



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 13 299 T2** 2006.06.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 365 799 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 13 299.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IN01/00018**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 274 060.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/078732**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.02.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.10.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.12.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/00** (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/47 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

**Registrar, Indian Institute of Science, Karnataka,
IN; Indian Immunologicals Ltd., Andhra, IN**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PUNDI, Narasimhan Rangarajan, Bangalore 560
079, Karnataka State, IN; VILLUPPANOOR, Alwar
Srinivasan, Hyderabad 500 019, Andhra Pradesh,
IN; SUBHABRATA, Biswas, Calcutta 700 064, West
Bengal, IN; GUDDETI, Sreenivasa Reddy,
Hyderabad 500 019, Andhra Pradesh, IN**

(54) Bezeichnung: **NEUE VAKZINFORMULIERUNG AUS DNA-VAKZINE-INAKTIVIERTEM VIRUS**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Impfstoffformulierung zur prophylaktischen oder therapeutischen Immunisierung von Wirbeltieren gegen Tollwut. Die Impfstoffzusammensetzung weist ein Minimum an zwei Komponenten auf, wobei eine Komponente einen Desoxyribonucleotid-(DNA-)Impfstoff darstellt, der ein DNA-Molekül umfasst, das für ein Virusoberflächenglykoprotein kodiert, und die andere Komponente aus einer inaktivierten Form des Virus besteht. Die durch die gemeinsame Verabreichung dieser beiden Komponenten induzierte schützende Immunantwort ist besser als jene, die durch alleiniges Verabreichen der einzelnen Komponenten induziert wird. Folglich kann diese Erfindung verwendet werden, um einen Kombinationsimpfstoff zu entwickeln, der aus einem DNA-Impfstoff und einem inaktivierten Virus besteht. In einem weiteren Aspekt kann diese Erfindung verwendet werden, um kostengünstige Impfstoffe auf Basis von inaktivierten Viren zu entwickeln, die eine weitaus geringere Menge des Virus aufweisen, als dies bei ähnlichen Impfstoffen nach dem Stand der Technik gegenwärtig der Fall ist.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Seit Edward Jenner vor mehr als 200 Jahren als Erster eine erfolgreiche Impfstrategie gegen Pocken dokumentiert hat, hat sich die Impfstoffentwicklung stark verändert. Die erste Impfstoffgeneration umfasste die Verwendung von abgeschwächten, inaktivierten oder Lebendpathogenen als Impfstoffe, und diese Impfstoffart trug hauptsächlich dazu bei, dass Krankheiten wie Kinderlähmung, Pocken, etc. ausgerottet wurden. Der rasante Fortschritt in der tierischen Zellkulturtechnologie führte zur Entwicklung von Impfstoffen auf Zellkulturbasis, worin die pathogenen Organismen industriell kultiviert, gereinigt, inaktiviert und als Impfstoffe verwendet wurden. Die Verwendung von Viren auf Basis von Totvakzinen bzw. inaktivierten Impfstoffen bei Krankheiten, wie z.B. Kinderlähmung, Tollwut, Masern, etc., ist weit verbreitet. Bei diesem Impfverfahren wird das Virus dem Immunsystem in nicht-infizierender Form zugeführt, sodass das jeweilige Individuum eine Immunantwort dagegen aufbauen kann. Viren auf Basis von Totvakzinen bzw. inaktivierten Impfstoffen stellen Schutz bereit, indem sie direkt T-Helferzellen und humorale Immunantworten gegen Immunogene des Virus produzieren. Dennoch wird bei dieser Impfform keine zellvermittelte Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) hervorgerufen, da das Virus nicht repliziert oder einen Infektionszyklus durchläuft. In Abwesenheit einer effizienten CTL-Antwort verleihen diese Impfstoffe häufig keinen vollständigen Schutz gegen Pathogene. Ein weiteres Hauptproblem in Zusammenhang mit Impfstoffen auf Basis von Totvakzinen oder inaktivierten Viren liegt in den hohen Herstellungskosten. Obwohl für Krankheiten wie etwa Tollwut mehrere solcher inaktivierten Virusimpfstoffe auf Gewebekulturbasis verfügbar sind, gelten diese Impfstoffe aufgrund der hohen Herstellungskosten des Virus in hohen Titern in vielen Teilen der Welt als unwirtschaftlich, insbesondere in Entwicklungsländern, wo die Nachfrage nach Impfstoffen auf Basis von inaktivierten Viren das Angebot weit übersteigt. Somit liegt ein Hauptnachteil dieser Impfstofftypen in deren hohen Herstellungskosten und der Schwierigkeit, sie in großen Mengen herzustellen. Strategien, die darauf abzielen, die Menge des inaktivierten Virus in der Impfstoffformulierung zu verringern ohne dabei die Impfstoffpotenz zu verschlechtern, können die Herstellungskosten von Impfstoffen auf Basis von inaktivierten Viren verringern. Folglich besteht die Notwendigkeit, neuartige Impfstoffe zu entwickeln, die alle oder einige in Zusammenhang mit Impfstoffen auf Basis von inaktivierten Viren stehenden Nachteile beseitigen können.

[0003] Der Verwendung von Plasmid-DNA als Impfstoff kommt dabei eine wichtige Rolle zu, da diese zu sehr geringen Kosten hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert werden kann. In der von Wolff et al. durchgeführten Ausgangsstudie über "Plasmid- oder Nackt-" DNA-Impfungen in vivo wurde gezeigt, dass die direkte intramuskuläre Impfung von Plasmid-DNA, die für mehrere unterschiedliche Reportergene kodiert, eine Proteinexpression in den Muskelzellen (1) induzieren könnte. Diese Studie lieferte eine gute Grundlage für die Annahme, dass gereinigte, rekombinante Nucleinsäuren ("nackte DNA") in vivo abgegeben werden und eine Proteinexpression steuern können. Diese Beobachtungen wurden in einer Studie von Tang et al. (2) fortgesetzt, worin demonstriert wird, dass Mäuse, denen hGH-kodierende Plasmid-DNA injiziert wurde, Antigen-spezifische Antikörperantworten auslösen konnten. In darauf folgenden Studien zeigten Ulmer et al. (3) und Robinson et al. (4), dass DNA-Impfstoffe Mäuse bzw. Hühner vor einer Grippeinfektion schützen konnten, was ein bemerkenswertes Beispiel dafür darstellt, wie DNA-Impfungen schützende Immunität verleihen könnten. Die Studie an Mäusen zeigte zudem, dass sowohl Antworten von Antikörpern als auch zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) bewirkt wurden (3,4), die mit den DNA-Impfstoffen übereinstimmen, welche sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität stimulieren. Darauf folgten mehrere Berichte, die in Versuchsmodellen die Nützlichkeit von DNA-Impfstoffen zur Induktion von schützenden Immunantworten gegen mehrere Infektionskrankheiten, einschließlich Krebs, aufzeigten. Wie aus mehreren zu dieser Thematik veröffentlichten Büchern

(5 bis 9) und Rezensionen (10 bis 38) hervorgeht, ist die Literatur auf dem Gebiet der Erfindung hinsichtlich DNA-Impfstoffen reichhaltig. Eine Website, die sich mit DNA-Impfstoffen beschäftigt, bietet auch wertvolle Informationen über den auf diesem Gebiet erbrachten Fortschritt (39). Zudem sind auch Leitlinien zur Verwendung von DNA-Impfstoffen in klinischen Versuchen an Tieren und Menschen verfügbar (40). Andere nützliche Informationen zum besseren Verständnis und zur praktischen Umsetzung der DNA-Impfstofftechnologie liegt in folgenden Patenten vor: US05580859, US05589466, US05620896, US05736524, US05939400, US05989553, US06063385, US06087341, US06090790, US06110898, US06156322, US05576196, 5707812, US5643578, US0557619, US0570781; US05916879, US05958895, US05830876, US05817637, US6133244, US6020319, US5593972, WO00/24428, WO99/51745, WO99/43841, WO99/388880, WO99/02132, WO98/14586, WO98/08947, WO98/04720, WO00/77188, WO00/77043, WO00/77218, WO0077188, WO00037649, WO00044406, WO09904009, WO00053019, WO00050044, WO00012127, WO09852603, WO9748370 und WO97730587. Das umfangreiche Literaturangebot an DNA-Impfstoffen weist darauf hin, dass DNA-Impfstoffe bei der Prävention und Behandlung mehrerer infektiöser Krankheiten, einschließlich Krebs, viel versprechende Impfstoffe darstellen. Die allgemeine Anwendbarkeit von DNA-Impfstoffen zur Induktion von Schutzimmunitäten wurde in mehreren Tierversuchsmodellen festgestellt, was zur Phase I der menschlichen klinischen Versuche führte. Die in den letzten Jahren durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass bei bestimmten Krankheiten die DNA-Impfung allein nicht den gewünschten Effekt erzielt; bei einer Kombination mit anderen prophylaktischen oder therapeutischen Maßnahmen können die gewünschten Ergebnisse jedoch erzielt werden. Eine solche Maßnahme, die nach dem Stand der Technik als "Prime-Boost-Strategie" bezeichnet wird, umfasst die Verabreichung eines DNA-Impfstoffs, um das Immunsystem zu "primen", gefolgt von der Verabreichung eines rekombinanten Proteins oder von Lebendimpfstoffen oder Impfstoffen auf Basis von inaktivierten Pathogenen, um das Immunsystem zu "boosten" (41 bis 59). Außer der Prime-Boost-Strategie werden im Stand der Technik mehrere andere Strategien zur Verbesserung der Potenz von DNA-Impfstoffen beschrieben. Diese umfassen:

