



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 30 798 T2** 2005.12.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 017 837 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 30 798.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/02867**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 944 085.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/015683**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.07.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/86**
C12N 7/01, C12N 5/10, C12N 15/63,
C12N 15/53, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:
9720465 25.09.1997 GB

(73) Patentinhaber:
Oxford Biomedica (UK) Ltd., Oxford, GB

(74) Vertreter:
**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**BEBBINGTON, Chris, Boxford, Newbury RG20
8DJ, GB; KINGSMAN, Susan, Islip, Oxford OX5
2SF, GB; UDEN, Mark, Oxford OX1 4RA, GB;
KINGSMAN, Alan, Islip, Oxford OX5 2SF, GB;
MITROPHANOS, Kyriacos, Oxford OX4 1SZ, GB**

(54) Bezeichnung: **RETROVIRALE VEKTOREN, DIE FUNKTIONELLE SPLEISS-DONOR- UND SPLEISS-AKZEP-
TOR-STELLEN ENTHALTEN**

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 einen Vektor.

[0002] Genauer gesagt, betrifft die vorliegende Erfindung ein neuartiges System für die Verpackung und Expression von genetischem Material in einem retroviralen Partikel.

[0003] Noch genauer betrifft die vorliegende Erfindung ein neues System, das zur Expression eines retroviralen Partikels in der Lage ist, das dazu befähigt ist, eine Nukleotidsequenz von Interesse (hiernach abgekürzt als „NOI“) – oder sogar eine Vielzahl von NOI – an eine oder mehrere Zielstellen zu liefern.

[0004] Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung unter anderem einen neuen retroviralen Vektor, der für die Gentherapie nützlich ist.

[0005] Gentherapie kann einen oder mehrere der folgenden Punkte beinhalten: die Addition, das Ersetzen, die Deletion, den Austausch, die Manipulation etc. von einer oder mehreren Nukleotidsequenzen, in z.B. einer oder mehreren Zielstellen, so etwa in Zielzellen. Wenn die Zielstellen Zielzellen sind, so können die Zellen Teil eines Gewebes oder Organs sein. Eine allgemeine Unterrichtung über die Gentherapie ist in „Molecular Biology“ (Herausgeber: Robert Meyers, VCH-Verlag, z.B. Seiten 556-558) zu finden.

[0006] In einem weiteren Beispiel kann die Gentherapie auch ein Mittel bereitstellen, mittels dessen ein jedes oder mehrere der folgenden Punkte realisiert werden können: Anwendung einer Nukleotidsequenz, wie etwa eines Gens, zum Austauschen oder Supplementieren eines defekten Gens; Eliminieren einer pathogenen Nukleotidsequenz, wie etwa eines Gens oder eines Expressionsproduktes hiervon, Hinzufügen oder Einführen einer Nukleotidsequenz, wie etwa eines Gens oder eines Expressionsproduktes hiervon, beispielsweise zur Erzeugung eines günstigeren Phänotyps; Hinzufügen oder Einführen einer Nukleotidsequenz, wie etwa eines Gens oder eines Expressionsproduktes hiervon, z.B. für Selektionszwecke (d.h. zur Selektion transformierter Zellen und dergleichen gegenüber nicht-transformierten Zellen); Manipulation von Zellen auf der molekularen Ebene zur Behandlung, Heilung oder Verhinderung von Krankheitszuständen, wie etwa Krebs (Schmidt-Wolf und Schmidt-Wolf, 1994, Annals of Hematology 69: 273-279) oder anderer Krankheitszustände, wie etwa Immunstörungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, neurologische, entzündliche oder infektiöse Erkrankungen; Manipulation und/oder Einführung von Antigenen zur Auslösung einer Immunantwort, wie etwa als genetische Impfung.

[0007] In den letzten Jahren sind Retroviren für die Verwendung bei der Gentherapie vorgeschlagen worden. Im wesentlichen sind Retroviren RNA-Viren mit einem Lebenszyklus, der von dem der lytischen Viren verschieden ist. Diesbezüglich ist ein Retrovirus eine infektiöse Einheit, die sich über eine DNA-Zwischenstufe repliziert. Wenn ein Retrovirus eine Zelle infiziert, wird sein Genom durch ein reverses Transkriptase-Enzym in eine DNA-Form überführt. Die DNA-Kopie dient als Matrize für die Produktion neuer RNA-Genome und viral codierter Proteine, die für den Zusammenbau der infektiösen Viruspartikel notwendig sind.

[0008] Es gibt zahlreiche Retroviren, und Beispiele beinhalten: Murines Leukämievirus (MLV), humanes Immunschwächevirus (HIV), equines infektiöses Anämievirus (EIAV), Mausbrusttumovirus (MMTV), Rous Sarcomavirus (RSV), Fujinami Sarcomavirus (FuSV), murines Moloney Leukämievirus (Mo-MLV), murines FBR-Osteosarcomavirus (FBR MSV), murines Moloney Sarcomavirus (Mo-MSV), murines Abelson Leukämievirus (A-MLV), Vogel-Myelozytomatose-Virus 29 (MC29) und Vogel-Erythroblastose-Virus (AEV).

[0009] Eine detaillierte Liste von Retroviren findet sich in Coffin et al („Retroviruses“ 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Herausgeber: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, S. 758-763).

[0010] Details über die genomische Struktur einiger Retroviren lassen sich in der Technik finden. Beispielhaft sind Details über HIV in NCBI Genbank (d.h. unter der Genom-Zugangsnummer AF033819) zu finden.

[0011] Im wesentlichen enthalten alle wildtypischen Retroviren drei hauptsächlich codierende Domänen, gag, pol, env, die für essentielle Proteine des Virions codieren. Nichtsdestoweniger können Retroviren grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: nämlich „einfach“ und „komplex“. Diese Kategorien sind anhand der Organisation von deren Genomen unterscheidbar. Einfache Retroviren tragen gewöhnlich nur elementare Informationen. Im Gegensatz dazu codieren komplexe Retroviren auch für zusätzliche regulatorische Proteine, die von multiplen gespleißten Botenmolekülen abgeleitet sind.

[0012] Retroviren können sogar weiter in sieben Gruppen unterteilt werden: Fünf dieser Gruppen repräsentieren Retroviren mit onkogenem Potential. Die verbleibenden zwei Gruppen sind die Lentiviren und die Spumaviren. Eine Zusammenschau dieser Retroviren wird in „Retroviruses“ (1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Herausgeber: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, S. 1-25) vorgestellt.

[0013] Alle onkogenen Mitglieder mit Ausnahme der Gruppe humanes T-Zell-Leukämievirus und Rinderleukämievirus (HTLV-BLV) sind einfache Retroviren. HTLV, BLV und die Lentiviren und Spumaviren sind komplex. Einige der am besten untersuchten onkogenen Retroviren sind Rous Sarcomavirus (RSV), Maus-Brusttumovirus (MMTV) und murines Leukämievirus (MLV), sowie das humane T-Zell-Leukämievirus (HTLV).

[0014] Die Gruppe der Lentiviren kann noch weiter in „Primat“ und „Nicht-Primat“ unterteilt werden. Beispiele für Primaten-Lentiviren beinhalten das humane Immunschwächevirus (HIV), das verursachende Agens des humanen Auto-Immunschwäche-Syndroms (AIDS) und das Affen-Immunschwächevirus (SIV). Die Nicht-Primaten-Gruppe der Lentiviren beinhaltet das prototypische „langsame Virus“ Visna/Maedi-Virus (VMV), ebenso wie das verwandte caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV), equines infektiöses Anämievirus (EIAV) und das in jüngerer Zeit beschriebene feline Immunschwächevirus (FIV) und das Rinder-Immunschwächevirus (BIV).

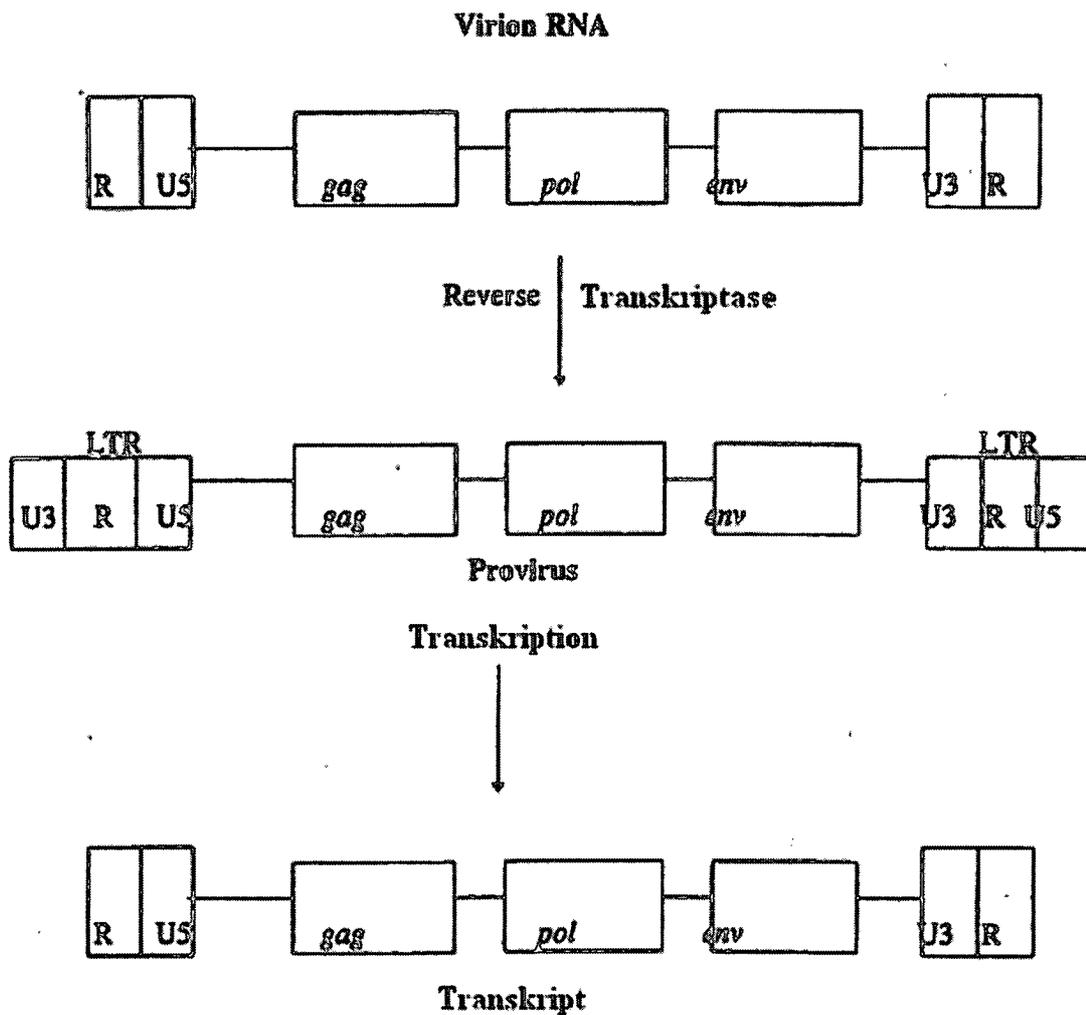
[0015] Eine Abgrenzung zwischen der Lentivirusfamilie und anderen Typen von Retroviren liegt darin, dass Lentiviren die Fähigkeit besitzen, sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Lewis et al 1992 EMBO J 11: 3053-3058; Lewis und Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516). Im Gegensatz dazu sind andere Retroviren, wie etwa MLV, nicht dazu in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu infizieren, wie etwa diejenigen, die z.B. Muskeln, Gehirn, Lungen- und Lebergewebe aufbauen.

[0016] Während des Prozesses der Infektion heftet sich ein Retrovirus zu Beginn an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor an. Beim Eintritt in die empfängliche Wirtszelle wird das retrovirale RNA-Genom dann durch die viral codierte reverse Transkriptase, die im Inneren des Elternvirus getragen wird, in DNA kopiert. Diese DNA wird zum Zellkern der Wirtszelle transportiert, wo sie nachfolgend in das Wirtsgenom integriert. Auf dieser Stufe wird sie typischerweise als das Provirus bezeichnet. Das Provirus liegt während der Zellteilung stabil im Wirtschromosom vor und wird, wie andere zelluläre Proteine, transkribiert. Das Provirus codiert die Proteine und die Verpackungsmaschinerie, die zur Produktion von weiterem Virus benötigt werden; die neuen Viren können die Zelle dann durch einen manchmal als „Knospung“ bezeichneten Vorgang verlassen.

[0017] Wie bereits angezeigt, umfasst jedes retrovirale Genom die als gag, pol und env bezeichneten Gene, die für Virion-Proteine und Enzyme codieren. Im Provirus sind diese Gene an beiden Enden durch Regionen flankiert, die als lange terminale Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTRs) bezeichnet werden. Die LTRs sind für die Integration des Provirus und für die Transkription verantwortlich. Sie dienen auch als Enhancer-Promotor-Sequenzen. Mit anderen Worten können die LTRs die Expression der viralen Gene kontrollieren. Die Verpackung der retroviralen RNAs im Capsid erfolgt mittels einer psi-Sequenz, die sich am 5'-Ende des viralen Genoms befindet.

[0018] Die LTRs sind ihrerseits identische Sequenzen, die in drei Elemente unterteilt werden können, die als U3, R und U5 bezeichnet werden. U3 ist von einer Sequenz abgeleitet, die nur am 3'-Ende der RNA vorkommt. R ist von einer Sequenz abgeleitet, die an beiden Enden der RNA wiederholt ist, und U5 ist von einer Sequenz abgeleitet, die dem 5'-Ende der RNA vorbehalten ist. Die Größe der drei Elemente kann unter den verschiedenen Retroviren erheblich variieren.

[0019] Zur Erleichterung des Verständnisses werden unten die einfachen allgemeinen Strukturen (nicht maßstabsgerecht) der RNA- und DNA-Formen des retroviralen Genoms dargestellt, wobei die elementaren Merkmale der LTRs und die relative Positionierung von gag, pol und env angezeigt sind.



[0020] Wie im obigen Diagramm dargestellt, ist der grundlegende molekulare Aufbau eines infektiösen retroviralen RNA-Genoms (5') R-U5 – gag, pol, env – U3-R (3'). In einem defekten retroviralen Vektorgenom können gag, pol und env abwesend oder nicht funktionell sein. Die R-Regionen an den beiden Enden der RNA sind wiederholte Sequenzen. U5 und U3 stellen singuläre Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende des RNA-Genoms dar.

[0021] Die reverse Transkription der Virion-RNA in doppelsträngige DNA findet im Zytoplasma statt und beinhaltet zwei Sprünge der reversen Transkriptase vom 5'-Ende an das 3'-Ende des Matrizenmoleküls. Das Ergebnis dieser Sprünge ist eine Verdoppelung der am 5'- und 3'-Ende der Virion-RNA befindlichen Sequenzen. Diese Sequenzen erscheinen dann in Tandemfusion an beiden Enden der viralen DNA und bilden die langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTRs), die R-, U5- und U3-Regionen umfassen. Nach Abschluss der reversen Transkription wird die virale DNA in den Zellkern verbracht, wo die lineare Kopie des retroviralen Genoms, als Präintegrationskomplex (PIC) bezeichnet, mittels der Virion-Integrase in zufälliger Weise in die chromosomale DNA inseriert wird, um ein stabiles Provirus auszubilden. Die Anzahl der möglichen Integrationsstellen in das Wirtszellgenom ist sehr groß und sehr weit verstreut.

[0022] Die Kontrolle der proviralen Transkription verbleibt weitgehend bei den nicht-codierenden Sequenzen der viralen LTR. Die Stelle der Transkriptionsinitiation liegt an der Grenze zwischen U3 und R in der linksseitigen LTR (wie oben dargestellt), und die Stelle der poly(A)-Anheftung (Termination) liegt an der Grenze zwischen R und U5 in der rechtsseitigen LTR (wie oben dargestellt). U3 enthält die meisten der transkriptionellen Kontrollelemente des Provirus, was den Promotor und mehrere Enhancer-Sequenzen einschließt, die auf zelluläre und, in einigen Fällen, auf virale Transkriptionsaktivator-Proteine ansprechen. Einige Retroviren besitzen irgendeines oder mehrere der folgenden Gene, wie tat, rev, tax und rex, die für Proteine codieren, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind.

[0023] Die Transkription der proviralen DNA führt zur einer Neubildung von genomischen RNA-Molekülen der viralen RNA voller Länge und von in ihrer Größe subgenomischen RNA-Molekülen, die jeweils durch RNA-Prozessierung gebildet werden. Typischer Weise dienen alle RNA-Produkte als Matrizen für die Produktion viraler Proteine. Die Expression der RNA-Produkte wird erreicht durch eine Kombination von RNA-Transkript-Splei-

ßen und ribosomaler Leserasterverschiebung bei der Translation.

[0024] RNA-Spleißen ist der Prozess, durch den zwischengeschaltete oder „intronische“ RNA-Sequenzen entfernt und die verbleibenden „exonischen“ Sequenzen ligiert werden, um durchgehende Leseraster für die Translation bereitzustellen. Das Primärtranskript der retroviralen DNA wird auf verschiedene Weisen modifiziert und zeigt starke Ähnlichkeit zu zellulärer mRNA. Jedoch muss neu synthetisierte retrovirale RNA, anders als die meisten zellulären mRNAs, in denen alle Introns effizient gespleißt werden, in zwei Populationen unterteilt werden. Eine Population bleibt ungespleißt, um als genomische RNA zu fungieren, und die andere Population wird gespleißt, um subgenomische RNA zu liefern.

[0025] Die ungespleißten retroviralen RNA-Transkripte voller Länge dienen zwei Funktionen: (i) sie codieren die Genprodukte von gag und pol und (ii) werden sie als genomische RNA in Nachkommen-Virion-Partikeln verpackt. Die RNA-Moleküle subgenomischer Größe liefern die mRNA für den Rest der viralen Genprodukte. Alle gespleißten retroviralen Transkripte tragen das erste Exon, das die U5-Region der 5'-LTR überspannt. Das letzte Exon behält stets die Regionen U3 und R bei, die von der 3-LTR codiert sind, obwohl dies in der Größe variiert. Die Zusammensetzung der restlichen RNA-Struktur hängt ab von der Anzahl der Spleißereignisse und der Auswahl der alternativen Spleißstellen.

[0026] Bei einfachen Retroviren bleibt eine Population der neu synthetisierten retroviralen RNA ungespleißt, um als genomische RNA und als mRNA für gag und pol zu fungieren. Die andere Population wird gespleißt, wobei der 5'-Bereich der genomischen RNA mit den stromabwärtigen Genen, am häufigsten mit env, fusioniert wird. Das Spleißen wird erreicht mittels der Verwendung eines Spleiß-Donors, der sich aufstromig von gag befindet, und eines Spleiß-Akzeptors nahe dem 3'-Terminus von pol. Das Intron zwischen dem Spleiß-Donor und dem Spleiß-Akzeptor, das durch das Spleißen entfernt wird, enthält die Gene gag und pol. Dieses Spleißereignis erzeugt die mRNA für das envelope (Env)-Protein. Typischer Weise liegt der Spleiß-Donor aufstromig von gag, jedoch ist es bei einigen Viren, wie etwa ASLV, so, dass der Spleiß-Donor einige wenige Codons in das gag-Gen hineinverlagert ist, was in einem primären Env-Translationsprodukt resultiert, das einige wenige amino-terminale Aminosäurereste mit Gag gemeinsam hat. Das Env-Protein wird an membrangebundenen Polyribosomen synthetisiert und durch den Vesikel-Transport der Zelle zur Plasmamembran transportiert, wo es in die Viruspartikel eingebaut wird.

[0027] Komplexe Retroviren erzeugen sowohl einfach als auch mehrfach gespleißte Transkripte, die nicht nur die env-Genprodukte codieren, sondern auch die Sets regulatorischer und akzessorischer Proteine, die für diese Viren typisch sind. Komplexe Retroviren, wie etwa die Lentiviren, und insbesondere HIV, liefern erstaunliche Beispiele der Komplexität des alternativen Spleißens, das während der retroviralen Infektion stattfinden kann. Beispielsweise ist es inzwischen bekannt, dass HIV-1 in der Lage ist, über 30 verschiedene mRNAs durch suboptimales Spleißen aus primären genomischen Transkripten zu erzeugen. Dieser Auswahlprozess scheint reguliert zu sein, da Mutationen, die konkurrierende Spleiß-Akzeptoren unterbrechen bzw. trennen, Verschiebungen im Spleißmuster hervorrufen und die virale Infektivität beeinflussen können (Purcell und Martin 1993 J Virol 67: 6365-6378).

[0028] Die relativen Mengenanteile von RNA voller Länge und RNA subgenomischer Größe variieren in den infizierten Zellen und eine Modulation der Spiegel dieser Transkripte ist ein potentieller Kontrollschritt bei der retroviralen Genexpression. Für die retrovirale Genexpression müssen sowohl die ungespleißten als auch die gespleißten RNAs ins Zytoplasma transportiert werden, und das richtige Verhältnis der gespleißten und ungespleißten RNA muss für eine effiziente retrovirale Genexpression aufrechterhalten werden. Unterschiedliche Klassen von Retroviren haben verschiedene Lösungen für dieses Problem entwickelt. Die einfachen Retroviren, die nur RNAs voller Länge und einfach gespleißte RNAs verwenden, regulieren die zytoplasmatischen Verhältnisse dieser Spezies entweder durch die Verwendung unterschiedlich effizienter Spleißstellen oder durch den Einbau mehrerer cis-wirkender Elemente, die nur zum Teil definiert worden sind, in ihr Genom. Die komplexen Retroviren, die die Synthese sowohl einfach als auch mehrfach gespleißter RNA steuern, regulieren den Transport und das mögliche Spleißen der verschiedenen genomischen und subgenomischen RNA-Spezies durch die Interaktion von Sequenzen auf der RNA mit dem Proteinprodukt eines der akzessorischen Gene, wie etwa rev bei HIV-1 und rex bei HTLV-1.

[0029] Im Hinblick auf die Strukturgene gag, pol und env selber und in geringfügig größerem Detail, codiert gag das innere Strukturprotein des Virus. Gag wird proteolytisch in die reifen Proteine MA (Matrix), CA (Capsid) und NC (Nukleocapsid) prozessiert. Das pol-Gen codiert die reverse Transkriptase (RT), die sowohl eine DNA-Polymerase als auch zugehörige RNase H-Aktivitäten und Integrase (IN) beinhaltet, welche somit die Replikation des Genoms vermittelt. Das env-Gen codiert das Oberflächen (SU)-Glykoprotein und das Transmem-

bran (TM)-Protein des Virions, die einen Komplex bilden, der spezifisch mit zellulären Rezeptorproteinen interagiert. Diese Interaktion führt schließlich zur Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran.

[0030] Das Env-Protein ist ein virales Protein, das das Viruspartikel überzieht und eine essentielle Rolle dabei spielt, den Viruseintritt in eine Zielzelle zu erlauben. Der envelope (Hüll)-Glykoproteinkomplex von Retroviren beinhaltet zwei Polypeptide: ein äußeres, glykosyliertes hydrophiles Polypeptid (SU) und ein Membran-durchspannendes Protein (TM). Zusammen bilden diese einen oligomeren „Knauf“ oder eine „Knaufspitze“ auf der Oberfläche eines Virions. Beide Polypeptide werden durch das env-Gen codiert und werden in Form eines Polyprotein-Vorläufers synthetisiert, der während seines Transports zur Zelloberfläche proteolytisch gespalten wird. Obwohl ungespaltene Env-Proteine in der Lage sind, an den Rezeptor zu binden, ist das Spaltereignis selber notwendig, um das Fusionspotential des Proteins zu aktivieren, das für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle benötigt wird. Typischerweise werden sowohl die SU- als auch die TM-Proteine an mehreren Stellen glykosyliert. Bei einigen Viren jedoch, z.B. bei MLV, wird TM nicht glykosyliert.

[0031] Obwohl die SU- und TM-Proteine nicht immer für den Zusammenbau des umhüllten Virionpartikels als solchem benötigt werden, so spielen sie eine wesentliche Rolle beim Eintrittsprozess. In diesem Zusammenhang bindet die SU-Domäne an ein Rezeptormolekül, oft ein spezifisches Rezeptormolekül, auf der Zielzelle. Man nimmt an, dass dieses Bindungsereignis das Membranfusions-induzierende Potential des TM-Proteins aktiviert, wonach die virale und die zelluläre Membran fusionieren. Bei einigen Viren, bekannter Weise bei MLV, wird angenommen, dass ein Spaltereignis, das in der Entfernung eines kurzen Abschnitts vom zytoplasmatischen Schwanz von TM resultiert, eine Schlüsselrolle bei der Entfaltung der vollständigen Fusionsaktivität dieses Proteins spielt (Brody et al 1994 J Virol 68: 4620-4627; Rein et al 1994 J Virol 68: 1773-1781). Dieser zytoplasmatische „Schwanz“, distal zu dem Membran-durchspannenden Segment von TM befindlich, verbleibt an der Innenseite der viralen Membran; er variiert bei verschiedenen Retroviren erheblich in seiner Länge.

[0032] Somit kann die Spezifität der SU/Rezeptor-Interaktion das Wirtsspektrum und den Gewebetropismus eines Retrovirus definieren. In einigen Fällen kann diese Spezifität das Transduktionspotential eines rekombinanten retroviralen Vektors einschränken. Hier beinhaltet Transduktion einen Prozess der Verwendung eines viralen Vektors zur Auslieferung eines nicht-viralen Gens an eine Zielzelle. Aus diesem Grund haben viele Gentherapieversuche MLV verwendet. Ein bestimmtes MLV, das ein als 4070A bezeichnetes Hüllprotein (envelope-Protein) aufweist, ist als ein amphotropes Virus bekannt, und dieses kann auch humane Zellen infizieren, da sein Hüllprotein an einem Phosphattransport-Protein „andockt“, das zwischen Mensch und Maus konserviert ist. Dieser Transporter ist ubiquitär, sodass diese Viren befähigt sind, viele Zelltypen zu infizieren. In einigen Fällen jedoch, besonders aus Aspekten der Sicherheit, kann es nutzbringend sein, spezifisch auf begrenzte Zellen abzielen. Zu diesem Zweck haben mehrere Gruppen ein ecotropes Maus-Retrovirus hergestellt, das anders als sein amphotroper Verwandter normalerweise nur Mauszellen infiziert, um in spezifischer Weise bestimmte humane Zellen zu infizieren. Der Austausch eines Fragments eines Env-Proteins durch ein Erythropoietin-Segment erzeugte ein rekombinantes Retrovirus, das dann spezifisch an menschliche Zellen bindet, die den Erythropoietin-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, wie etwa die Vorläufer roter Blutzellen (Maulik und Patel, 1997, „Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies“ 1997, Wiley-Liss Inc., S. 45).

[0033] Zusätzlich zu gag, pol und env enthalten die komplexen Retroviren auch „akzessorische“ Gene, die für akzessorische Proteine bzw. für Hilfsproteine codieren. Akzessorische Proteine oder Hilfsproteine werden als diejenigen Proteine definiert, die von den akzessorischen Genen codiert werden, zusätzlich zu denjenigen, die von den üblichen replikativen Genen oder Strukturgenen gag, pol und env codiert werden. Diese akzessorischen Proteine sind von denen abgegrenzt, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, wie etwa den von tat, rev, tax und rex codierten Proteinen. Beispiele für akzessorische Gene beinhalten eines oder mehrere von vif, vpr, vpx, vpu und nef. Diese akzessorischen Gene sind z.B. in HIV zu finden (siehe z.B. Seiten 802 und 803 von „Retroviruses“, Herausgeber Coffin et al, Pub. CSHL 1997). Nicht-essentielle akzessorische Proteine können in spezialisierten Zelltypen funktionell sein und Funktionen bereitstellen, die wenigstens teilweise eine Verdopplung einer Funktion eines zellulären Proteins darstellen. Typischerweise sind die akzessorischen Gene zwischen pol und env positioniert, gerade abstromig von env, enthaltend die U3-Region der LTR oder überlappende Abschnitte mit env bzw. miteinander.

[0034] Die komplexen Retroviren haben regulatorische Mechanismen entwickelt, die viral codierte Transkriptionsaktivatoren ebenso wie zelluläre Transkriptionsfaktoren nutzen. Diese in trans wirkenden viralen Proteine dienen als Aktivatoren der von den LTRs gesteuerten RNA-Transkription. Die transkriptionellen trans-Aktivatoren der Lentiviren werden von den viralen tat-Genen codiert. Tat bindet an eine stabile, als Stamm-Schleife vorliegende sekundäre RNA-Struktur, die als TAR bezeichnet wird und bei der eine Funktion offenbar darin be-

steht, Tat optimal zu positionieren, um die Transkription zu trans-aktivieren.

[0035] Wie im vorigen erwähnt, sind Retroviren als Auslieferungssystem (auch als Auslieferungsvehikel oder Auslieferungsvektor bezeichnet) vorgeschlagen worden, um unter anderem eine NOI oder eine Mehrzahl von NOI an eine oder mehrere Stellen von Interesse zu übertragen. Der Transfer kann *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* oder in Kombinationen hiervon erfolgen. Wenn sie in dieser Weise verwendet werden, so werden die Retroviren typischerweise als retrovirale Vektoren oder rekombinante retrovirale Vektoren bezeichnet. Retrovirale Vektoren sind sogar dafür genutzt worden, um verschiedene Aspekte des retroviralen Lebenszyklus, einschließlich der Rezeptornutzung, der reversen Transkription und RNA-Verpackung, zu studieren (Übersichtsartikel von Miller, 1992, *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 1-24).

[0036] Bei einem typischen rekombinanten retroviralen Vektor zur Verwendung bei der Gentherapie kann wenigstens ein Teil von einem oder mehreren der gag, pol und env Proteincodierenden Regionen aus dem Virus entfernt werden. Dies macht den retroviralen Vektor hinsichtlich der Replikation defekt. Die entfernten Abschnitte können sogar durch eine NOI ersetzt werden, um ein Virus zu erzeugen, das in der Lage ist, sein Genom in ein Wirtsgenom zu integrieren, wo jedoch das modifizierte virale Genom aufgrund eines Fehlens von Strukturproteinen nicht in der Lage ist, sich selbst zu vermehren. Bei Integration im Wirtsgenom erfolgt die Expression des NOI, was z.B. in einem therapeutischen und/oder einem diagnostischen Effekt resultiert. Somit wird die Übertragung eines NOI in eine Stelle von Interesse typischerweise erreicht durch: die Integration des NOI in den rekombinanten viralen Vektor; die Verpackung des modifizierten viralen Vektors in eine Virionhülle; und das Ermöglichen der Transduktion einer Stelle von Interesse, wie etwa einer Zielzelle oder einer Zielzellpopulation.

[0037] Es ist möglich, für die nachfolgende Transduktion z.B. einer Stelle von Interesse Mengen an retroviralen Vektoren zu vervielfältigen und zu isolieren (z.B. durch die Herstellung geeigneter Titer des retroviralen Vektors), wobei eine Kombination einer Verpackungs- oder Helferzelllinie und eines rekombinanten Vektors verwendet wird.

[0038] In einigen Fällen kann die Vervielfältigung und Isolierung die Isolierung der retroviralen Gene gag, pol und env und deren separate Einführung in eine Wirtszelle mit sich bringen, um eine „Verpackungszelllinie“ herzustellen. Die Verpackungszelllinie produziert die Proteine, die für die Verpackung der retroviralen DNA benötigt werden, jedoch kann sie beim Fehlen einer psi-Region keine Verpackung in Capside bewirken. Wenn jedoch ein rekombinanter Vektor, der eine NOI und eine psi-Region trägt, in die Verpackungszelllinie eingeführt wird, so können die Helferproteine den psi-positiven rekombinanten Vektor verpacken, um einen rekombinanten Virenstamm herzustellen. Dieser kann verwendet werden, um Zellen zu transduzieren, um die NOI in das Genom der Zellen einzuführen. Das rekombinante Virus, dessen Genom sämtliche Gene fehlen, die erforderlich sind, um virale Proteine herzustellen, kann nur einmal transduzieren und kann sich nicht vermehren. Diese viralen Vektoren, die nur zu einer einzigen Runde der Transduktion von Zielzellen befähigt sind, sind als replikationsdefekte Vektoren bekannt. Somit wird die NOI ohne die Erzeugung potentiell schädlicher Retroviren in das Wirts- bzw. Zielzell-Genom eingeführt. Eine Zusammenfassung der verfügbaren Verpackungslinien ist in „Retroviruses“ (1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Herausgeber: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, S. 449) dargestellt.

