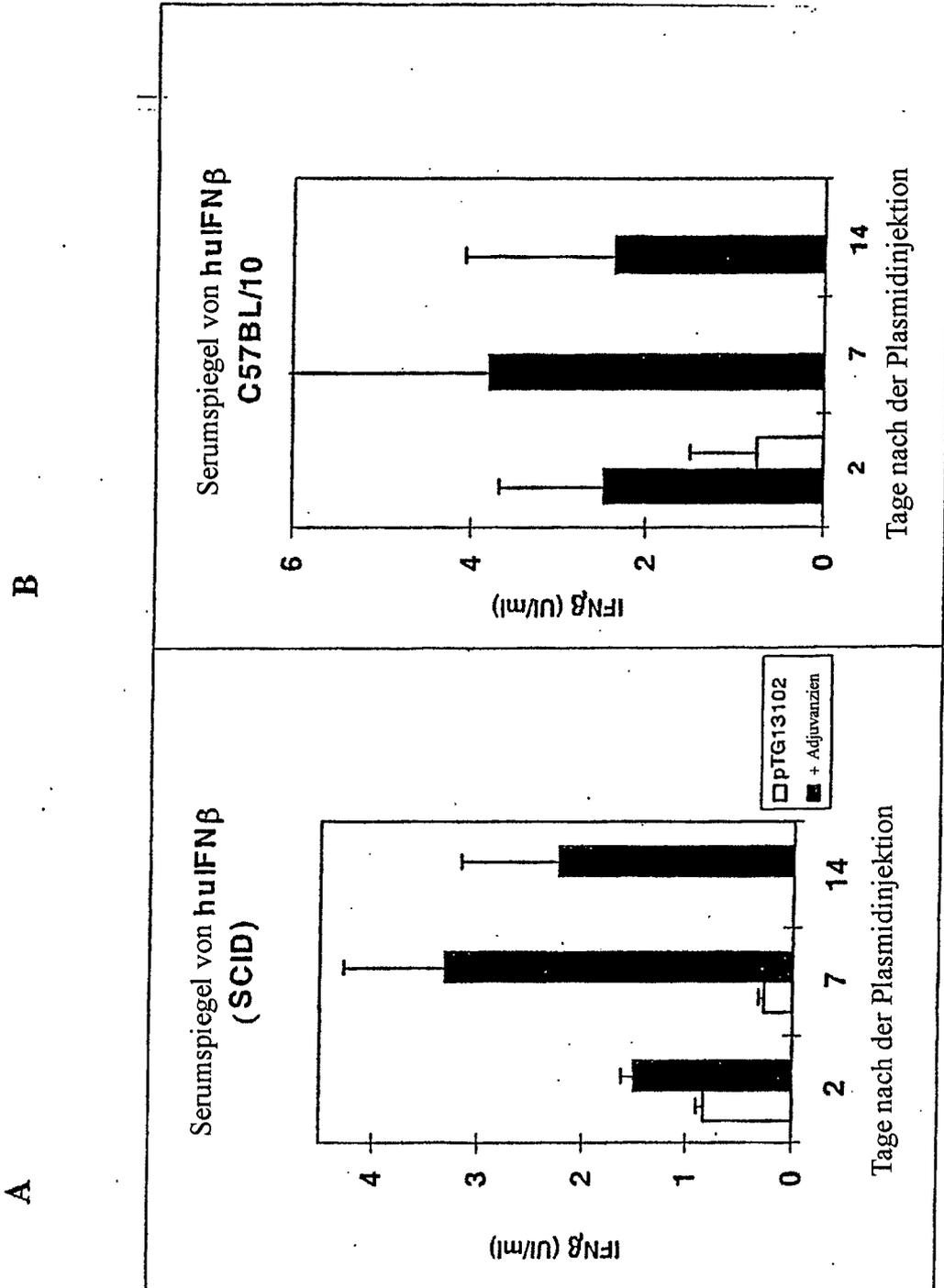
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Figur 1

Kinetik der HuIFN- β -Expression in vitro
(C2C12-Zellen)