1. Co-Impfung mehrfacher Plasmide, die unterschiedliche Antigene eines Pathogens exprimieren, oder Plasmide, die mehrere Epitope unterschiedlicher Antigene eines Pathogens exprimieren (60 bis 71).
2. Co-Impfung von Plasmiden, die für Cytokine oder co-stimulierende Moleküle kodieren, und Plasmiden, die Antigene von Interesse exprimieren (72 bis 94).
3. Einschluss bestimmter Verbindungen, wie z.B. Saponine, Alaun, Chitosan, Liposome, kationische Lipide, etc., in die DNA-Impfstoffpräparate (95 bis 106).
4. Einschluss spezifischer Sequenzen, die in der Plasmid-DNA als CpG-Motive bezeichnet werden (107 bis 117).

[0004] Zudem wurde eine Reihe von Strategien zur Modifizierung des Plasmidvektors und/oder des Gens, welches für das Antigen kodiert, angeführt, um die Potenz von DNA-Impfstoffen zu verbessern (118 bis 136). Folglich gibt es einen gewissen Raum zur Entwicklung von neuartigen Zusammensetzungen, die die Potenz von DNA-Impfstoffen verbessern können.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Diese Erfindung beschreibt ein neuartiges Verfahren zur Verbesserung der Potenz von DNA-Tollwutimpfstoffen durch Zugabe geringer Mengen an inaktiviertem Virus zum DNA-Impfstoffpräparat. In einer Ausführungsform kann diese Erfindung zur Entwicklung von Kombinationsimpfstoffen führen, die einen DNA-Impfstoff und ein inaktiviertes Virus aufweisen. In einer anderen Ausführungsform kann diese Erfindung zur Entwicklung von Impfstoffen führen, die viel geringere Mengen an inaktiviertem Virus aufweisen, als dies in herkömmlichen Impfstoffen auf Basis von inaktivierten Viren der Fall ist. Diese Erfindung beschreibt auch ein Verfahren zur Herstellung einer neuartigen Impfstoffzusammensetzung gegen das Tollwutvirus.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0006] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung des DNA-Tollwutimpfstoffplasmids (pCMV-Rab), welches für das Tollwutvirusoberflächenglykoprotein kodiert.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung beschreibt eine Tollwutimpfstoffformulierung zur Verwendung bei der Immunisierung von Wirbeltieren gegen Tollwut unter Verwendung einer Impfstoffformulierung, die DNA-Sequenzen umfasst, welche für das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren und inaktivierten Tollwutviren kodieren. Das in der vorliegenden Erfindung beschriebene Verfahren kann verwendet werden, um einen Kombinationsimpfstoff zu entwickeln, der hauptsächlich aus inaktiviertem Virus und einer Plasmid-DNA besteht, die für ein oder

mehrere Polypeptide des Virus kodiert. Die aus inaktiviertem Tollwutvirus und DNA-Impfstoff bestehende Impfstoffformulierung weist eine viel höhere Potenz als jene Formulierungen auf, die über ein inaktiviertes Virus allein oder einen DNA-Impfstoff allein verfügen, und zwar in Mengen, die im Kombinationsimpfstoff vorliegen. Für alle Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gilt, dass die Impfstoffformulierung keine Lebendviren oder abgeschwächte Viren enthält.

[0008] Die in vorliegender Erfindung beschriebene Potenz bezieht sich auf die Fähigkeit von Impfstoffen, Virus-neutralisierende Antikörper zu induzieren und/oder den immunisierten Wirt gegen eine nachfolgende Virus-Provokation zu schützen. In einer Ausführungsform wird die Potenz des Tollwutimpfstoffs durch Messung des Titers zur Antikörperneutralisierung des Tollwutvirus im Serum von immunisierten Tieren mittels eines Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test bzw. RFFIT (137) bewertet. In einer weiteren Ausführungsform wird die Potenz des Tollwutimpfstoffs anhand der Ausmaße an Schutz bewertet, der im immunisierten Wirt gegen eine Tollwutvirus-Provokation verliehen wird.

[0009] Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Impfstoffe auf Basis von inaktivierten Viren können durch Zell-/Gewebekulturverfahren unter Verwendung von allen _ nach dem Stand der Technik bekannten Wirbeltieren-Zelllinien hergestellt werden. Beispielsweise können Tollwutimpfstoffe auf Basis von inaktivierten Viren unter Verwendung von Wirbeltierzellen in Kulturen hergestellt werden, die in folgenden US-Patenten beschrieben sind: 3.423.505, 3.585.266, 4.040.904, 3.769.415, 4.115.195, 3.397.267, 4.664.912 und 4.726.946. In einer Ausführungsform wurde ein aus Hühnerembryozellen hergestellter gereinigter Hühnerembryozellen-Tollwutimpfstoff (PCEC) in Kombination mit DNA-Tollwutimpfstoff verwendet. In einer weiteren Ausführungsform wurde ein aus Verozellen hergestellter gereinigter Verozellen-Tollwutimpfstoff (PVRV) in Kombination mit DNA-Tollwutimpfstoff verwendet. In einer weiteren Ausführungsform wurden die Hamsterbabynierenzellen (BHK) als Quelle für ein inaktiviertes Tollwutvirus verwendet. Darüber hinaus werden die erfindungsgemäßen Verfahren als geeignet zur Immunisierung von Wirbeltierspezies, wie z.B. der Spezies der Murinae, der Spezies der Caninae, der Spezies der Ovinae oder Menschen, angesehen. In einer Ausführungsform ist die Spezies der Murinae eine Maus. In einer weiteren Ausführungsform ist die Spezies der Caninae ein Hund. In einer weiteren Ausführungsform ist die Spezies der Bovinae ein Rind.

[0010] Die Menge an inaktiviertem Virus im Kombinationsimpfstoff kann je nach Immunogenität und Potenz der Formulierungen auf Basis inaktivierter Viren stark variieren. In einer Ausführungsform beträgt die Menge an inaktiviertem Tollwutvirus im Kombinationsimpfstoff 600 Mal weniger als jene in Gewebekultur-Tollwutimpfstoffen nach dem Stand der Technik vorliegende Menge. Die in Kombination mit dem DNA-Tollwutimpfstoff zu verwendende Menge an inaktiviertem Tollwutvirus wurde bezogen auf die vorsichtige Titration unterschiedlicher Verdünnungen des Tollwutimpfstoffs auf Basis von inaktivierten Viren ermittelt. Die Dosis, die nicht ausreichte, um einen merklichen Grad an VNA im immunisierten Wirt zu induzieren, und/oder die keinen 100%igen Schutz nach einer Tollwutvirus-Provokation verleihen konnte, wurde als jene in Kombination mit dem DNA-Impfstoff zu verwendende Dosis ausgewählt, um einen Kombinationsimpfstoff mit höherer Potenz zu entwickeln. Fachleuten auf dem Gebiet der Herstellung von Tollwutimpfstoffen ist klar, dass die in der Impfstoffformulierung vorzuliegende Endkonzentration des inaktivierten Tollwutvirus und der Plasmid-DNA anhand von nach dem Stand der Technik beschriebenen Vorschriften bestimmt werden soll; dafür kommen beispielsweise jene in der US-amerikanischen oder britischen Pharmakopöe erwähnten in Frage, und zwar unter Verwendung von Impfstoffstandards, die der Weltgesundheitsbehörde (WHO) entnommen sind.

[0011] Die in der vorliegenden Erfindung verwendete Plasmid-DNA bezieht sich auf extrachromosomale, kovalente, ringförmige DNA-Moleküle, die zur autonomen Replikation in Bakterienzellen fähig sind und aus Transkriptionseinheiten (nämlich Polypeptid-kodierende Nucleotidsequenzen) bestehen, die jenen im Virus von Interesse ähnlich oder damit ident sind, und operabel mit Transkriptional- und Translational-Regulationssequenzen verbunden sind, die zur Expression von Proteinen in Wirbeltierzellen erforderlich sind.