[0039] Die Erstellung von Retrovirus-Verpackungszelllinien hat dazu geführt, sich unter anderem mit dem Problem der spontanen Produktion von Helferviren zu beschäftigen, das bei frühen Konzepten häufig anzutreffen war. Da die Rekombination durch Homologie erheblich erleichtert wird, hat die Verringerung oder Eliminierung der Homologie zwischen den Genomen des Vektors und des Helfers das Problem der Produktion von Helferviren vermindert. In neuerer Zeit sind Verpackungszellen entwickelt worden, bei denen die viral codierten Regionen gag, pol und env auf separaten Expressionsplasmiden getragen werden, die unabhängig von einander in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden, sodass für eine Produktion von wildtypischem Virus drei Rekombinationsereignisse benötigt würden. Dies verringert das Potential für die Erzeugung eines replikationskompetenten Virus. Diese Strategie wird manchmal als das Drei-Plasmid-Transfektionsverfahren bezeichnet (Soneoka et al 1995 *Nucl. Acids Res.* 23: 628-633).

[0040] Transiente Transfektion kann auch verwendet werden, um die Vektorproduktion zu messen, wenn Vektoren entwickelt werden. In diesem Zusammenhang vermeidet die transiente Transfektion die längere Zeit, die benötigt wird, um stabile Vektor-produzierende Zelllinien zu erzeugen und wird verwendet, wenn der Vektor oder die retroviralen Verpackungskomponenten toxisch für Zellen sind. Komponenten, die typischerweise verwendet werden, um retrovirale Vektoren zu erzeugen, beinhalten ein Plasmid, das die Gag/Pol-Proteine codiert, ein Plasmid, das das Env-Protein codiert und ein Plasmid, das eine NOI enthält. Die Vektorproduktion

beinhaltet die transiente Transfektion einer oder mehrerer dieser Komponenten in Zellen, die die anderen erforderlichen Komponenten enthalten. Wenn der Vektor toxische Gene codiert, oder Gene, die störend in die Replikation der Wirtszelle eingreifen, wie etwa Inhibitoren des Zellzyklus oder Gene, die Apoptose induzieren, so kann es schwierig sein, stabile Vektorproduzierende Zelllinien zu erzeugen, jedoch kann eine transiente Transfektion verwendet werden, um den Vektor zu produzieren, bevor die Zelle abstirbt. Es sind unter Verwendung von transienter Infektion auch Zelllinien entwickelt worden, die Vektortiter-Spiegel produzieren, die den Spiegeln vergleichbar sind, die bei stabilen Vektor-produzierenden Zelllinien erhalten werden (Pear et al 1993, Proc Natl Acad Sci 90: 8392-8396).

[0041] Angesichts der Toxizität einiger HIV-Proteine – die es schwierig machen kann, stabile, HIV-basierte Verpackungszellen zu erzeugen – werden HIV-Vektoren für gewöhnlich durch transiente Transfektion von Vektor und Helfervirus hergestellt. Einige Techniker haben sogar das HIV Env-Protein durch das des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) ersetzt. Die Insertion des Env-Proteins von VSV erleichtert die Vektor-Konzentrierung, da HIV/VSV-G-Vektoren mit Titern von 5×10^5 (10^8 nach der Konzentrierung) mittels transienter Transfektion erzeugt worden sind (Naldini et al 1996 Science 272: 263-267). Somit kann die transiente Transfektion von HIV-Vektoren eine nützliche Strategie für die Erzeugung von Vektoren mit hohen Titern bereitstellen (Yee et al 1994 PNAS 91: 9564-9568).

[0042] Im Hinblick auf den Vektor-Titer sind die praktischen Anwendungen retroviraler Vektoren in hohem Maße durch die Titer der transduzierenden Partikel, die bei der *in vitro*-Kultur erreicht werden können (typischerweise nicht mehr als 10^8 Partikel/ml), sowie durch die Empfindlichkeit vieler umhüllter Viren gegenüber traditionellen biochemischen und physikochemischen Techniken der Konzentrierung und Reinigung von Viren begrenzt worden.

[0043] Beispielsweise sind mehrere Verfahren für die Konzentrierung retroviraler Vektoren entwickelt worden, einschließlich der Verwendung von Zentrifugation (Fekete und Cepko 1993 Mol Cell Biol 13: 2604-2613), der Hohlfaser-Filtration (Paul et al 1993 Hum Gene Ther 4: 609-615) und der Tangentialfluss-Filtration (Kotani et al 1994 Hum Gene Ther 5: 19-28). Obwohl ein 20-facher Anstieg des Virustiters erreicht werden kann, begrenzt die relative Zerbrechlichkeit des retroviralen Env-Proteins die Befähigung, retrovirale Vektoren zu konzentrieren, und das Konzentrieren des Virus verläuft für gewöhnlich mit einer schlechten Ausbeute an infektiösen Virionen. Obwohl dieses Problem, wie oben beschrieben, durch das Ersetzen des retroviralen Env-Proteins durch das stabilere VSV-G-Protein überwunden werden kann, was eine effektivere Vektor-Konzentrierung mit besseren Ausbeuten erlaubt, so wird dies durch den Nachteil beeinträchtigt, dass das VSV-G-Protein recht toxisch für Zellen ist.

[0044] Obwohl Helfervirus-freie Vektor-Titer von 10^7 cfu/ml mit den derzeit verfügbaren Vektoren erhältlich sind, können die Versuche oft mit Vektorstammansätzen mit viel niedrigerem Titer durchgeführt werden. Aus praktischen Gründen ist jedoch ein Virus mit hohem Titer erstrebenswert, insbesondere, wenn eine große Anzahl an Zellen infiziert werden muss. Zusätzlich sind hohe Titer eine Notwendigkeit für die Transduktion eines großen Prozentanteils bestimmter Zelltypen. Beispielsweise ist die Häufigkeit der Infektion bei humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen stark abhängig vom Vektor-Titer, und sinnvolle Infektionshäufigkeiten erfolgen nur bei Stammansätzen mit sehr hohem Titer (Hock und Miller 1986 Nature 320: 275-277; Hogge und Humphries 1987 Blood 69: 611-617). In diesen Fällen ist es nicht ausreichend, die Zellen einfach einem größeren Volumen an Virus auszusetzen, um den niedrigen Virustiter zu kompensieren. Im Gegenteil kann die Konzentration an infektiösen Vektor-Virionen in einigen Fällen entscheidend sein, um eine effiziente Transduktion zu unterstützen.

[0045] Techniker versuchen, Vektoren mit hohem Titer zur Anwendung bei der Genübertragung zu erzeugen. Beispielsweise hat sich ein Vergleich verschiedener Vektoraufbauten als nützlich herausgestellt, um die Definition der essentiellen Elemente zu unterstützen, die für eine Virusproduktion mit hohem Titer benötigt werden. Frühe Arbeiten an verschiedenen retroviralen Vektoraufbauten zeigten, dass nahezu die Gesamtheit der internen Protein-codierenden Regionen bei den MLVs deletiert werden kann, ohne die Infektivität des Vektors aufzuheben (Miller et al 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713). Diese frühen Vektoren behielten nur einen kleinen Teil des 3'-Endes der env-codierenden Region bei. Die nachfolgende Arbeit hat gezeigt, dass die für das env-Gen codierenden Sequenzen vollständig entfernt werden können, ohne eine weitere Verminderung des Vektor-Titers zu bewirken (Miller und Rosman 1989 Biotechnique 7: 980-990; Morgenstern und Land 1990 Nucleic Acids Res 18: 3587-3596). Nur die viralen LTRs und kurze an die LTRs angrenzende Regionen, einschließlich der Segmente, die für die Primasereaktion an der Plus- und Minusstrang-DNA benötigt werden, sowie einer Region, die für die selektive Verpackung viraler RNA in die Virionen erforderlich ist (die psi-Stelle; Mann et al 1983 Cell 33: 153-159), wurden als notwendig für die Vektor-Transmission erachtet. Nichtsdesto-

weniger waren die viralen Titer, die mit diesen frühen Vektoren erhalten wurden, immer noch etwa zehnfach niedriger als der Titer des parentalen Helfervirus.

[0046] Zusätzliche Experimente zeigten an, dass der Erhalt von Sequenzen am 5'-Ende des gag-Gens die viralen Vektor-Titer signifikant erhöhte, und dass dies auf eine Steigerung der Verpackungseffizienz der viralen RNA in Virionen zurückging (Armentano et al 1987 J Virol 61: 1647-1650; Bender et al 1987 J Virol 61: 1639-1646; Adam und Miller 1988 J Virol 62: 3802-3806). Dieser Effekt lag nicht an einer von der gag-Region des Vektors ausgehenden viralen Proteinsynthese, da die Unterbrechung des gag-Leserasters oder die Mutagenisierung des gag-Codons zu einem Stopcodon keine Auswirkung auf den Vektor-Titer hatten (Bender et al 1987 ibidem). Diese Versuche zeigten, dass die Sequenzen, die für eine effiziente Verpackung der genomischen RNA in MLV benötigt werden, größer als das psi-Signal waren, das zuvor durch Deletionsanalyse (Mann et al 1983 ibidem) definiert worden war. Es wurde gezeigt, dass es zum Erhalten hoher Titer (10^6 bis $> 10^7$) wichtig ist, dass dieses größere Signal, bezeichnet als psi plus, in die retroviralen Vektoren einbezogen wird. Es ist nun gezeigt worden, dass sich dieses Signal von aufstromig des Spleiß-Donors bis abstromig vom gag-Startcodon erstreckt (Bender et al 1987 ibidem). Aufgrund dieser Position wird dieses Signal in gespleißten env-exprimierenden Transkripten deletiert. Dies stellt sicher, dass nur Transkripte voller Länge, die alle drei essentiellen Gene für den viralen Lebenszyklus enthalten, verpackt werden.

[0047] Zusätzlich zur Manipulation des retroviralen Vektors im Hinblick auf einen gesteigerten Vektor-Titer sind retrovirale Vektoren auch dafür entworfen worden, um die Produktion einer spezifischen NOI (gewöhnlich ein Markerprotein) in transduzierten Zellen zu induzieren. Wie bereits erwähnt, beinhaltet der gebräuchlichste retrovirale Vektoraufbau den Austausch retroviraler Sequenzen durch eine oder mehrere NOI, um replikationsdefekte Vektoren zu erzeugen. Der einfachste Ansatz bestand darin, den Promotor in der retroviralen 5'-LTR zur Kontrolle der Expression einer cDNA zu verwenden, die für eine NOI codiert, oder den Enhancer/Promotor der LTR zu verändern, um für eine gewebespezifische Expression oder Induzierbarkeit zu sorgen. Alternativ ist eine einzelne codierende Region unter Verwendung eines internen Promotors exprimiert worden, was eine größere Flexibilität bei der Promotorauswahl verspricht.

[0048] Diese Strategien zur Expression eines Gens von Interesse werden am einfachsten umgesetzt, wenn die NOI ein selektierbarer Marker ist, wie im Fall der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (hprt) (Miller et al 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713), was die Selektion der Vektor-transduzierten Zellen erleichtert. Wenn der Vektor eine NOI enthält, die kein selektierbarer Marker ist, so kann der Vektor durch Co-Transfektion mit einem Selektionsmarker, der auf einem separaten Plasmid vorliegt, in Verpackungszellen eingeführt werden. Diese Strategie besitzt einen reizvollen Vorteil für die Gentherapie, da in den letztlichen Zielzellen ein einziges Protein exprimiert wird und die mögliche Toxizität oder Antigenizität eines Selektionsmarkers vermieden werden. Wenn das inserierte Gen jedoch nicht selektierbar ist, hat dieser Ansatz den Nachteil, dass es schwieriger ist, Zellen zu erzeugen, die einen Vektorstamm mit hohem Titer hervorbringen. Zusätzlich ist es für gewöhnlich schwieriger, den Titer des Vektors zu bestimmen.

[0049] Die derzeitigen Methodiken, die verwendet werden, um retrovirale Vektoren zu erstellen, die zwei oder mehr Proteine exprimieren, haben sich auf drei allgemeine Strategien gestützt. Diese beinhalten: (i) die Expression von verschiedenen Proteinen aus alternativ gespleißten mRNAs bei Transkription ausgehend von einem Promotor; (ii) die Verwendung des Promotors in der 5'-LTR und von internen Promotoren zum Antreiben der Transkription bei verschiedenen cDNAs und (iii) die Verwendung interner Ribosomeneintrittsstellen (IRES)-Elementen, um die Translation multipler codierender Regionen entweder ausgehend von einer einzigen mRNA zu ermöglichen, oder von Fusionsproteinen, die so von einem offenen Leseraster exprimiert werden können.

[0050] Vektoren, die interne Promotoren enthalten, sind in breitem Umfang verwendet worden, um multiple Gene zu exprimieren. Ein interner Promotor macht es möglich, andere Promotor/Enhancer-Kombinationen als bei der viralen LTR auszunutzen, um die Genexpression anzutreiben. Es können mehrere interne Promotoren in einen retroviralen Vektor einbezogen werden, und es hat sich als möglich erwiesen, wenigstens drei verschiedene cDNAs jeweils von ihrem eigenen Promotor aus zu exprimieren (Overell et al 1988 Mol Cell Biol 8: 1803-1808).

[0051] Obwohl es inzwischen viele solcher modifizierten retroviralen Vektoren gibt, die für die Expression von NOI bei einer Vielzahl von Säugerzellen verwendet werden können, so sind die meisten dieser retroviralen Vektoren von einfachen Retroviren, wie den murinen Onko-Retroviren, abgeleitet, die nicht dazu in der Lage sind, sich nicht teilende Zellen zu transduzieren.

[0052] Beispielsweise enthält ein in breitem Maße verwendeter Vektor, der alternatives Spleißen zur Expression von Genen, ausgehend von der viralen LTR SV(X) (Cepko et al 1984 Cell 37: 1053-1062), verwendet, das Neomycin-Phosphotransferasegen als einen selektierbaren Marker. Das Modell für diesen Typ von Vektor ist das parentale Virus, MO-MLV, bei dem die Proteine Gag und Gag-Pol aus der viralen mRNA voller Länge und das Env-Protein aus der gespleißten mRNA translatiert wird. Eines der von diesem Vektor codierten Proteine wird aus der RNA voller Länge translatiert, wogegen Spleißen, das den Spleiß-Donor nahe der 5'-LTR mit einem Spleiß-Akzeptor gerade aufstromig des zweiten Gens verbindet, eine RNA hervorbringt, von der aus das zweite Genprodukt translatiert werden kann. Ein Nachteil dieser Strategie liegt darin, dass Fremdsequenzen in das Intron des gespleißten Gens inseriert werden. Dies kann das Verhältnis von gespleißten zu ungespleißten RNAs beeinflussen oder alternative Spleiß-Akzeptoren einführen, die störend in die Produktion der gespleißten RNA eingreifen, die das zweite Genprodukt codiert (Korman et al 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 2150-2154). Da diese Auswirkungen nicht vorhersagbar sind, können sie die Produktion der codierten Gene beeinflussen.

[0053] Andere modifizierte retrovirale Vektoren können im Hinblick auf ihre Spleißfähigkeiten in zwei Klassen unterteilt werden.

[0054] Die erste Klasse der modifizierten retroviralen Vektoren, typischerweise dargestellt durch die pBA-BE-Vektoren (Morgenstern et al 1990 Nucleic Acid Research 18: 3587-3596), enthält Mutationen im Spleiß-Donor (GT zu GC), die das Spleißen viraler Transkripte inhibieren. Eine solche Spleiß-Inhibition ist aus zwei Gründen vorteilhaft: Erstens stellt sie sicher, dass alle viralen Transkripte ein Verpackungssignal enthalten und somit alle in der Produzentenzelle verpackt werden können. Zweitens verhindert sie ein potentiell abweichendes Spleißen zwischen viralen Spleiß-Donoren und möglichen kryptischen Spleiß-Akzeptoren inserierter Gene.

[0055] Die zweite Klasse der modifizierten retroviralen Vektoren, typischerweise dargestellt sowohl von N2 (Miller et al 1989 Biotechniques 7: 980-990) als auch von dem jüngeren MFG (Dranoff et al 1993 Proc Natl Acad Sci 19: 3979-3986), enthält funktionelle Introns. Beide dieser Vektoren verwenden den normalen Spleiß-Donor, der sich innerhalb des Verpackungssignals befindet. Ihre jeweiligen Spleiß-Akzeptoren (SAs) unterscheiden sich jedoch. Bei N2 findet sich der SA innerhalb des „verlängerten“ Verpackungssignals (Bender et al 1987 ibidem). Bei MFG wird der natürliche SA (befindlich innerhalb von pol, siehe [Fig. 1](#) hiervon) verwendet. Es ist für beide dieser Vektoren gezeigt worden, dass das Spleißen die Genexpression in den transduzierten Zellen in hohem Maße verstärkt (Miller et al 1989 ibidem; Krall et al 1996 Gene Therapy 3: 37-48). Diese Beobachtungen stützen vorherige Ergebnisse darüber, dass Spleißen allgemein die mRNA-Translation verstärken kann (Lee et al 1981 Nature 294: 228-232; Lewis et al 1986 Mol Cell Biol 6: 1998-2010; Chapman et al 1991 Nucleic Acids Res 19: 3979-3986). Ein wahrscheinlicher Grund hierfür ist, dass dieselbe Maschinerie, die am Spleißen von Transkripten beteiligt ist, auch beim Export der Transkripte aus dem Zellkern helfen kann.

[0056] Anders als bei den oben beschriebenen modifizierten retroviralen Vektoren hat es nur sehr geringe Anstrengungen hinsichtlich des alternativen Spleißens bei den retroviralen Lentivirus-Systemen gegeben, die dazu befähigt sind, sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Naldini et al 1996 Science 272: 263-267). Derzeit sind die einzigen veröffentlichten lentiviralen Vektoren diejenigen, die von HIV-1 (Kim et al 1997 J Virol 72: 811-816) und FIV (Poeschla et al 1998 Nat Med 4: 354-357) abgeleitet sind. Diese Vektoren enthalten immer noch viral abgeleitete Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Sequenzen (Naldini et al 1996 ibidem).

[0057] Einige alternative Ansätze für die Entwicklung von Hochtiter-Vektoren für die Genübertragung haben die Verwendung folgender Elemente beinhaltet: (i) defektive virale Vektoren, wie etwa Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV), Herpes-Viren und Pockenviren und (ii) modifizierte retrovirale Vektor-Aufbauten.

[0058] Das Adenovirus ist ein doppelsträngiges, lineares DNA-Virus, das keine RNA-Zwischenstufe durchläuft. Es gibt über 50 verschiedene humane Serotypen des Adenovirus, die auf Basis von genetischer Sequenzhomologie in 6 Untergruppen unterteilt werden. Das natürliche Ziel des Adenovirus ist das Epithel des Atmungs- und Magendarmtrakts, was im allgemeinen nur zu milden Symptomen führt. Die Serotypen 2 und 5 (mit 95% Sequenzhomologie) werden am gebräuchlichsten in adenoviralen Vektorsystemen verwendet und stehen normalerweise mit Infektionen des oberen Atemwegstrakts im Jugendalter in Zusammenhang.

[0059] Adenoviren sind nicht umhüllte, reguläre Icosaeder. Ein typisches Adenovirus beinhaltet ein 140 nm eingekapseltes DNA-Virus. Die icosaedrische Symmetrie des Virus setzt sich aus 152 Capsomeren zusammen: 240 Hexagons und 12 Pentagons. Das Kernelement (Core) des Partikels enthält die 36 kb große lineare Duplex-DNA, die am 5'-Ende kovalent mit dem Terminalen Protein (TP) verbunden ist, das als Primer bei der DNA-Replikation fungiert. Die DNA besitzt endständige, invertierte Sequenzwiederholungen (inverted terminal

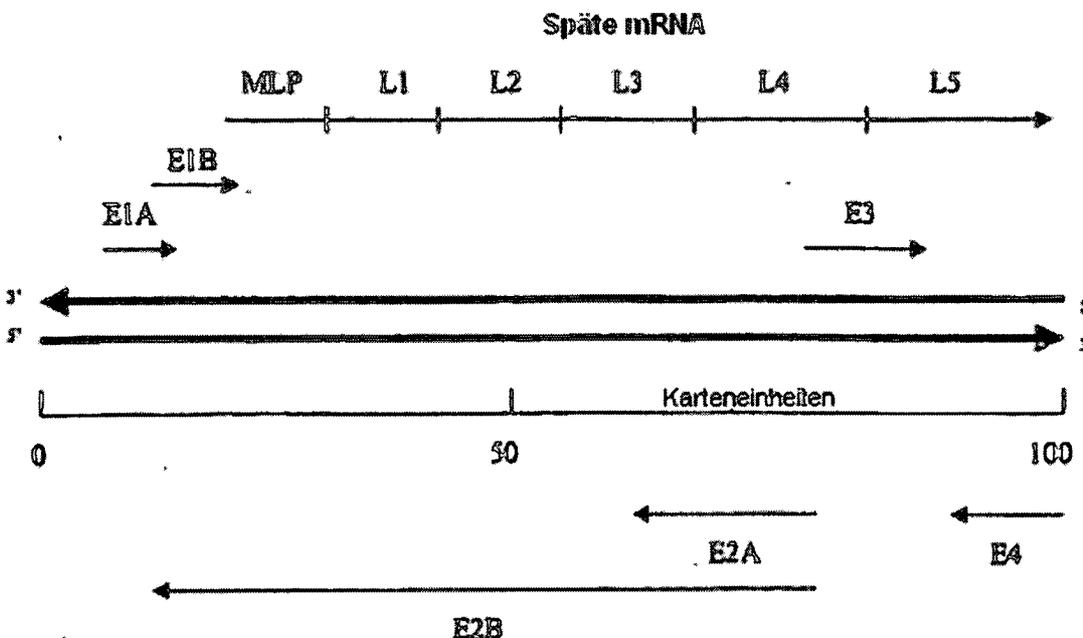
repeats, ITR), deren Länge mit dem Serotyp variiert.

[0060] Der Eintritt des Adenovirus in die Zellen beinhaltet eine Reihe von einander abgegrenzter Ereignisse. Die Anheftung des Virus an die Zelle erfolgt über eine Interaktion zwischen der viralen Faser (37 nm) und den Faser-Rezeptoren auf der Zelle. Dieser Rezeptor ist jüngst für die Ad2/5-Serotypen identifiziert worden und ist als CAR bezeichnet worden (Coxsackie and Adeno Receptor, Tomko et al 1997 Proc Natl Acad Sci 94: 3352-2258). Die Internalisierung des Virus in das Endosom über die zellulären $\alpha\beta 3$ - und $\alpha\beta 5$ -Integrine wird über eine virale RGD-Sequenz in dem Pentagon-assoziierten Capsid-Protein vermittelt (Wickham et al., 1993 Cell 73: 309-319). Nach der Internalisierung wird das Endosom über einen als Endosom-Lyse bekannten Prozess aufgebrochen, ein Ereignis, von dem man annimmt, dass es bevorzugt von dem zellulären $\alpha\beta 5$ -Integrin unterstützt wird (Wickham et al., 1994 J Cell Biol 127: 257-264). Zusätzlich gibt es jüngere Anhaltspunkte dafür, dass der Ad5-Faserknopf mit hoher Affinität an die MHC Klasse 1 $\alpha 2$ -Domäne auf der Oberfläche bestimmter Zelltypen, einschließlich humaner Epithel- und B-Lymphoblastenzellen bindet (Hong et al., 1997 EMBO 16: 2294-2306).

[0061] Nachfolgend wird das Virus in den Zellkern verbracht, wo die Aktivierung der frühen Regionen erfolgt, kurz danach gefolgt von DNA-Replikation und der Aktivierung der späten Regionen. Die Transkription, Replikation und Verpackung der adenoviralen DNA erfordert sowohl die funktionelle Protein-Maschinerie des Wirts als auch des Virus.

[0062] Die virale Genexpression kann in frühe (E) und späte (L) Phasen unterteilt werden. Die späte Phase ist durch das Einsetzen der viralen DNA-Replikation definiert. Die adenoviralen Strukturproteine werden allgemein während der späten Phase synthetisiert. Nach der Adenovirus-Infektion wird die zelluläre mRNA- und Proteinsynthese des Wirts bei den meisten Serotypen in den infizierten Zellen inhibiert. Der adenovirale lytische Zyklus mit Adenovirus 2 und Adenovirus 5 ist sehr effizient und resultiert in etwa 10.000 Virionen pro infizierter Zelle, zusammen mit der Synthese von überschüssigem viralen Protein und viraler DNA, die nicht in das Virion eingebaut wird. Die frühe Adenovirus-Transkription ist eine komplizierte Abfolge von mit einander in Beziehung stehenden biochemischen Ereignissen, jedoch bringt sie als wesentliches Element die Synthese viraler RNAs vor dem Einsetzen der DNA-Replikation mit sich.

[0063] Das unten stehende schematische Diagramm des Adenovirusgenoms zeigt die relative Richtung und Position der frühen und späten Gen-Transkription:



[0064] Die Organisation des Adenovirusgenoms ist bei allen Adenovirusgruppen ähnlich, und spezifische Funktionen befinden sich für gewöhnlich bei allen untersuchten Serotypen an identischen Positionen. Die frühen zytoplasmatischen mRNAs sind komplementär zu vier definierten, nicht zusammenhängenden Regionen auf der viralen DNA. Diese Regionen werden als E1-E4 bezeichnet. Die frühen Transkripte sind in eine Abfolge von sehr früh (E1a), verspätet früh (E1b, E2a, E2b, E3 und E4) und in intermediäre Regionen klassifiziert worden.

[0065] Die frühen Gene werden etwa 6-8 Stunden nach der Infektion exprimiert und werden von 7 Promotoren in den Genblocks E1-4 aus angetrieben.

[0066] Die E1a-Region ist sowohl an der transkriptionellen Transaktivierung viraler und zellulärer Gene als auch an der transkriptionellen Unterdrückung anderer Sequenzen beteiligt. Das E1a-Gen übt eine wichtige Kontrollfunktion auf sämtliche der anderen frühen adenoviralen mRNAs aus. In normalen Geweben wird aktives E1a-Produkt benötigt, um die Regionen E1b, E2a, E2b, E3 oder E4 effizient zu transkribieren. Die E1a-Funktion kann jedoch umgangen werden. Zellen können manipuliert werden, um E1a-artige Funktionen bereitzustellen oder können solche Funktionen natürlicher Weise enthalten. Das Virus kann ebenfalls manipuliert werden, um die E1a-Funktion zu umgehen. Das virale Verpackungssignal überlappt mit dem E1a-Enhancer (Nukleotide 194-358).

[0067] Die E1b-Region beeinflusst den viralen und zellulären Metabolismus und das Abschalten von Wirtspoteinen. Sie beinhaltet auch das Gen, das für das pIX-Protein codiert (Nukleotide 3525-4088), das für das Verpacken der viralen DNA voller Länge benötigt wird und wichtig für die Thermostabilität des Virus ist. Die E1b-Region wird für den normalen Ablauf der viralen Ereignisse in der Spätphase der Infektion benötigt. Das E1b-Produkt wirkt im Zellkern des Wirts. Mutanten, die im Bezug auf die E1b-Sequenzen erzeugt wurden, zeigen eine verminderte späte virale mRNA-Akkumulation, sowie eine Beeinträchtigung bei der Inhibition des zellulären Transports des Wirts, die normalerweise im Spätstadium der Adenovirus-Infektion zu beobachten ist. E1b wird für das Verändern von Funktionen der Wirtszelle in der Weise benötigt, dass die Prozessierung und der Transport zugunsten der späten viralen Genprodukte verschoben werden. Diese Produkte führen dann zur viralen Verpackung und zur Freisetzung von Virionen. E1b produziert ein 19 kD-Protein, das Apoptose verhindert. E1b produziert auch ein 55 kD-Protein, das an p53 bindet. Für eine Zusammenschau über die Adenoviren und deren Replikation wird auf die WO 96/17053 verwiesen.

[0068] Die E2-Region ist insofern essentiell, als sie das 72 kDa DNA-Bindungsprotein, DNA-Polymerase und den 80 kDa-Vorläufer des 55 kDa großen Terminalen Proteins (TP), das für die Protein-basierte Primerreaktion zur Initiierung der DNA-Synthese benötigt wird, codiert.

[0069] Ein 19 kDa-Protein (gp 19K) ist in der E3-Region codiert; es ist der Modulierung der Wirtsimmunantwort gegen das Virus zugeordnet worden. Die Expression dieses Proteins wird während der ersten Phase der Infektion als Antwort auf TNF alpha heraufreguliert, wobei dieses dann an die MHC Klasse 1-Antigene bindet und deren Migration an die Epitheloberfläche verhindert, wodurch es die Erkennung der adenoviral infizierten Zellen durch die zytotoxischen T-Lymphozyten dämpft. Die E3-Region ist bei in vitro-Studien verzichtbar und kann durch die Deletion eines 1,9 kb großen XbaI-Fragments entfernt werden.

[0070] Die E4-Region ist mit der Verminderung der Wirtspoteinsynthese und der Steigerung der DNA-Replikation des Virus beschäftigt.

[0071] Es gibt 5 Familien von späten Genen, und alle werden von dem späten Haupt-Promotor aus initiiert. Die Expression der späten Gene beinhaltet einen sehr komplexen posttranskriptionalen Kontrollmechanismus, an dem RNA-Spleißen beteiligt ist. Das Faserprotein ist innerhalb der L5-Region codiert. Das adenovirale Genom ist durch die invertierten terminalen Sequenzwiederholungen flankiert, welche bei Ad5 103 bp groß und essentiell für die DNA-Replikation ist. 30-40 Stunden nach der Infektion ist die virale Produktion abgeschlossen.

[0072] Adenoviren können für die Verwendung als Vektoren für den Gentransfer abgeändert werden, indem das E1-Gen deletiert wird, das für die Induktion der E2-, E3- und E4-Promotoren wichtig ist. Das E1-replikationsdefekte Virus kann in einer Zelllinie vermehrt werden, die die E1-Polypeptide in trans bereitstellt, wie etwa die humane embryonale Nierenzelllinie 293. Ein therapeutisches Gen oder Gene können durch Rekombination anstelle des E1-Gens inseriert werden. Die Expression des Gens wird entweder durch den E1-Promotor oder durch einen heterologen Promotor angetrieben.

[0073] Es sind sogar noch stärker abgeschwächte adenovirale Vektoren entwickelt worden, indem ein Teil oder die Gesamtheit der offenen Leseraster (ORFs) von E4 deletiert wurde. Jedoch scheinen bestimmte Vektoren der zweiten Generation keine länger anhaltende Genexpression zu ergeben, obwohl die DNA offenbar aufrechterhalten wird. Es scheint daher so zu sein, dass die Funktion eines oder mehrerer der E4-ORFs darin besteht, die Genexpression wenigstens von bestimmten, vom Virus getragenen viralen Promotoren zu verstärken.

[0074] Ein alternativer Ansatz zur Herstellung eines stärker defekten Virus hat darin bestanden, das Virus vollständig „auszuweiden“ und nur die terminalen Wiederholungssequenzen, die für die virale Replikation benötigt werden, aufrechtzuerhalten. Das „ausgeweidete“ oder „entleerte“ Virus kann mit einem Helfervirus der ersten Generation in der 293-Zelllinie bis zu hohen Titern herangezüchtet werden, allerdings war es schwierig, den „entleerten“ Vektor von dem Helfervirus abzutrennen.