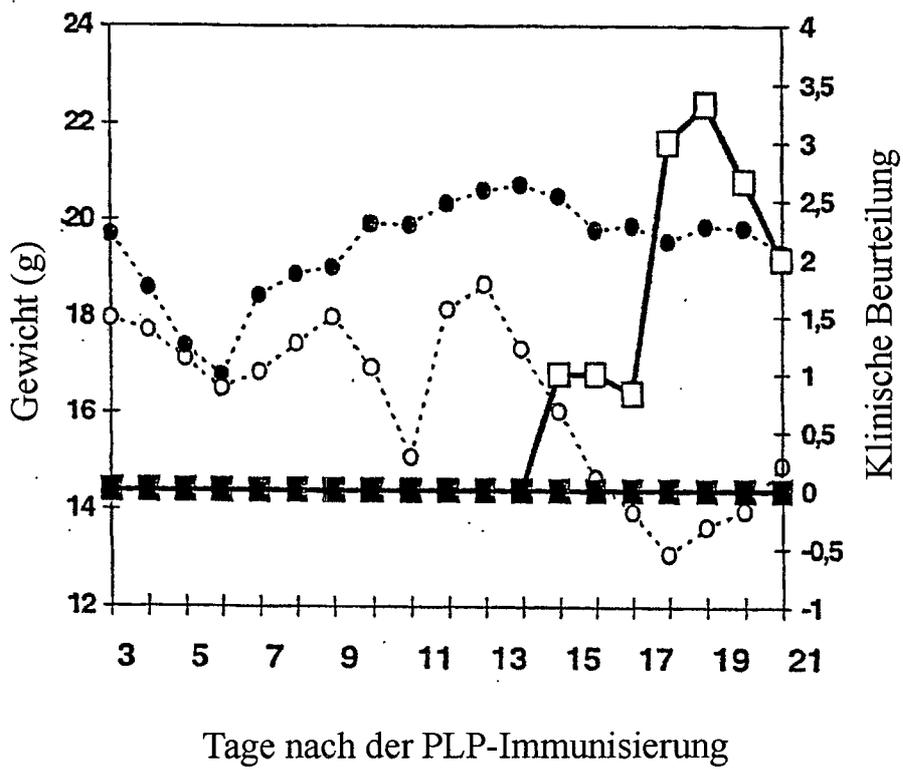


Figur 2

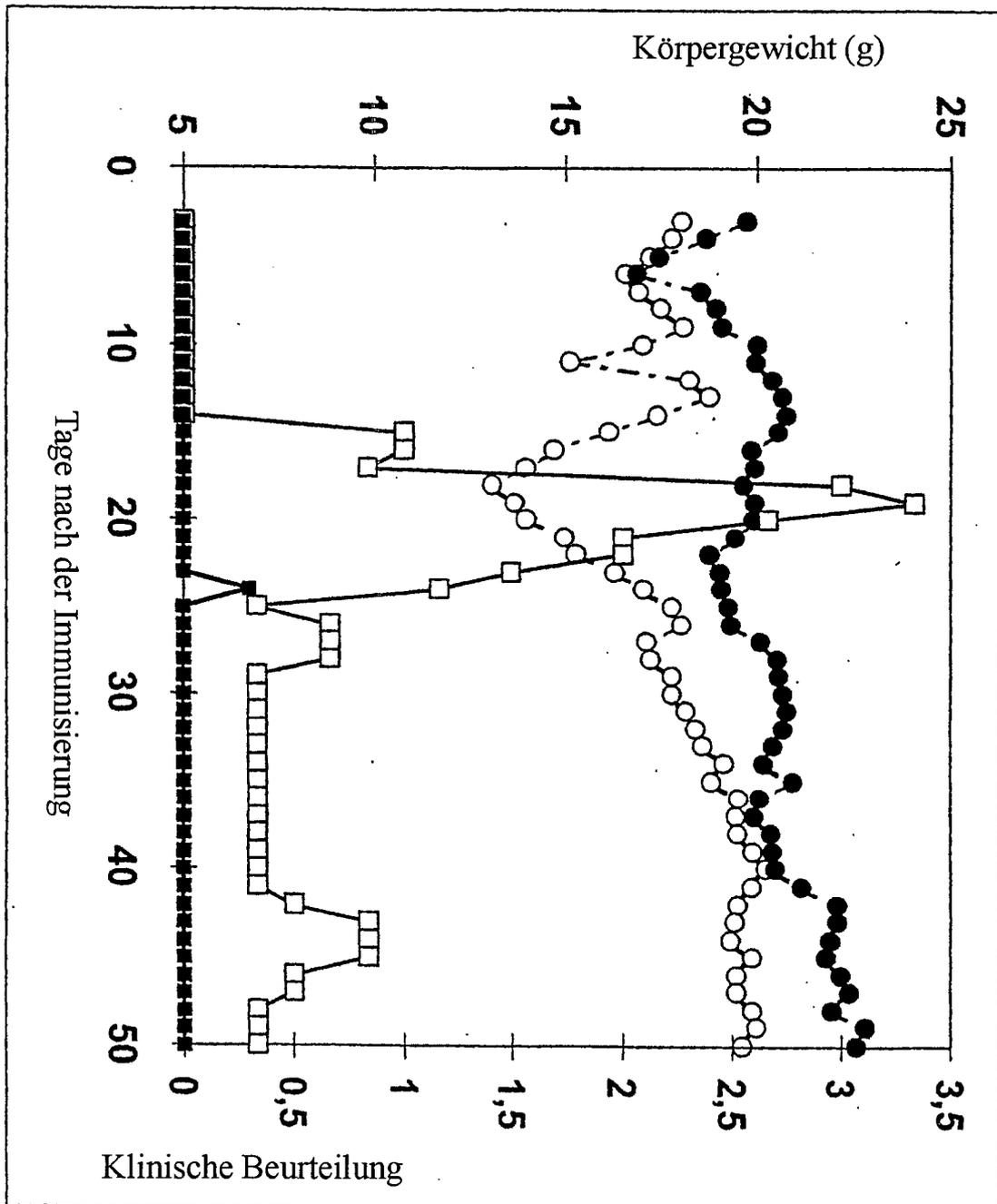


Figur 3

pCMV-IFN- β verhindert eine EAE



Figur 4



Figur 5

Kumulierte klinische Bewertungen
und Körpergewichte