[0012] Die Transkriptionseinheit des in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Plasmids kann jede beliebige große Anzahl an bekannten eukaryotischen Promotoren aufweisen, wie z.B. jene, die in Genomen von tierischen Viren und Tieren, einschließlich Menschen, vorliegen. Zudem kann die Transkriptionseinheit eine DNA aufweisen, die Polypeptide von Wirbeltierpathogenen aufweist, wie z.B. Viren, Bakterien, Parasiten, etc. Die Transkriptionseinheit besteht aus einer DNA, die für das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren kodiert.

[0013] Die Einführung von DNA, die für Polypeptide von Wirbeltierpathogenen kodiert, in Plasmide kann mittels jeder beliebigen im Stand der Technik beschriebenen Vorschrift durchgeführt werden (138). Zudem können Verfahren zur Einführung solcher Plasmide in Bakterien, das Kultivieren in einem Nährmedium und die Reinigung der Plasmide aus Bakterienkulturen unter Verwendung jedes beliebigen nach dem Stand der Technik be-

kannten Vorgangs durchgeführt werden (138, 139).

[0014] Im Folgenden sind Beispiele zur Veranschaulichung der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung angeführt. Diese Beispiele dienen nur zur Veranschaulichung und keineswegs als Einschränkung der übrigen Offenbarung.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung von DNA-Tollwutimpfstoff

[0015] Das DNA-Tollwutimpfstoffplasmid wurde wie folgt konstruiert. Der unmittelbar frühe Cytomegalievirus-Promotor und das Intron wurden aus dem pCMVintBL-Plasmid durch Verdau mit den Restriktionsenzymen HINDIII und PstI isoliert (140) und an den HindIII- und PstI-Stellen des pEGFP1-Plasmids geklont (Clontech, CA, USA), um ein pCMVEGFP-Konstrukt zu erhalten. Die Tollwutvirus-Oberflächenglykoprotein kodierende cDNA wurde als ein BglII-Restriktionsfragment aus dem pTg155-Vektor (141) isoliert und in eine BamHI-Stelle von pCMVEGFP geklont. Schließlich wurde die EGFP kodierende cDNA als SbaI-NotI-Fragment herausgeschnitten und der Vektor religiert, um ein pCMVRab-Konstrukt zu erhalten. Bei der Konstruktion von pCMVRab wurden nach dem Stand der Technik beschriebene DNA-Standardrekombinationstechniken (138) angewandt. Das schematische Diagramm von pCMVRab ist in [Fig. 1](#) dargestellt. Mittels alkaliner Lyse wurde eine großtechnische Isolierung und Reinigung des pCMVRab durchgeführt (138, 139). Das Endplasmidpräparat wurde in Kochsalzlösung (0,15 M NaCl) gelöst und als DNA-Tollwutimpfstoff verwendet. Fachleuten auf dem Gebiet der Herstellung von eukaryotischen Expressionsplasmiden ist klar, dass zur Entwicklung von DNA-Tollwutimpfstoffplasmiden mehrere Veränderungen des obigen Protokolls möglich sind. Beispielsweise kann die Tollwutglykoprotein kodierende cDNA aus anderen Tollwutvirussträngen stammen, wie z.B. Challenge Virus Standard (CVS), Street-Alabama-Dufferin (SAD), Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA), etc. Auf ähnliche Weise kann der Cytomegalovirus-Promotor aus mehreren handelsüblichen eukaryotischen Expressionsplasmiden erhalten werden.

Beispiel 2: Herstellung von Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren aus Gewebekulturen von Wirbeltierzellen

[0016] Der Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren kann mittels jedes beliebigen, Verfahrens nach dem Stand der Technik hergestellt werden, wie die in folgenden US-Patenten beschriebenen: 3.423.505, 3.585.266, 4.040.904, 3.769.415, 4.115.195, 3.397.267, 4.664.912 und 4.726.946. Kurz gefasst werden Wirbeltierzellen, wie z.B. Verozellen, Babyhamsternierenzellen (BHK), etc. mit dem Tollwutvirus infiziert. Das Virus wird von den Zellbruchstücken mittels Filtrieren getrennt und anschließend durch Zugabe von β -Propiolacton oder Bromethylenimin inaktiviert. Das Virus wird sodann konzentriert und ein Teil davon durch Impfung der sensitiven Monoschichtzellkulturen und intrazerebrale Impfung von Mäusen auf Nichtansteckungsgefahr durch infektiöse Viren untersucht. Das konzentrierte Viruspräparat wird mit Hilfsmitteln, wie z.B. Aluminiumhydroxid (3 mg pro Dosis), vermischt und der flüssige Impfstoff zur Impfung von Tieren verwendet. Alternativ dazu wird das Virus mittels Zonenzentrifugation weitergereinigt, gefolgt von Lyophilisierung in Gegenwart von Verbindungen wie etwa menschlichem Serumalbumin Maltose etc., und das lyophilisierte Präparat wird als Tollwutimpfstoff verwendet. In einer Ausführungsform wurde der aus dem von Indian Immunologicals Ltd, Hyderabad, Indien hergestellte und als Abhayrab[®] bekannte Tollwutimpfstoff, der aus gereinigten Verozellen stammt, als Quelle für den Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren verwendet. In einer weiteren Ausführungsform wurde der von Hoechst Marion Roussel, Indien, hergestellte und als Rabipur[®] bekannte Tollwutimpfstoff, der aus gereinigten Hühnerembryozellen (PCEC) stammt, als Quelle für den Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren verwendet. In einer weiteren Ausführungsform wurde der von Indian Immunologicals Ltd, Hyderabad, Indien, hergestellte und als bekannte veterinäre Tollwutimpfstoff, der aus Babyhamsternierenzellen (BHK) stammt, als Quelle für den Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren verwendet.

Beispiel 3: Herstellung eines Kombinationsimpfstoffs bestehend aus einem inaktivierten Tollwutvirus und einem DNA-Tollwutimpfstoff

[0017] Die Tollwutimpfstoffe auf Basis von inaktivierten Viren, wie z.B. Abhayrab[®], Raksharab[®] oder Rabipur[®], wurden mit einer Kochsalzlösung 625fach verdünnt, und 0,5 ml der verdünnten Probe wurden mit 100 μ g DNA-Tollwutimpfstoff vermischt und das Gemisch als Kombinationstollwutimpfstoff zur Immunisierung von Mäusen, Hunden oder Vieh eingesetzt. Bei Bedarf wurde Aluminiumhydroxid in einer Endkonzentration von 3,0 mg pro Dosis zugesetzt. Das Endimpfstoffpräparat kann auch Konservierungsstoffe, wie z.B. Thiomersol (0,015 %), aufweisen und entweder als Flüssigimpfstoff oder als lyophilisiertes Präparat verwendet werden.

Beispiel 4: Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs, des Tollwutimpfstoffs auf Basis von inaktivierten Viren und des Kombinationsimpfstoffs, der aus inaktiviertem Tollwutvirus und DNA-Impfstoff besteht, untersucht mittels eines Tollwutvirus-Provokationsversuchs an Mäusen