[0075] Replikationskompetente Adenoviren können ebenfalls für die Gentherapie verwendet werden. Beispielsweise kann das E1A-Gen unter der Regulation eines tumorspezifischen Promotors in ein Virus der ersten Generation eingesetzt werden. Theoretisch könnte es sich nach der Injektion des Virus in einen Tumor spezifisch im Tumor, jedoch nicht in den umgebenden normalen Zellen, replizieren. Dieser Vektor-Typ könnte entweder verwendet werden, um Tumorzellen direkt durch Lyse abzutöten oder um ein „Selbstmord-Gen“, wie etwa das Herpes simplex-Virus Thymidinkinase-Gen (HSV tk), zu übertragen, das infizierte Zellen und umliegende Zellen nach der Behandlung mit Ganciclovir abtöten kann. Alternativ ist ein Adenovirus, das nur hinsichtlich E1b defekt ist, in spezifischer Weise für die Antitumor-Behandlung bei klinischen Phase-1-Studien verwendet worden. Die von E1b codierten Polypeptide sind dazu in der Lage, die p53-vermittelte Apoptose zu blockieren, was die Zelle davon abhält, sich selbst als Reaktion auf die Virusinfektion abzutöten. Folglich ist das Virus bei normalen Nicht-Tumorzellen in Abwesenheit von E1b nicht zur Blockierung der Apoptose befähigt und ist damit nicht in der Lage, infektiöses Virus zu produzieren und sich weiterzuverbreiten. In Tumorzellen, die für p53 defizient sind, kann das E1b-defekte Virus wachsen und sich auf angrenzende p-53-defekte Tumorzellen, jedoch nicht auf normale Zellen, weiterverbreiten. Wiederum könnte dieser Vektortyp auch dazu verwendet werden, um ein therapeutisches Gen, wie etwa HSV tk, zu übertragen.

[0076] Das Adenovirus bietet aus folgenden Gründen gegenüber anderen gentherapeutischen Vektorsystemen Vorteile als Vektor zur Genübertragung:

Es ist ein nicht umhülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, das zur in vivo- und in vitro-Transduktion bei einem breiten Spektrum von Zelltypen menschlichen und nicht-menschlichen Ursprungs in der Lage ist. Diese Zellen beinhalten Epithelzellen der Atem- bzw. Luftwege, Hepatozyten, Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Synoviozyten, Primäre Epithelzellen der Brust, sowie post-mitotische, terminal ausdifferenzierte Zellen, wie etwa Neurone (vielleicht mit der wichtigen Ausnahme einiger Lymphoidzellen, einschließlich Monozyten).

[0077] Adenovirale Vektoren sind auch dazu in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu transduzieren. Dies ist sehr wichtig für Krankheiten wie etwa Cystische Fibrose, bei der die betroffenen Zellen im Lungenepithel eine niedrige Umsatzrate zeigen. Tatsächlich sind verschiedene Studien im Gange, die einen Adenovirus-vermittelten Transfer des Cystische Fibrose Transporters (CFTR) in die Lungen von betroffenen adulten Cystische Fibrose-Patienten verwenden.

[0078] Adenoviren sind als Vektoren für die Gentherapie und für die Expression heterologer Gene verwendet worden. Das große Genom (36 Kilobasen) kann bis zu 8 kb an inserierter Fremd-DNA aufnehmen und ist zu effizienter Replikation in komplementierenden Zelllinien befähigt, um sehr hohe Titer von bis zu 10^{12} zu produzieren. Das Adenovirus ist somit eines der besten Systeme, um die Expression von Genen in primären, nicht-replikativen Zellen zu untersuchen.

[0079] Die Expression von viralen Genen oder von Fremdgenen ausgehend von dem Adenovirusgenom erfordert keine sich replizierende Zelle. Adenovirale Vektoren gelangen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen. Wenn sie sich im Inneren der Zelle befinden, integrieren Adenovirus-Vektoren nur selten in das Wirtschromosom. Stattdessen funktionieren sie in episomaler Weise (unabhängig vom Wirtsgenom) als ein lineares Genom im Wirts-Zellkern. Folglich mildert die Verwendung von rekombinantem Adenovirus die Probleme, die mit einer zufälligen Integration in das Wirtsgenom verbunden sind.

[0080] Es gibt keinen Zusammenhang von humanen malignen Erkrankungen und Adenovirus-Infektion. Es sind abgeschwächte adenovirale Stämme entwickelt und als Lebendimpfstoffe beim Menschen verwendet worden.

[0081] Dennoch leiden die derzeitigen adenoviralen Vektoren im Hinblick auf die therapeutische in vivo-Anwendung an einigen wesentlichen Einschränkungen. Diese beinhalten folgendes: (i) die transiente Genexpression – der adenovirale Vektor bleibt im allgemeinen episomal und repliziert nicht, sodass er nicht an eine folgende Nachkommenschaft weitergegeben wird; (ii) aufgrund seiner Unfähigkeit, zu replizieren, kann die Proliferation der Zielzellen zu einer Verdünnung des Vektors führen; (iii) gegen die adenoviralen Proteine wird eine Immunantwort erzeugt, sodass Zellen, die adenovirale Proteine auch nur auf niedrigem Niveau exprimieren, zerstört werden; und (iv) eine Unfähigkeit, einen wirksamen therapeutischen Index zu erreichen, da die in vi-

vo-Verabreichung nur bei einem Teil der Zielzellen zu einer Aufnahme des Vektors und zu einer Expression der übertragenen Gene führt.

[0082] Wenn die Merkmale der Adenoviren mit der genetischen Stabilität von Retro-/Lentiviren kombiniert werden könnten, so könnte das Adenovirus in wesentlichem Maße dazu verwendet werden, um Zielzellen zu transduzieren, um transiente retrovirale Produzentenzellen zu werden, die in stabiler Weise benachbarte Zellen infizieren können.

[0083] Die vorliegende Erfindung versucht, einen neuen retroviralen Vektor bereitzustellen.

[0084] Insbesondere versucht die vorliegende Erfindung, einen neuen retroviralen Vektor bereitzustellen, der in der Lage ist, die effiziente Expression einer NOI – oder sogar einer Mehrzahl von NOI – an einer oder mehreren gewünschten Zielstellen zu verwirklichen.

[0085] Die vorliegende Erfindung versucht auch, ein neuartiges System für die Erzeugung hoher Titer an Vektor-Virionen bereitzustellen, das Sicherheitskriterien für die in vivo-Anwendung einbezieht und dazu befähigt ist, die effiziente Expression einer NOI – oder sogar einer Mehrzahl von NOI – an einer oder mehreren gewünschten Zielstellen zu verwirklichen.

[0086] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, der eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle umfasst, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfasst, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so dass der retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

[0087] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei der retrovirale Provektor ein retrovirales Verpackungssignal umfasst und wobei die zweite NS abstromig zu dem retroviralen Verpackungssignal angeordnet ist, so dass ein Spleißen an einer primären Zielstelle verhindert ist.

[0088] Gemäß einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei die zweite NS abstromig zu der ersten NOI angeordnet ist, so dass die erste NOI an einer primären Zielstelle exprimiert werden kann.

[0089] Gemäß einem vierten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei die zweite NS aufstromig zu einer multiplen Klonierungsstelle angeordnet ist, so dass eine oder mehrere zusätzliche NOI eingesetzt werden können.

[0090] Gemäß einem fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei die zweite NOI eine Nukleotidsequenz ist, die ein immunologisches Molekül oder einen Teil davon codiert.

[0091] Gemäß einem sechsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei das immunologische Molekül ein Immunglobulin ist.

[0092] Gemäß einem siebten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei die zweite NOI eine Nukleotidsequenz ist, die für eine variable Region einer schweren Kette eines Immunglobulins codiert.

[0093] Gemäß einem achten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei der Vektor zusätzlich ein funktionales Intron umfasst.

[0094] Gemäß einem neunten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei das funktionale Intron so angeordnet ist, dass es in der Lage ist, die Expression von wenigstens einer der NOI an einer gewünschten Zielstelle zu beschränken.

[0095] Gemäß einem zehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt,

wobei die Zielstelle eine Zelle ist.

[0096] Gemäß einem elften Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei der Vektor oder Provektor von einem Maus-Onkoretrovirus oder einem Lentivirus abgeleitet werden kann.

[0097] Gemäß einem zwölften Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei der Vektor von MMLV, MSV, MMTV, HIV-1 oder EIAV abgeleitet werden kann.

[0098] Gemäß einem dreizehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, wobei der retrovirale Vektor ein integriertes Provirus ist.

[0099] Gemäß einem vierzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Retroviruspartikel bereitgestellt, das von einem retroviralen Vektor erhalten werden kann.

[0100] Gemäß einem fünfzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Zelle bereitgestellt, die mit einem retroviralen Vektor transfiziert oder transduziert ist.

[0101] Gemäß einem sechzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor oder ein Viruspartikel oder eine Zelle für eine Verwendung in der Medizin bereitgestellt.

[0102] Gemäß einem siebzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Auslieferungssystem für einen retroviralen Vektor oder ein Viruspartikel oder eine Zelle bereitgestellt, wobei das Auslieferungssystem einen oder mehrere nicht-retrovirale Expressionsvektoren, Adenoviren oder Plasmide oder Kombinationen davon für eine Auslieferung einer NOI oder einer Vielzahl von NOI an eine erste Zielzelle und einen retroviralen Vektor für eine Auslieferung einer NOI oder einer Vielzahl von NOI an eine zweite Zielzelle umfasst.

[0103] Gemäß einem achtzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Provektor bereitgestellt.

[0104] Gemäß einem neunzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Hybridvirusvektorsystem für eine Genauslieferung in vivo bereitgestellt, wobei das System einen oder mehrere primäre virale Vektoren umfasst, welche einen sekundären viralen Vektor codieren, wobei der primäre Vektor oder die primären Vektoren in der Lage sind, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren.

[0105] Gemäß einem zwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Hybridvirusvektorsystem bereitgestellt, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem Adenovirus-Vektor und/oder der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, vorzugsweise einem Lentivirusvektor.

[0106] Gemäß einem einundzwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Hybridvirusvektorsystem bereitgestellt, wobei der lentivirale Vektor eine Spalt-Intron-Anordnung umfasst oder zu deren Auslieferung befähigt ist.

[0107] Gemäß einem zweiundzwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Lentivirusvektorsystem bereitgestellt, wobei der lentivirale Vektor eine Spalt-Intron-Anordnung umfasst oder zu deren Auslieferung befähigt ist.

[0108] Gemäß einem dreiundzwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Adenovirusvektorsystem bereitgestellt, wobei der adenovirale Vektor eine Spalt-Intron-Anordnung umfasst oder zu deren Auslieferung befähigt ist.

[0109] Gemäß einem vierundzwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Vektoren oder Plasmide bereitgestellt, die basieren auf oder erhältlich sind aus einer oder mehreren der als pE1sp1A, pCI-Neo, pE1RevE, pE1HORSE3.1, pE1PEGASUS4, pCI-Rab, pE1Rab dargestellten Einheiten.

[0110] Gemäß einem fünfundzwanzigsten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein retroviraler Vektor bereitgestellt, der zu einer differentiellen Expression der NOI in den Zielzellen befähigt ist.

[0111] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung beinhaltet ein Hybridvirusvektorsystem für eine Gen-

auslieferung in vivo, wobei das System einen primären viralen Vektor umfasst, welcher einen sekundären viralen Vektor codiert, wobei der primäre Vektor in der Lage ist, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem Adenovirus-Vektor und der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, vorzugsweise einem Lentivirusvektor.

[0112] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung beinhaltet ein Hybridvirusvektorsystem für eine Genauslieferung in vivo, wobei das System einen primären viralen Vektor umfasst, welcher einen sekundären viralen Vektor codiert, wobei der primäre Vektor in der Lage ist, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem Adenovirus-Vektor und der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, vorzugsweise einem Lentivirusvektor, wobei das virale Vektorsystem eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle umfasst, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfasst, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so dass der retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

[0113] Bevorzugt umfasst der retrovirale Provektor eine dritte NS, die aufstromig zu der zweiten Nukleotidsequenz angeordnet ist, wobei die dritte NS in der Lage ist, eine nicht-funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern.

[0114] Bevorzugt umfasst der retrovirale Vektor weiterhin eine zweite NOI, wobei die zweite NOI abstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist.

[0115] Bevorzugt umfasst der retrovirale Provektor die zweite NOI, wobei die zweite NOI abstromig zu der zweiten Nukleotidsequenz angeordnet ist.

[0116] Bevorzugt ist oder umfasst die zweite NOI oder das Expressionsprodukt davon ein therapeutisches Mittel oder ein diagnostisches Mittel.

[0117] Bevorzugt ist oder umfasst die erste NOI oder das Expressionsprodukt davon eines oder mehrere Elemente, ausgewählt unter einem Mittel, das Selektierbarkeit verleiht (z.B. ein Markerelement), einem essentiellen Viruselement oder einem Teil davon oder Kombinationen davon.

[0118] Bevorzugt ist die erste NS an oder in der Nähe des 3'-Endes eines retroviralen Provektors angeordnet, wobei vorzugsweise das 3'-Ende eine U3-Region und eine R-Region umfasst und wobei die erste NS vorzugsweise zwischen der U3-Region und der R-Region angeordnet ist.

[0119] Bevorzugt umfassen die U3-Region und/oder die erste NS des retroviralen Provektors eine NS, die eine dritte NOI ist, wobei die NOI eine oder mehrere, ausgewählt unter einem Transkriptionskontrollelement, einer codierenden Sequenz oder einem Teil davon, ist.

[0120] Bevorzugt ist die erste NS von einem Virus erhältlich.

[0121] Bevorzugt ist die erste NS ein Intron oder ein Teil davon.

[0122] Bevorzugt ist das Intron von dem Intron des kleinen t von SV40-Virus erhältlich.

[0123] Bevorzugt sind die Vektorkomponenten reguliert. Bei einem bevorzugten Aspekt der Erfindung sind die Vektorkomponenten durch Hypoxie reguliert.

[0124] Bei einem weiteren bevorzugten Aspekt der Erfindung sind die Vektorkomponenten durch ein Tetracyclin-basiertes An/Aus-System reguliert.

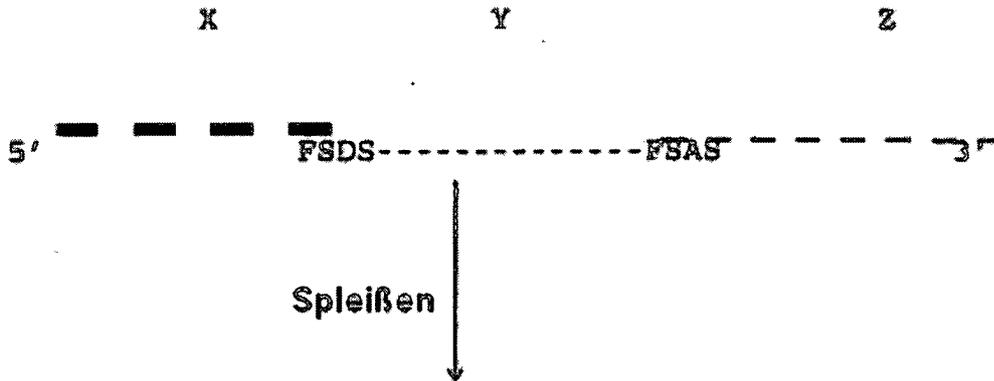
[0125] Somit stellt die vorliegende Erfindung ein Auslieferungssystem bereit, das einen retroviralen Vektor

verwendet.

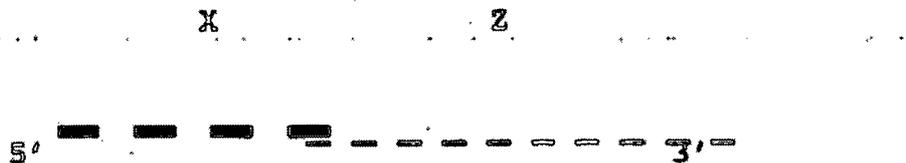
[0126] Der retrovirale Vektor des Auslieferungssystems der vorliegenden Erfindung umfasst eine funktionale Spleiß-Donorstelle („FSDS“) und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle („FSAS“), die eine erste NOI flankieren. Der retrovirale Vektor wird als Ergebnis der reversen Transkription eines retroviralen Provektors gebildet, der eine Vielzahl von NOI beinhalten kann.

[0127] Wenn die FSDS aufstromig zu der FSAS angeordnet ist, können alle dazwischenliegenden Sequenzen gespleißt werden. Typischerweise entfernt das Spleißen zwischengeschaltete oder „intronische“ RNA-Sequenzen, und die verbleibenden „exonischen“ Sequenzen werden ligiert, um zusammenhängende Sequenzen für die Translation bereitzustellen.

[0128] Der Spleiß-Prozess kann bildlich wie folgt dargestellt werden:



Gespleißte Form



[0129] Bei dieser bildlichen Darstellung repräsentiert Y die zwischengeschaltete Sequenz, die als Ergebnis des Spleißens entfernt wird.

[0130] Die natürliche Spleißanordnung für retrovirale Vektoren ist in [Fig. 27a](#) dargestellt. Die Spleißanordnung von bekannten Vektoren ist in [Fig. 27b](#) gezeigt. Die Spleißanordnung gemäß der vorliegenden Erfindung ist in [Fig. 27c](#) dargestellt.

[0131] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung kann kein Spleißen erfolgen, wenn die FSDS abstromig von der FSAS liegt.

[0132] In entsprechender Weise kann Spleißen nicht erfolgen, wenn die FSDS eine nicht-funktionale Spleiß-Donorstelle (NFSDS) ist und/oder wenn die FSAS eine nicht-funktionale Akzeptorstelle (NFAS) ist.

[0133] Ein Beispiel für eine NFSDS ist eine mutierte FSDS, sodass die FSDS nicht länger von dem Spleiß-Mechanismus erkannt werden kann.

[0134] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann jede NS eine beliebige geeignete Nukleotidsequenz sein. Beispielsweise kann jede Sequenz in unabhängiger Weise DNA oder RNA sein, die synthetisch oder unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken hergestellt werden kann, oder die aus natürlichen Quellen isoliert werden kann, oder Kombinationen hiervon. Die Sequenz kann eine Sinnsequenz oder eine Gegensinnsequenz (sense or antisense sequence) sein. Es kann eine Vielzahl an Sequenzen vorliegen, die direkt oder indirekt oder in Kombinationen hiervon miteinander verbunden sein können.

[0135] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann jede NOI eine beliebige geeignete Nukleotidsequenz sein. Beispielsweise kann jede Sequenz in unabhängiger Weise DNA oder RNA sein, die synthetisch oder unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken hergestellt werden kann, oder die aus natürlichen Quellen isoliert werden kann, oder Kombinationen hiervon. Die Sequenz kann eine Sinnsequenz oder eine Gegensequenz (sense or antisense sequence) sein. Es kann eine Vielzahl an Sequenzen vorliegen, die direkt oder indirekt oder in Kombinationen hiervon miteinander verbunden sein können.

[0136] Die erste NOI kann einen oder mehrere der folgenden selektierbaren Marker beinhalten, die erfolgreich in retroviralen Vektoren verwendet wurden: die bakteriellen Gene für Neomycin- und Hygromycin-Phosphotransferase, die Resistenz gegenüber G418 bzw. Hygromycin verleihen (Palmer et al 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 1055-1059; Yang et al 1987 Mol Cell Biol 7: 3923-3928); ein mutantes Maus-Dihydrofolat-Reduktasegen (dhfr), das Resistenz gegenüber Methotrexat verleiht (Miller et al 1985 Mol Cell Biol 5: 431-437); das bakterielle gpt-Gen, das es Zellen erlaubt, in Medium mit Mycophenolsäure, Xanthin und Aminopterin zu wachsen (Mann et al 1983 Cell 33: 153-159); das bakterielle hisD-Gen, das es Zellen erlaubt, in Medium ohne Histidin, jedoch mit Histidinol zu wachsen (Danos und Mulligan 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 6460-6464); das „multidrug“-Resistenzgen (mdr), das Resistenz gegenüber einer Reihe von Wirkstoffen verleiht (Guild et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 1595-1599; Pastan et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4486-4490) und die bakteriellen Gene, die Resistenz gegenüber Puromycin oder Phleomycin (Morgenstern und Land 1990 Nucleic Acid Res 18: 3587-3596) verleihen.

[0137] Alle diese Marker sind dominante selektierbare Marker und erlauben eine chemische Selektion der meisten Zellen, die diese Gene exprimieren. β -Galaktosidase kann ebenfalls als ein dominanter Marker betrachtet werden; Zellen, die β -Galaktosidase exprimieren, können unter Verwendung von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung selektiert werden. Tatsächlich kann jedes Zelloberflächenprotein einen selektierbaren Marker für Zellen bereitstellen, die dieses Protein nicht bereits herstellen. Zellen, die das Protein exprimieren, können unter Verwendung eines fluoreszierenden Antikörpers gegen das Protein und eines Zellsortierers selektiert werden. Andere selektierbare Marker, die in Vektoren einbezogen wurden, beinhalten das hprt-Gen und das HSV-Thymidinkinasegen, die es Zellen erlauben, in Medium zu wachsen, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält.

[0138] Die erste NOI kann nicht-codierende Sequenzen beinhalten, z.B. die retrovirale Verpackungsstelle oder Nonsense-Sequenzen, die die zweite NOI in dem Provektor nicht-funktional machen, wobei durch ihre Entfernung durch das Spleißen die zweite NOI für eine funktionale Expression freigelegt wird.

[0139] Die erste NOI kann auch ein essentielles virales Element codieren, wie etwa env, das das Env-Protein codiert, was die Komplexität des Produktionssystems reduzieren kann. Beispielsweise bei einem Adenovirus-Vektor erlaubt dies, das retrovirale Vektorgenom und die Hülle in einem einzigen adenoviralen Vektor und unter derselben Promotorkontrolle anzuordnen, was somit ein vereinfachtes System bereitstellt und in dem adenoviralen Vektor mehr Spielraum für zusätzliche Sequenzen belässt. Bei einem Aspekt können diesen zusätzlichen Sequenzen die gag-pol-Kassette selbst darstellen. Somit kann man ein retrovirales Vektorpartikel in einem einzigen Adenovirus-Vektor herstellen. Vorherige Studien (Feng et al 1997 Nature Biotechnology 15: 866) erforderten die Verwendung mehrerer Adenovirus-Vektoren.

[0140] Wenn die retrovirale Komponente eine env-Nukleotidsequenz beinhaltet, so kann die Gesamtheit oder ein Teil dieser Sequenz optional durch eine andere, vollständige oder partielle env-Nukleotidsequenz ausgetauscht werden, wie z.B. durch das als 4070A bezeichnete amphotrope Env-Protein oder das Influenza-Hämagglutinin (HA) oder das G-Protein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G). Der Austausch des env-Gens durch ein heterologes env-Gen ist ein Beispiel für eine Technik oder Strategie, die als Pseudotypen-Bildung bezeichnet wird. Die Herstellung von Pseudotypen ist kein neues Phänomen, und Beispiele hierfür sind zu finden in der WO-A-98/05759, WO-A-98/05754, WO-A-97/17457, WO-A-96/09400, WO-A-91/00047 und in Metsion et al 1997 Cell 90, 841-847.

[0141] Bei einem bevorzugten Aspekt ist der retrovirale Vektor der vorliegenden Erfindung pseudotypisiert worden. In diesem Kontext kann eine Pseudotypen-Bildung einen oder mehrere Vorteile verleihen. Im Beispiel der lentiviralen Vektoren würde das env-Genprodukt von HIV-basierten Vektoren diese Vektoren darauf beschränken, nur Zellen zu infizieren, die ein als CD4 bezeichnetes Protein exprimieren. Wenn jedoch das env-Gen in diesen Vektoren durch env-Sequenzen aus anderen RNA-Viren ersetzt worden ist, so können diese ein breiteres Infektionsspektrum erreichen (Verma und Somia 1997 Nature 389: 239-242). Beispielsweise haben Techniker einen HIV-basierten Vektor mit dem Glykoprotein von VSV pseudotypisiert (Verma und Somia 1997 ibidem).

[0142] Bei einer anderen Alternative kann das Env-Protein ein modifiziertes Env-Protein, wie etwa ein mutantes oder ein künstlich hergestelltes Env-Protein sein. Die Modifikationen können durchgeführt oder ausgewählt werden, um eine bestimmte Zielsteuerungsfähigkeit einzuführen, die Toxizität zu vermindern oder für einen anderen Zweck (Valesia-Wittman et al 1996 J Virol 70: 2056-64; Nilson et al 1996 Gene Therapy 3: 280-6; Fielding et al 1998 Blood 9: 1802, sowie die darin zitierten Literaturstellen).

[0143] Geeignete codierende Sequenzen für die zweite NOI beinhalten diejenigen, die therapeutische und/oder diagnostische Anwendbarkeit besitzen, wie etwa, ohne hierauf beschränkt zu sein: Sequenzen, die codieren für Zytokine, Chemokine, Hormone, Antikörper, technisch erzeugte Immunglobulin-artige Moleküle, Einzelkettenantikörper, Fusionsproteine, Enzyme, immunologisch co-stimulierende Moleküle, immunmodulatorische Moleküle, Antisense-RNA, eine transdominant negative Mutante eines Zielproteins, ein Toxin, ein konditionales Toxin, ein Antigen, ein Tumorsuppressor-Protein, Wachstumsfaktoren, Membranproteine, vasoaktive Proteine und Peptide, anti-virale Proteine und Ribozyme, sowie Derivate hiervon (wie etwa solche mit einer assoziierten Reportergruppe). Wenn sie einbezogen werden, können solche codierenden Sequenzen typischerweise operativ mit einem geeigneten Promotor verbunden werden, der ein Promotor sein kann, der die Expression von einem Ribozym, bzw. von Ribozymen steuert, oder ein andersartiger Promotor oder Promotoren.

[0144] Die codierende Sequenz der zweiten NOI kann für ein Fusionsprotein oder ein Segment einer codierenden Sequenz codieren.

[0145] Der retrovirale Vektor der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um eine zweite NOI, wie etwa ein Prowirkstoff-aktivierendes Enzym für die Behandlung von Krebs an eine Tumorstelle auszuliefern. In jedem Fall wird ein geeigneter Prowirkstoff für die Behandlung des Individuums (wie etwa eines Patienten) in Kombination mit dem geeigneten Prowirkstoffaktivierenden Enzym verwendet. Ein geeigneter Prowirkstoff wird in Verbindung mit dem Vektor verabreicht. Beispiele für Prowirkstoffe beinhalten: Etoposid-Phosphat (mit alkalischer Phosphatase, Senter et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4842-4846); 5-Fluorcytosin (mit Cytosin-Deaminase, Mullen et al 1994 Cancer Res 54: 1503-1506); Doxorubicin-N-p-hydroxyphenoxyacetamid (mit Penicillin-V-Amidase, Kerr et al 1990 Cancer Immunol Immunother 31: 202-206); Para-N-bis(2-chlorethyl)-aminobenzoylglutamat (mit Carboxypeptidase G2); Cephalosporin-Stickstoff-Senf-Carbamate (mit β -Lactamase); SR4233 (mit P450-Reduktase); Ganciclovir (mit HSV-Thymidinkinase, Borrelli et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 7572-7576); Senf-Prowirkstoffe mit Nitroreduktase (Friedlos et al 1997 J Med Chem 40: 1270-1275) und Cyclophosphamid (mit P450, Chen et al 1996 Cancer Res 56: 1331-1340).

[0146] Der Vektor der vorliegenden Erfindung kann über einen viralen oder nicht-viralen Vektor an eine Zielstelle ausgeliefert werden.

[0147] Wie in der Technik wohlbekannt, ist ein Vektor ein Werkzeug, das die Übertragung einer Einheit von einer Umgebung in eine andere ermöglicht oder erleichtert. Beispielsweise erlauben einige bei rekombinanten DNA-Techniken verwendete Vektoren, Einheiten, wie etwa ein DNA-Segment (wie etwa ein heterologes DNA-Segment) in eine Zielzelle zu übertragen. Optional kann der Vektor nach dem Eintritt in die Zielzelle dann dazu dienen, die heterologe DNA in der Zelle aufrecht zu erhalten, oder er kann als Einheit der DNA-Replikation dienen. Beispiele für Vektoren, die in rekombinanten DNA-Techniken verwendet werden, beinhalten Plasmide, Chromosomen, künstliche Chromosomen oder Viren.

[0148] Nicht-virale Übertragungs- bzw. Auslieferungssysteme beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, Verfahren der DNA-Transfektion. Hier beinhaltet die Transfektion ein Verfahren, das einen nicht-viralen Vektor verwendet, um ein Gen an eine Säuger-Zielzelle auszuliefern.

[0149] Typische Transfektionsverfahren beinhalten Elektroporation, DNA-Biolistik, Lipidvermittelte Transfektion, Transfektion über kompaktierte DNA, Liposomen, Immunliposomen, Lipofectin, Vermittlung über kationische Mittel, kationische faziale Amphiphile (CFAs) (Nature Biotechnology 1996 14; 556) und Kombinationen hiervon.

[0150] Virale Auslieferungssysteme beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, Adenovirus-Vektoren, Adeno-assoziierte virale (AAV)-Vektoren, herpesvirale Vektoren, retrovirale Vektoren, lentivirale Vektoren und baculovirale Vektoren. Andere Beispiele für Vektoren beinhalten ex vivo-Auslieferungssysteme, die, ohne hierauf beschränkt zu sein, folgendes beinhalten: DNA-Transfektionsverfahren, wie etwa Elektroporation, DNA-Biolistik, Lipid-vermittelte Transfektion, Transfektion unter Vermittlung kompakterter DNA.

[0151] Das Vektor-Auslieferungssystem der vorliegenden Erfindung kann aus einem primären Vektor bestehen, der in vitro hergestellt wurde und der die Gene codiert, die notwendig sind, um einen sekundären Vektor in vivo zu produzieren.

[0152] Der primäre virale Vektor oder die primären viralen Vektoren können eine Vielzahl verschiedener viraler Vektoren darstellen, wie etwa retrovirale oder adenovirale Vektoren, Herpesvirus- oder Pockenvirus-Vektoren, oder sie können – im Falle multipler primärer viraler Vektoren – ein Gemisch von Vektoren mit unterschiedlichem viralem Ursprung sein. In jedem Fall sind die primären viralen Vektoren vorzugsweise in der Weise defektiv, dass sie unfähig zu unabhängiger Replikation sind. Somit sind sie in der Lage, in eine Zielzelle einzudringen und die Sequenzen des sekundären Vektors zu übertragen, jedoch nicht dazu, zu replizieren und somit eine Infektion weiterer Zielzellen fortzuführen.

[0153] In dem Fall, in dem das Hybridvirusvektorsystem mehr als einen primären Vektor umfasst, um den sekundären Vektor zu codieren, werden beide oder alle drei primären Vektoren dafür verwendet, um eine primäre Zielzellpopulation zu transfizieren oder zu transduzieren, und zwar für gewöhnlich gleichzeitig.

[0154] Bevorzugt gibt es einen einzigen primären viralen Vektor, der alle Komponenten des sekundären viralen Vektors codiert.

[0155] Die bevorzugten singulären oder multiplen primären viralen Vektoren sind Adenovirus-Vektoren.

[0156] Adenovirus-Vektoren für die Verwendung bei der Erfindung können von einem humanen Adenovirus abgeleitet sein oder von einem Adenovirus, das normalerweise keine Menschen infiziert. Vorzugsweise werden die Vektoren abgeleitet von Adenovirus Typ2 oder Adenovirus Typ 5 (Ad2 oder Ad5), oder von einem Maus-Adenovirus oder einem Vogel-Adenovirus, wie etwa CELO-Virus (Cotton et al 1993 J Virol 67:3777-3785). Die Vektoren können replikationskompetente adenovirale Vektoren sein, jedoch sind sie bevorzugter defektive adenovirale Vektoren. Adenovirale Vektoren können defektiv gemacht werden, indem eine oder mehrere Komponenten, die für die Replikation des Virus benötigt werden, deletiert werden. Typischerweise enthält jeder adenovirale Vektor wenigstens eine Deletion in der E1-Region. Für die Produktion infektiöser adenoviraler Vektorpartikel kann diese Deletion durch die Passage des Virus in einer humanen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie, wie etwa der humanen 293-Zelllinie, die eine integrierte Kopie des linken Abschnitts von Ad5, einschließlich des E1-Gens, enthält, komplementiert werden. Die Kapazität für die Insertion heterologer DNA in solche Vektoren kann bis etwa 7 kb betragen. Somit sind solche Vektoren nützlich für die Konstruktion eines Systems gemäß der Erfindung, das drei separate rekombinante Vektoren umfasst, von denen jeder eine der essentiellen Transkriptionseinheiten enthält, um den retroviralen sekundären Vektor zu konstruieren.