[0018] Die Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs wurde in einem peripheren Tollwutvirus-Provokationsversuch an Mäusen untersucht. Eine Gruppe von zehn Mäusen wurde mit 100 µg DNA-Tollwutimpfstoff zweimal pro Maus in zweiwöchigen Intervallen geimpft. Zwei Wochen nach Verabreichung der zweiten Dosis wurden die Mäuse mit einem virulenten Tollwutvirus des Standardprovokationsvirusstrangs (CVS) in den Fußballen geimpft und 14 Tage lang beobachtet. Die in Tabelle 1 angeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur 80 % der mit dem DNA-Tollwutimpfstoff geimpften Mäuse vor einer Tollwutvirusprovokation geschützt sind. Die Erfinder müssen deshalb herausfinden, ob Zusatz geringer Mengen an inaktiviertem Tollwutvirus zum DNA-Tollwutimpfstoffpräparat zu einem höheren Schutz führen kann. Vor der Zugabe des inaktivierten Tollwutvirus zum DNA-Impfstoff untersuchten die Erfinder in einem Tollwutvirus-Provokationsversuch an Mäusen die Potenz von Abhayrab®, einem aus Verozellen hergestellten Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren. Zu jeder der Abhayrab®-Ampullen (> 2,5 IU) wurden 200 µl Kochsalzlösung zugesetzt und jede der Mäuse in einer Gruppe von zehn Mäusen wurde intramuskulär mit 0,1 ml des Impfstoffs geimpft. Es wurden zudem fünffache Verdünnungen von Abhayrab® (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) hergestellt und 0,1 ml jedes der verdünnten Abhayrab®-Präparate pro Maus auf intraperitonealem Weg injiziert. Die Immunisierungen wurden 14 Tage später wiederholt. Die Mäuse wurden in die Fußballen mit einem virulenten Tollwutvirus des CVS-Strangs zwei Wochen nach Verabreichung der zweiten Dosis geimpft und 14 Tage lang beobachtet. Die in Tabelle 1 angeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der unverdünnte Abhayrab®-Impfstoff sowie der 5-, 25-, oder 125fach verdünnte Impfstoff einen 100%igen Schutz gegen eine Tollwutvirusprovokation verleiht. Folglich wurden diese Verdünnungen nicht in Kombination mit dem DNA-Impfstoff verwendet, da der Impfstoff auf Basis von inaktivierten Viren bei diesen Verdünnungen einen 100%igen Schutz verliehen hatte. Bei einer 625fachen Verdünnung nahm die Potenz von Abhayrab® jedoch signifikant ab, und lediglich 50 % der Mäuse waren gegen eine Tollwutvirusprovokation geschützt. Diese Abhayrab®-Dosis, die einen suboptimalen Schutz verleiht, wurde verwendet, um die Wirkung von inaktivierten Tollwutviren auf die Potenz von DNA-Tollwutimpfstoffen zu untersuchen. Die Immunisierungsexperimente wurden wiederholt, und die Mäuse wurden zweimal in zweiwöchigen Intervallen mit 0,1 ml des 625fach verdünnten Abhayrab® allein oder mit 100 µg des DNA-Tollwutimpfstoffs allein oder mit einer Kombination von beiden geimpft. Die Mäuse wurden zwei Wochen später provoziert, und die in Tabelle 1 angeführten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Abhayrab® und der DNA-Tollwutimpfstoff einen 50%igen bzw. 80%igen Schutz verleihen, wohingegen es bei einer Kombination dieser beiden Wirkstoffe zu einem 100%igen Schutz gegen eine Tollwutvirusprovokation kommt. Folglich führt die Zugabe einer suboptimalen Dosis von inaktivierten Tollwutviren zum DNA-Tollwutimpfstoff zur Entwicklung eines neuartigen Tollwutkombinationsimpfstoffs mit höherer Potenz.

[0019] Zur Untersuchung ob inaktivierte Tollwutviren, die aus Hühnerembryozellen hergestellt werden, auch die Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs verbessern können, wurden unter Verwendung von Rabipur®, einem aus Hühnerembryozellen hergestellten Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren, Virusprovokationsversuche durchgeführt. Zu jeder der Rabipur®-Ampullen (> 2,5 IU) wurden 200 µl Kochsalzlösung zugesetzt, wobei 100 µl bis zu 625fach mit Kochsalzlösung verdünnt wurden. Der verdünnte Impfstoff wurde entweder allein oder in Kombination mit dem DNA-Tollwutimpfstoff (100 µl) jeder der Mäuse zweimal in zweiwöchigen Intervallen injiziert, und die Mäuse wurden, wie oben beschrieben, zwei Wochen nach der letzten Immunisierung provoziert. Die in Tabelle 1 angeführten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Rabipur®, 625fach verdünnt, einen 60%igen Schutz gegen eine Tollwutvirusprovokation verleiht, während der Schutz bei einer Kombination mit dem DNA-Tollwutimpfstoff auf 100 % erhöht wird.

[0020] Folglich kann ein aus entweder Verozellen oder Hühnerembryozellen hergestelltes Präparat aus inaktivierten Tollwutviren die Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs erhöhen.

Beispiel 5: Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs, des Tollwutimpfstoffs auf Basis von inaktivierten Viren und des Kombinationsimpfstoffs, der aus inaktiviertem Tollwutvirus und DNA-Impfstoff besteht, untersucht mittels eines RFFIT in einem Versuch an Mäusen

[0021] Die Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs kann auch durch dessen Fähigkeit zur Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern (VNA) im immunisierten Wirt mittels RFFIT (137) bestimmt werden. Kurz gefasst werden unterschiedliche Verdünnungen des Serums mit einer Standarddosis des Provokationsviruspräparats in den Wells von Gewebekultur-Kammerobjektträgern inkubiert, wobei die Objektträger bei 35 °C 60 bis 90 Minuten lang in einem befeuchteten Kohlendioxidinkubator inkubiert werden. Anschließend werden BHK-Zellen zugesetzt (1×10^5 Zellen pro Well) und das Gemisch wie oben beschrieben weitere 20 Stunden lang inkubiert.

Die Objektträger werden in Phosphatpufferlösung (PBS) gewaschen und in kaltem Aceton fixiert. Nach dem Trocknen wird ein mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiertes Antitollwut-Nucleoprotein in geeigneter Verdünnung zugesetzt und die Inkubation weitere 20 bis 30 Minuten bei 37 °C fortgesetzt. Schließlich werden die Objektträger in PBS gewaschen und unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Virusneutralisierenden Titer werden unter Verwendung bekannter Vorschriften ermittelt. Nationales oder internationales Referenzserum, das auf eine Potenz von 1,0 IU/ml verdünnt ist, wird in jedem Test zum Titrieren des Testserumtiters verwendet, und die Ergebnisse sind in IU/ml angeführt. Ein Tollwutimpfstoff, der einen VNA-Titer von 0,15 IU/ml und mehr induziert, wird als schützend angesehen. Somit ist die VNA-Konzentration im immunisierten Wirt ein Maßstab für die Tollwutimpfstoffpotenz, wobei Impfstoffe mit besserer Potenz höhere VNA-Titer induzieren. Die Erfinder haben deshalb untersucht, ob die Verabreichung eines Kombinationsimpfstoffs, der aus 625fach verdünntem Abhayrab® und einem DNA-Tollwutimpfstoff (100 µg) besteht, die Induktion von höheren VNA im immunisierten Tier bewirken kann. Dazu wurden aus 10 Mäusen bestehende Gruppen mit dem DNA-Tollwutimpfstoff allein, unterschiedlichen Verdünnungen von Abhayrab® oder einer Kombination von 625fach verdünntem Abhayrab® und dem DNA-Tollwutimpfstoff wie oben beschrieben geimpft. Den Mäusen wurde mittels retroorbitaler Punktion vor Verabreichung der zweiten Dosis (Postimmunisierung an Tag 14) sowie zwei Wochen nach der Verabreichung der zweiten Dosis (Postimmunisierung an Tag 28) Blut abgenommen. Die Serumproben von Mäusen aus allen Gruppen wurden eingesammelt und der Wert der Tollwut-VNA mittels RFFIT untersucht. Die in Tabelle 2 angeführten Ergebnisse weisen darauf hin, dass es 14 Tage nach der Verabreichung einer einmaligen Dosis des DNA-Tollwutimpfstoffs allein, des 1:625 verdünnten Abhayrab® oder beiden zu einem VNA-Titer (IU/ml) von 0,287, 0,095 bzw. 1,42 kommt. Wenn die Sera zwei Wochen nach Verabreichung der zweiten Dosis analysiert wurden, stieg der VNA-Titer (IU/ml) bei Mäusen, die nur mit dem DNA-Tollwutimpfstoff, dem 1:625 verdünnten Abhayrab® oder beiden immunisiert worden waren, auf 1,96, 0,55 bzw. 4,07. Die Ergebnisse deuten klar darauf hin, dass eine Kombination aus einem Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren und einem DNA-Tollwutimpfstoff bei Mäusen zu höheren VNA-Werten führt, als dies der Fall wäre, wenn diese jeweils einzeln verwendet werden.

Beispiel 6: Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs, des Tollwutimpfstoffs auf Basis von inaktivierten Viren und des Kombinationsimpfstoffs, der aus inaktiviertem Tollwutvirus und DNA-Impfstoff besteht, untersucht mittels eines RFFIT in einem Versuch an Hunden

[0022] Zur Untersuchung ob die bei Mäusen erhaltenen Ergebnisse in einer anderen Wirbeltierspezies reproduziert werden könnten, wurden die Immunisierungsexperimente mit Hunden wiederholt. Es wurden 3 bis 4 Monate alte Hunde, die bezüglich Tollwut-VNA seronegativ sind, auf intramuskulärem Weg mit 625fach verdünntem Abhayrab®, 100 µg DNA-Tollwutimpfstoff oder beiden zweimal in zweiwöchigen Intervallen immunisiert. Jede der Gruppen bestand aus einem Tier. An den Tagen 7, 14, 21, 28 und 35 nach der Immunisierung wurde den Tieren Blut abgenommen und der Tollwut-VNA-Titer in den Seren mittels RFFIT analysiert. Die in Tabelle 3 angeführten Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass der VNA-Titer bei mit 625fach verdünntem Abhayrab® und DNA-Tollwutimpfstoff geimpften Tieren an allen Testpunkten höher war als jener bei den Tieren, die entweder mit dem DNA-Impfstoff oder dem 625fach verdünnten Abhayrab® allein geimpft wurden.