[0157] In der Technik sind alternative adenovirale Vektoren bekannt, die weitere Deletionen in anderen adenoviralen Genen enthalten; diese Vektoren sind ebenfalls für die Verwendung bei der Erfindung geeignet. Verschiedene dieser adenoviralen Vektoren der zweiten Generation zeigen eine verminderte Immunogenität (z.B. E1- und E2-Deletionen, Gorziglia et al 1996 J Virol 70: 4173-4178; E1- und E4-Deletionen, Yeh et al 1996 J Virol 70: 559-565). Ausgedehnte Deletionen dienen dazu, weitere Klonierungskapazität für die Einführung multipler Gene in den Vektor bereitzustellen. Beispielsweise ist eine 25 kb-Deletion beschrieben worden (Lieber et al 1996 J Virol 70: 8944-8960), sowie ein Klonierungsvektor, bei dem sämtliche viralen Gene deletiert wurden, und der die Einführung von mehr als 35 kb an heterologer DNA erlaubt (siehe Fisher et al 1996 Virology 217: 11-22). Solche Vektoren können dafür verwendet werden, um einen primären adenoviralen Vektor gemäß der Erfindung zu erzeugen, der zwei oder drei Transkriptionseinheiten für die Konstruktion des retroviralen sekundären Vektors codiert.

[0158] Der sekundäre virale Vektor ist vorzugsweise ein retroviraler Vektor. Der sekundäre Vektor wird in der primären Zielzelle durch die Expression der essentiellen Gene für den Zusammenbau und die Verpackung eines defektiven viralen Vektorpartikels produziert. Es ist in sofern defektiv, als es nicht zu unabhängiger Replikation befähigt ist. Folglich ist der sekundäre, retrovirale Vektor, sobald er eine sekundäre Zielzelle transduziert hat, nicht befähigt, sich durch Replikation auf irgendwelche weiteren Zielzellen auszubreiten.

[0159] Der Begriff „retroviraler Vektor“ bezieht typischer Weise eine retrovirale Nukleinsäure ein, die zur Infektion befähigt ist, die jedoch alleine nicht zur Replikation befähigt ist. Somit ist sie „replikationsdefekt“. Ein retroviraler Vektor umfasst typischerweise eine oder mehrere NOI(s), bevorzugt von nicht-retroviralem Ursprung, um diese an Zielzellen auszuliefern. Ein retroviraler Vektor kann auch eine funktionale Spleiß-Donorstelle (FSDS) und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle (FSAS) umfassen, sodass, wenn die FSDS aufstromig von der FSAS angeordnet ist, sämtliche der dazwischen liegenden Sequenzen) gespleißt werden können.

Ein retroviraler Vektor kann weitere nicht-retrovirale Sequenzen, wie etwa nicht-retrovirale Kontrollsequenzen in der U3-Region, umfassen, die die Expression der NOI(s) beeinflussen können, sobald sich der retrovirale Vektor als Provirus in einer Zielzelle integriert hat. Der retrovirale Vektor muss nicht nur Elemente aus einem einzigen Retrovirus enthalten. Somit ist es gemäß der vorliegenden Erfindung möglich, Elemente zu verwenden, die von zwei oder mehr verschiedenen Retroviren oder anderen Quellen ableitbar sind.

[0160] Der Begriff „retroviraler Provektor“ beinhaltet typischerweise ein retrovirales Vektorgenom gemäß obiger Beschreibung, dieses jedoch umfassend eine erste Nukleotidsequenz (NS), die in der Lage ist, eine funktionale Spleiß-Donorstelle (FSDS) zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle (FSAS) zu liefern, und zwar derart, dass die erste NS abstromig von der zweiten NS liegt, sodass kein mit der ersten NS und der zweiten NS in Verbindung stehendes Spleißen erfolgen kann. Bei der reversen Transkription des retroviralen Provektors wird ein retroviraler Vektor gebildet.

[0161] Der Begriff „retrovirales Vektorpartikel“ bezieht sich auf den verpackten retroviralen Vektor, der vorzugsweise befähigt ist, an Zielzellen zu binden und in diese einzudringen. Die Komponenten des Partikels, wie bereits für den Vektor diskutiert, können gegenüber dem wildtypischen Retrovirus modifiziert werden. Beispielsweise können die Env-Proteine der proteinösen Hülle des Partikels genetisch modifiziert werden, um deren Zielsteuerungs-Spezifität zu verändern oder um eine andere gewünschte Funktion zu erreichen.

[0162] Der retrovirale Vektor dieses Aspekts der Erfindung kann aus einem murinen Onko-Retrovirus, wie etwa MMLV, MSV oder MMTV ableitbar sein; oder er kann von einem Lentivirus, wie etwa HIV-1 oder EIAV oder von einem anderen Retrovirus ableitbar sein.

[0163] Der retrovirale Vektor der Erfindung kann modifiziert werden, um die natürliche Spleiß-Donorstelle des Retrovirus nicht-funktional zu machen.

[0164] Der Begriff „Modifikation“ beinhaltet das Stilllegen oder die Entfernung des natürlichen Spleiß-Donors. Vektoren, wie etwa MLV-basierte Vektoren, bei denen die Spleiß-Donorstelle entfernt wurde, sind in der Technik bekannt. Ein Beispiel für einen solchen Vektor ist pBABE (Morgenstern et al 1990 ibidem).

[0165] Der sekundäre Vektor kann über die Expression von essentiellen Genen der retroviralen Vektorproduktion, die in der DNA des primären Vektors codiert sind, erzeugt werden. Solche Gene bzw. Elemente können ein gag-pol-Gen von einem Retrovirus, ein env-Gen von einem umhüllten Virus und einen defektiven retroviralen Vektor, der eine oder mehrere therapeutische oder diagnostische NOI(s) enthält, beinhalten. Der defektive retrovirale Vektor enthält in allgemeinen Begriffen Sequenzen, die eine reverse Transkription erlauben, wenigstens einen Teil einer 5'-ständigen langen terminalen Sequenzwiederholung (LTR), wenigstens ein Teil einer 3'-LTR und ein Verpackungssignal.

[0166] Wenn es beabsichtigt ist, den sekundären Vektor replikationsdefekt zu machen, so kann der sekundäre Vektor von einer Mehrzahl an Transkriptionseinheiten codiert werden, die sich in einem einzigen, zwei oder mehr adenoviralen oder anderen Primärvektoren befinden. Folglich kann eine Transkriptionseinheit vorliegen, die das Genom des sekundären Vektors codiert, eine Transkriptionseinheit, die für gag-pol codiert, und eine Transkriptionseinheit, die für env codiert. Alternativ können zwei oder mehr dieser Elemente zusammengeführt werden. Beispielsweise können Nukleinsäuresequenzen, die für gag-pol und env codieren, oder für env und das Genom, in einer einzigen Transkriptionseinheit kombiniert werden. Wege, um dies zu erreichen, sind in der Technik bekannt.

[0167] Transkriptionseinheiten, wie sie hier beschrieben sind, sind Nukleinsäureregionen, die codierende Sequenzen und die Signale zum Erreichen der Expression dieser codierenden Sequenzen unabhängig von irgendwelchen anderen codierenden Sequenzen enthalten. Folglich umfasst jede Transkriptionseinheit im allgemeinen wenigstens einen Promotor, einen Enhancer und ein Polyadenylierungssignal.

[0168] Der Begriff „Promotor“ wird im normalen Sinne der Technik verwendet, z.B. als Bindestelle einer RNA-Polymerase gemäß der Jacob-Monod-Theorie der Genexpression.

[0169] Der Begriff „Enhancer“ beinhaltet eine DNA-Sequenz, die an andere Proteinkomponenten des Transkriptions-Initiationskomplexes bindet und somit die Initiation der Transkription, die von dem zugehörigen Promotor gesteuert wird, erleichtert.

[0170] Der Promotor und Enhancer der Transkriptionseinheiten, die den sekundären Vektor codieren, sind in

den primären Zielzellen unter den Bedingungen für die Produktion des sekundären viralen Vektors vorzugsweise stark aktiv oder sind dazu in der Lage, sich stark induzieren zu lassen. Der Promotor und/oder Enhancer können konstitutiv wirksam sein, oder sie können in ihrer Aktivität in gewebespezifischer oder zeitabhängiger Weise begrenzt sein. Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren/Enhancer sind diejenigen, die in Tumorzellen hochaktiv sind, wie etwa ein Promotor/Enhancer aus einem MUC1-Gen, einem CEA-Gen oder einem 5T4-Antigen-Gen. Beispiele für in zeitlicher Weise begrenzte Promotoren/Enhancer sind diejenigen, die auf Ischämie und/oder Hypoxie reagieren, wie etwa Hypoxie-Response-Elemente oder der Promotor/Enhancer eines grp78- oder eines grp94-Gens. Eine bevorzugte Promotor/Enhancer-Kombination ist eine Kombination auf Basis des sehr frühen Haupt- (major immediate early (MIE)) Promotors/Enhancers des humanen Cytomegalievirus (hCMV).

[0171] Andere bevorzugte zusätzliche Komponenten beinhalten Einheiten, die eine effiziente Expression einer NOI oder einer Vielzahl von NOI ermöglichen.

[0172] Bei einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung gibt es eine Hypoxie- oder Ischaemie-regulierbare Expression der sekundären Vektorkomponenten. Diesbezüglich ist Hypoxie ein wirkungsvoller Regulator der Genexpression in einem breiten Spektrum verschiedener Zelltypen und wirkt durch die Induktion der Aktivität Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktoren, wie etwa des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (HIF-1; Wang & Semenza 1993 Proc Natl Acad Sci 90: 430), der an verwandte DNA-Erkennungsstellen bindet, die so genannten Hypoxie-Response-Elemente (HREs) in verschiedenen Gen-Promotoren. Dachs et al (1997 Nature Med 5: 515) haben eine multimere Form des HRE aus dem Phosphoglyceratkinase 1-Gen (PGK-1) der Maus (Firth et al 1994 Proc Natl Acad Sci 91: 6496-6500) verwendet, um die Expression sowohl von Markergenen als auch von therapeutischen Genen durch humane Fibrosarkom-Zellen in Reaktion auf Hypoxie in vitro und innerhalb solider Tumore in vivo zu kontrollieren (Dachs et al ibidem). Alternativ kann die Tatsache, dass eine merkliche Glukoseverknappung auch in ischämischen Regionen von Tumoren vorkommt, dazu verwendet werden, um die heterologe Genexpression spezifisch in Tumoren zu aktivieren. Eine trunkeerte 632-Basenpaarsequenz des grp 78-Gen-Promotors, die bekanntermaßen spezifisch durch Glukoseabfall aktiviert wird, ist ebenfalls als dazu in der Lage bestätigt worden, eine Hochniveau-Expression eines Reportergens in murinen Tumoren in vivo anzutreiben (Gazit et al 1995 Cancer Res 55: 1660).

[0173] Ein alternatives Verfahren für die Regulierung der Expression derartiger Komponenten ist die Verwendung des Tetracyclin-basierten An/Aus-Systems (siehe Gossen und Bujard 1992 Proc Natl Acad Sci 89: 5547), wie es von Yoshida et al (1997 Biochem Biophys Res Comm 230: 426) für die Produktion von retroviralen gag, pol und VSV-G-Proteinen beschrieben wurde. Ungewöhnlicher Weise wird dieses regulatorische System auch bei der vorliegenden Erfindung verwendet, um die Produktion des Provektor-Genoms zu kontrollieren. Dies stellt sicher, dass in Abwesenheit von Tetracyclin keine Vektorkomponenten von dem adenoviralen Vektor exprimiert werden.

[0174] Sicherheitsmerkmale, die in das Hybridvirusvektorsystem eingebaut werden können, sind unten beschrieben. Eines oder mehrere dieser Merkmale können vorhanden sein.

[0175] Der sekundäre Vektor ist auch für die in vivo-Verwendung vorteilhaft, als in ihn ein oder mehrere Elemente eingebaut sind, die die Möglichkeit einer Rekombination und damit zur Produktion eines infektiösen, zur unabhängigen Replikation befähigten Virus eliminieren. Derartige Merkmale waren in den zuvor veröffentlichten Studien nicht einbezogen (Feng et al 1997 ibidem). Insbesondere ist die Konstruktion eines retroviralen Vektors aus drei Komponenten, wie unten beschrieben, nicht von Feng et al (ibidem) beschrieben worden.

[0176] Zum ersten kann durch die Deletion von Homologie-Regionen eine Sequenzhomologie zwischen den Sequenzen, die für die Komponenten des sekundären Vektors codieren, vermieden werden. Homologe Regionen erlauben das Auftreten von genetischer Rekombination. Bei einer spezifischen Ausführungsform werden drei Transkriptionseinheiten verwendet, um einen sekundären retroviralen Vektor zu konstruieren. Die erste Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales gag-pol-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die zweite Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales env-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die dritte Transkriptionseinheit umfasst ein defektives retrovirales Genom unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Im nativen retroviralen Genom ist das Verpackungssignal so angeordnet, dass ein Teil der gag-Sequenz für eine korrekte Funktion benötigt wird. Wenn hieraus retrovirale Vektorsysteme konstruiert werden, verbleibt das Verpackungssignal, einschließlich eines Teils des gag-Gens, normalerweise im Vektorgenom. Im vorliegenden Fall enthält das defektive retrovirale Genom jedoch ein minimales Verpackungssignal, das keine Sequenzen enthält, die homolog zu gag-Sequenzen der ersten Transkriptionseinheit sind. Ebenso gibt es bei Retroviren, z.B. dem murinen Molo-

ney Leukämievirus (MMLV), eine kleine Region der Überlappung zwischen dem 3'-Ende der für pol codierenden Sequenz und dem 5'-Ende von env. Die entsprechende Homologie-Region zwischen der ersten und zweiten Transkriptionseinheit kann entfernt werden, indem die Sequenz entweder des 3'-Endes der für pol codierenden Sequenz oder des 5'-Endes von env verändert werden, um so die Codon-Nutzung, jedoch nicht die Aminosäuresequenz der codierten Proteine zu verändern.

[0177] Zum zweiten kann die Möglichkeit replikationskompetenter sekundärer viraler Vektoren vermieden werden, indem das Genom eines Retrovirus mit dem Env-Protein eines anderen Retrovirus oder eines anderen umhüllten Virus pseudotypisiert wird, sodass Homologie-Regionen zwischen der env-Komponente und der gag-pol-Komponente vermieden werden.

[0178] Bei einer bestimmten Ausführungsform wird der retrovirale Vektor aus den folgenden drei Komponenten konstruiert: Die erste Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales gag-pol-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die zweite Transkriptionseinheit enthält das env-Gen aus einem alternativen umhüllten Virus unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die dritte Transkriptionseinheit umfasst ein defektives retrovirales Genom unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Das defektive retrovirale Genom enthält ein minimales Verpackungssignal, das keine Sequenzen beinhaltet, die homolog zu gag-Sequenzen in der ersten Transkriptionseinheit sind.

[0179] Zum Dritten kann die Möglichkeit replikationskompetenter Retroviren durch die Verwendung von zwei Transkriptionseinheiten, die auf spezielle Weise konstruiert sind, eliminiert werden. Die erste Transkriptionseinheit enthält eine gag-pol codierende Region unter der Kontrolle eines Promotors/Enhancers, der in den primären Zielzellen aktiv ist, wie etwa einen hCMV-Promotor/Enhancer oder einen Gewebe-spezifischen Promotor/Enhancer. Die zweite Transkriptionseinheit codiert eine retrovirale Genom-RNA, die in der Lage ist, in ein retrovirales Partikel verpackt zu werden. Die zweite Transkriptionseinheit enthält retrovirale Sequenzen, die für Verpackung, Integration und reverse Transkription notwendig sind, und sie enthält auch Sequenzen, die für ein Env-Protein eines umhüllten Virus codieren, sowie die codierende Sequenz eines oder mehrerer therapeutischer Gene.

[0180] In diesem Beispiel ist die Transkription der für env und NOI codierenden Sequenzen so angelegt, dass das Env-Protein bevorzugt in den primären Zielzellen produziert wird, während das NOI-Expressionsprodukt bevorzugt in den sekundären Zielzellen befindlich ist, bzw. darin produziert wird.

[0181] Eine geeignete Intron-Spleiß-Anordnung wird später in Beispiel 5 beschrieben und in [Fig. 17](#) und [Fig. 27c](#) dargestellt. Hier ist eine Spleiß-Donorstelle abstromig von einer Spleiß-Akzeptorstelle in der vom primären Vektor an die primäre Zielzelle ausgelieferten retroviralen Genomsequenz angeordnet. Spleißen wird daher in der primären Zielzelle fehlen oder selten sein, sodass das Env-Protein bevorzugt exprimiert wird. Sobald das Vektorgenom jedoch den Prozess der reversen Transkription und der Integration in die sekundäre Zielzelle durchlaufen hat, wird eine funktionale Spleiß-Donorsequenz in der 5'-LTR positioniert sein, aufstromig von einer funktionalen Spleiß-Akzeptorsequenz. Es erfolgt Spleißen, um die env-Sequenz herauszuspleißen, und Transkripte der NOI werden produziert.

[0182] Bei einer zweiten Anordnung dieses Beispiels ist die Expression einer NOI auf die sekundäre Zielzelle begrenzt, und eine Expression in der primären Zielzelle wird wie folgt verhindert: Diese Anordnung wird später in Beispiel 6 beschrieben und in [Fig. 18](#) dargestellt. Dort werden ein Promotor-Enhancer und ein erstes Fragment einer NOI, enthaltend das 5'-Ende der codierenden Sequenz und eine auf natürliche oder künstliche Weise gewonnene oder ableitbare Spleiß-Donorsequenz am 3'-Ende des retroviralen Genomkonstrukts aufstromig der R-Region inseriert. Ein zweites Fragment der NOI, das alle diejenigen Sequenzen beinhaltet, die zur Vervollständigung der codierenden Region benötigt werden, wird abstromig einer natürlich oder artifiziell gewonnenen oder ableitbaren Spleiß-Akzeptorsequenz, positioniert abstromig des Verpackungssignals, in dem retroviralen Genomkonstrukt angeordnet. Bei reverser Transkription und Integration des retroviralen Genoms in der sekundären Zielzelle werden das Promotor-5'-Fragment der NOI und die funktionale Spleiß-Donorsequenz aufstromig des funktionalen Spleiß-Akzeptors und des 3'-Endes der NOI positioniert. Die vom Promotor ausgehende Transkription und das Spleißen ermöglichen dann die Translation der NOI in der sekundären Zielzelle.

[0183] Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Hybridvirusvektorsystem gemäß der Erfindung einzelne oder multiple adenovirale primäre Vektoren, die einen retroviralen sekundären Vektor codieren.

[0184] Bevorzugte Ausführungsformen der beschriebenen vorliegenden Erfindung richten sich auf eines der

Hauptprobleme, die mit adenoviralen und anderen viralen Vektoren verbunden sind, nämlich, dass die Genexpression von solchen Vektoren transient ist. Die in den primären Zielzellen erzeugten retroviralen Partikel können sekundäre Zielzellen transduzieren, und die Genexpression in den sekundären Zielzellen wird aufgrund der Integration des retroviralen Vektorgenoms in das Wirtszellgenom stabil aufrecht erhalten. Die sekundären Zielzellen exprimieren keine signifikanten Mengen an viralen Protein-Antigenen und sind so weniger immunogen als Zellen, die mit einem adenoviralen Vektor transduziert wurden.

[0185] Die Verwendung eines retroviralen Vektors als sekundärer Vektor ist vorteilhaft, da sie ein gewisses Maß an zellulärer Unterscheidung ermöglicht, z.B. indem sie gestattet, auf sich rasch teilende Zellen abzu zielen. Weiterhin erlaubt die retrovirale Integration die stabile Expression von therapeutischen Genen in dem Zielgewebe, einschließlich der stabilen Expression in proliferierenden Zielzellen.

[0186] Die Verwendung des neuartigen retroviralen Vektoraufbaus der vorliegenden Erfindung ist auch insofern vorteilhaft, als die Genexpression auf eine primäre oder eine sekundäre Zielstelle begrenzt werden kann. Auf diese Weise können singuläre oder multiple NOI bevorzugt an einer sekundären Zielstelle exprimiert werden, während sie an einer primären Zielstelle nur schwach, bzw. nicht auf einem biologisch signifikanten Niveau exprimiert werden. Im Ergebnis können die mögliche Toxizität oder Antigenizität einer NOI vermieden werden.

[0187] Vorzugsweise transduziert der primäre virale Vektor bevorzugt einen bestimmten Zelltyp oder bestimmte Zelltypen.

[0188] Bevorzugter ist der primäre Vektor ein zielgerichteter Vektor, d.h. er besitzt einen Gewebetropismus, der im Vergleich zu dem nativen Virus verändert ist, sodass der Vektor auf bestimmte Zellen abzielt.

[0189] Der Begriff „zielgerichteter Vektor“ steht nicht zwingend mit dem Begriff der „Zielstelle“ oder „Zielzelle“ in Verbindung.

[0190] „Zielstelle“ bezieht sich auf eine Stelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0191] „Primäre Zielstelle“ bezieht sich auf eine erste Stelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0192] „Sekundäre Zielstelle“ bezieht sich auf eine zweite bzw. sekundäre Stelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0193] „Zielzelle“ bezieht sich einfach auf eine Zelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0194] „Primäre Zielzelle“ bezieht sich auf eine erste Zelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0195] „Sekundäre Zielzelle“ bezieht sich auf eine zweite bzw. sekundäre Zelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, transfizieren oder transduzieren kann.

[0196] Der bevorzugte, adenovirale primäre Vektor gemäß der Erfindung ist außerdem bevorzugt ein zielgerichteter Vektor, bei dem der Gewebetropismus des Vektors gegenüber dem Tropismus eines wildtypischen Adenovirus verändert wurde. Adenovirale Vektoren können modifiziert werden, um zielgerichtete adenovirale Vektoren herzustellen, z.B. gemäß der Beschreibung in: Krasnykh et al 1996 J. Virol 70: 6839-6846; Wickham et al 1996 J. Virol 70: 6831-6838; Stevenson et al 1997 J. Virol 71: 4782-4790; Wickham et al 1995 Gene Therapy 2: 750-756; Douglas et al 1997 Neuromuscul. Disord 7: 284-298; Wickham et al 1996 Nature Biotechnology 14: 1570-1573.

[0197] Die primären Zielzellen für das Vektorsystem gemäß der Erfindung beinhalten hämatopoetische Zellen (einschließlich Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten oder Vorläuferzellen einer jeden von diesen), endotheliale Zellen, Tumorzellen, Stromazellen, Astrozyten oder Gliazellen, Muskelzellen und epitheliale Zellen.

[0198] Somit kann eine primäre Zielzelle gemäß der Erfindung, die in der Lage ist, den sekundären viralen

Vektor zu produzieren, eine beliebige der obigen Zelltypen sein.

[0199] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die primäre Zielzelle gemäß der Erfindung eine Monozyte oder Makrophage, die mit einem defektiven adenoviralen Vektor transduziert ist, dieser enthaltend eine erste Transkriptionseinheit für ein retrovirales gag-pol und eine zweite Transkriptionseinheit, die befähigt ist, ein verpackbares defektives retrovirales Genom zu produzieren. In diesem Fall steht wenigstens die zweite Transkriptionseinheit bevorzugt unter der Kontrolle eines Promotors-Enhancers, der bevorzugt an einer erkrankten Stelle im Körper aktiv ist, wie etwa an einer ischämischen Stelle oder in der Mikroumgebung eines soliden Tumors.

[0200] Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die zweite Transkriptionseinheit so konstruiert, dass bei der Insertion des Genoms in die sekundäre Zielzelle ein Intron erzeugt wird, das dazu dient, die Expression eines essentiellen viralen Elements, so etwa des viralen env-Gens, herabzusetzen und eine effiziente Expression der therapeutischen und/oder diagnostischen NOI oder NOI zu erlauben.

[0201] Die verpackende Zelle kann eine in vivo verpackende Zelle im Körper eines zu behandelnden Individuums sein, oder es kann eine in vitro kultivierte Zelle sein, wie etwa eine Gewebekultur-Zelllinie. Geeignete Zelllinien beinhalten Säugerzellen, wie etwa von murinen Fibroblasten abgeleitete Zelllinien oder humane Zelllinien. Bevorzugt ist die Verpackungszelllinie eine humane Zelllinie, so z.B. HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

[0202] Alternativ kann die Verpackungszelle eine Zelle sein, die von dem zu behandelnden Individuum stammt, wie etwa eine Monozyte, Makrophage, Blutzelle oder ein Fibroblast. Die Zelle kann aus einem Individuum isoliert und die Verpackungs- und Vektorkomponenten ex vivo appliziert werden, gefolgt von einer erneuten Zufuhr der autologen verpackenden Zellen. Alternativ können die Verpackungs- und Vektorkomponenten der Verpackungszelle in vivo zugeführt werden. Verfahren zur Einschleusung retroviraler Verpackungs- und Vektorkomponenten in die Zellen eines Individuums sind in der Technik bekannt. Beispielsweise besteht ein Ansatz darin, die verschiedenen DNA-Sequenzen, die zur Produktion eines retroviralen Vektorpartikels benötigt werden, z.B. die env codierende Sequenz, die gag-pol codierende Sequenz und das defektive retrovirale Genom, durch transiente Dreifachtransfektion gleichzeitig in die Zelle einzuführen (Landau & Littman 1992 J. Virol 66, 5110; Soneoka et al 1995 Nucleic Acids Res 23: 628-633).

[0203] Die sekundären viralen Vektoren können ebenfalls zielgerichtete Vektoren sein. Bei retroviralen Vektoren kann dies erreicht werden, indem das Env-Protein modifiziert wird. Das Env-Protein des retroviralen sekundären Vektors muss ein nicht-toxisches Hüllprotein sein, oder ein Hüllprotein, das in der primären Zielzelle in nicht-toxischen Mengen hergestellt werden kann, wie z.B. ein amphotropes MMLV Env-Protein oder ein modifiziertes amphotropes Env-Protein. Das Sicherheitsmerkmal in einem solchen Fall ist vorzugsweise die Deletion von Regionen der Sequenzhomologie zwischen den retroviralen Komponenten.

[0204] Vorzugsweise ist das Env-Protein bzw. die Virushülle so geartet, dass eine Transduktion von humanen Zellen ermöglicht wird. Beispiele für geeignete env-Gene beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, VSV-G, ein amphotropes env aus MLV, wie etwa das 4070A env, das RD114 feline Leukämievirus env oder Hämagglutinin (HA) aus einem Influenzavirus. Das Env-Protein kann eines sein, das dazu in der Lage ist, an einen Rezeptor auf einer begrenzten Anzahl humaner Zelltypen zu binden, ebenso kann es ein technisch hergestelltes Env-Protein sein, das zielspezifische Gruppierungen enthält. Die für env und gag-pol codierenden Sequenzen werden ausgehend von einem Promotor und, optional, von einem Enhancer aus transkribiert, der jeweils in der gewählten Verpackungszelllinie aktiv ist; terminiert wird die Transkriptionseinheit durch ein Polyadenylierungssignal. Wenn die Verpackungszelle beispielsweise eine humane Zelle ist, so ist eine geeignete Promotor-Enhancer-Kombination diejenige aus dem sehr frühen Hauptgen des humanen Cytomegalievirus (hCMV-MIE), wobei ein Polyadenylierungssignal von SV40-Virus verwendet werden kann. Andere geeignete Promotoren und Polyadenylierungssignale sind in der Technik bekannt.

[0205] Die sekundäre Zielzellpopulation kann dieselbe sein wie die primäre Zielzellpopulation. Beispielsweise kann die Auslieferung eines primären Vektors der Erfindung an Tumorzellen zur Replikation und zur Erzeugung weiterer Vektorpartikel führen, die weitere Tumorzellen transduzieren können.

[0206] Alternativ kann die sekundäre Zielzellpopulation von der primären Zielzellpopulation verschieden sein. In diesem Fall dienen die primären Zielzellen als eine endogene Fabrik im Körper des behandelten Individuums und produzieren zusätzliche Vektorpartikel, die die sekundäre Zielzellpopulation transduzieren können. Beispielsweise kann die primäre Zielzellpopulation aus hämatopoetischen Zellen bestehen, die durch den primären Vektor in vivo oder ex vivo transduziert wurden. Die primären Zielzellen werden dann einer Körperstelle

zugeführt oder migrieren zu einer Körperstelle, wie etwa einem Tumor, und produzieren die sekundären Vektorpartikel, die in der Lage sind, z.B. mitotisch aktive Tumorzellen in einem soliden Tumor zu transduzieren.

[0207] Das retrovirale Vektorpartikel gemäß der Erfindung wird auch dazu in der Lage sein, Zellen zu transduzieren, die sich langsam teilen, und die von Nicht-Lentiviren, wie etwa MLV, nicht effizient transduziert werden könnten. Sich langsam teilende Zellen teilen sich etwa einmal alle drei bis vier Tage und beinhalten bestimmte Tumorzellen. Obwohl Tumore sich rasch teilende Zellen enthalten, teilen sich einige Tumorzellen, insbesondere diejenigen im Zentrum des Tumors, selten. Alternativ kann die Zielzelle eine im Wachstum arretrierte Zelle sein, die in der Lage ist, die Zellteilung zu durchlaufen, so wie etwa eine Zelle im Zentralbereich einer Tumormasse oder eine Stammzelle, wie etwa eine hämatopoetische Stammzelle oder eine CD34-positive Zelle. Als weitere Alternative kann die Zielzelle ein Vorläufer einer differenzierten Zelle sein, wie etwa ein Monozyten-Vorläufer, eine CD33-positive Zelle oder ein Myeloid-Vorläufer. Als weitere Alternative kann die Zielzelle eine ausdifferenzierte Zelle, wie etwa ein Neuron, eine Astrozyte, Gliazelle, Mikrogliazelle, Makrophage, Monozyte, Epithelzelle, Endothelzelle, Hepatozyte, Spermatozyte, ein Spermamid oder eine Spermatozoe sein. Die Zielzellen können entweder in vitro nach der Isolierung aus einem menschlichen Individuum transduziert werden, oder sie können direkt in vivo transduziert werden.

[0208] Die Erfindung erlaubt die örtlich festgelegte Produktion hoher Titer an defektiven retroviralen Vektorpartikeln in vivo an oder nahe der Stelle, an der die Wirkung eines therapeutischen Proteins oder von therapeutischen Proteinen benötigt wird, mit einer folgenden effizienten Transduktion der sekundären Zielzellen. Dies ist effizienter als entweder einen defektiven adenoviralen oder einen defektiven retroviralen Vektor alleine zu verwenden.

[0209] Die Erfindung erlaubt auch die Produktion retroviraler Vektoren, wie etwa MMLV-basierter Vektoren, in sich nicht teilenden Zellen und sich langsam teilenden Zellen in vivo. Die Produktion von MMLV-basierten retroviralen Vektoren ist bisher nur in sich schnell teilenden Zellen, wie etwa in an Gewebekultur angepassten, in vitro proliferierenden Zellen oder in sich in vivo rasch teilenden Tumorzellen möglich gewesen. Die Erweiterung des Spektrums von Zelltypen, die zur Produktion retroviraler Vektoren befähigt sind, ist vorteilhaft für die Auslieferung von Genen an die Zellen solider Tumore, von denen etliche langsam proliferieren, und für die Verwendung von sich nicht teilenden Zellen, wie etwa Endothelzellen und Zellen der verschiedenen hämatopoetischen Abstammungslinien, als endogene Fabriken für die Produktion therapeutischer Proteinprodukte.

[0210] Die Auslieferung eines oder mehrerer therapeutischer Gene durch ein Vektorsystem gemäß der vorliegenden Erfindung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen oder Behandlungskomponenten verwendet werden.

[0211] Beispielsweise kann der retrovirale Vektor der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um eine oder mehrere NOI(s) auszuliefern, die nützlich für die Behandlung der in der WO-A-98/05635 aufgelisteten Erkrankungen sind. Zur Erleichterung der Bezugnahme wird ein Teil der Liste nun bereitgestellt: Krebs, Entzündung oder entzündliche Erkrankungen, Hautkrankheiten, Fieber, Kardiovaskuläre Zustände, Hämorrhagie, Koagulation und Akutphasen-Reaktion, Kachexie, Anorexie, akute Infektion, HIV-Infektion, Schockzustände, Wirts-Transplantat-Unverträglichkeit, Autoimmunerkrankungen, Reperfusionverletzungen, Meningitis, Migräne und Aspirin-abhängige Anti-Thrombose; Tumorwachstum, -invasion und -ausbreitung, Angiogenese, Metastasen, maligne Erkrankungen, Aszites und maligne Pleuraleffusion; cerebrale Ischämie, ischämische Herzerkrankungen, Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Asthma, Multiple Sklerose, Neurodegeneration, Alzheimer-Krankheit, Arteriosklerose, Schlaganfall, Vaskulitis, Crohn'sche Erkrankung und Colitis ulcerosa; Periodontitis, Gingivitis; Psoriasis, Neurodermatitis, chronische Geschwüre, Epidermolysis bullosa; Ulzeration der Augenhornhaut, Retinopathie und chirurgische Wundheilung; Rhinitis, allergische Konjunktivitis, Ekzeme, Anaphylaxie; wiederkehrende Stenose, kongestives Herzversagen, Endometriose, Arteriosklerose oder Endosklerose.

[0212] Zusätzlich oder alternativ kann der retrovirale Vektor der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um eine oder mehrere NOI(s) auszuliefern, die nützlich für die Behandlung der in der WO-A-98/07859 aufgelisteten Erkrankungen sind. Zur Erleichterung der Bezugnahme wird ein Teil der Liste nun bereitgestellt: Zytokin- und Zellteilungsaktivität und Differenzierungsaktivität; immunsupprimierende oder immunstimulierende Aktivität (z.B. zur Behandlung von Immundefizienz, einschließlich Infektion mit dem humanen Immunschwäche-Virus, Regulation des Lymphozytenwachstums, Behandlung von Krebs und zahlreichen Autoimmunerkrankungen, Verhinderung von Transplantatabstoßung oder Induzieren von Tumor-Immunität); Regulierung der Hämatopoese, z.B. Behandlung von myeloiden oder lymphoiden Erkrankungen; Förderung des Wachstums von Knochen, Knorpel, Sehnen, Bändern und von Nervengewebe, z.B. für die Wundheilung, Behandlung

von Verbrennungen, Geschwüren und periodontaler Erkrankung und Neurodegeneration; Inhibition oder Aktivierung des Follikel-stimulierenden Hormons (Modulation der Fertilität); chemotaktische/chemokine Aktivität (z.B. zur Mobilisierung spezifischer Zelltypen zu Stellen der Verletzung oder Infektion); hämostatische und thrombolytische Aktivität (z.B. zur Behandlung von Hämophilie und Schlaganfall); entzündungshemmende Aktivität (zur Behandlung z.B. von septischem Schock oder Crohn'scher Erkrankung); als antimikrobielle Mittel; als Modulatoren z.B. des Stoffwechsels oder des Verhaltens; als Analgetika; zur Behandlung spezifischer Defizienz- bzw. Mangelkrankheiten; zur Behandlung z.B. von Psoriasis; in der Human- oder Veterinärmedizin.

[0213] Zusätzlich oder alternativ kann der retrovirale Vektor der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um eine oder mehrere NOI(s) auszuliefern, die nützlich für die Behandlung der in der WO-A-98/09985 aufgelisteten Erkrankungen sind. Zur Erleichterung der Bezugnahme wird ein Teil der Liste nun bereitgestellt: Inhibitorische Aktivität gegenüber Makrophagen und/oder T-Zellen, und somit entzündungshemmende Aktivität; Antiimmunaktivität, d.h. inhibitorische Wirkungen gegenüber einer zellulären und/oder humoralen Immunantwort, einschließlich einer Antwort, die nicht mit Entzündung in Zusammenhang steht; Inhibition der Befähigung von Makrophagen und T-Zellen, sich an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an Fibronectin anzuheften, ebenso wie heraufregulierter Fas-Rezeptor-Expression in T-Zellen; Inhibition unerwünschter Immunreaktionen und Entzündungsreaktionen, einschließlich Arthritis, rheumatoide Arthritis, mit Überempfindlichkeit verbundene Entzündung, allergische Reaktionen, Asthma, systemischer Lupus erythematoses, Kollagenerkrankungen und andere Autoimmunerkrankungen, mit Arteriosklerose assoziierte Entzündung, Arteriosklerose, arteriosklerotische Herzerkrankung, Reperfusionverletzung, Herzstillstand, Myocardinfarkt, entzündliche Gefäßerkrankungen, Atemnotsyndrom oder andere cardiopulmonale Erkrankungen, mit peptischem Geschwür assoziierte Entzündung, Colitis ulcerosa und andere Erkrankungen des Magendarmtrakts, Leberfibrose, Leberzirrhose oder andere Lebererkrankungen, Thyroiditis oder andere Drüsenerkrankungen, Glomerulonephritis oder andere renale und urologische Erkrankungen, Otitis oder andere Halsnasenohrenerkrankungen, Dermatitis oder andere dermale Erkrankungen, periodontale Erkrankungen oder andere dentale Erkrankungen, Orchitis oder Epididymoorchitis, Infertilität, Hodentrauma oder andere Hodenerkrankungen mit Immunaspekten, Plazenta-fehlfunktion, Plazentainsuffizienz, habituelle Fehlgeburt, Eklampsie, Prä-Eklampsie und andere Immun- und/oder Entzündungs-bezogene gynäkologische Erkrankungen, posteriore Uveitis, intermediäre Uveitis, anteriore Uveitis, Konjunktivitis, Chorioretinitis, Uveoretinitis, optische Neuritis, intraokulare Entzündung, z.B. Retinitis oder zystoides Maculaödem, sympathische Ophthalmie, Skleritis, Retinitis pigmentosa, Immun- und Entzündungskomponenten der degenerativen Erkrankung des Augenhintergrunds, Entzündungskomponenten bei Augenverletzung, infektionsbedingte Augenentzündung, proliferative Vitreoretinopathien, akute ischämische optische Neuropathie, exzessive Vernarbung, z.B. nach operativer Glaukomfiltration, Immun- und/oder Entzündungsreaktionen gegen Augenimplantate und andere Immun- und Entzündungs-bezogene Augenerkrankungen, mit Autoimmunerkrankungen oder Autoimmunzuständen assoziierte Entzündung, Erkrankungen sowohl des Zentralnervensystems (ZNS) als auch beliebiger anderer Organe, bei denen eine Unterdrückung von Immun- und/oder Entzündungsprozessen sinnvoll wäre, Parkinson-Erkrankung, Komplikationen und/oder Nebenwirkungen bei der Behandlung der Parkinson-Erkrankung, mit AIDS in Zusammenhang stehender Demenz-Komplex, HIV-bedingte Enzephalopathie, Devic-Syndrom, Sydenham-Chorea, Alzheimer-Erkrankung und andere degenerative Erkrankungen, Zustände oder Erkrankungen des ZNS, Entzündungskomponenten bei Schlaganfall, Post-Polio-Syndrom, Immun- und Entzündungskomponenten psychiatrischer Erkrankungen, Myelitis, Enzephalitis, subakute sklerosierende Panenzephalitis, Enzephalomyelitis, akute Neuropathie, subakute Neuropathie, chronische Neuropathie, Guillain-Barre-Syndrom, Sydenham-Chorea, Myasthenia gravis, Pseudotumor cerebri, Down-Syndrom, Huntington-Krankheit, amyotrophe Lateralsklerose, Entzündungskomponenten bei ZNS-Quetschung oder ZNS-Verletzung oder bei Infektionen des ZNS, Entzündungskomponenten bei Muskelatrophien und -Dystrophien, und Immun- und Entzündungs-bezogene Erkrankungen, Zustände oder Störungen des zentralen und peripheren Nervensystems, post-traumatische Entzündung, septischer Schock, infektiöse Erkrankungen, Entzündungskomplikationen oder Nebenwirkungen bei Chirurgie, Knochenmarkstransplantation oder andere Transplantationskomplifikationen und/oder Nebenwirkungen, Entzündungs- und/oder Immunkomplikationen und Nebenwirkungen der Gentherapie, z.B. infolge der Infektion durch einen viralen Träger, oder mit AIDS assoziierte Entzündung, die Unterdrückung oder Inhibition einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort zur Behandlung oder Milderung proliferativer Monozyten- oder Leukozyten-Erkrankungen, z.B. von Leukämie, durch die Verminderung der Menge an Monozyten oder Lymphozyten, die Verhinderung und/oder Behandlung der Transplantatabstoßung bei der Transplantation natürlicher oder künstlicher Zellen, Gewebe und Organe, wie etwa Hornhaut, Knochenmark, Organen, Linsen, Schrittmachern, natürlichem oder künstlichem Hautgewebe.

[0214] Weiterhin werden gemäß der Erfindung Verfahren bereitgestellt, um die Produktion einer therapeutischen NOI oder von therapeutischen NOI zu kontrollieren, sodass die therapeutische(n) NOI(s) vorzugsweise in einer sekundären Zielzellpopulation exprimiert wird/werden, und in einer primären Zielzelle nur schwach

oder nicht auf biologisch signifikantem Niveau exprimiert wird/werden.

[0215] Die vorliegende Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung eines Individuums durch Gentherapie bereit, wobei die Zusammensetzung eine therapeutisch wirksame Menge des retroviralen Vektors der vorliegenden Erfindung, umfassend eine oder mehrere auslieferbare therapeutische und/oder diagnostische NOI(s), beinhaltet, oder ein mittels dieses Vektors produziertes oder erhaltenes Viruspartikel. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann der Anwendung beim Menschen oder beim Tier dienen. Typischerweise wird ein Arzt die tatsächliche Dosis bestimmen, die für ein Individuum am geeignetsten sein wird, wobei diese mit dem Alter, dem Gewicht und der Reaktion des jeweiligen Individuums variieren wird.

[0216] Die Zusammensetzung kann optional einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, ein Verdünnungsmittel, einen Hilfsstoff oder ein Adjuvans umfassen. Die Auswahl des pharmazeutischen Trägers, Hilfsstoffes oder Verdünnungsmittels kann im Hinblick auf die beabsichtigte Verabreichungsrouten und die pharmazeutische Standardpraxis erfolgen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können als – oder zusätzlich zu – dem Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel jedes geeignete Bindemittel, Gleitmittel, Suspendiermittel, Beschichtungsmittel, jeden Lösungsvermittler und sonstige Trägerstoffe beinhalten, die bei dem Viruseintritt in die Zielstelle helfen oder diesen steigern (wie beispielsweise ein Lipid-Zufuhrsystem).

[0217] Wo es geeignet ist, können die pharmazeutischen Zusammensetzungen mittels einer jeden oder mehrerer der folgenden Weisen appliziert werden: Inhalation, in Form eines Zäpfchens oder Pessars, topisch in Form einer Lotion, Lösung, Creme, Salbe oder eines Stäubepuders, mittels eines Hautpflasters, oral in Form von Tabletten, enthaltend Hilfsstoffe, wie etwa Stärke oder Laktose, oder in Kapseln oder Ovula, entweder alleine oder im Gemisch mit Hilfsstoffen, oder in Form von Elixieren, Lösungen oder Suspensionen, enthaltend Geschmacks- oder Farbstoffe, oder sie können parenteral injiziert werden, z.B. intrakavernös, intravenös, intramuskulär oder subkutan. Für die parenterale Verabreichung können die Zusammensetzungen am besten in Form einer sterilen wässrigen Lösung verwendet werden, die andere Substanzen enthalten kann, z.B. eine hinreichende Menge an Salzen oder Monosacchariden, um die Lösung gegenüber dem Blut isotonisch zu machen. Für die bukkale oder sublinguale Verabreichung können die Zusammensetzungen in Form von Tabletten oder Pastillen, die in einer konventionellen Weise formuliert werden können, verabreicht werden.

[0218] Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Hybridvirusvektorsystem für die in vivo-Genübertragung bereitgestellt, wobei dieses System einen oder mehrere primäre virale Vektoren umfasst, die einen sekundären viralen Vektor codieren, wobei der primäre Vektor oder die primären Vektoren in der Lage sind, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem adenoviralen Vektor, und der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, bevorzugt einem lentiviralen Vektor, und wobei der sekundäre virale Vektor einen retroviralen Vektor gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung umfasst.

[0219] Bei dieser spezifischen Ausführungsform ist der genetische Vektor der Erfindung somit ein Hybridvirusvektorsystem für die Genübertragung, das ausgehend vom Inneren einer Zielzelle in der Lage ist, defektive infektiöse Partikel zu erzeugen. Somit besteht ein genetischer Vektor der Erfindung aus einem in vitro erzeugten primären Vektor, der die Gene codiert, die zur Produktion eines sekundären Vektors in vivo benötigt werden. Für die Anwendung trägt der sekundäre Vektor ein oder mehrere ausgewählte Gene für die Insertion in die sekundäre Zielzelle. Die ausgewählten Gene können ein oder mehrere Markergene und/oder therapeutische Gene sein. Die Markergene codieren für selektierbare und/oder detektierbare Proteine.

[0220] Weitere Aspekte bezüglich dieses speziellen Aspekts der vorliegenden Erfindung folgen nun, wobei diese Lehre auch auf die vorstehend genannten Aspekte der vorliegenden Erfindung anwendbar ist.

[0221] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Zielzellen bereit, die mit dem/den primären viralen Vektoren) infiziert sind und in der Lage sind, infektiöse sekundäre virale Vektorpartikel zu produzieren.

[0222] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung eines Menschen oder eines nicht-menschlichen Säugers bereit, wobei das Verfahren die Applikation eines Hybridvirusvektorsystems oder die Applikation von mit dem/den primären viralen Vektoren) infizierten Zielzellen gemäß vorliegender Beschreibung umfasst.

[0223] Der primäre virale Vektor oder die primären viralen Vektoren können eine Vielzahl verschiedener viraler Vektoren darstellen, wie etwa retrovirale oder adenovirale Vektoren, Herpesvirus- oder Pockenvirus-Vekto-

ren, oder sie können – im Falle multipler primärer viraler Vektoren – ein Gemisch von Vektoren mit unterschiedlichem viralem Ursprung sein. In jedem Fall sind die primären viralen Vektoren vorzugsweise in der Weise defektiv, dass sie unfähig zu unabhängiger Replikation sind. Somit sind sie in der Lage, in eine Zielzelle einzudringen und die Sequenzen des sekundären Vektors zu übertragen, jedoch nicht dazu, zu replizieren und somit eine Infektion weiterer Zielzellen fortzuführen.

[0224] In dem Fall, in dem das Hybridvirusvektorsystem mehr als einen primären Vektor umfasst, um den sekundären Vektor zu codieren, werden beide oder alle drei primären Vektoren dafür verwendet, um eine primäre Zielzellpopulation zu infizieren, und zwar für gewöhnlich gleichzeitig. Bevorzugt gibt es einen einzelnen primären viralen Vektor, der alle Bestandteile des sekundären viralen Vektors codiert.

[0225] Die bevorzugten singulären oder multiplen primären viralen Vektoren sind adenovirale Vektoren. Adenovirus-Vektoren besitzen signifikante Vorteile gegenüber anderen viralen Vektoren hinsichtlich der Titer, die aus in vitro-Kulturen erhalten werden können. Die adenoviralen Partikel sind im Vergleich zu den Partikeln umhüllter Viren außerdem relativ stabil und lassen sich daher einfacher reinigen und lagern. Jedoch leiden die derzeitigen Adenovirus-Vektoren an wesentlichen Einschränkungen bei der therapeutischen in vivo-Verwendung, da die Genexpression von defektiven adenoviralen Vektoren nur transient ist. Da sich das Vektorgenom nicht repliziert, führt die Proliferation der Zielzellen zu einer Verdünnung des Vektors. Außerdem werden Zellen, die adenovirale Proteine auch schon auf niedrigem Niveau exprimieren, durch eine gegen die adenoviralen Proteine erzeugte Immunantwort zerstört.

[0226] Der sekundäre virale Vektor ist bevorzugt ein retroviraler Vektor. Der sekundäre Vektor wird durch die Expression essentieller Gene für den Zusammenbau und die Verpackung eines defektiven viralen Vektorpartikels innerhalb der primären Zielzelle produziert. Das Viruspartikel ist insofern defektiv, als es nicht zu unabhängiger Replikation befähigt ist. Somit ist der sekundäre, retrovirale Vektor, sobald er eine sekundäre Zielzelle transduziert hat, nicht in der Lage, sich durch Replikation auf irgendwelche weiteren Zielzellen zu verbreiten.

[0227] Der sekundäre Vektor kann über die Expression essentieller Gene für die retrovirale Vektorproduktion, die in der DNA des primären Vektors codiert sind, produziert werden. Solche Gene können ein gag-pol-Gen eines Retrovirus, ein envelope-Gen von einem umhüllten Virus und ein defektives retrovirales Genom, enthaltend ein oder mehrere therapeutische Gene, einschließen. Das defektive retrovirale Genom enthält in allgemeinen Begriffen Sequenzen, um reverse Transkription zu ermöglichen, d.h. wenigstens einen Teil einer 5'-ständigen langen terminalen Sequenzwiederholung (LTR), wenigstens einen Teil einer 3'-LTR und ein Verpackungssignal.

[0228] Wichtiger Weise ist der sekundäre Vektor auch bei der in vivo-Anwendung sicher, da in ihn ein oder mehrere Sicherheitsmerkmale einbezogen sind, die die Möglichkeit einer Rekombination zur Produktion eines infektiösen, zu unabhängiger Replikation befähigten Virus eliminieren.

[0229] Um sicherzustellen, dass er replikationsdefekt ist, kann der sekundäre Vektor durch eine Mehrzahl an Transkriptionseinheiten codiert sein, die sich in einem einzigen oder in zwei oder mehr adenoviralen oder anderen primären Vektoren befinden können. Es kann somit eine Transkriptionseinheit vorliegen, die das sekundäre Vektorgenom codiert, eine Transkriptionseinheit, die gag-pol codiert, und eine Transkriptionseinheit, die env codiert.

[0230] Alternativ können zwei oder mehr dieser Elemente kombiniert werden. Beispielsweise können Nukleinsäuresequenzen, die gag-pol und env codieren, oder env und das Genom, in einer einzigen Transkriptionseinheit kombiniert werden. Wege, um dies zu erreichen, sind in der Technik bekannt.

[0231] Transkriptionseinheiten, wie sie hier beschrieben sind, sind Nukleinsäureregionen, die codierende Sequenzen und die Signale zum Erreichen einer Expression dieser codierenden Sequenzen unabhängig von irgendwelchen anderen codierenden Sequenzen enthalten. Somit umfasst jede Transkriptionseinheit im allgemeinen wenigstens einen Promotor, einen Enhancer und ein Polyadenylierungssignal. Der Promotor und Enhancer der Transkriptionseinheiten, die den sekundären Vektor codieren, sind in den primären Zielzellen unter den Bedingungen für die Produktion des sekundären viralen Vektors vorzugsweise stark aktiv oder sind dazu in der Lage, sich stark induzieren zu lassen. Der Promotor und/oder Enhancer können konstitutiv wirksam sein, oder sie können in ihrer Aktivität in gewebespezifischer oder zeitabhängiger Weise begrenzt sein. Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren/Enhancer sind diejenigen, die in Tumorzellen hochaktiv sind, wie etwa ein Promotor/Enhancer aus einem MUC1-Gen, einem CEA-Gen oder einem 5T4-Antigen-Gen. Beispiele für in zeitlicher Weise begrenzte Promotoren/Enhancer sind diejenigen, die auf Ischämie und/oder Hypoxie re-

agieren, wie etwa Hypoxie-Response-Elemente oder der Promotor/Enhancer eines grp78- oder eines grp94-Gens. Eine bevorzugte Promotor/Enhancer-Kombination ist eine Kombination auf Basis des sehr frühen Haupt- (major immediate early (MIE)) Promotors/Enhancers des humanen Cytomegalievirus (hCMV).

[0232] Die Hypoxie- oder Ischämie-regulierbare Expression sekundärer Vektorkomponenten kann unter bestimmten Umständen besonders nützlich sein. Hypoxie ist ein wirkungsvoller Regulator der Genexpression in einem breiten Spektrum verschiedener Zelltypen und wirkt durch die Induktion der Aktivität Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktoren, wie etwa des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (HIF-1; Wang & Semenza 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90: 430), der an verwandte DNA-Erkennungsstellen bindet, die so genannten Hypoxie-Response-Elemente (HREs) in verschiedenen Gen-Promotoren. Dachs et al (1997 Nature Med 5: 515) haben eine multimere Form des HRE aus dem Phosphoglyceratkinase 1-Gen (PGK-1) der Maus (Firth et al 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91: 6496-6500) verwendet, um die Expression sowohl von Markergenen als auch von therapeutischen Genen durch humane Fibrosarkom-Zellen in Reaktion auf Hypoxie in vitro und innerhalb solider Tumore in vivo zu kontrollieren (Dachs et al ibidem). Alternativ kann die Tatsache, dass eine merkliche Glukoseverknappung auch in ischämischen Regionen von Tumoren vorkommt, dazu verwendet werden, um die heterologe Genexpression spezifisch in Tumoren zu aktivieren. Eine trunkeerte 632-Basenpaarsequenz des grp 78-Gen-Promotors, die bekanntermaßen spezifisch durch Glukoseabfall aktiviert wird, ist ebenfalls als dazu in der Lage bestätigt worden, eine Hochniveau-Expression eines Reportergens in murinen Tumoren in vivo anzutreiben (Gazit G et al 1995 Cancer Res 55: 1660). Sicherheitsmerkmale, die in die Hybridvirusvektorsysteme eingebaut werden können, sind unten beschrieben. Es kann eines oder mehrere dieser Merkmale vorhanden sein.

[0233] Zum ersten kann durch die Deletion von Homologie-Regionen eine Sequenzhomologie zwischen den Sequenzen, die für die Komponenten des sekundären Vektors codieren, vermieden werden. Homologe Regionen erlauben das Auftreten von genetischer Rekombination. Bei einer spezifischen Ausführungsform werden drei Transkriptionseinheiten verwendet, um einen sekundären retroviralen Vektor zu konstruieren. Die erste Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales gag-pol-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die zweite Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales env-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die dritte Transkriptionseinheit umfasst ein defektives retrovirales Genom unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Im nativen retroviralen Genom ist das Verpackungssignal so angeordnet, dass ein Teil der gag-Sequenz für eine korrekte Funktion benötigt wird. Wenn hieraus retrovirale Vektorsysteme konstruiert werden, verbleibt das Verpackungssignal, einschließlich eines Teils des gag-Gens, normalerweise im Vektorgenom. Im vorliegenden Fall enthält das defektive retrovirale Genom jedoch ein minimales Verpackungssignal, das keine Sequenzen enthält, die homolog zu gag-Sequenzen der ersten Transkriptionseinheit sind. Ebenso gibt es bei Retroviren, z.B. dem murinen Moloney Leukämievirus (MMLV), eine kleine Region der Überlappung zwischen dem 3'-Ende der für pol codierenden Sequenz und dem 5'-Ende von env. Die entsprechende Homologie-Region zwischen der ersten und zweiten Transkriptionseinheit kann entfernt werden, indem die Sequenz entweder des 3'-Endes der für pol codierenden Sequenz oder des 5'-Endes von env verändert werden, um so die Codon-Nutzung, jedoch nicht die Aminosäuresequenz der codierten Proteine zu verändern.

[0234] Zum zweiten kann die Möglichkeit replikationskompetenter sekundärer viraler Vektoren vermieden werden, indem das Genom eines Retrovirus mit dem Env-Protein eines anderen Retrovirus oder eines anderen umhüllten Virus pseudotypisiert wird, sodass Homologie-Regionen zwischen der env-Komponente und der gag-pol-Komponente vermieden werden. Bei einer bestimmten Ausführungsform wird der retrovirale Vektor aus den folgenden drei Komponenten konstruiert: Die erste Transkriptionseinheit enthält ein retrovirales gag-pol-Gen unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die zweite Transkriptionseinheit enthält das env-Gen aus einem alternativen umhüllten Virus unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Die dritte Transkriptionseinheit umfasst ein defektives retrovirales Genom unter der Kontrolle eines nicht-retroviralen Promotors und Enhancers. Das defektive retrovirale Genom enthält ein minimales Verpackungssignal, das keine Sequenzen beinhaltet, die homolog zu gag-Sequenzen in der ersten Transkriptionseinheit sind.

[0235] Die Pseudotypisierung kann z.B. ein retrovirales Genom auf Basis eines Lentivirus, wie etwa eines HIV-Virus oder equinen infektiösen Anämievirus (EIAV) einbeziehen, während das envelope-Protein z.B. das als 4070A bezeichnete amphotrope envelope-Protein sein kann. Alternativ kann das retrovirale Genom auf MMLV basieren, und das envelope-Protein kann ein Protein von einem anderen Virus sein, das in nicht-toxischen Mengen in der primären Zielzelle produziert werden kann, wie etwa ein Influenza-Hämagglutinin oder das G-Protein des vesikulären Stomatitis-Virus. Bei einer anderen Alternative kann das envelope-Protein ein modifiziertes envelope-Protein sein, wie etwa ein mutantes oder künstlich hergestelltes envelope-Protein. Es

können Modifikationen eingeführt oder selektiert werden, um eine Zielsteuerungsfähigkeit einzuführen, um die Toxizität zu reduzieren oder für einen anderen Zweck.

[0236] Zum Dritten kann die Möglichkeit replikationskompetenter Retroviren durch die Verwendung von zwei Transkriptionseinheiten, die auf spezielle Weise konstruiert sind, eliminiert werden. Die erste Transkriptionseinheit enthält eine gag-pol codierende Region unter der Kontrolle eines Promotors/Enhancers, der in den primären Zielzellen aktiv ist, wie etwa eines hCMV-Promotors/Enhancers oder eines Gewebe-spezifischen Promotors/Enhancers. Die zweite Transkriptionseinheit codiert eine retrovirale Genom-RNA, die in der Lage ist, in ein retrovirales Partikel verpackt zu werden. Die zweite Transkriptionseinheit enthält retrovirale Sequenzen, die für Verpackung, Integration und reverse Transkription notwendig sind, und sie enthält auch Sequenzen, die für ein Env-Protein eines umhüllten Virus codieren, sowie die codierende Sequenz eines oder mehrerer therapeutischer Gene.

[0237] Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Hybridvirusvektorsystem gemäß der Erfindung einzelne oder multiple adenovirale primäre Vektoren, die einen retroviralen sekundären Vektor codieren. Adenovirus-Vektoren für die Verwendung bei der Erfindung können von einem humanen Adenovirus abgeleitet sein oder von einem Adenovirus, das normalerweise keine Menschen infiziert. Vorzugsweise werden die Vektoren abgeleitet von Adenovirus Typ2 oder Adenovirus Typ 5 (Ad2 oder Ad5), oder von einem Maus-Adenovirus oder einem Vogel-Adenovirus, wie etwa CELO-Virus (Cotton et al 1993 J Virol 67:3777-3785).

[0238] Die Vektoren können replikationskompetente adenovirale Vektoren sein, jedoch sind sie bevorzugter defektive adenovirale Vektoren. Adenovirale Vektoren können defektiv gemacht werden, indem eine oder mehrere Komponenten, die für die Replikation des Virus benötigt werden, deletiert werden. Typischerweise enthält jeder adenovirale Vektor wenigstens eine Deletion in der E1-Region. Für die Produktion infektiöser adenoviraler Vektorpartikel kann diese Deletion durch die Passage des Virus in einer humanen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie, wie etwa der humanen 293-Zelllinie, die eine integrierte Kopie des linken Abschnitts von Ad5, einschließlich des E1-Gens, enthält, komplementiert werden. Die Kapazität für die Insertion heterologer DNA in solche Vektoren kann bis etwa 7 kb betragen. Somit sind solche Vektoren nützlich für die Konstruktion eines Systems gemäß der Erfindung, das drei separate rekombinante Vektoren umfasst, von denen jeder eine der essentiellen Transkriptionseinheiten enthält, um den retroviralen sekundären Vektor zu konstruieren.

[0239] In der Technik sind alternative adenovirale Vektoren bekannt, die weitere Deletionen in anderen adenoviralen Genen enthalten; diese Vektoren sind ebenfalls für die Verwendung bei der Erfindung geeignet. Verschiedene dieser adenoviralen Vektoren der zweiten Generation zeigen eine verminderte Immunogenität (z.B. E1- und E2-Deletionen, Gorziglia et al 1996 J Virol 70: 4173-4178; E1- und E4-Deletionen, Yeh et al 1996 J Virol 70: 559-565). Ausgedehnte Deletionen dienen dazu, weitere Klonierungskapazität für die Einführung multipler Gene in den Vektor bereitzustellen. Beispielsweise ist eine 25 kb-Deletion beschrieben worden (Lieber et al 1996 J Virol 70: 8944-8960), sowie ein Klonierungsvektor, bei dem sämtliche viralen Gene deletiert wurden, und der die Einführung von mehr als 35 kb an heterologer DNA erlaubt (siehe Fisher et al 1996 Virology 217: 11-22). Solche Vektoren können dafür verwendet werden, um einen adenoviralen primären Vektor gemäß der Erfindung zu erzeugen, der zwei oder drei Transkriptionseinheiten für die Konstruktion des retroviralen sekundären Vektors codiert.

[0240] Die Ausführungsformen der beschriebenen Erfindung lösen eines der Hauptprobleme, die mit adenoviralen und anderen viralen Vektoren verbunden sind, nämlich dass die Genexpression von solchen Vektoren transient ist. Die von den primären Zielzellen erzeugten retroviralen Partikel können sekundäre Zielzellen infizieren, und die Genexpression in den sekundären Zielzellen wird aufgrund der Integration des retroviralen Vektorgenoms in das Wirtszellgenom stabil aufrechterhalten. Die sekundären Zielzellen exprimieren keine signifikanten Mengen an viralen Protein-Antigenen und sind so weniger immunogen als Zellen, die mit einem adenoviralen Vektor transduziert wurden.

[0241] Die Verwendung eines retroviralen Vektors als sekundärer Vektor ist auch vorteilhaft, da sie ein gewisses Maß an zellulärer Unterscheidung ermöglicht, z.B. indem sie gestattet, auf sich rasch teilende Zellen abzielen. Weiterhin erlaubt die retrovirale Integration die stabile Expression von therapeutischen Genen in dem Zielgewebe, einschließlich der stabilen Expression in proliferierenden Zielzellen.

[0242] Vorzugsweise infiziert der primäre virale Vektor bevorzugt einen bestimmten Zelltyp oder bestimmte Zelltypen. Bevorzugter ist der primäre Vektor ein zielgerichteter Vektor, d.h. er besitzt einen Gewebetropismus, der im Vergleich zu dem nativen Virus verändert ist, sodass der Vektor auf bestimmte Zellen abzielt. Der Begriff „zielgerichteter Vektor“ steht nicht zwingend mit dem Begriff „Zielzelle“ in Zusammenhang. „Zielzelle“ bezieht

sich einfach auf eine Zelle, die ein Vektor, egal ob nun nativ oder zielgerichtet, infizieren oder transduzieren kann.

[0243] Der bevorzugte, adenovirale primäre Vektor gemäß der Erfindung ist außerdem bevorzugt ein zielgerichteter Vektor, bei dem der Gewebetropismus des Vektors gegenüber dem Tropismus eines wildtypischen Adenovirus verändert wurde. Adenovirale Vektoren können modifiziert werden, um zielgerichtete adenovirale Vektoren herzustellen, z.B. gemäß der Beschreibung in: Krasnykh et al 1996 J. Virol 70: 6839-6846; Wickham et al 1996 J. Virol 70: 6831-6838; Stevenson et al 1997 J. Virol 71: 4782-4790; Wickham et al 1995 Gene Therapy 2: 750-756; Douglas et al 1997 Neuromuscul. Disord 7: 284-298; Wickham et al 1996 Nature Biotechnology 14: 1570-1573.

[0244] Die primären Zielzellen für das Vektorsystem gemäß der Erfindung beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein, hämatopoetische Zellen (einschließlich Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten oder Vorläuferzellen einer jeden von diesen), endotheliale Zellen, Tumorzellen, Stromazellen, Astrozyten oder Gliazellen, Muskelzellen und epitheliale Zellen.