[0023] Folglich induziert die Impfung einer Kombination aus einem Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren und einem DNA-Tollwutimpfstoff nicht nur bei Mäusen, sondern auch bei Hunden höhere Tollwut-VNA-Werte.

Beispiel 7: Potenz des DNA-Tollwutimpfstoffs, des Tollwutimpfstoffs auf Basis von inaktivierten Viren und des Kombinationsimpfstoffs, der aus inaktiviertem Tollwutvirus und DNA-Impfstoff besteht, untersucht mittels eines RFFIT in einem Versuch an Rindern

[0024] Nachdem die Erfinder die Potenz des Kombinationsimpfstoffs, der aus einem Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren und dem DNA-Tollwutimpfstoff besteht, bei Mäusen und Hunden aufgezeigt hatten, untersuchten sie dessen Immunogenität in einem Versuch mit Großtieren, nämlich Rindern. In diesem Versuch wurden Raksharab®, ein aus BHK-Zellen hergestellter Tollwutimpfstoff auf Basis von veterinären inaktivierten Viren, sowie Abhayrab® eingesetzt. Es wurden 12 bis 16 Monate alte gekreuzte Kälber, die bezüglich Tollwut-VNA seronegativ sind, auf intramuskulärem Weg mit 625fach verdünntem Abhayrab® oder Raksharab® entweder allein oder in Kombination mit 100 µg DNA-Tollwutimpfstoff zweimal in zweiwöchigen Intervallen immunisiert, und die Blutproben wurden an den Tagen 7, 14, 21, 28 und 35 nach der Immunisierung eingesammelt. Jede der Gruppen bestand aus drei Rindern, und an allen Testpunkten wurden die Rindersera aus allem Gruppen eingesammelt und anschließend einer RFFIT-Analyse unterzogen. Die in Tabelle 4 angeführten Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass der VNA-Titer bei Rindern, die mit inaktivierten Tollwutviren (entweder Abhayrab® oder Raksharab®) und dem DNA-Tollwutimpfstoff geimpft worden waren, weitaus höher war als je-

ner bei den Tieren, die mit dem Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren oder dem DNA-Tollwutimpfstoff allein geimpft wurden.

[0025] In einem weiteren unabhängigen Experiment wurde die Wirkung von Hilfsmitteln, wie z.B. Aluminiumhydroxid, auf die Potenz des Kombinationsimpfstoffs (inaktivierte Tollwutviren + DNA-Impfstoff) untersucht. Rinder wurden zweimal in zweiwöchigen Intervallen (Tag 0 und Tag 14) mit dem DNA-Impfstoff, 625fach verdünntem Raksharab® oder beiden in Gegenwart oder Abwesenheit von Aluminiumhydroxid immunisiert. Den Rindern wurde in regelmäßigen Abständen Blut abgenommen und der VNA-Wert mittels RFFIT untersucht. Die in Tabelle 5 angeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zugabe von Aluminiumhydroxid die Potenz des Kombinationstollwutimpfstoffs zusätzlich erhöht.

[0026] Diese Beispiele, welche die Verwendung des DNA-Tollwutimpfstoffs in Kombination mit unterschiedlichen Tollwutimpfstoffen auf Basis von inaktivierten Viren beschreiben, dienen nur zur Veranschaulichung und nicht als Einschränkung der in den beigefügten Ansprüchen definierten Erfindung.

TABELLE 1

Schutz vor einer Tollwutvirus-Provokation bei mit dem DNA-Tollwutimpfstoff, dem Tollwutimpfstoff auf Basis von inaktivierten Viren (Abhayrab® oder Rabipur®) oder dem Kombinationsimpfstoff geimpften Mäusen

Tiergruppe	Tollwutimpfstoff	Anzahl der geimpften Mäuse	Anzahl der überlebenden Mäuse	Prozent Schutz
1	DNA-Impfstoff	10	8	80
2	Abhayrab® (unverdünnt)	10	10	100
3	Abhayrab® 1:5-Verdünnung	10	10	100
4	Abhayrab® 1:25-Verdünnung	10	10	100
5	Abhayrab® 1:125-Verdünnung	10	10	100
6	Abhayrab® 1:625-Verdünnung	10	5	50
7	Abhayrab® 1:625-Verdünnung +DNA-Impfstoff	10	10	100
8	Rabipur 1:625-Verdünnung	10	6	60
9	Rabipur 1:625-Verdünnung +DNA-Impfstoff	10	10	100
10	Kochsalzlösung	10	0	0

TABELLE 2

Induktion von Tollwutviren-neutralisierenden Antikörpern (VNA) bei Mäusen mittels DNA-Impfstoff, Tollwutimpfstoff auf Basis inaktivierter Viren oder Kombinationsimpfstoff

Tiergruppe	Tollwutimpfstoff	VNA-Titer (IU/ml)	
		Tag 14 nach der Immunisierung	Tag 28 nach der Immunisierung
1	DNA-Impfstoff	0,287	1,96
2	Abhayrab® (unverdünnt)	2,46	4,65
3	Abhayrab® 1:5-Verdünnung	0,62	2,82
4	Abhayrab® 1:25-Verdünnung	0,5	2,13
5	Abhayrab® 1:125-Verdünnung	0,19	1,0
6	Abhayrab® 1:625-Verdünnung	0,095	0,55
7	Abhayrab® 1:625-Verdünnung +DNA-Impfstoff	1,42	4,07
8	Rabipur 1:625-Verdünnung	0,095	0,38
9	Rabipur 1:625-Verdünnung +DNA-Impfstoff	0,54	4,26

TABELLE 3

Induktion von Tollwutviren-neutralisierenden Antikörpern (VNA) bei Hunden mittels DNA-Impfstoff, Tollwutimpfstoff auf Basis inaktivierter Viren (Abhayrab®) oder Kombinationsimpfstoff

Tiergruppe	Tollwut-Impfstoff	Anzahl der Hunde	VNA-Titer (IU/ml)*					
			Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35
1	DNA-Impfstoff	1	<0,095	<0,095	0,217	0,575	0,76	1,0
2	Abhayrab® (1:625-Verdünnung)	1	<0,095	<0,095	0,217	0,28	0,5	0,575
3	DNA-Impfstoff + Abhayrab® (1:625-Verdünnung)	1	<0,095	<0,095	0,575	2,0	3,02	3,02

TABELLE 4

Induktion von Tollwutviren-neutralisierenden Antikörpern (VNA) bei Rindern mittels DNA-Impfstoff, Tollwutimpfstoff auf Basis inaktivierter Viren (Abhayrab® oder Raksharab®) oder Kombinationsimpfstoff

Tiergruppe	Tollwut-Impfstoff	Anzahl der Rinder	VNA-Titer (IU/ml)*					
			Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35
1	DNA-Impfstoff	3	<0,095	0,66	0,36	0,80	0,87	0,96
2	Abhayrab® (1:625-Verdünnung)	3	<0,095	0,21	0,33	0,32	0,47	0,64
3	DNA-Impfstoff + Abhayrab® (1:625-Verdünnung)	3	<0,095	0,34	0,76	2,0	3,5	3,82
4	Raksharab® (1:625-Verdünnung)	3	<0,095	0,14	0,21	0,31	0,54	1,06
5	DNA-Impfstoff + Raksharab® (1:625-Verdünnung)	3	<0,095	0,16	0,28	1,81	2,68	3,25

TABELLE 5

Wirkung von Hilfsmitteln, wie z.B. Aluminiumhydroxid, auf die Induktion von Tollwutviren-neutralisierenden Antikörpern (VNA) bei Rindern mittels DNA-Impfstoff, Tollwutimpfstoff auf Basis inaktivierter Viren (Raksharab®) oder Kombinationsimpfstoff

Tiergruppe	Tollwut-Impfstoff	Anzahl der Rinder	VNA-Titer (IU/ml)*			
			Tag 0	Tag 14	Tag 21	Tag 60
1	DNA-Impfstoff	4	<0,095	0,09	0,29	0,39
2	Raksharab® (1:625-Verdünnung)	4	<0,095	0,13	0,30	0,11
3	DNA-Impfstoff + Raksharab® (1:625-Verdünnung)	4	<0,095	0,56	1,28	1,37
4	Raksharab® (1:625-Verdünnung) + Aluminiumhydroxid	4	<0,095	0,20	0,79	0,49
5	DNA-Impfstoff + Raksharab® (1:625-Verdünnung) + Aluminiumhydroxid	4	<0,095	0,79	2,12	1,88

Literaturverweise:

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 247:1465-68.
2. Tang DC, De Vit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature 356:152-54,
3. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, De Witt DM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DC, Liu MA 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259:1745-49.
4. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA Vaccine 11:957-60.
5. DNA Vaccines: Methods and Protocols. Robert G. Whalen, Douglas B. Lowrie (Editor)/Hardcover/Humana Press/August 1999.
6. Gene Vaccination: Theory and Practice. Eyal Raz (Editor)/Hardcover/Springer-Verlag New York, Incorporated

ted/July 1998.

7. DNA Vaccines: A New Era in Vaccinology. Margaret A. Liu, Reinhard Kurth (Editor), Maurice R. Hilleman (Editor)/Paperback/New York Academy of Sciences/October 1995.
8. Current Topics in Microbiology and Immunology (vol. 226) entitled: DNA Vaccination/Genetic Vaccination edited by David Weiner and Hilary Koprowski,
9. Lewis PJ, Cox GJ, van Drunen Littel-vanden Hurk S, Babiuk LA. 1997. Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. *Vaccine*.
10. Babiuk LA, Lewis J, Suradhat S, Baca-Estrada M, Foldvari M, Babiuk S (1999). Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals *J Biotechnol*, 73: 131-140.
11. Babiuk LA, Lewis J, van den Hurk S, Braun R (1999) DNA immunization: present and future *Adv Vet Med*, 41: 163-179.
12. Babiuk LA (1999) Broadening the approaches to developing more effective vaccines *Vaccine*, 17: 1587-1595.
13. Boyle JS, Barr IG, Lew AM (1999) Strategies for improving responses to DNA vaccines *Mol Med*, 5: 1-8.
14. Cichutek K (1999) Development and standardisation of DNA vaccines *Dev Biol Stand*, 100: 119-129.
15. Davis HL (1999) DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B virus *Mt Sinai J Med*, 66: 84-90.
16. Donnelly JJ, Ulmer JB (1999) DNA vaccines for viral diseases *Braz J Med Biol Res*, 32: 215-222.
17. Encke J, zu Putlitz J, Wands JR (1999) DNA vaccines *Intervirology*, 42: 117-124.
18. Fomsgaard A (1999) HIV-1 DNA vaccines *Immunol Lett*, 65: 127-131.
19. Freis PC (1999) DNA vaccines [letter] *N Engl J Med*, 341: 1623-1624.
20. Gendon lu Z (1999) Progress in developing viral polynucleotide (DNA) vaccines *Vopr Virusol*, 44: 148-154.
21. Gorecki DC, Simons JP (1999) The dangers of DNA vaccination [letter] *Nat Med*, 5: 126.
22. Gursel M, Tunca S, Ozkan M, Ozcengiz G, Alaeddinoglu G (1999) Immunoadjuvant action of plasmid DNA in liposomes *Vaccine*, 17: 1376-1383.
23. Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJ (1999) Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines *J Immunol Methods*, 229: 1-22.
24. Haynes JR (1999) Genetic vaccines *Infect Dis Clin North Am*, 13: 11-26,
25. Kowalczyk DW, Ertl HC (1999) Immune responses to DNA vaccines *Cell Mol Life Sci*, 55: 751-770.
26. Kurane I (1999) Present status of basic studies and development of DNA vaccines *Nippon Rinsho*, 57: 975-981.
27. Leitner WW, Ying H, Restifo NP (1999) DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects *Vaccine*, 18: 765-777.
28. Lewis PJ, Babiuk LA (1999) DNA vaccines: a review *Adv Virus Res*, 54: 129-188.
29. Ramsay AJ, Kent S7, Strugnell RA, Suhrbier A, Thomson SA, Ramshaw IA (1999) Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity *Immunol Rev*, 171: 27-44.
30. Sasaki S, Inamura K, Okuda K (1999) Genes that induce immunity-DNA vaccines *Microbiol Immunol*, 43: 191-200.
31. Seder RA, Gurunathan S (1999) DNA vaccines-designer vaccines for the 21st century *N Engl J Med*, 341: 277-278.
32. Spiegelberg HL, Raz E (1999) DNA vaccines *Allergy*, 54: 47-48.
33. Stevenson FK (1999) DNA vaccines against cancer. from genes to therapy *Ann Oncol*, 10: 1413-1418.
34. Stevenson FK, Link CJ, Jr., Traynor A, Yu H, Corr M (1999) DNA vaccination against multiple myeloma *Semin Hematol*, 36: 38-42.
35. Tuteja R (1999) DNA vaccines; a ray of hope *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34: 1-24.
36. Watts AM, Kennedy RC (1999) DNA vaccination strategies against infectious diseases *Int J Parasitol*, 29: 1149-1163.
37. Weiner DB, Kennedy RC (1999) Genetic vaccines *Sci Am*, 281: 50-57.
38. Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE (1999) DNA immunization: mechanistic studies *Vaccine*, 17: 1612-1619.
39. www.dnavaccine.com.
40. U.S. Food and Drug Administration. Points to Consider. <http://www.fda.gov/cber/points.html>.
41. De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P (1999) Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep *Vet Immunol Immunopathol*, 71: 151-160.
42. Okuda K, Xin KO, Tsuji T, Bukawa H, Tanaka S, Koff WC, Tani K, Honma K, Kawamoto S, Hamajima K, Fukushima J, 1997. DNA vaccination followed by macromolecular multicomponent peptide vaccination against HIV-1 induces strong antigen-specific immunity. *Vaccine* 15:1049-56.
43. Barnett SW, Rajasekar S, Legg H, Doe B, Fuller DH, Haynes JR, Walker CM, Steimer KS. 1997, Vaccina-

- tion with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit, *Vaccine* 15:869-73.
44. Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW. 1997, Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9378-83.
 45. Fuller DH, Corb MM, Barnett S, Steimer K, Haynes JR. 1997. Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine* 15:924-26.
 46. Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL, McMichael A. 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptidespecific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16: 439-45.
 47. Haddad D, Liljeqvist S, Stahl S, Hansson M, Perlmann F, Ahlborg N, Berzins K (1999) Characterization of antibody responses to a *Plasmodium falciparum* bloodstage antigen induced by a DNA prime/protein boost immunization protocol *Scand J Immunol*, 49; 506-514.
 48. Fensterle J, Grode L, Hess J, Kaufmann SH (1999) Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun *J Immunol*, 163: 4510-4518.
 49. Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, Tine JA, Hoffman SL. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA, vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7648-53.
 50. Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM, Becker M, Sinden R, Smith GL, Hill AV, 1998. Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med* 4:397-402.
 51. Kent ST, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA. 1998. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J. Virol.* 72:10184-88.
 52. Xiang ZQ, Pasquini S, Ertl HC (1994) Induction of genital immunity by DNA. priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant *J Immunol*, 162: 6716-6723,
 53. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, Rizvi TA, Lu S, Hu SL, Mazza GP, Panicali DL, Herndon JG, Glickman R, Candido MA, Lydy SL, Wyand MS, McClure HM. 1999. Neutralizing antibodyindependent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med* 5:526-34.
 54. Richmond JF, Mustafa F, Lu S, Santoro JC, Weng J, O'Connell M, Fenyo EM, Hurwitz JL, Montefiori DC, Robinson HL. 1997. Screening of HIV-1 Env glycoproteins for the ability to raise neutralizing antibody using DNA immunization and recombinant vaccinia virus boosting. *Virology* 230:265-74.
 55. Richmond JF, Lu S, Santoro JC, Weng J, Hu SL, Montefiori DC, Robinson HL. 1998, Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type I Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J. Virol.* 72:9092-100.
 56. Hanke T, McMichael A (1999) Pre-clinical development of a multi-CTL epitopebased DNA prime MVA boost vaccine for AIDS *Immunol Lett*, 66: 177-181,
 57. Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael AJ (1999) Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen *J Virol*, 73: 7524-7532.
 58. Calarota SA, Leandersson AC, Bratt G, Hinkula J, Klinman DM, Weinhold KJ, Sandstrom E, Wahren B (1999) Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment *J Immunol*.
 59. Caver TE, Lockey TD, Srinivas RV, Webster RG, Hurwitz JL (1999) A novel vaccine regimen utilizing DNA, vaccinia virus and protein immunizations for HIV-1 envelope presentation *Vaccine*, 17: 1567-1572.
 60. Bot A, Bot S, Bona C. 1998. Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing hemagglutinin and nucleoprotein. *Vaccine* 16:1675-82.
 61. Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi, ML, Chattergoon M, Boyer JD, Wang B, Weiner DB. 1997. Development of a multicomponent candidate vaccine for HIV-1. *Vaccine* 15:879-83.
 62. Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE. 1999. DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine* 17:1612-19.
 63. Ciernik IF, Berzofsky JA, Carbone DP, 1996, Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T-cell epitopes. *J. Immunol.* 156:2369-75.
 64. Iwasaki A, Dela Cruz CS, Young AR, Barber BH. 1999. Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by mini-gene DNA immunization. *Vaccine* 17:2081-88.
 65. Yu Z, Karem KL, Kanangat S, Manickan E, Rouse BT. 1998. Protection by minigenes: a novel approach of DNA vaccines. *Vaccine* 16:1660-67.
 66. Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. 1998. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and

Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16:426-35.