[0245] Somit kann eine primäre Zielzelle gemäß der Erfindung, die zur Produktion des sekundären viralen Vektors befähigt ist, eine beliebige aus den obigen Zelltypen sein. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die primäre Zielzelle gemäß der Erfindung eine Monozyte oder Makrophage, die mit einem defektiven adenoviralen Vektor infiziert ist, dieser enthaltend eine erste Transkriptionseinheit für ein retrovirales gag-pol und eine zweite Transkriptionseinheit, die befähigt ist, ein verpackbares defektives retrovirales Genom zu produzieren. In diesem Fall steht wenigstens die zweite Transkriptionseinheit bevorzugt unter der Kontrolle eines Promotors-Enhancers, der bevorzugt an einer erkrankten Stelle im Körper aktiv ist, wie etwa an einer ischämischen Stelle oder in der Mikroumgebung eines soliden Tumors. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung ist die zweite Transkriptionseinheit so konstruiert, dass bei der Insertion des Genoms in die sekundäre Zielzelle ein Intron erzeugt wird, das dazu dient, die Expression des viralen env-Gens herabzusetzen und eine effiziente Expression eines therapeutischen Gens zu erlauben.

[0246] Die sekundären viralen Vektoren können ebenfalls zielgerichtete Vektoren sein. Bei retroviralen Vektoren kann dies erreicht werden, indem das envelope-Protein modifiziert wird. Das envelope-Protein des retroviralen sekundären Vektors muss ein nicht-toxisches Hüllprotein sein, oder ein Hüllprotein, das in der primären Zielzelle in nicht-toxischen Mengen hergestellt werden kann, wie z.B. ein amphotropes MMLV Env-Protein oder ein modifiziertes amphotropes Env-Protein. Das Sicherheitsmerkmal in einem solchen Fall ist vorzugsweise die Deletion von Regionen der Sequenzhomologie zwischen den retroviralen Komponenten.

[0247] Die sekundäre Zielzellpopulation kann dieselbe sein wie die primäre Zielzellpopulation. Beispielsweise kann die Auslieferung eines primären Vektors der Erfindung an Tumorzellen zur Replikation und zur Erzeugung weiterer Vektorpartikel führen, die weitere Tumorzellen transduzieren können. Alternativ kann die sekundäre Zielzellpopulation von der primären Zielzellpopulation verschieden sein. In diesem Fall dienen die primären Zielzellen als eine endogene Fabrik im Körper des behandelten Individuums und produzieren zusätzliche Vektorpartikel, die die sekundäre Zielzellpopulation infizieren können. Beispielsweise kann die primäre Zielzellpopulation aus hämatopoetischen Zellen bestehen, die durch den primären Vektor in vivo oder ex vivo transduziert wurden. Die primären Zielzellen werden dann einer Körperstelle zugeführt oder migrieren zu einer Körperstelle, wie etwa einem Tumor, und produzieren die sekundären Vektorpartikel, die in der Lage sind, z.B. Tumorzellen in einem soliden Tumor zu transduzieren.

[0248] Die Erfindung erlaubt die örtlich festgelegte Produktion hoher Titer an defektiven retroviralen Vektorpartikeln in vivo an oder nahe der Stelle, an der die Wirkung eines therapeutischen Proteins oder von therapeutischen Proteinen benötigt wird, mit einer folgenden effizienten Transduktion der sekundären Zielzellen. Dies ist effizienter als entweder einen defektiven adenoviralen oder einen defektiven retroviralen Vektor alleine zu verwenden.

[0249] Die Erfindung erlaubt auch die Produktion retroviraler Vektoren, wie etwa MMLV-basierter Vektoren, in sich nicht teilenden Zellen und sich langsam teilenden Zellen in vivo. Die Produktion von MMLV-basierten retroviralen Vektoren ist bisher nur in sich schnell teilenden Zellen, wie etwa in an Gewebekultur angepassten, in vitro proliferierenden Zellen oder in sich in vivo rasch teilenden Tumorzellen möglich gewesen. Die Erweiterung des Spektrums von Zelltypen, die zur Produktion retroviraler Vektoren befähigt sind, ist vorteilhaft für die Auslieferung von Genen an die Zellen solider Tumore, von denen etliche langsam proliferieren, und für die Verwendung von sich nicht teilenden Zellen, wie etwa Endothelzellen und Zellen der verschiedenen hämatopoetischen Abstammungswege, als endogene Fabriken für die Produktion therapeutischer Proteinprodukte.

[0250] Die Auslieferung eines oder mehrerer therapeutischer Gene durch ein Vektorsystem gemäß der Erfindung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen oder Behandlungskomponenten verwendet werden. Krankheiten, die behandelt werden können, beinhalten, ohne hierauf beschränkt zu sein: Krebs, neurologische Erkrankungen, erbliche Erkrankungen, Herzerkrankungen, Schlaganfall, Arthritis, virale Infektionen und Erkrankungen des Immunsystems. Geeignete therapeutische Gene beinhalten diejenigen, die für Tumorsuppressor-Proteine, Enzyme, Prowirkstoff-aktivierende Enzyme, immunmodulatorische Moleküle, Antikörper, künstlich hergestellte Immunglobulin-artige Moleküle, Fusionsproteine, Hormone, Membranproteine, vasoaktive Proteine oder Peptide, Zytokine, Chemokine, antivirale Proteine, antisense-RNA und Ribozyme codieren.

[0251] Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines Behandlungsverfahrens gemäß der Erfindung wird ein Gen, das ein Prowirkstoff-aktivierendes Enzym codiert, unter Verwendung des Vektorsystems der Erfindung einem Tumor zugeführt, und das Individuum wird nachfolgend mit einem geeigneten Prowirkstoff behandelt. Beispiele für Prowirkstoffe beinhalten Etoposid-Phosphat (mit alkalischer Phosphatase, Senter et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4842-4846); 5-Fluorcytosin (mit Cytosin-Deaminase, Mullen et al 1994 Cancer Res 54: 1503-1506); Doxorubicin-N-p-hydroxyphenoxyacetamid (mit Penicillin-V-Amidase, Kerr et al 1990 Cancer Immunol Immunother 31: 202-206); Para-N-bis(2-chlorethyl)-aminobenzoylglutamat (mit Carboxypeptidase G2); Cephalosporin-Stickstoff-Senf-Carbamate (mit β -Lactamase); SR4233 (mit P450-Reduktase); Ganciclovir (mit HSV-Thymidinkinase, Borrelli et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 7572-7576); Senf-Prowirkstoffe mit Nitroreduktase (Friedlos et al 1997 J Med Chem 40: 1270-1275) und Cyclophosphamid oder Ifosfamid (mit einem Zytocrom P450, Chen et al 1996 Cancer Res 56: 1331-1340).

[0252] Weiterhin werden gemäß der Erfindung Verfahren bereitgestellt, um die Produktion eines therapeutischen Gens zu kontrollieren, sodass das therapeutische Gen bevorzugt in der sekundären Zielzellpopulation exprimiert wird, während es in der primären Zielzelle nur schwach bzw. nicht auf einem biologisch signifikanten Niveau exprimiert wird.

[0253] Gemäß der Erfindung können molekularbiologische Standardtechniken verwendet werden, die auf dem Niveau der Fähigkeiten des Standes der Technik liegen. Solche Techniken sind vollständig in der Literatur beschrieben. Siehe hierzu z.B. Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, a Laboratory Manual; Hames und Glover (1985-1997) DNA Cloning: a practical approach, Bände I-IV (zweite Auflage); Verfahren zur technischen Herstellung von Immunglobulinen sind beschrieben in McCafferty et al (1996) "Antibody Engineering: A Practical Approach".

[0254] Zusammengefasst betrifft die vorliegende Erfindung ein neues Auslieferungssystem, das für die Einführung einer oder mehrerer NOI(s) in eine Zielzelle geeignet ist.

[0255] In einem weiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen retroviralen Vektor, umfassend eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfasst, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so dass der retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

[0256] In einem weiteren, breiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Hybridvirusvektorsystem für die in vivo-Genübertragung bereit, wobei dieses System einen oder mehrere primäre virale Vektoren umfasst, die einen sekundären viralen Vektor codieren, wobei der primäre Vektor oder die primären Vektoren in der Lage sind, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, und wobei der sekundäre Vektor einen retroviralen Vektor gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung umfasst.

[0257] In diesem Aspekt ist der primäre Vektor erhältlich von oder basiert auf einem adenoviralen Vektor, und der sekundäre virale Vektor ist erhältlich von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, bevorzugt einem lentiviralen Vektor.

[0258] Die Erfindung wird nun mittels Beispiel weiter beschrieben, wobei Bezug auf die folgenden Figuren genommen wird:

- [0259] [Fig. 1](#), die die Struktur eines retroviralen Provirus-Genoms zeigt;
- [0260] [Fig. 2](#), die das Hinzufügen eines kleinen T Spleiß-Donors in pLTR zeigt;
- [0261] [Fig. 3](#), die eine schematische Darstellung von pL-SA-N zeigt;
- [0262] [Fig. 4](#), die eine schematische Darstellung von pL-SA-N mit einer Spleiß-Donor-Deletion zeigt;
- [0263] [Fig. 5](#), die die Sequenz von MLV pICUT zeigt;
- [0264] [Fig. 6](#), die die Insertion eines Spleiß-Donors an der CMV/R-Verbindungsstelle des EIAV LTR-Plasmids zeigt;
- [0265] [Fig. 7](#), die die Insertion eines Spleiß-Akzeptors in pEGASUS-1 zeigt;
- [0266] [Fig. 8](#), die die Entfernung eines wildtypischen Spleiß-Donors aus dem EIAV-Vektor zeigt;
- [0267] [Fig. 9](#), die die Kombination von pCMVLTR+SD mit pEGASUS+SA(noSD) zur Erzeugung von pE1-CUT-1 zeigt;
- [0268] [Fig. 10](#), die die Konstruktion von pEICUT-LacZ zeigt;
- [0269] [Fig. 11](#), die die Sequenz von pEICUT-LacZ zeigt;
- [0270] [Fig. 12](#), die die Vektoranordnung in den beiden transfizierten und transduzierten Zellen zeigt;
- [0271] [Fig. 13](#), die die Beschränkung der Genexpression entweder auf Verpackungszellen oder auf transduzierte Zellen zeigt;
- [0272] [Fig. 14](#), die die Konstruktion eines MLV pICUT Neo-p450-Vektors zeigt, der die Hygromycin-Expression auf Produzentenzellen und die Expression von 2B6 (einer p450-Isoform) auf transduzierte Zellen begrenzt;
- [0273] [Fig. 15](#), die einen Sequenzvergleich eines mutanten env (m4070A) mit einer wildtypischen MMLV-Sequenz vom 3'-Ende des pol-Gens zeigt;
- [0274] [Fig. 16](#), die die vollständige Sequenz des modifizierten env-Gens m4070A zeigt;
- [0275] [Fig. 17](#), die ein Konstrukt mit eingegrenzter Genexpression zeigt; 4070A Envelope bei einer ersten Zelle, p450 bei einer zweiten Zelle;
- [0276] [Fig. 18](#), die die Verwendung eines Introns zeigt, um die Expression der NOI (in diesem Fall p450) auf eine transduzierte Zelle zu begrenzen;
- [0277] [Fig. 19](#), die eine bildliche Darstellung des Transfervektors pE1sp1A zeigt;
- [0278] [Fig. 20](#), die eine bildliche Darstellung des pE1sp1A-Konstrukts zeigt;
- [0279] [Fig. 21](#), die eine bildliche Darstellung des pE1RevE-Konstrukts zeigt;
- [0280] [Fig. 22](#), die eine bildliche Darstellung des pE1HORSE3.1-gag-pol-Konstrukts zeigt;
- [0281] [Fig. 23](#), die eine bildliche Darstellung des Konstrukts pE1PEGASUS4-Genom zeigt;
- [0282] [Fig. 24](#), die eine bildliche Darstellung des pCI-Neo-Konstrukts zeigt;
- [0283] [Fig. 25](#), die eine bildliche Darstellung des pCI-Rab-Konstrukts zeigt;
- [0284] [Fig. 26](#), die eine bildliche Darstellung des pE1 Rab-Konstrukts zeigt;

- [0285] [Fig. 27a](#) ist eine schematische Darstellung der natürlichen Spleiß-Anordnung in einem retroviralen Vektor;
- [0286] [Fig. 27b](#) ist eine schematische Darstellung der Spleiß-Anordnung in bekannten retroviralen Vektoren;
- [0287] [Fig. 27c](#) ist eine schematische Darstellung der Spleiß-Anordnung gemäß der vorliegenden Erfindung; und
- [0288] [Fig. 28](#) ist eine schematische Darstellung des zweifach hybriden viralen Vektorsystems gemäß der vorliegenden Erfindung.
- [0289] In etwas größerem Detail:
- [0290] [Fig. 1](#) zeigt die Struktur eines retroviralen proviralen Genoms. In diesem Kontext haben die einfachsten Retroviren, wie etwa die murinen Onko-Retroviren, drei offene Leseraster: gag, pol und env. Eine Leserasterverschiebung bei der Translation von gag führt zur Translation von pol. Die Expression und Translation von env wird über ein Spleißen zwischen dem gezeigten Spleiß-Donor (SD) und Spleiß-Akzeptor (SA) erreicht. Das Verpackungssignal ist als Psi angezeigt und ist nur in Transkripten voller Länge enthalten, nicht in den env exprimierenden subgenomischen Transkripten, bei denen das Signal während des Spleiß-Ereignisses entfernt wird.
- [0291] [Fig. 2](#) zeigt schematisch die Hinzufügung eines kleinen T Spleiß-Donors bei pLTR. Hier wird die kleine T Spleiß-Donorsequenz in einen LTR-Vektor inseriert, und zwar abstromig des Transkriptionsstarts, jedoch aufstromig der R-Sequenz, sodass bei reverser Transkription (im endgültigen Konstrukt) die U3-Spleiß-Donor-R-Kassette an das 5'-Ende des proviralen Vektors weitergegeben wird und die exprimierten RNA-Transkripte eine Spleiß-Donorsequenz nahe ihres 5'-Endes aufweisen.
- [0292] [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Darstellung von pL-SA-N. Sowohl der Konsensus-Spleiß-Akzeptor (T/C)_nNC/TAG-G (Mount 1982 Nucleic Acids Res 10: 459-472) als auch der Verzweigungspunkt sind unterstrichen und in Fettdruck dargestellt. Der Pfeil zeigt die Intron/Exon-Verbindungsstelle an. Hier ist die Konsensus-Spleiß-Akzeptorsequenz in die Stu1/BamH1-Stelle von pLXSN inseriert. Aufgrund seiner derartigen Positionierung wird dieser Akzeptor mit jedem aufstromig gelegenen Spleiß-Donor (in den endgültigen RNA-Transkripten) interagieren.
- [0293] [Fig. 4](#) zeigt ein schematisches Diagramm für die Konstruktion von pL-SA-N mit einer Spleiß-Donor-Deletion. Der Austausch von gT zu gC wird mittels einer PCR-Reaktion an dem pL-SA-N-Vektor durchgeführt, wobei die beiden Oligonukleotide darunter angezeigt sind. Das resultierende Produkt wird dann über Spe1-Asc1 in pL-SA-N inkloniert und ersetzt damit den wildtypischen Spleiß-Donor gT durch gC. Die Stellen Spe1 und Asc1 sind in Fettdruck angezeigt, die Mutation in dem Spe1-Oligonukleotid in Groß/Fettdruck.
- [0294] [Fig. 5](#) zeigt die Sequenz von MLV pICUT.
- [0295] [Fig. 6](#) zeigt eine schematische Darstellung der Insertion des Spleiß-Donors an der CMV/R-Verbindung des EIAV LTR-Plasmids. Die PCR erfolgt mit den beiden darunter angezeigten Oligonukleotiden, und das resultierende PCR-Produkt wird über Sac1-BamH1 in CMVLTR kloniert, wobei der äquivalente Abschnitt entfernt wird. In dem Sac1-Oligonukleotid zeigt der Pfeil den Transkriptionsstart an, das neue Insert ist in Großbuchstaben dargestellt, wobei die Spleiß-Donorsequenz unterstrichen ist. Der Start von R ist in Kursivschrift dargestellt.
- [0296] [Fig. 7](#) zeigt ein schematisches Diagramm der Insertion eines Spleiß-Akzeptors in pEGASUS-1. Hier wird das unterhalb beschriebene, doppelsträngige Oligonukleotid in mit Xho1-Bpu102 verdautes pEGASUS-1 eingesetzt, um das Plasmid pEGASUS+SA zu erzeugen. Sowohl der Konsensus-Spleiß-Akzeptor (T/C)_nNC/TAG-G (Mount 1982 ibidem) als auch der Verzweigungspunkt sind unterstrichen und in Fettdruck dargestellt. Der Pfeil zeigt die Intron/Exon-Verbindungsstelle an.
- [0297] [Fig. 8](#) zeigt eine schematische Darstellung der Entfernung des wildtypischen Spleiß-Donors aus dem EIAV-Vektor. Die Spleiß-Donorsequenz wird durch überlappende PCR unter Verwendung der unterhalb dargestellten Oligonukleotide und der Matrize pEGASUS+SA entfernt. Die ersten, separaten PCR-Reaktionen werden mit den Oligos 1+2 und den Oligos 3+4 durchgeführt. Die resultierenden amplifizierten Produkte werden dann eluiert und kombiniert in einer dritten PCR-Reaktion verwendet. Nach 10 Zyklen dieser dritten Reaktion

werden dann die Oligos 2 und 4 zugegeben. Das resultierende Produkt wird dann über Sac1-Sal1 in pEGASUS+SA kloniert, um das Plasmid pEGASUS+SA(noSD) zu erzeugen. Die Position des Spleiß-Donors (SD) ist angezeigt. Die Punktmutation, die den wildtypischen Spleiß-Donor von GT zu GC verändert, ist sowohl in Oligo 1 als auch in dem komplementären Oligo 3 in Fettdruck angegeben.

[0298] [Fig. 9](#) zeigt eine schematische Darstellung der Kombination von pCMVLTR+SD mit pEGASUS+SA(noSD), um pEICUT-1 zu erzeugen. Hier inseriert man das Mlu1-Fragment aus pEGASUS+SA(noSD) in die singuläre Mlu1-Stelle von pCMV-LTR.

[0299] [Fig. 10](#) zeigt eine schematische Darstellung der Konstruktion von pEICUT-LacZ. Es wird hergestellt durch die Insertion des Xho1-Bpu1102-LacZ-Fragments aus pEGASUS-1 und dessen Insertion in die Xho1-Bpu1102-Stelle von pEICUT-1 gemäß unten stehender Darstellung.

[0300] [Fig. 11](#) zeigt die pEICUT-LacZ-Sequenz.

[0301] [Fig. 12](#) zeigt eine schematische Darstellung der Vektoranordnung in transfizierten und transduzierten Zellen. Hier enthält der Startvektor pICUT keinen Spleiß-Donor aufstromig eines Spleiß-Akzeptors (in diesem Fall der von IgSA abgeleitete Konsensus-Spleiß-Akzeptor), daher werden die resultierenden RNA-Transkripte nicht gespleißt. Somit werden alle Transkripte Transkripte voller Länge sein, die ein Verpackungssignal (A) enthalten. Bei der Transduktion wird jedoch der Spleiß-Donor (in diesem Fall der kleine T Spleiß-Donor) an den 5'-Bereich des proviralen Vektors weitergegeben, sodass alle nun produzierten RNA-Transkripte einen Spleiß-Donor aufstromig eines Spleiß-Akzeptors enthalten, d.h. es ergibt sich ein „Intron“ und es wird maximales Spleißen erreicht (B).

[0302] [Fig. 13](#) zeigt eine schematische Darstellung der Beschränkung der Genexpression entweder auf Verpackungszellen oder transduzierte Zellen. Die Beschränkung der Genexpression wird in diesem Fall erreicht durch Platzieren des Hygromycin-ORF (ORF = offenes Leseraster) aufstromig des Neomycin-ORF in MLV pEICUT (a). Durch diese Klonierungsstrategie wird der resultierende Vektor nun RNA-Transkripte exprimieren, die Hygromycin nur in transfizierten Zellen exprimieren, da die von Ribosomen und 5'-CAP abhängige Translation nur das aufstromig gelegene ORF effizient ablesen wird. Bei der Transduktion gelangt die Hygromycin-Sequenz jedoch in ein funktionelles Intron und wird somit aus den reifen Transkripten deletiert (b), sodass das Neomycin-ORF nun in 5'-CAP-abhängiger Weise translatiert wird.

[0303] [Fig. 14](#) zeigt ein schematisches Diagramm der Konstruktion eines MLV pICUT Neo-p450-Vektors, der die Expression von Hygromycin auf Produzentenzellen und die Expression von 2B6 (einer p450-Isoform) auf transduzierte Zellen begrenzt. Der Startvektor für dieses Konstrukt ist der pICUT-Vektor aus [Fig. 13](#), der sowohl hydro als auch neo enthält. Das neo-Gen wird wie folgt durch die vollständige p450 2B6 cDNA ausgetauscht: Die vollständige 2B6-cDNA wird durch RT-PCR aus humaner Leber-RNA (Clontech) gewonnen, wobei die folgenden Primer verwendet werden:

5'**ttcagatcaccaccatggaactcagcgtcctcctcttcccttgcac**3'

5'**ttcagccggctcctcagcggggcaggaagcggatcggatgttg**3'

[0304] Dies erzeugt die vollständige 2B6-cDNA mit einer optimierten Kozak-Sequenz, die von singulären Bcl1 und NgoM1-Stellen flankiert ist. Diese cDNA wird dann in die Bcl1-NgoM1-Stelle von pICUT-Hyg-Neo kloniert und ersetzt somit Neo durch p450 (siehe (A) unten). Ebenfalls unten dargestellt sind die proviralen DNA-Konstrukte in den beiden transfizierten (B) und transduzierten (C) Zellen.

[0305] [Fig. 15](#) ist ein Sequenzvergleich des mutanten env (m4070A) mit der wildtypischen MMLV-Sequenz vom 3'-Ende des pol-Gens.

[0306] [Fig. 16](#) ist eine vollständige Sequenz des veränderten 4070A.

[0307] [Fig. 17](#) zeigt einen retroviralen Vektor mit beschränkter Genexpression, bei dem die erste NOI (das 4070A envelope ORF) im anfänglichen Vektor exprimiert wird, wogegen die zweite NOI (in diesem Fall p450) nur nach der Vektorreplikation exprimiert wird. Nach der Replikation befindet sich das 4070A-Gen innerhalb eines funktionalen Introns und wird somit während des RNA-Spleißens entfernt.

[0308] [Fig. 18](#) zeigt einen retroviralen Expressionsvektor, bei dem das 5'-Ende des p450-Gens (angrenzend an einen Spleiß-Donor) erst nach der Replikation aufstromig des 3'-Endes des p450-Gens (angrenzend an SA) liegt und somit erst nach der Replikation ein funktionales p450-Gen exprimiert wird (aus gespleißter mRNA).

BEISPIELE

Beispiel 1 Konstruktion eines Spalt-Intron-MLV-Vektors.

(i) Anfügung eines kleinen T Spleiß-Donors:

[0309] Das Start-Plasmid für dieses Konstrukt ist pLXSN (Miller et al 1989 *ibidem*); zuerst wird dieses Konstrukt mit Nhe1 verdaut und das Rückgrat wieder ligiert, um ein LTR (U3-R-U5)-Plasmid zu erzeugen. In dieses Plasmid wird dann ein Oligonukleotid inseriert, das die Spleiß-Donorsequenz zwischen den Stellen Kpn1-Bbe1 enthält. Ebenfalls enthalten in diesem Oligonukleotid, abstromig des Spleiß-Donors, ist die MLV R-Sequenz bis zu der Kpn1-Stelle. Das resultierende Plasmid wird als 3'LTR-SD bezeichnet (siehe [Fig. 2](#)).

(ii) Hinzufügen eines Spleiß-Akzeptors:

[0310] Die in diesem Konstrukt verwendete Spleiß-Akzeptorsequenz (einschließlich des Verzweigungspunkts, eines A-Restes zwischen 20 und 40 Basen aufstromig des Spleiß-Akzeptors, der an der Lariat-Bildung des Introns beteiligt ist (Aebi et al 1987 *Trends in Genetics* 3: 102-107)) wird abgeleitet aus der mRNA der variablen Region einer schweren Immunglobulinkette (Bothwell et al 1981 *Cell* 24: 625-637), jedoch mit einer optimierten/Konsensus-Akzeptorstelle. Ein solches Sequenzsignal ist auch in pCI (Promega) vorhanden. Diese Akzeptorsequenz wird zunächst als doppelsträngiges Oligonukleotid in die BamH1-Stu1-Stelle von pLXSN eingesetzt, um den Vektor pL-SA-N zu erzeugen (Beachte: der SV40-Promotor geht bei der Klonierung aus pLNSX verloren). Siehe [Fig. 3](#) für einen Überblick über die Klonierungsstrategie.

(iii) Entfernung des ursprünglichen Spleiß-Donors aus pL-SA-N

[0311] Die Entfernung des in der gag-Sequenz von pL-SA-N enthaltenen Spleiß-Donors wird mittels PCR-basierter, positionsspezifischer Mutagenese erreicht. Es werden zwei Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation der Region verwendet, die die singulären Asc1- und Spe1-Stellen von pL-SA-N überspannen. Ebenfalls einbezogen in das Spe1-überspannende Oligonukleotid ist der Austausch von agGtaag zu agGcaag, der auch in den Spleiß-negativen pBABE-Vektoren (Morgenstern et al 1990 *ibidem*) zu finden ist. Siehe [Fig. 4](#) als Überblick über die Klonierungsstrategie.

(iv) Kombinieren von pL(noSD)-SA-N mit 3'LTR-SD

[0312] Das Plasmid pL(noSD)SA-N enthält eine normale, von MLV abgeleitete 3'-LTR. Dieses wird durch die 3'-LTR-SD-Sequenz ersetzt, indem man das Nhe1-Insert aus pL(noSD)SA-N heranzieht und dieses in den mit Nhe1 verdauten 3'-LTR-SD-Vektor einsetzt. Das resultierende Plasmid, bezeichnet als pICUT (Intron Created Upon Transduction), enthält alle Merkmale für diese neue Generation retroviraler Vektoren (siehe [Fig. 5](#) für Sequenzdaten).

Beispiel 2 Konstruktion eines Spalt-Intron-Lentivektors

Konstruktion des anfänglichen EIAV-Lentivirus-Expressionsvektors (siehe auch WO 99/32646)

[0313] Für die Konstruktion eines mit „Spalt-Funktion“ ausgestatteten lentiviralen Vektors dient der als pEASUS-1 (siehe WO 99/32646) bezeichnete Vektor als Ausgangspunkt. Dieser Vektor wird von dem infektiösen proviralen EIAV-Klon pSPEIAV19 (Zugangsnummer: U01866; Payne et al 1994) abgeleitet. Seine Konstruktion stellt sich wie folgt dar: Zuerst wird EIAV LTR, amplifiziert durch PCR, in pBluescript II KS+ (Stratagene) kloniert. Das MluI/MluI (216/8124)-Fragment von pSPEIAV19 wird dann inseriert, um einen wildtypischen proviralen Klon (pONY2) in pBluescript II KS+ zu erzeugen ([Fig. 1](#)). Die env-Region wird dann durch Entfernung des HindIII/HindIII-Fragments deletiert, um pONY2-H zu erzeugen. Zusätzlich wird ein BglII/NcoI-Fragment innerhalb von pol(1901/4949) deletiert und ein β -Galaktosidase-Gen, das durch den HCMV IE Enhancer/Promotor angetrieben wird, an dessen Stelle inseriert. Dieses Produkt wird als pONY2.10nlsLacZ bezeichnet. Um die EIAV-Sequenz auf 759 Basenpaare zu vermindern und um das Primärtranskript, ausgehend von einem CMV-Promotor, anzutreiben, wird folgendes getan: Zuerst werden Sequenzen, die den EIAV-Polypurin-Trakt (PPT) und die 3'LTR einschließen, mittels PCR aus pONY2.10LacZ amplifiziert, wobei die folgenden Primer

verwendet werden:

PPTEIAV+ (Y8198): GACTACGACTAGIGTATGTTTAGAAAAACAAGG, und

3'NEG^{SpeI}(Y8199): CTAGGCTACTAGTACTGTAGGATCTCGAACAG.

[0314] Das PCR-Produkt wird dann in die Spe1-Stelle von pBS II KS⁺ kloniert, wobei die Orientierung so ist, dass das U5 proximal zu Not1 in dem pBlueScript II KS⁺ ist.

[0315] Danach wird für die Reporter-Gen-Kassette ein CMV-Promotor/LacZ aus pONY 2.10nlsLacZ durch Pst1-Verdau entnommen und in die Pst1-Stelle von pBS.3'LTR kloniert, wobei die Orientierung so ist, dass sich das LacZ-Gen proximal zu der 3'-LTR befindet; dieser Vektor wird als pBS CMVLacZ.3'LTR bezeichnet.

[0316] Die 5'-Region des EIAV-Vektors wird in dem Expressionsvektor pCI_{Eneo} konstruiert, der ein Derivat von pCI_{neo} (Promega) ist, modifiziert durch die Einbeziehung von etwa 400 Basenpaaren, die vom 5'-Ende des vollständigen CMV-Promotors gemäß vorheriger Definition stammen. Dieses 400bp-Fragment wird mittels PCR-Amplifikation erhalten, wobei die folgenden Primer verwendet werden:

VSAT1: (GGGCTATATGAGATCTTGAATAATAAAATGTGT) und

VSAT2: (TATTAATAACTAGD) und

[0317] pHIT60 (Soneoka et al 1995 Nucleic Acids Res 23: 628-633) als Matrize. Das Produkt wird mit BglII und SpeI verdaut und in die BglII/SpeI-Stelle von pCI_E-Neo kloniert.

[0318] Ein Fragment des EIAV-Genoms, verlaufend von der R-Region bis Nukleotid 150 der gag codierenden Region (Nukleotide 268 bis 675), wird mittels der folgenden Primer aus pSEIAV amplifiziert:

(Z0591)(GCTACGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTG):

(die unterstrichenen Sequenzen paaren mit der EIAV R-Region) und

3'PSI.NEG (GCTGAGCTCTAGAGTCCTTTTCTTTTACAAAGTTGG).

[0319] Das resultierende PCR-Produkt wird von Xba1- und Sac1-Stellen flankiert. Dieses wird dann geschnitten und in die Xba1-Sac1-Stelle von pCI_E-Neo kloniert. Das resultierende Plasmid, bezeichnet als pCI_E-neoS'EIAV, enthält nun den Start der EIAV R-Region am Transkriptionsstartpunkt des CMV-Promotors. Die CMV LacZ/3LTR-Kassette wird dann in das Plasmid pCI_{Eneo}5'EIAV inseriert, indem das Apa1-Not1-Fragment aus pBS.CMVLacZ.3LTR herangezogen und in das mit Sal1-Not1 verdaute pCI_{Eneo}5'EIAV kloniert wird (die Sal1- und Apa1-Stellen werden mit T4 „geglättet“, um stumpfe Enden zu erzeugen, bevor die Not1-Verdaue für Vektor bzw. Insert erfolgen). Das resultierende Plasmid wird als pEGASUS-1 bezeichnet.

[0320] Für die Verwendung als Gentransfervektor benötigt pEGASUS-1 sowohl die Expression von gag/pol als auch von env, die in trans durch eine Verpackungszelle bereitgestellt werden. Zur Erlangung von gag/pol wird ein EIAV-gag/pol-Expressionsplasmid (pONY3) hergestellt, indem das MluI/MluI-Fragment aus pONY2-H in das Säuger-Expressionsplasmid pCI-neo (Promega) inseriert wird, sodass das gag/pol-Gen ausgehend von dem hCMV-MIE-Promotor/Enhancer exprimiert wird und keine LTR-Sequenzen beinhaltet. Zur Erlangung von env wird routinemäßig das Expressionsplasmid pRV583 VSV-G verwendet. Diese drei Vektoren werden in einer 3-Plasmid-Co-Transfektion verwendet, wie sie für MLV-basierte Vektoren beschrieben ist (Soneoka et al 1995 Nucl. Acids Res. 23:628-633). Das resultierende Virus zeigt gewöhnlich Titer von 10⁴ bis 10⁵ lacZ-bildenden Einheiten pro ml auf D17-Fibroblasten.