67. Thomson SA, Sherrett MA, Medveczky J, Elliott SL, Moss DJ, Fernando JG, Brown LE, Suhrbier A. 1998. Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J. Immunol.* 160:1717-23.
68. Suhrbier A. 1997. Multi-epitope DNA vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 75:402-8.
69. Wang R, Doolan DL, Charoenvit Y, Hedstrom RC, Gardner NJ, Hobart P, Tine J, Sedegah M, Fallarme V, Sacci JB Jr, Kaur M, Klinman DM, Hoffman SL, Weiss WR. 1998. Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four *Plasmodium falciparum* DNA plasmids. *Infect. Immun.* 66:4193-202.
70. Shi YP, Hasnain SE, Sacci JB, Holloway BP, Fujioka H, Kumar N, Wohlhueter R, Hoffman SL, Collins WE, Lal AA. 1999. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1615-20.
71. Mossman SP, Pierce CC, Robertson MN, Watson AJ, Montefiori DC, Rabin M, Kuller L, Thompson J, Lynch JB, Morton WR, Benveniste RE, Munn R, Hu SL, Greenberg P, Haigwood NL (1999) Immunization against SIVmne in macaques using multigenic DNA vaccines *J Med Primatol*, 28: 206-213.
72. Mendoza RB, Cantwell MJ, Kipps TJ. 1997. Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization. *J. Immunol.* 159:5777-81.
73. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JL, Dang K, Oh J, Dentchev T, Lee D, Nottingham LK, Chalian AA, McCallus D, Ciccarelli R, Agadjanyan MG, Weiner DB (1999) Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV *J Interferon Cytokine Res*, 19: 77-84,
74. Corr M, Tighe H, Lee D, Dudler J, Trieu M, Brinson DC, Carson DA, 1997. Costimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J. Immunol.* 159:4999-5004.
75. Lee AH, Suh YS, Sung YC (1999) DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses *Vaccine*, 17: 473-479.
76. Kim JJ, Bagarazzi ML, Trivedi N, Hu Y, Kazahaya K, Wilson DM, Ciccarelli R, Chattergoon MA, Dang K, Mahalingam S, Chalian AA, Agadjanyan MG, Boyer JD, Wang B, Weiner DB. 1997, Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat. Bio-technol.* 15:641-46.
77. Tsuji T, Harnajima K, Ishii N, Aoki I, Fukushima J, Xin KQ, Kawamoto S, Sasaki S, Matsunaga K, Ishigatsubo Y, Tani K, Okubo T, Okuda K. 1997. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.* 27:782-87.
78. Xiang Z, Ertl HC. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2:129-35.
79. Lee AH, Suh YS, Sung YC. 1999. DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses. *Vaccine* 17: 473-79.
80. Weiss WR, Ishii KJ, Hedstrom RC, Sedegah M, Ichino M, Barnhart K, Klinman DM, Hoffman SL. 1998. A plasmid encoding murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine. *J. Immunol.* 161:2325-32.
81. Svanholm C, Lowenadler B, Wigzell H. 1997. Amplification of T-cell and anti-body responses in DNA based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with a GM-CSF expression vector. *Scand. J. Immunol.* 46:298-303.
82. Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Xin KQ, Ishii N, Aoki I, Ishigatsubo Y, Tani K, Kawamoto S, Nitta Y, Miyazaki J, Koff WC, Okubo T, Okuda K. 1997. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. *J. Immunol* 158:4008-13.
83. Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Dang K, Wang B, Boyer JD, Weiner DB. 1997. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 158:816-26.
84. Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, Mc-Gregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, Lunn DP, Olsen CW. 1998. Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J. Virol.* 72:1704-8.
85. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JL, Dang K, Oh J, Dentchev T, Lee D, Nottingham LK, Chalian AA, McCallus D, Ciccarelli E, Agadjanyan MG, Weiner DB. 1999. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and STV. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:77-84.
86. Chow YH, Chiang BL, Lee YL, Chi WK, Lin WC, Chen YT, Tao MH. 1998. Development of Th1 and Th2 population and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by code-livery of various cytokine genes. *J. Immunol.* 160:1320-29.
87. Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* 158:1231-37.
88. Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J. Virol.* 71:169-78.

89. Kim JJ, Trivedi NN, Nottingham LK, Morrison L, Tsai A, Hu Y, Mahalingam S, Dang K, Ahn L, Doyle NK, Wilson DM, Chattergoon MA, Chalian AA, Boyer JD, Agadjanyan MG, Weiner DB. 1998. Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* 28:1089-103.
90. Gurunathan S, Irvine KR, Wu CY, Cohen JI, Thomas E, Prussin C, Restifo NP, Seder RA. 1998. CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge. *J. Immunol.* 161:4563-71.
91. Maecker HT, Umetsu DT, DeKruyff RH, Levy S. 1997. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine* 15:1687-96.
92. Hakim I, Levy S, Levy R. 1996. A nine amino acid peptide from IL-1 β augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines. *J. Immunol.* 157:5503-11.
93. Ishii KJ, Weiss WR, Ichino D, Verthelyi D, Klinman DM. 1999. Activity and safety of DNA plasmids encoding IL-4 and IFN- γ . *Gene Ther.* 6:237-44.
94. Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K. 1997. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in lipo-somes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J. Immunol* 159:3638-47.
95. Iwasaki A., Stiernholm BJ, Chan AK, Berinstein NL, Barber BH. 1997. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J. Immunol.* 158:4591-601.
96. Operschall E, Schuh T, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K (1999) Enhanced protection against viral infection by co-administration of plasmid DNA coding for viral antigen and cytokines in mice *J Clin Virol*, 13: 17-27.
97. Ishii N, Tsuji T, Xin KQ, Mohri H, Okuda K. 1998. Adjuvant effect of Uben-imex on a DNA vaccine for HIY-1. *Clin. Exp. Immunol.* 111:30-35.
96. Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kawamoto S, Mohri H, Kensil CR, Okuda K. 1998, Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA, vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes *J. Virol.* 72:4931-39.
99. Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, Ihata A, Ishii N, Gorai J, Hirahara F, Mohri H, Okuda K. 1998. Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect. Immun.* 66:823-26.
100. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. 1999. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med* 5:387-91.
101. Klavinskis LS, Gao L, Barnfield C, Lehner T, Parker S. 1997, Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* 15:818-20.
102. Haigwood NL, Pierce CC, Robertson MN, Watson AJ, Montefiori DC, Rabin M, Lynch JB, Kuller L, Thompson J, Morton WR, Benveniste RE, Hu SL, Greenberg P, Mossman SP (1999) Protection from pathogenic SIV challenge using multigenic DNA vaccines *Immunol Lett*, 66: 183-188.
103. Herrmann JE, Chen SC, Jones DH, Tin-sley-Bown A, Fynan EF, Greenberg HB, Farrar GH. 1999. Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. *Virology* 29:148-53.
104. Chen SC, Jones DH, Fynan EF, Farrar GH, Clegg JC, Greenberg HB, Hermann JE. 1998. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J. Virol.* 72:5757-61.
105. Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JC, Farrar GH. 1997. Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* 15:814-17.
106. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC (2000) DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL) *Vaccine*, 18; 1059-1066.
107. Krieg AM (1999) CpG DNA: a novel immunomodulator *Trends Microbiol* 7.
108. Sato Y, Roman M, Tighe J, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-54.
109. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Wald-schmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-49.
110. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigat-subo Y. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 158:3635-39.
111. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. 1998. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15553-58
112. Klinman DM. 1998. Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxy nucleotides. *Antisense Nucl.*

Acid Drug Dev. 8:181-84.

113. Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. 1999, CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* 17:19-25.
114. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 160:3627-30.
115. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1 promoting adjuvants. *Nat. Med* 3:849-54.
116. Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klennerman P (1999) CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines *J Virol*, 73: 4120-4126.
117. Paillard F (1999) CpG: the double-edged sword [comment] *Hum Gene Ther*, 10: 2089-2090.
118. Bryder K, Sbai H, Nielsen HV, Corbet S, Nielsen C, Whalen RG, Fomsgaard A (1999) Improved immunogenicity of HIV-1 epitopes in HBsAg chimeric DNA vaccine plasmids by structural mutations of HBsAg DNA *Cell Biol.*
119. Norman JA, Hobart P, Manthorpe M, Felgner P, Wheeler C. 1997. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine* 15:801-3.
120. Wild B, Gruner B, Metzger K, Kuhrober A, Pudollek HP, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. 1998, Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid, *Vaccine* 16:353-60.
121. Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y, 1998, Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J. Immunol.* 161:5594-99.
122. Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A, Haas J. 1998. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage, *J. Virol.* 72:1497-503.
123. Vinner L, Nielsen HV, Bryder K, Corbet S, Nielsen C, Fomsgaard A. 1999. Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine* 17:2166-75.
124. Inchauspe G, Vitvitski L, Major ME, Jung G, Spengler U, Maisonnas M, Trepo C. 1997. Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol.* 16:185-95.
125. Rice J, King CA, Spellerberg MB, Fairweather N, Stevenson FK. 1999. Manipulation of pathogen-derived genes to influence antigen presentation via DNA vaccines. *Vaccine* 17:3030-38.
126. Wu Y, Kipps TJ. 1997. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 159:6037-43.
127. Tobery TW, Siliciano RF. 1997, Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J. Exp. Med* 185:909-20.
128. Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. 1997, DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J. Virol.* 71:8497-503.
129. Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, McWaters P, Kelly J, Tennent JM, Lew AM, Scheerlinck JP (1999) Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep *Infect Immun*, 67: 6434-6438.
130. Forns X, Emerson SU, Tobin GJ, Mushahwar IK, Purcell RH, Bukh J(1999) DNA immunization of mice and macaques with plasmids encoding hepatitis C virus envelope E2 protein expressed intracellularly and on the cell surface *Vaccine*, 17: 1992-2002.
131. Lewis PJ, van Drunen Littel-van den H, Babiuk LA (1999) Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response *J Virol*, 73: 10214-10223.
132. Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collies F, Morris S (1999) Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences *Infect Immun*, 67: 4780-4786.
133. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL (1999) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination *Nature*, 400: 269-271.
134. Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Kawashima M, Koide Y (1999) Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 445-451.
135. Svanholm C, Bandholtz L, Lobell A, Wigzell H (1999) Enhancement of antibody responses by DNA immunization using expression vectors mediating efficient antigen secretion *J Immunol Methods*, 228: 121-130.
136. Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL (1999) DNA, immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses *Vaccine*, 18: 805-814.
137. Smith J S, Yager P A, Baer GM in *Laboratory techniques in rabies*, by Meslin F-X, Kaplan M M & Ko-

prowski H, (WHO, Geneva) 1996, 181.

138. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning; A laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbour laboratory press, Cold Spring Harbour, NY).

139. Prazeres DMF, Ferreira GNM, Monteiro GA, Cooney CL, Cabral JMS. (1999) large scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. TIBTECH 17: 169-174.

140. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki VJ. (1993) Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum. Gene Ther. 4: 419-421.

141. Keiny, MP, Lathe R, Drillen R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecocq JP. (1984) Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature 312: 163-166.

Patentansprüche

1. Die Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut ist **dadurch gekennzeichnet**, dass sie ein Plasmid enthält, das die entsprechende DNA-Sequenzen hat, die das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren und inaktivierte Tollwutviren kodieren.

2. Die Zusammensetzung des Impfstoffes nach Anspruch 1 ist dadurch gekennzeichnet, dass das Präparat von inaktivierten Tollwutviren aus Wirbeltierzellen hergestellt wird.

3. Die Zusammensetzung des Impfstoffes nach Anspruch 2 ist dadurch gekennzeichnet, dass die Wirbeltierzellen Vero Zellen, Zellen der Nieren des Hamstersäuglings, Hühnerembryozellen sind.

4. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut, der ein Plasmid enthält, das die entsprechende DNA-Sequenzen hat, die das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren und inaktivierte Tollwutviren kodieren, ist dadurch gekennzeichnet, dass der Prozess folgende Schritte beinhaltet:

- a) die Herstellung des Plasmides, das die entsprechende DNA-Sequenzen hat, die das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren kodieren;
- b) die Herstellung des Präparates von inaktivierten Tollwutviren;
- c) die Vermischung des Plasmides, das nach Schritt a) entwickelt wird, mit der Dosis zwischen 1-200 Mikrogramm mit inaktivierten Tollwutviren, die nach Schritt b) entwickelt werden, mit einem Puffer, dessen pH-Wert zwischen 7.0 und 8.0 liegt, mit entsprechenden Salzen und stabilisierenden oder konservierenden Stoffen;
- d) die Durchmischung der Zusammensetzung;
- e) die Abfüllung der Zusammensetzung.

5. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach Anspruch 4 ist dadurch gekennzeichnet, dass es einen zusätzlichen Schritt gibt, in dem ein Hilfsmittel zugegeben wird.

6. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach Anspruch 5 ist dadurch gekennzeichnet, dass das Hilfsmittel Aluminiumhydroxyd enthält.

7. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach einem der Ansprüche 4-6 ist dadurch gekennzeichnet, dass das Salz Natriumchlorid ist.

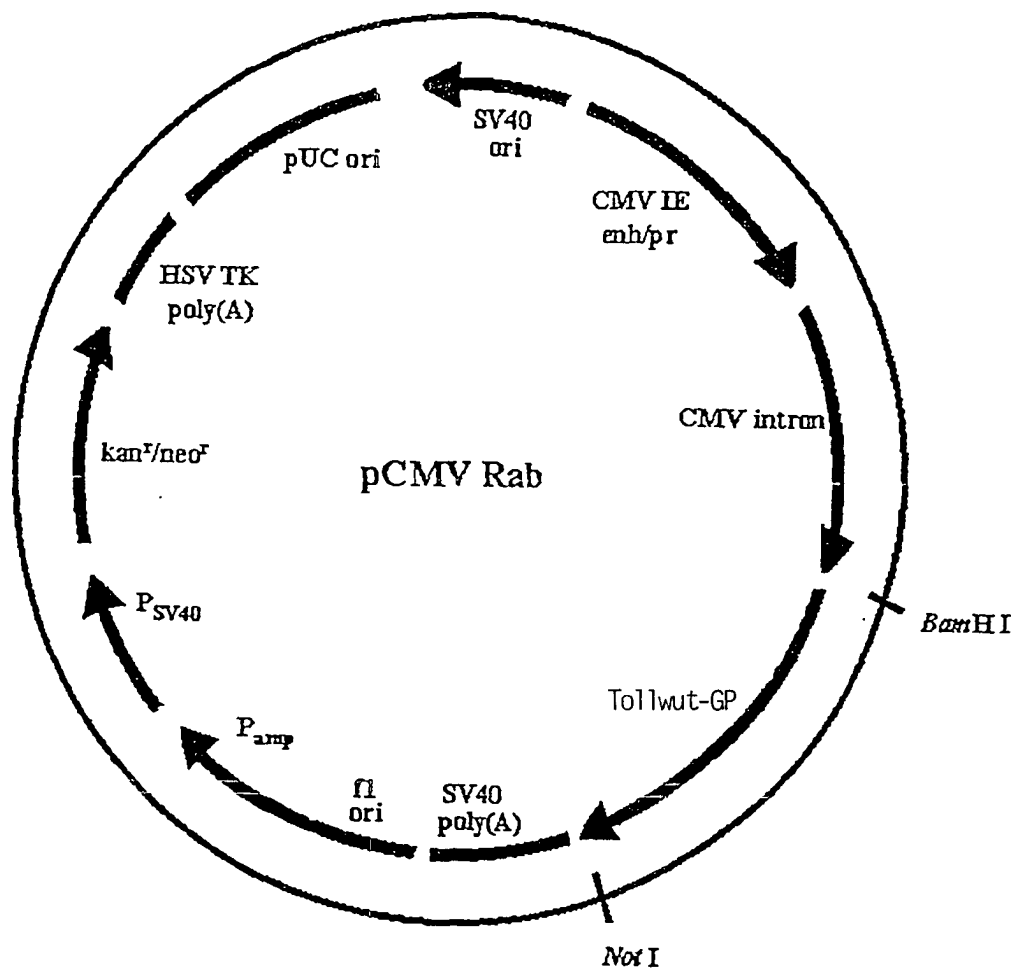
8. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach einem der Ansprüche 4-7 ist dadurch gekennzeichnet, dass die stabilisierenden oder konservierenden Stoffe Thiomersol, Malzzucker und/oder menschliches Serumalbumin enthalten.

9. Das Verfahren der Herstellung der Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach einem der Ansprüche 4-8 ist dadurch gekennzeichnet, dass die Puffer einen Phosphatpuffer und/oder einen Tris-Puffer enthalten.

10. Die Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut, die ein Plasmid enthält, das die das Oberflächenglykoprotein von Tollwutviren und inaktivierte Tollwutviren kodierende DNA-Sequenzen hat, zum Gebrauch zur Immunisierung der Wirbeltiere gegen Tollwut

11. Die Zusammensetzung des Impfstoffes gegen Tollwut nach Anspruch 10 zum Gebrauch zur Immunisierung des Viehes, der Hunde oder der Menschen.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen



Figur 1