Konstruktion eines EIAV Lentivirus-Versions-Vektors von pICUT, bezeichnet als pE1CUT

[0321] Um pE1CUT zu konstruieren, wird zuerst das Xma1-SexA1-Fragment aus pEGASUS-1 entfernt; die

Enden werden mit T4-Polymerase geglättet und das Plasmid religiert, um ein Plasmid zu erzeugen, das nur den CMV-R-US-Anteil von pEGASUS-1 enthält, der die SV40-Neo-Kassette im Rückgrat belässt. Dieses Plasmid wird als CMVLTR bezeichnet. Um einen Spleiß-Donor an der CMV-R-Grenze einzuführen, wird eine PCR mit den beiden Oligonukleotiden durchgeführt, die untenstehend in [Fig. 6](#) und gemäß Darstellung in der Legende von [Fig. 6](#) beschrieben sind. Das resultierende Plasmid wird als pCMVLTR+SD bezeichnet. Derselbe, Immunglobulin-basierte Konsensus-Spleiß-Akzeptor wie für MLV pICUT (siehe oben) wird bei der EIAV-Version benutzt. Dieser wird unter Verwendung von Oligonukleotiden, die in [Fig. 7](#) beschrieben sind, in die Xho1-Bpu1102-Stelle von pEGASUS-1 inseriert, um das Plasmid pEGASUS+SA zu erzeugen. Der wildtypische Spleiß-Donor von EIAV wird entfernt, indem überlappende PCR mit den Oligonukleotiden und der Methodik gemäß Beschreibung in [Fig. 8](#) durchgeführt wird, wobei pEGASUS+SA als Matrize verwendet wird, um das Plasmid pEGASUS+SA(noSD) zu erzeugen. Für die Herstellung von pEICUT-1 wird das Mlu1-Mlu1-Fragment aus pEGASUS+SA(noSD) dann in die singuläre Mlu1-Stelle von pCMVLTR+SD inseriert, um pEICUT-1 zu erzeugen (siehe [Fig. 9](#)). LacZ kann mittels Xho1-Bpu1102-Verdau und Insertion von pEGASUS-1 auf pEICUT-1 übertragen werden, um pEICUT-Z herzustellen (siehe [Fig. 10](#); für Sequenzdaten siehe [Fig. 11](#)).

[0322] Sowohl der MLV als auch der EIAV pICUT-Vektor enthalten einen starken Spleiß-Akzeptor aufstromig des Spleiß-Donors und daher kein funktionales Intron (Introns erfordern Spleiß-Donoren, die 5' von Spleiß-Akzeptoren angeordnet sind). Wenn der Vektor in Produzentenzellen transfiziert wird, werden die resultierenden, erzeugten Transkripte daher nicht gespleißt. Somit geht das Verpackungssignal nicht verloren, und es wird folglich eine maximale Verpackung erreichbar (siehe [Fig. 12](#)).

[0323] Aufgrund der einzigartigen Replikationsweise von Retroviren werden sich jedoch bei der Transduktion die Transkripte, die ausgehend von dem integrierten pICUT-Vektor erzeugt werden, von denen der oben beschriebenen transfizierten Zellen unterscheiden. Dies liegt daran, dass der 3'U3-Promotor bei der Replikation (an den 5'-Start von R) kopiert wird und in den transduzierten Zellen als 5'-Promotor verwendet wird. Aus diesem Grund werden Transkripte, die ausgehend von integriertem pICUT erzeugt werden, nun einen starken Spleiß-Donor 5' zu dem starken Spleiß-Akzeptor tragen, wobei beide aufstromig zu dem neo-ORF angeordnet sind. Diese Transkripte werden daher ein funktionales Intron in der 5'UTR (untranslatierte Region) enthalten und werden daher maximal gespleißt und translatiert.

[0324] Ein weiterer Vorteil dieser oben beschriebenen Vektoren besteht darin, dass es aufgrund der nur bei Transduktion erfolgenden Erzeugung eines Introns möglich ist, die Genexpression entweder auf Verpackungszellen oder auf transduzierte Zellen zu beschränken. Ein Beispiel, wie dieses erreicht wird, ist in [Fig. 13](#) dargestellt. Die Strategie beinhaltet die Klonierung eines zweiten Gens (in diesem Beispiel Hygromycin) aufstromig des Spleiß-Akzeptors. Dies wird erreicht, indem die Hygromycin-cDNA auf einem Sall-Fragment von SelctaVector Hygro (Ingenius; Oxfordshire, UK) verwendet und diese in die Xho1-Stelle (befindlich aufstromig des Spleiß-Akzeptors) von pICUT kloniert wird. Dieser Vektor exprimiert selektiv Hygromycin in den transfizierten Zellen und Neomycin in den transduzierten Zellen. Der Grund dafür liegt darin, dass bei jedem mRNA-Transkript nur das erste Gen von den Ribosomen translatiert wird, wenn interne Ribosomeneintrittsstellen (IRESs) fehlen. In der transfizierten Zelle wird dieses Gen Hygromycin sein. In den transduzierten Zellen befindet sich das offene Leseraster (ORF) von Hygromycin dagegen in einem funktionalen Intron; daher wird dieses Gen aus den reifen mRNA-Transkripten entfernt, was folglich die Translation des neo-ORF erlaubt.

[0325] Vektoren mit einer solchen zellspezifischen Genexpression können aus einer Vielzahl von Gründen von klinischem Nutzen sein. Beispielsweise kann die Expression von Resistenzmarkern auf Produzentenzellen beschränkt werden, wo diese benötigt werden, jedoch bei transduzierten Zellen vermieden werden, wo sie immunogen sein können. In einem anderen Beispiel könnte die Expression toxischer Gene, wie etwa von Ricin und dominant negativen Signalproteinen auf transduzierte Zellen begrenzt werden, wo sie benötigt werden könnten, um optional das Zellwachstum anzuhalten oder Zellen abzutöten, jedoch nicht in Produzentenzellen, wo solche Eigenschaften eine Hochtitervirusproduktion verhindern würden. [Fig. 14](#) zeigt ein Neo-p450 MLV pICUT-Konstrukt, das so ist, dass nur Neo in den Produzentenzellen exprimiert wird und die Prowirkstoff p450 2B6-Isoform in transduzierten Zellen exprimiert wird.

[0326] Ein weiterer Vorteil der Erzeugung eines Introns bei Transduktion besteht darin, dass alle essentiellen Elemente, die für die Vektorfunktion benötigt werden, nun in ein funktionales Intron platziert werden können, das bei der Transduktion gebildet wird und aus den Transkripten der transduzierten Zellen entfernt wird. Beispielsweise bezogen sowohl auf die MLV- als auch auf die zu den Lentivektoren gehörenden pICUT-Vektoren enthält das virale Transkript das funktionale Psi-Verpackungssignal in einem Intron, das bei Transduktion erzeugt wurde und das aus den Transkripten der transduzierten Zellen entfernt wird (siehe Bender et al 1987 für die Position von Psi in MLV; siehe WO 99/32646 für die Position von Psi in EIAV).

[0327] Die Vorteile einer solchen Anordnung beinhalten:

- (i) Gesteigerte Translation von den resultierenden Transkripten, da die Ribosomen in Gegenwart von Psi-basierten Sekundärstrukturen „stottern“ können, wenn solche Strukturen vorhanden sind (Krall et al 1996 *ibidem* und Literaturstellen darin).
- (ii) In Abwesenheit des Verpackungssignals wird die Verpackung des Transkripts durch endogene Retroviren verhindert.
- (iii) Eine unerwünschte vorzeitige Translationsinitiation wird verhindert, wenn essentielle virale Elemente wie etwa gag (und andere potentielle ATG-Translationsstartstellen) aus den in den transduzierten Zellen exprimierten Transkripten entfernt werden. Dies ist von besonderem Nutzen, wenn sich die Verpackungssignale in gag hinein erstrecken, wie es sowohl bei EIAV-Vektoren als auch bei MLV pICUT-Vektoren der Fall ist.
- (iv) Promotor, Enhancer und Suppressoren können in ein Intron platziert werden, das bei der Transduktion erzeugt wird und somit andere Transkriptanordnungen nachahmen, wie etwa diejenigen, die von CMV erzeugt werden und solche Einheiten innerhalb von Introns tragen (Chapman et al 1991 *ibidem*).

[0328] Zusammengefasst erleichtert das neue, in der vorliegenden Erfindung beschriebene pICUT-Vektorsystem die folgenden Merkmale/Anordnungen:

- (i) Maximale Verpackung und reduzierte Translation von Transkripten in Produzentenzellen
- (ii) Maximales Spleißen und damit „Intron-verstärkte“ Translation von Transkripten in transduzierten Zellen
- (iii) Begrenzung der Expression von Genen und/oder essentiellen viralen Elementen entweder auf Produzentenzellen oder auf transduzierte Zellen.

Beispiel 3 Konstruktion eines amphotropen MMLV-env-Gens mit minimaler Homologie zu dem pol-Gen und einer gag-pol-Transkriptionskassette

[0329] Im murinen Moloney-Leukämievirus (MMLV) überlappen die ersten etwa 60 Basenpaare der env-codierenden Sequenz mit Sequenzen am 3'-Ende des pol-Gens. Die Homologie-Region zwischen diesen beiden Genen wurde entfernt, um die Möglichkeit der Rekombination zwischen diesen in Zellen, die beide Gene exprimieren, zu verhindern.

[0330] Die DNA-Sequenz der ersten 60 bp der codierenden Sequenz von env wurde verändert, während die Aminosäuresequenz des codierten Proteins wie folgt erhalten wurde. Es wurde ein synthetisches Oligonukleotid konstruiert, um die Codon-Nutzung des 5'-Endes von env zu verändern (siehe [Fig. 15](#)), und dieses Oligonukleotid wurde wie folgt in den Rest von env inseriert.

[0331] Das Start-Plasmid für die Neukonstruktion des 5'-Endes des 4070A-Gens war das pCI-Plasmid (Promega), in das zuvor das Xba1-Xba1-Fragment, enthaltend das 4070A-Gen aus pHIT456 (Soneoka et al 1995 *ibidem*), kloniert worden war, um pCI-4070A zu erzeugen.

[0332] Es wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern A und B ([Fig. 15](#)) an pCI-4070A durchgeführt, um ein 600 bp großes Produkt zu erzeugen. Dieses Produkt wurde dann in die Nhe1-Xho1-Stelle von pCI-4070A kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde über die Nhe1-Xho1-Region sequenziert. Obwohl die Aminosäuresequenz des resultierenden Gens dieselbe wie bei dem ursprünglichen 4070A ist, wurde die Homologie-Region mit dem pol-Gen entfernt.

[0333] Die vollständige Sequenz des modifizierten env-Gens m4070A ist in [Fig. 16](#) angegeben. Diese Sequenz wird mittels Standardtechniken in den Expressionsvektor pCI (Promega) inseriert. Die CMV gag-pol Transkriptionseinheit wird aus pHIT60 (Soneoka et al 1995 *ibidem*) erhalten.

Beispiel 4 Deletion der gag-Sequenzen aus dem retroviralen Verpackungssignal

[0334] Ein DNA-Fragment, das die LTR und ein minimales funktionales Verpackungssignal enthält, wird aus dem retroviralen Vektor MFG (Bandara et al 1993 Proc Natl Acad Sci 90: 10764-10768) oder aus proviraler DNA von MMLV gewonnen, wobei dies mittels PCR-Reaktion und unter Verwendung der folgenden Oligonukleotid-Primer erfolgt:

HindIII: GCATTAAGCTTTGCTCT

LS23: GCCTCGAGCAAAAATTCAGACGGA

[0335] Dieses PCR-Fragment enthält die MMLV-Nukleotide +1 bis +523 und enthält somit keine gag codierenden Sequenzen, die bei +621 beginnen (die Nummerierung basiert auf der Nukleotidsequenz von MMLV, Shinneck et al 1981 Nature 293: 543-548).

[0336] Das PCR-Fragment kann verwendet werden, um einen retroviralen Genom-Vektor durch Verdau unter Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI und Subklonierung mittels Standardtechniken zu konstruieren. Solche Vektoren enthalten keine Homologie zu gag-codierenden Sequenzen.

Beispiel 5 Konstruktion eines defektiven retroviralen Genoms

[0337] Die Transkriptionseinheit, die zur Produktion eines defektiven retroviralen Genoms befähigt ist, ist in [Fig. 17](#) dargestellt. Sie enthält die folgenden Elemente: einen Hypoxieregulierten Promotor/Enhancer, umfassend 3 Kopien des HRE aus dem PGK-Gen und einen SV40-Promotor, deletiert von dem 72bp-Wiederholungssequenz-Enhancer aus pGL3 (Promega); eine MMLV-Sequenz, enthaltend R, U5 und das Verpackungssignal; die codierende Sequenz von m4070A (Beispiel 3); einen Spleiß-Akzeptor; eine Klonierungsstelle für die Insertion einer codierenden Sequenz für ein therapeutisches Protein; den Polypyrimidin-Abschnitt aus MMLV; eine zweite Kopie des HRE-enthaltenden Promotors/Enhancers; eine Spleiß-Donorstelle; und eine zweite Kopie von R, U5.

[0338] Bei der reversen Transkription und Integration des Vektors in die sekundäre Zielzelle wird der Spleiß-Donor aufstromig des env-Gens eingeführt, was bewirkt, dass dieses durch Spleißen aus der mRNA entfernt wird, was somit eine effiziente Expression des therapeutischen Gens ausschließlich in der sekundären Zielzelle erlaubt (siehe [Fig. 17](#)).

Beispiel 6 Konstruktion eines konditionalen Expressionsvektors für Cytochrom P450

[0339] [Fig. 18](#) zeigt die Struktur der zum retroviralen Expressionsvektor gehörenden cDNA-codierenden Sequenzen aus dem Cytochrom P450-Gen in zwei Hälften angeordnet, sodass nur bei Transduktion ein korrektes Spleißen erreicht wird, um die Expression von P450 zu ermöglichen. Dies begrenzt die Expression daher auf transduzierte Zellen.

1) Das Ausgangsplasmid für die Konstruktion dieses Vektors ist pLNSX (Miller und Rosman 1989 BioTechniques 7: 980-990). Der natürliche Spleiß-Donor (...agGTAag...), der im Verpackungssignal von pLNSX enthalten ist (Position 781/782), wird durch PCR-Mutagenese unter Verwendung des ALTERED SITES II Mutagenese-Kits (Promega) und eines synthetischen Oligonukleotids der folgenden Sequenz mutagenisiert: 5'-caaccaccggagGCaagctggccagcaactta-3'

2) Ein CMV-Promotor aus dem pCI-Expressionsvektor (Promega) wird mittels PCR unter Verwendung der beiden folgenden Oligonukleotide isoliert:

Primer 1: 5'-atcggctagcagatcttcaatattggccattagccatat-3'

Primer 2: 5'-atcgagatctgcccggcttaacctgccagtgccctcagccaa-3'

[0340] Dies erzeugt ein Fragment, das den CMV-Promotor zusammen mit einer 5' NheI-Stelle (Primer 1) und einer 3' NotI- und XbaI-Stelle (Primer 2) enthält. Dieses wird mit NheI und XbaI geschnitten und in pLNSX kloniert, aus dem ein NheI-NheI-Fragment entfernt worden war.

3) Das 5'-Ende der für Cytochrom P450 cDNA codierenden Sequenz wird mittels RT-PCR unter Verwendung der folgenden Primer aus humaner Leber-RNA (Clontech) isoliert:

Primer 3: 5'-atcggcggccgccaccatggaactcagcgtctctcttccctgcaccctagg-3'

Primer 4: 5'-atcggcggccgcactacCtctgtgccccaggaaagtatttcaagaagccag-3'

[0341] Dies amplifiziert das 5'-Ende von P450 von ATG bis zu Rest 693 (Nummerierung ausgehend von der Translationsinitiationsstelle, Yamano et al 1989 Biochem 28: 7340-7348). Außerdem enthalten im 5'-Ende des Fragments (abgeleitet von Primer 3) sind eine NotI-Stelle und ein optimiertes „Kozak“-Translationsinitiations-signal. Im 3'-Ende der Sequenz (abgeleitet von Primer 4) befinden sich eine weitere NotI-Stelle und eine Konsensus-Spleiß-Donorsequenz (auch zu finden in pCI und ursprünglich gewonnen aus dem humanen beta-Glo-

bingen), wobei das GT-Spleiß-Donorpaar angrenzend an Rest 704 von P450 liegt (der komplementäre Rest ist in Primer 4 in Großschrift gezeigt). Dieses Fragment wird mit Not1 verdaut und in das mit Not1 verdaute, in Schritt 2 erzeugte Plasmid kloniert.

4) Das bei der Klonierung in Schritt 2 entnommene Nhe1-Nhe1-Fragment wird dann erneut in das Plasmid aus Schritt 3 eingeführt. Dies erzeugt einen retroviralen Vektor gemäß der Beschreibung in [Fig. 17](#), jedoch ohne das 3'-Ende von P450.

5) Die 3'-Region der P450 codierenden Sequenz wird durch RT-PCR-Amplifikation aus humaner Leber-RNA (Clontech) isoliert, wofür die folgenden Primer verwendet werden:

Primer 5: `actgtgatcatagggcacctatgggtctactgacatccactttctctccacagGcaagttacaaaacctgc
aggaaatcaatgcttacatt-3'`

Primer 6: `actgatcgatttcctcagcccttcagcggggcaggaagc-3'`

[0342] Dies erzeugt das PCR-amplifizierte 3'-Ende von P450 von Rest 705 (Großschrift in Primer 5) bis über das Translationsterminationscodon hinaus. Enthalten im 5'-Ende dieses Produkts und erzeugt mittels Primer 5 sind eine Bcl1-Restriktionsstelle, ein Konsensus-Spleiß-Akzeptor und ein Verzweigungspunkt (auch in pCI zu finden und ursprünglich aus einem Immunglobulingen) aufstromig von Rest 705. Enthalten am 3'-Ende dieses Produkts abstromig des Stopp-Codons und erzeugt mittels Primer 6 befindet sich eine Cla1-Stelle. Dieses PCR-Produkt wird dann mit Bcl1 und Cla1 verdaut und in den Vektor aus Schritt 3, bei dem das Bcl1-Cla1-Fragment entfernt wurde, kloniert, um den retroviralen Vektor gemäß [Fig. 18](#) zu erzeugen.

[0343] Die folgenden Beispiele beschreiben die Konstruktion eines adenolentiviralen Systems, das für die transiente Produktion von Lentivirus in vitro oder in vivo verwendet werden kann.

Rekombinantes Adenovirus der ersten Generation

[0344] Die Adenovirus-Vektoren der ersten Generation basieren auf einer Deletion der E1- und E3-Regionen des Virus unter Ermöglichung der Insertion von Fremd-DNA, für gewöhnlich in den linken Arm des Virus, angrenzend an die linke Invertierte Terminale Wiederholungssequenz (ITR). Das virale Verpackungssignal (194-358 Nt) überlappt mit dem E1a-Enhancer und liegt daher in den meisten Vektoren im E1-deletierten Bereich vor. Diese Sequenz kann durch Translokation an das rechte Ende des viralen Genoms verschoben werden (Hearing & Shenk, 1983 Cell 33: 59-74). Somit können in einem E1-deletierten Vektor 3,2 kb deletiert werden (358-3525 Nt).

[0345] Das Adenovirus ist zur Verpackung von 105% seiner Genomlänge befähigt und erlaubt somit ein Hinzufügen von zusätzlichen 2,1 kb. Somit erreicht die Klonierungskapazität bei einem E1/E3-deletierten viralen Vektor die Klonierungskapazität 7-8 kb (2,1 kb + 1,9 kb (Entfernung von E3) + 3,2 kb (Entfernung von E1)). Da dem rekombinanten Adenovirus das essentielle frühe E1-Gen fehlt, ist es nicht in der Lage, in nicht für E1 komplementierenden Zelllinien zu replizieren. Die Zelllinie 293 wurde von Graham et al entwickelt (1977 J Gen Virol 36: 59-74) und enthält etwa 4 kb vom linken Ende des Ad5-Genoms einschließlich ITR, Verpackungssignal, E1a, E1b und pIX. Die Zellen exprimieren in stabiler Weise die E1a- und E1b-Genprodukte, jedoch nicht das späte Protein IX, obwohl sich pIX-Sequenzen innerhalb von E1b befinden. In nicht-komplementierenden Zellen transduziert das E1-deletierte Virus die Zelle und wird in den Zellkern transportiert, aber es gibt keine Expression von dem E1-deletierten Genom.

Adenovirus-Produktionssystem der ersten Generation

Microbix Biosystems – nbl Gene Sciences

[0346] Das Diagramm in [Fig. 19](#) zeigt die allgemeine Strategie, die verwendet wird, um rekombinante Adenoviren unter Verwendung des Microbix Systems herzustellen.

[0347] Die allgemeine Strategie beinhaltet die Klonierung der Fremd-DNA in einem E1-Schaukelvektor, wobei die E1-Region von 402-3328 bp durch eine Kasette mit Fremd-DNA ersetzt ist. Das rekombinante Plasmid wird dann zusammen mit dem pJM17-Plasmid in 293-Zellen co-transfiziert. pJM17 enthält eine Deletion der E3-Region und eine Insertion des prokaryotischen pBRX-Vektors (einschließlich Ampicillin-Resistenz und bakterieller ori-Sequenzen) in der E1-Region bei 3,7 Karteneinheiten. Dieses 40kb-Plasmid ist daher zu lang, um

in Adeno-Nukleocapside verpackt zu werden, aber es kann in Bakterien vermehrt werden. Die intrazelluläre Rekombination in 293-Zellen resultiert im Austausch der amp^r -Sequenz und der ori-Sequenzen mit dem Insert der Fremd-DNA.

Beispiel 7 Konstruktion von Transfer-Plasmiden für die Erzeugung von Adenoviren, die EIAV-Komponenten enthalten

[0348] Um die lentiviralen Vektoren herzustellen, müssen vier Adenoviren erzeugt werden: Genom, gag-pol, envelope (Rabies G) und Rev. Die lentiviralen Komponenten werden von heterologen Promotoren aus exprimiert; sie enthalten Introns, wo dies erforderlich ist (für eine hohe Expression von gag-pol, Rev und Rabies envelope), sowie ein Polyadenylierungssignal. Wenn diese vier Viren in E1a minus-Zellen transduziert werden, werden die adenoviralen Komponenten nicht exprimiert, jedoch werden die heterologen Promotoren die Expression der lentiviralen Komponenten erlauben. Ein Beispiel (Beispiel 1) ist unten für die Konstruktion eines EIAV-Adenovirussystems (WO 99/32646) dargestellt. Das EIAV basiert auf einem Minimalsystem, das ein System ist, bei dem alle nicht-essentiellen EIAV-codierten Proteine (S2, Tat oder envelope) fehlen. Das envelope-Protein, das verwendet wird, um EIAV zu pseudotypisieren, ist das Rabies envelope (G-Protein). Für dieses ist gezeigt worden, dass es EIAV gut pseudotypisiert (WO 99/61639).

Transfer-Plasmide

[0349] Unten wird die Konstruktion des Transfer-Plasmids beschrieben, das die EIAV-Komponenten enthält. Das Transfer-Plasmid ist pE1sp1A ([Fig. 20](#)).

[0350] Die rekombinanten Transfer-Plasmide können dann dazu verwendet werden, um rekombinante Adenoviren durch homologe Rekombination in 293-Zellen herzustellen.

[0351] Eine bildliche Darstellung der folgenden Plasmide ist angefügt.

A) pE1RevE – Rev-Konstrukt

[0352] Das Plasmid pCI-Rev wird mit Apa I und Cla I geschnitten. Die 2,3 kb-Bande, die für EIAV Rev codiert, wird mittels Klenow-Polymerase mit glatten Enden versehen und in die EcoRV-Stelle von pE1sp1A inseriert, um das Plasmid pE1RevE zu ergeben ([Fig. 21](#)).

B) pE1HORSE3.1 – gag-pol-Konstrukt

[0353] pHORSE3.1 wurde mit Sna BI und Not I geschnitten. Die 6,1 kb-Bande, die EIAV gag-pol codiert, wurde in pE1 RevE inseriert, das mit Sna BI und Not I geschnitten worden war (es wurde die 7,5 kb-Bande gereinigt). Dies ergibt das Plasmid pE1HORSE3.1 ([Fig. 22](#)).

C) pE1PEGASUS – Genomkonstrukt

[0354] pEGASUS4 wurde mit Bgl II und Not I geschnitten. Die 6,8 kb-Bande, die das EIAV-Vektorgenom enthält, wurde in pE1 RevE inseriert, das mit Bgl II und Not I geschnitten worden war (es wurde die 6,7 kb-Bande gereinigt). Dies ergab das Plasmid pE1 PEGASUS ([Fig. 23](#)).

D) pCI-Rab – Rabieskonstrukt

[0355] Um pE1Rab herzustellen, wurde das offene Leseraster aus Rabies in pCI-Neo ([Fig. 24](#)) inseriert, indem das Plasmid pSA91RbG mit Nsi I und Ahd I geschnitten wurde. Die 1,25 kb-Bande wurde mittels T4-DNA-Polymerase mit glatten Enden versehen und in pCI-Neo inseriert, das mit Sma I geschnitten worden war. Dies ergab das Plasmid pCI-Rab ([Fig. 25](#)).

F) pE1Rab – Rabieskonstrukt

[0356] pCI-Rab wurde mit Sna BI und Not I geschnitten. Die 1,9 kb-Bande, die das envelope-Protein von Rabies codiert, wurde in pE1 RevE inseriert, das mit Sna BI und Not I geschnitten worden war (es wurde die 7,5 kb-Bande gereinigt). Dies ergab das Plasmid pE1 Rab ([Fig. 26](#)).

ZUSAMMENFASSUNG

[0357] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Auslieferungssystem, das geeignet ist, um eine oder mehrere NOI in eine Zielzelle einzuführen.

[0358] In einem bevorzugten Aspekt deckt die vorliegende Erfindung einen retroviralen Vektor ab, der eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle umfasst, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfasst, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so dass der retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

[0359] Alternativ ausgedrückt, deckt dieser Aspekt ein neuartiges Auslieferungssystem ab, das eine oder mehrere NOI umfasst, die von einer funktionalen SD und einer funktionalen SA flankiert sind, unter der Voraussetzung, dass dieses aus einem Provektor erzeugt wurde, bei dem die Anordnung von SD und SA umgekehrt ist, um das Spleißen nicht-funktional zu machen.

[0360] Dieser Aspekt der vorliegenden Erfindung kann als „Spalt-Intron“-Aspekt bezeichnet werden. Ein schematisches Diagramm, das diesen Aspekt der vorliegenden Erfindung zeigt, wird in [Fig. 27c](#) bereitgestellt. Demgegenüber zeigen die [Fig. 27a](#) und [Fig. 27b](#) Spleiß-Anordnungen in bekannten retroviralen Vektoren.

[0361] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein neues Auslieferungssystem bereit, das eine oder mehrere adenovirale Vektorkomponenten beinhaltet, die zur Verpackung einer oder mehrerer lentiviraler Vektorkomponenten befähigt sind, wobei der lentivirale Vektor eine Spalt-Intron-Anordnung umfasst.

[0362] Dieses Auslieferungssystem kann als Hybridvirusvektorsystem bezeichnet werden. In diesem speziellen Fall kann die Kombination einer adenoviralen Komponente und einer lentiviralen Komponente als duales Hybridvirusvektorsystem bezeichnet werden.

[0363] Ein schematisches Diagramm, das diesen Aspekt der vorliegenden Erfindung zeigt, wird in [Fig. 28](#) bereitgestellt.

[0364] Diese und andere breite Aspekte der vorliegenden Erfindung werden hier diskutiert.

SEQUENZPROTOKOLLE

SEQ ID NO.1

GCTAGCTTAAGTAAACGCCACTTTGCAAGGCATGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTTCAGATCAAGG
TCAGGAACAAGAAAACAGCTGAATACCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCGGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCA
AGAACAGATGAGACAGCTGAGTGTATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCGGGG
CCAAGAACAGATGCTCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGTGAATCATCAGATGTTTCCAGGGT
GCCCCAAGGACCTGAAAAATGACCCGTACCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTGCTTCGCTTCTGTTCCG
GCGCTTCCGCTCTCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCACAAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTTCCGATAGACTG
CGTCGCCCCGGTACCCGATTTCCCAATAAAGCCTCTTGTGTTTTGCATCCGAAATCGTGGTCTCGCTGTTCTTT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTATTGACTACCCACGACCGGGGCTTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATTTGGA
GACCCCTGCCCCAGGACCCGACCCACCCCGGGAGGCAAGCTGGCCAGCAACTFATCTGTGTCTGTCCGAT
TGTCTAGTGTCTATGTTTGAATGTTATGCGCCTGCGTCTGTAAGTACTAGCTAAGTACTGCTGTATCTGCGGA
CCCGTGGTGGAACTGACCGAGTTCTGAACACCCGCGCCAAACCTGGGAGACGTCCCAAGGACTTTGGGGCCG
TTTTTGTGGCCGACCTGAGGAAGGAGTCTGATGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTTGGTTCTGGTAGGA
GACGGAACCTTAAACAGTTCGCGCTCCGCTGTAATTTTGTCTTTCGGTTTGGAACCGAAGCCGCGCTCTT
GTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCGTCTGTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAAATTA
GGCCAGACTGTTAACACTCCCTTAAGTTTGAACCTTAGGTCACTGGAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAAC
CAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAAATGGCCAACTTTAACGTCGGAT
GGCCGCGAGACGCGCACCTTAAACGAGACCTCATACCCAGGTTAAGATCAAGGCTTTTTCACCTGGCCCCGA
TGGACACCCAGACCGGTCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAG
CCCTTTGTACACCTTAAGCCTCCGCTCCTCTTCCATCCGCCCCGTCCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTT
CGACCCCGCTCGATCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGGCGCGGAATTCGTTAACTCGAGGA
TCTAACCTAGTCTCGAGTGTAAAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTTTCGCTTCTGATAGGCA
CCTATTGCTCTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGG
GCTGCAGGTCGAGGCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATGAACLAGATGGATTGC
ACGCAAGTTCTCCGCGCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAAAGACAAATCGGCTGCTC
TGATGCGCGCTGTTCCGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTCCC
CTGAATGAATGACGAGGAGGAGGAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTTCGCGACTGTGC
TCAGCCTTGTCACTGAAGCGGGAGGGACTGGCTGCTATTTGGGCGAAGTCCGGGCGAGGATCTCCTGTCTC
TCACCTTGTCTCCTGCCGAGAAATATCCATCATGCTGATGCAATGCGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCT
ACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAAGTCCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCC
ATCAGGATGATCTGGAAGAAGACATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCAT
GCCGACCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCCTGCTTGCAGAAATATCATGTTGAAAAATGGCCG
TTTTCTGGAATCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGAACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCGGT
ATATTGCTGAAGAGCTTTGGCGGAAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTGTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT
GCAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTTGAAGCGGACTCTGGGTTGRTAAAAATAAAG
ATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAATGAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAA
CGCCATTTTCAAGGCATGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAAGTCAAGGTCAGGAACAGATGG
AACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAGAACAGAT
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAGAACAG
ATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTCCCCAAGGA
CCTGAATGACCCGTGTCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTGCTTCTCGCTTCTGTTCCGCGCTTCTGCT
CCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGCGCGTTAACACTAGTAAGCTTGTCTTAAGGT
AAATATGTGACAGGCTCGCGCAGTCCCGATTGACTGAGTCCGCGGGTACCCGTTATCCAAATAAACCC
TCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGCTCCTCTGAGTGAATGACTACCCGTC
AGCGGGGCTTTTCAATTTGGGGCTCGTCCGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCG
GGAGGTAAGCTGGCTGCTCGCGGTTTCGGTGAATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACRAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGG
TGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCAAGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGCTTAACTATGCGGCATCAGA
GCAGATTGTAAGTGTACCATATGCGGTGTAATAACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATC
AGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTGCTGCGCTCGGCTCGTTCGGCTGCGGTCGGGTCAGGTC
ACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTTTTCCA TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT

CACAAAATCGACCGTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTAGGTGCTTCCGCTCCAACCTGGG
TGTTGCACGAACCCCGCTTCCGCACTGCAGCGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGC
TAAGAQCAGACTTATCGCCACTGCAGCGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGC
TACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTCGGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTGTTTTCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG
GTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACC
TAGATCCTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT
ACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCAATCCATAGTTGCCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAA
CTTTATCGGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGAAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTT
GCCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
CGTTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTC
CGATCGTTGTGAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTAC
TGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAGTCAATTCGAGAAATAGTGTATG
CGCCACCGAGTTGCTCTTGGCCCGGCTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGC
TCATCATTTGAAAAACGTTCTTCCGGCGGAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTA
ACCCACTCGTGCACCCCACTGATCTTCAGCACTTTTACTTTTACCAGGCTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGA
AGCCAAAATGCGCAAAAAAGGGAAATAAGGGCGACCGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAAT
ATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTA
ACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTTCAAGAATTCATACCAGATCACCGAAAACCTGCTC
CCAAATGTGTCCTCCCTCACACTCCCAAATTCGCGGGCTTCTGCTCTTAGACCCTCTACCCTATTTCCCA
CTCACCGGAGCCAAAGCCGCGGCCCTTCCGTTCTTTGCTTTTGAAGACCCCAACCGTAGGTGGCAA

SEQ ID NO.2

TGAATAATAAAATGTTGTTGTCGAAATACGCGTTTGGAGATTTCTGTCCCGACTAAATTCATGTCGCGC
GATAGTGGTPTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGAAAAATTGATATTTGAAAAATAGGCATATTGAAA
ATGTCGCCCGATGTGAGTTTCTGTGTAAGTATCGCCATTTTCCAAAAGTGATTTTGGGCATACCGGATA
TCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGAAGTTGGCGATTCTGTGTG
TCGCAAAATATCCAGTTTCCGATATAGGTGACAGAGCATATGAGGCTATATCCCGGATAGAGCGACATCAAGC
TGGCAGATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATGGCCATTAGCCATATTATTCATTTGTTA
TATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATFGCATACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATAT
GGCTCATGTCCAACATTTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATACGGGGT
CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCC
CRAAGACCCCGCCCTTGCAGCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA
CGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGC
CCCCATTGACGCTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGATATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGG
CGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGCTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC
ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTGCGATCGCCCGCCCGTTGACGCAAAATGGGGGT
AGCGGTACCGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGTCTGA
GTCCCTTCTCTGCTGGCTGAAAAGGCCCTTTGTAATAAATAAATTTCTACTCAGTCCCTGTCTTAGTTTG
TCTGTTGAGATCTTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGGCCAGACCCCTACCTGTTGAACCTGG
CTGATCGTAGGATCCCGGGACAGCAAGGAGAACTTACAGAGTCTTCTGGAGGTGTTCTTGGCCAGAACAC
AGGAGGACAGGTAAGATGGGAGACCCTTTGACATGGAGCAGGCGCTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTAC
AAGGGTCTCAGAAATTAATACTGTGTAAGTAAATGGGCGTAAAGTCTAGTAGACTTATTTTATGATACCAA
CTTTGTAATAAGAAAAGGACTCTAGAGTCCACCCCTCGACGTTTAAACTCTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGA
CTCTTGGCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTACAGTGA
AGCTAGCCCTGAGGATCTGCGGATCCGGGAATTTCCAGTCTCAGGATCCACCAATGGGGATCCCGTCTGTTT
TACAACTGCTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACCTTAACTGCGCTTGCAGCACATCCCCCTTCCCGAC

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGC
TTTGCCTGGTTCCGGCACCAGAGGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCAGTCTTCTGAGGCCGATACCTG
TCGTCGTCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATTCGCGCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTAC
GGTCAATCCGGCTTTGTTCCACGGAGAAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGC
TGGCTACAGBAAGGCCAGACCGGAATTAATTTTGTATGGCGTTAACTCGCGTTTCATCTGTGGTGCACACGGGC
GCTGGGTCGGTACGGCCAGGACAGTCTGTTGCGCTGTAATTTGACCTGAGCGCATTTTTTACGGCCGGAGA
AAACCGCCTCGCGGTATGCTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATAATGTTGGCGGATG
AGCGGCATTTTCCGTGACGCTCTCGTTGCTGCATAAACCCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTC
GCTTAATGATGATTTACAGCCGCTGTACTGGAGGCTGAACTTCAATGTTGCGCGAGTTGCTGACTACCT
ACGGGTAAACAGTTTCTTTATGCGAGGGTGAACCGCAGGTCCGCCAGCGCCACCGCGCTTTCCGGCGTGAAT
ATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCGCATCGCTCACACTACGCTGAACTGCGAAACCCGAACTGTGGAGCG
CCGAAATCCCGAATCTCTATGCTGCGGTGTTGAACTCACACCCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAAGC
CTGCGATGCTGGTTTCCGCGAGGTGCGGATGAAATGGTCTGCTGCTGCTGAAACGGCAAGCCGTTGCTGAT
CGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCTCTGCATGGTCAAGTCAATGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATA
TCCTGCTGATGAAGCAGAACTTTAACGCGGTGCGCTGTTCCGATTATCCGAAACATCCGCTGTGTTACAC
GCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTTGTTGATGAAGCCAAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCTAAT
CGTCTGACCGATGATCCGCGTGGCTACCGCGATGAGCGAACCGCTAACCGCAATGGTGCAGCGCGATCGTA
ATCACCGAGTGTGATCATCTGCTCGCTGGGAAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACCGCTGTATCG
CTGGATCAAAATCTGTGATCTTCCCGCCCGGTGAGTGAAGGGCGGGAGCCGACACCACGGCCACCGAT
ATTAATTTCCCGGATGACCGCGGTGATGAAGACCAGCTTCCCGGCTGTGCGAAATGGTCCATCAAAA
AATGGCTTTGCTACTCTGAGAGAGACCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCAAGCGATGGGTAAACAGT
TGGCGGTTTCCGTAATACTGCGAGCGTTCGTCAGTATCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGCTGGGACTGG
GTGGATCAGTCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGCTGGCTGCGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATA
CGCCGAACGATCGCCAGTTCGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCGGACCGCACGGCGATCCAGCGCTGACGGGA
AGCAAAACACCGAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGTTATCCGGGCAACCATCGAAGTACAGCGAATACCTG
TTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCTGCACTGATGTTGGCGCTGGATGGTAAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAG
TGCCCTCTGGATGTCGCTCCACAGGTAAACAGTTGATGAACTGCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCGGG
GCAACTCTGGCTCACAGTACCGGTAGTCAACCGAACCGCATGCTGAGAGCGCGGACATCAGCGCC
TGGCAGCAGTGGCGTCTGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCGCGCGTCCACGGCATCCCGCATCTGTA
CCACCAGGAAATGGATTTTTCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCT
TTCACGATGTTGGATTTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACCGCGCTGCGGATCAGTTCACCCGTCACCGCTG
GATAACGACATTTGGCTAAGTGAAGCGACCCGATGACCTAACCGCTGGGTGAAACGCTGAAAGCGCGGG
GCCATTACCGGGCGAAGCAGCGTGTGTTGAGTGCACGGCAGATACACTTGTGATGGGTGCTGATTACGAC
CGCTACCGCTGCGGACCGCGAATTAATTTATGCCCCACACAGTGGCGCGGACTTCCAGTTCACATCA
GCCCCTACAGTCAACAGCACTGATGAAAACCGCCATCGCCATCTGCTGCAAGCGGAAGAGGCATGGCT
GAATATCGACGGTTCCATATGGGGATGGTGGCGAGACTCCTGGAGCCCGTCAATATCGGCGGAATTCAG
CTGAGCGCGCTGCTACCATTACAGTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCGGCAGGGGGATCCCG
AGATCCGGCTGTGAAATGTTGTTGAGTGGCGAGGATACACCGCATCCCGCGGATGGCTGAACTGTC
AAGCATGCTGACCGCGGGGATCCACTAGTGTATGTTAGAAAAACAAGGGGGAACTGTGGGTTTTTAT
GAGGGTTTTATAAATGATTAAGAGTAAAAAGAAAGTTGCTGATGCTCTCATAACCTGTATAACCCAAAG
GACTAGCTCATGTTGCTAGGCAACTAAACCGCAATAACCGCATTGTTGACCGGAGTCCCCATTTGGTACGCG
TTTTGAGATTTCTGTCGCGACTAAATTCATGTCGCGGATAGTGGTGTATTCGCGGATAGAGATGGCGATA
TTGGAAAAATGATATTTGAAAATAAGCATATTGAAAATGTCGCCATGTTGAGTTTCTGTGTAACCTGATATC
GCCATTTTTCAAAGTGAATTTTGGGCATACCGGATCTGCGGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGATG
GCGATAGACGACTTTGGTACTTGGCGATTCTGTGTGTCGAAATATCGCAGTTTCGATATAGTTGACAGAC
GATATGAGCTATATCGCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATG
AATCAATATTGGCCATTAGCCATTTATTCATTTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGC
ATACGTTGATCCATATCGTAATATGTAATTTATTTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTG
ATTATTGACTAGTTAATAAGTAATCAATTAACGGGGTCAATAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
ACATAACTTACGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCGCCCATGACGTCATAAATGACCT
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGCTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCA
CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCC
TGGCATATTGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTCGCTA

TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCGAAG
 TCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAAAC
 AACTGCGATCGCCCGCCCGTTGACGCAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCATATAAAGCAGAGC
 TCGTTTAGTGAACCGACTTAAGTCTTCTGACAGGGCTCTAAGGTAATAGGGCACTCAGATTCTGCGGCTG
 AGTCCCTTCTCTGCTGGCTGAAAAGGCTTTGTATAAATAAATTCTCTACTCACTCCCTGTCTTAGTTF
 GTCTGTTCCAGATCCACAGTTGGCGCCGAACAGGACCTGAGAGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTG
 GCTGATCGTAGGATCCCGCCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCG
 CCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAAGGCGGAGGCCGCTCCGCTCTGAGCT
 ATTCAGAGTAGTAGGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTGCAAAAAGCTTGAATCTTCTGACACAACA
 GTCTCGAECTAAGGCTAGAGCCACCAATGATTGAACAAGATGGATTGCCAGCGGTTCTCCGCGCGTTGGT
 GGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGCAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCCGCTGTCA
 GCGCAGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG
 CCGGCTATCGTGGCTCCCGCAAGCGGGCGTTCCTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGGAG
 GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTACTCACCTTGCTCCTGCGGAGAAAGTA
 TCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGAATCCGGCTACCTGCCATTGACCAACCAAGCGA
 AACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA
 TCAGGGGCTCCGCGCCAGCCGACTGTTCCGCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGCGGAGGATCTCGTCTG
 ACCCATGGCGATGCCCTGCTTCCGGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTCTGGATTCTAGACTGTGGCC
 GGCTGGGTGTGGCGGACCCCTATCAGGACATAGCCTGGCTACCCGATGATTTGCTGAAGAGCTTGGCGGCA
 ATGGGCTGACCGCTTCCCTCGTCTTACGGTATCCCGCTCCCGATTCCGAGCGCATCGCCTTCTATCCGCTT
 CTGACGAGTCTTCTGAGCGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGAGCCCAACTGCCATCAG
 ATGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCAATACATCTGTGTGTTGGYTTTTGTGTGAATCGATAGCGATAAG
 GATCGATCCGCGTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCC
 GCCAACCCCGCTEACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCT
 TCCGGGAGCTGCATGTCTCAGAGGTTTTCCCGTCTACCCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTATAC
 GCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGT
 GCGCGAACCCTTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCRAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGTA
 TAARTGCTTCAATAATATTGAAAAGCAAGAGTATGAGTATCAACAATTCGCTGTCGCCCTTATTCCTTTT
 TTGGCGCATTTGCCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAOTT
 GGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGGAAGAA
 CTTTTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGTATTTATCCGATATTGACCGCGGCAAG
 AECRACTCGGTCGCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTACAGAAAAGCATCT
 TACGGATGGCATGACGTAAGAGAATTATGAGTGTGCCATAACCAAGAGTATAACACTGGCGCAACTTA
 TTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGACTAACCGTTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTGCC
 TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCTGTAGCAAT
 GBCAACACGTTGCGCAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACCAATTAATAGACTGG
 ATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAT
 CTGGAGCCGCTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCGT
 AGTTATCTACAGCGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCA
 CTGATTAAGCATTTGTTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTT
 AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTTAGTTTTGTT
 CCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGTCAAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAACTGCTG
 TGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTT
 CGAAGGTAAGTGCCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTGCTCCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCA
 CTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGG
 GATAAGTCTGTTTACCGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGG
 GGGGTTCTGTACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGTAGCTATG
 AGAAAGCCCAAGCTTCCGGAAGGAGAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCGAGGGTCCGAAACGAGAG
 CGCACGAGGAGCTTCCGGAAGGAAACGCTGTTCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCCACTCTGACTTG
 AGCGTCAATTTTTGTGATGCTCCTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTTACG
 GTTCTGCGCTTTTTGCTGCGCTTTTGTCTACATGGCTCGACAGATCT

SEQ ID NO.3

Siehe Figur 16

Patentansprüche

1. Retroviraler Vektor, der eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle umfaßt, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfaßt, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so daß der

retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

2. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1, wobei der retrovirale Provektor eine dritte NS umfaßt, die aufstromig zu der zweiten Nukleotidsequenz angeordnet ist, wobei die dritte NS in der Lage ist, eine nicht-funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern.

3. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der retrovirale Vektor weiterhin eine zweite NOI umfaßt, wobei die zweite NOI abstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist.

4. Retroviraler Vektor nach Anspruch 3, wobei der retrovirale Provektor die zweite NOI umfaßt, wobei die zweite NOI abstromig zu der zweiten Nukleotidsequenz angeordnet ist.

5. Retroviraler Vektor nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, wobei die zweite NOI oder das Expressionsprodukt davon ein therapeutisches Mittel oder ein diagnostisches Mittel ist oder umfaßt.

6. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die erste NOI oder das Expressionsprodukt davon eines oder mehrere ausgewählt unter einem Mittel, das Selektierbarkeit verleiht (z.B. ein Markerelement), einem wichtigen Viruselement oder einem Teil davon oder einer Kombination davon ist oder umfaßt.

7. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die erste NS an oder in der Nähe des 3'-Endes eines retroviralen Provektors angeordnet ist, wobei vorzugsweise das 3'-Ende eine U3-Region und eine R-Region umfaßt und wobei vorzugsweise die erste NS zwischen der U3-Region und der R-Region angeordnet ist.

8. Retroviraler Vektor nach Anspruch 7, wobei die U3-Region und/oder die erste NS des retroviralen Provektors eine NS umfaßt, die eine dritte NOI ist, wobei die dritte NOI eine oder mehrere ausgewählt unter einem Transkriptionskontrollelement, einer codierenden Sequenz oder einem Teil davon ist.

9. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die erste NS von einem Virus erhältlich ist.

10. Retroviraler Vektor nach Anspruch 9, wobei die erste NS ein Intron oder ein Teil davon ist.

11. Retroviraler Vektor nach Anspruch 10, wobei das Intron von dem Intron des kleinen t von SV40-Virus erhältlich ist.

12. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der retrovirale Provektor ein retrovirales Verpackungssignal umfaßt und wobei die zweite NS abstromig zu dem retroviralen Verpackungssignal angeordnet ist, so daß ein Spleißen an einer primären Zielstelle verhinderbar ist.

13. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die zweite NS abstromig zu der ersten NOI angeordnet ist, so daß die erste NOI an einer primären Zielstelle exprimiert werden kann.

14. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die zweite NS aufstromig zu einer multiplen Klonierungsstelle angeordnet ist, so daß eine oder mehrere zusätzliche NOI eingesetzt werden können.

15. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die zweite NS eine Nukleotidsequenz ist, die ein immunologisches Molekül oder einen Teil davon codiert.

16. Retroviraler Vektor nach Anspruch 15, wobei das immunologische Molekül ein Immunglobulin ist.

17. Retroviraler Vektor nach Anspruch 16, wobei die zweite NS eine Nukleotidsequenz ist, die eine variable Region einer schweren Kette eines Immunglobulins codiert.

18. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Vektor zusätzlich ein funktionales Intron umfaßt.

19. Retroviraler Vektor nach Anspruch 18, wobei das funktionale Intron so angeordnet ist, daß es in der

Lage ist, die Expression wenigstens einer der NOI an einer gewünschten Zielstelle zu beschränken.

20. Retroviraler Vektor nach Anspruch 19, wobei die Zielstelle eine Zelle ist.

21. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Vektor oder Provektor von einem Mausonkoretrovirus oder einem Lentivirus erhältlich ist.

22. Retroviraler Vektor nach Anspruch 21, wobei der Vektor von MMLV, MSV, MMTV, HIV-1 oder EIAV erhältlich ist.

23. Retroviraler Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der retrovirale Vektor ein integriertes Provirus ist.

24. Retroviruspartikel, erhältlich von einem retroviralen Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche.

25. Zelle, die mit einem retroviralen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 23 oder einem Retroviruspartikel nach Anspruch 24 transfiziert oder transduziert ist.

26. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 23 oder Viruspartikel nach Anspruch 24 oder Zelle nach Anspruch 25 für eine Verwendung in der Medizin.

27. Auslieferungssystem für einen retroviralen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 23 oder ein Viruspartikel nach Anspruch 24 oder eine Zelle nach Anspruch 25, wobei das Auslieferungssystem einen oder mehrere nicht-retrovirale Expressionsvektoren, Adenoviren oder Plasmide oder Kombinationen davon für eine Auslieferung einer NOI oder einer Vielzahl von NOI an eine erste Zielzelle und einen retroviralen Vektor für eine Auslieferung einer NOI oder einer Vielzahl von NOI an eine zweite Zielzelle umfaßt.

28. Retroviraler Provektor nach einem der Ansprüche 1 bis 23.

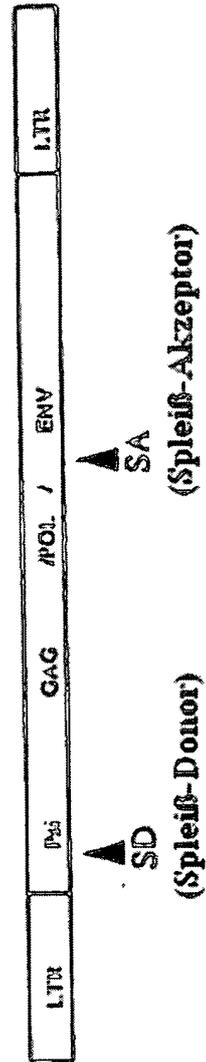
29. Hybridvirusvektorsystem für eine Genauslieferung in vivo, wobei das System einen primären viralen Vektor umfaßt, welcher einen sekundären viralen Vektor codiert, wobei der primäre Vektor in der Lage ist, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem Adenovirusvektor und der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, vorzugsweise einem Lentivirusvektor, wobei der sekundäre virale Vektor einen retroviralen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 23 umfaßt.

30. Hybridvirusvektorsystem für eine Genauslieferung in vivo, wobei das System einen primären viralen Vektor umfaßt, welcher einen sekundären viralen Vektor codiert, wobei der primäre Vektor in der Lage ist, eine erste Zielzelle zu infizieren und darin den sekundären viralen Vektor zu exprimieren, wobei der sekundäre Vektor in der Lage ist, eine sekundäre Zielzelle zu transduzieren, wobei der primäre Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem Adenovirusvektor und der sekundäre virale Vektor erhältlich ist von oder basiert auf einem retroviralen Vektor, vorzugsweise einem Lentivirusvektor, wobei das virale Vektorsystem eine funktionale Spleiß-Donorstelle und eine funktionale Spleiß-Akzeptorstelle umfaßt, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle und die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle eine erste interessierende Nukleotidsequenz ("NOI") flankieren, wobei die funktionale Spleiß-Donorstelle aufstromig zu der funktionalen Spleiß-Akzeptorstelle angeordnet ist, wobei der retrovirale Vektor von einem retroviralen Provektor abgeleitet ist, wobei der retrovirale Provektor eine erste Nukleotidsequenz ("NS") umfaßt, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Donorstelle zu liefern, und eine zweite NS, die in der Lage ist, die funktionale Spleiß-Akzeptorstelle zu liefern, wobei die erste NS abstromig zu der zweiten NS angeordnet ist, so daß der retrovirale Vektor als ein Ergebnis von reverser Transkription des retroviralen Provektors gebildet wird.

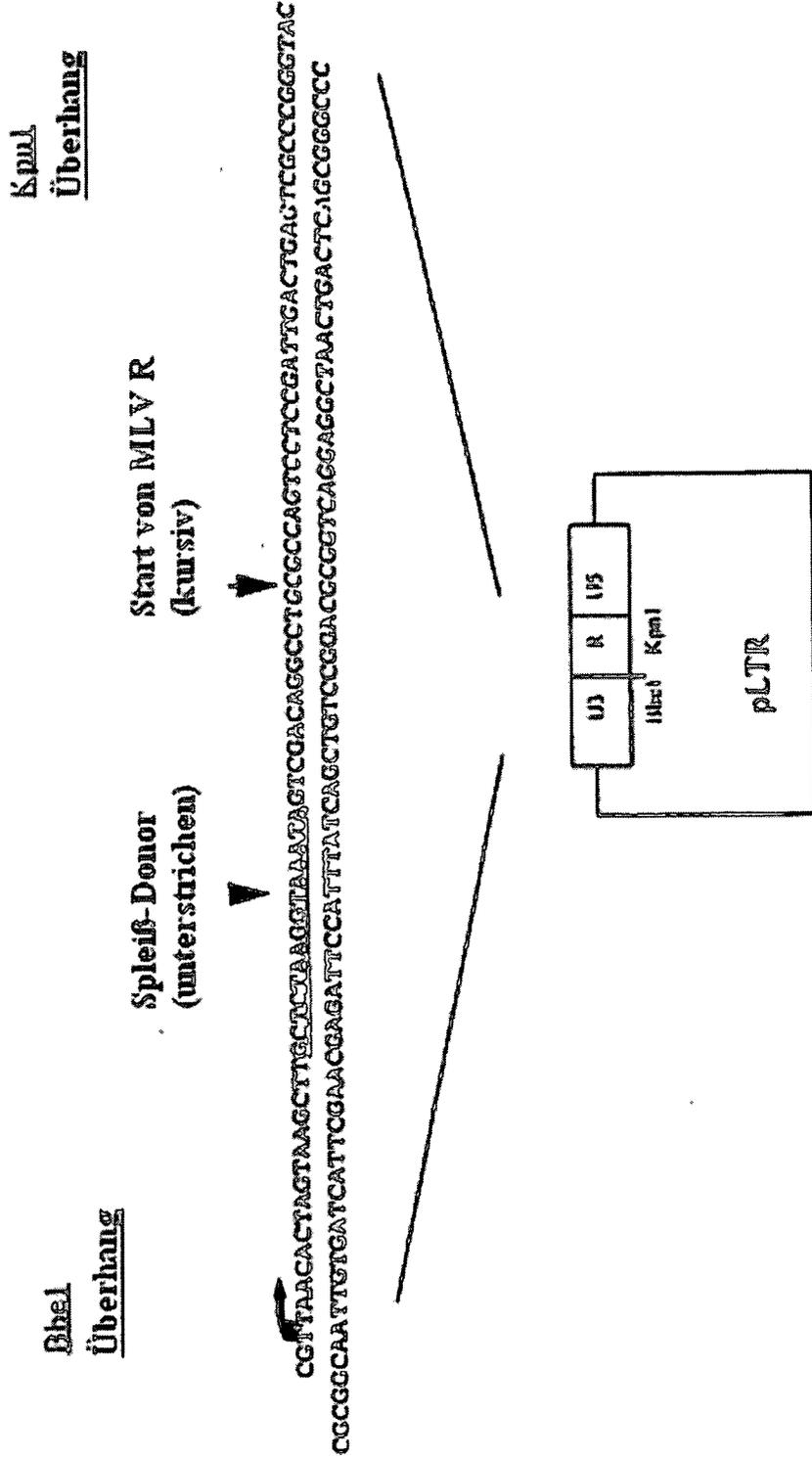
Es folgen 34 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

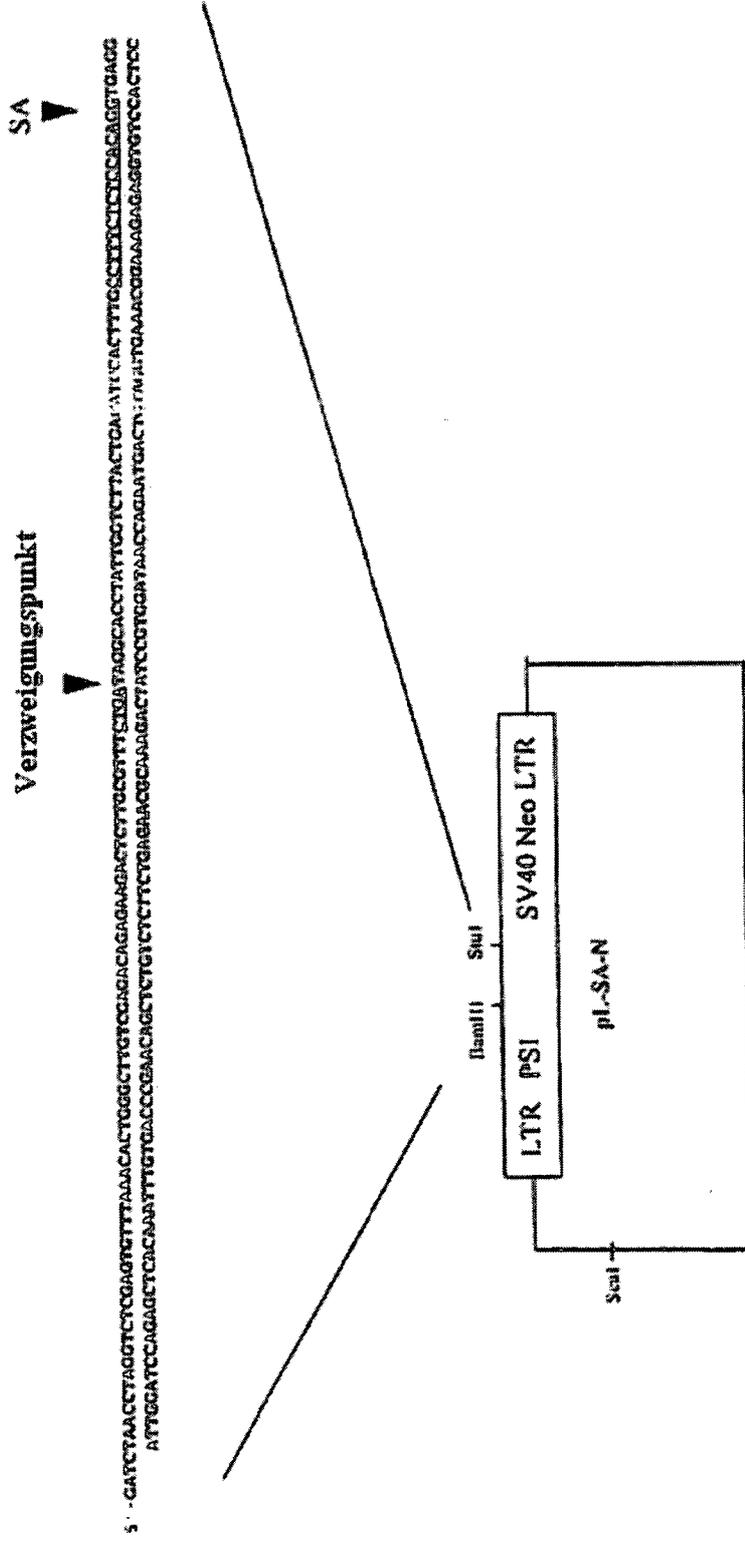
Figur 1



Figur 2



Figur 3



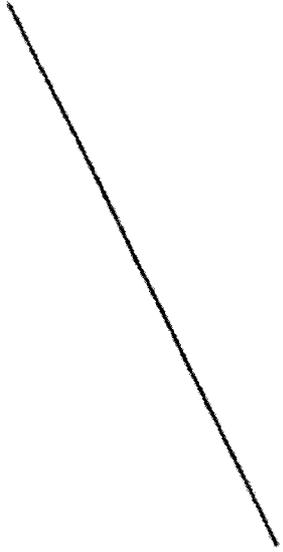
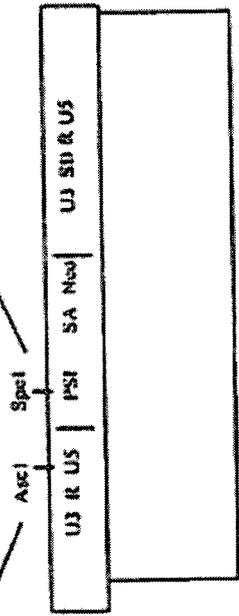
Figur 4

GT zu GC -Änderung

3' - GGTCGGCTCCCTTCGACCCGCTTCGATAGACAGACAGGCTTAACTGATCAGAGATACTACTACATATGCGGACGCGACATGTCATTCGATTT - 5'

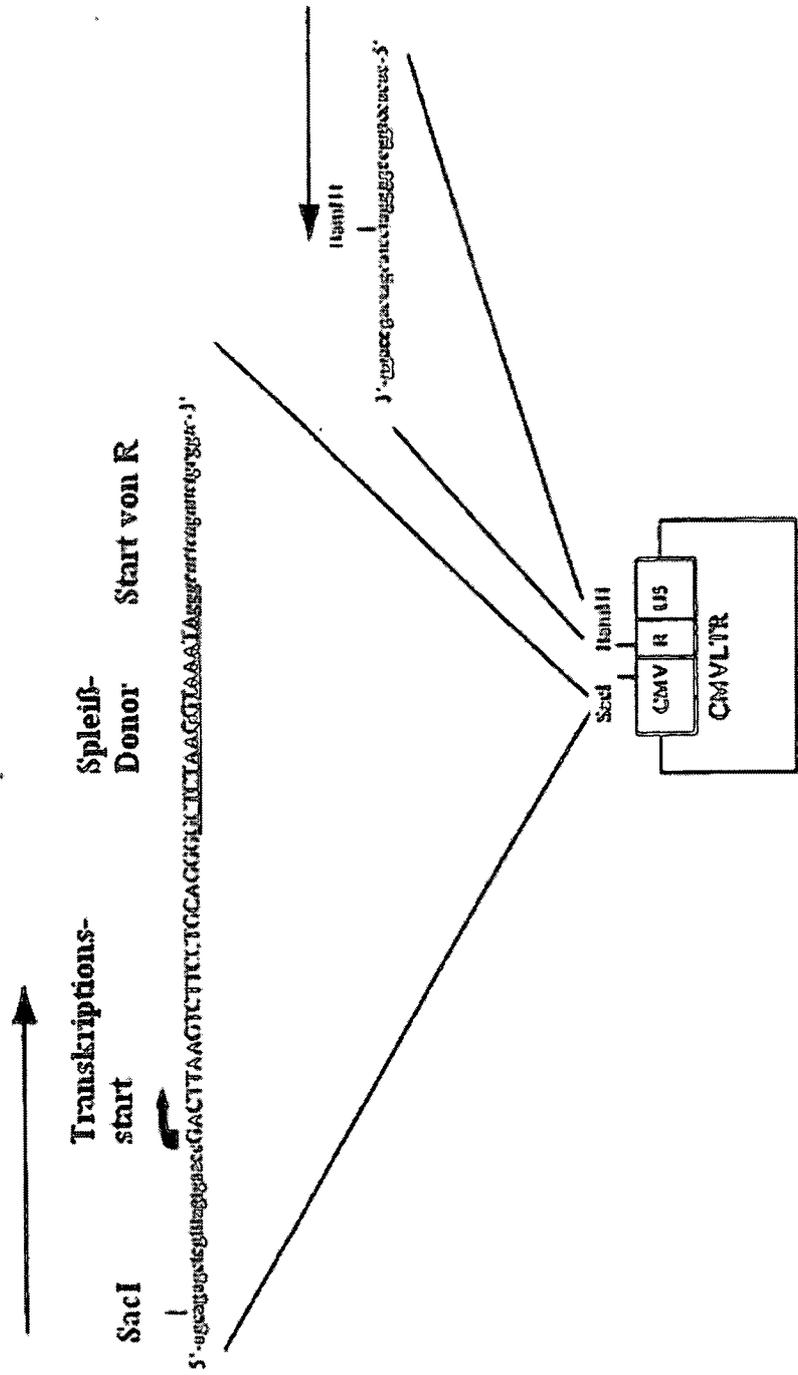
Asc I

5' - CCTTCACTCGGCGCGCAGCTCTCCGA - 3'

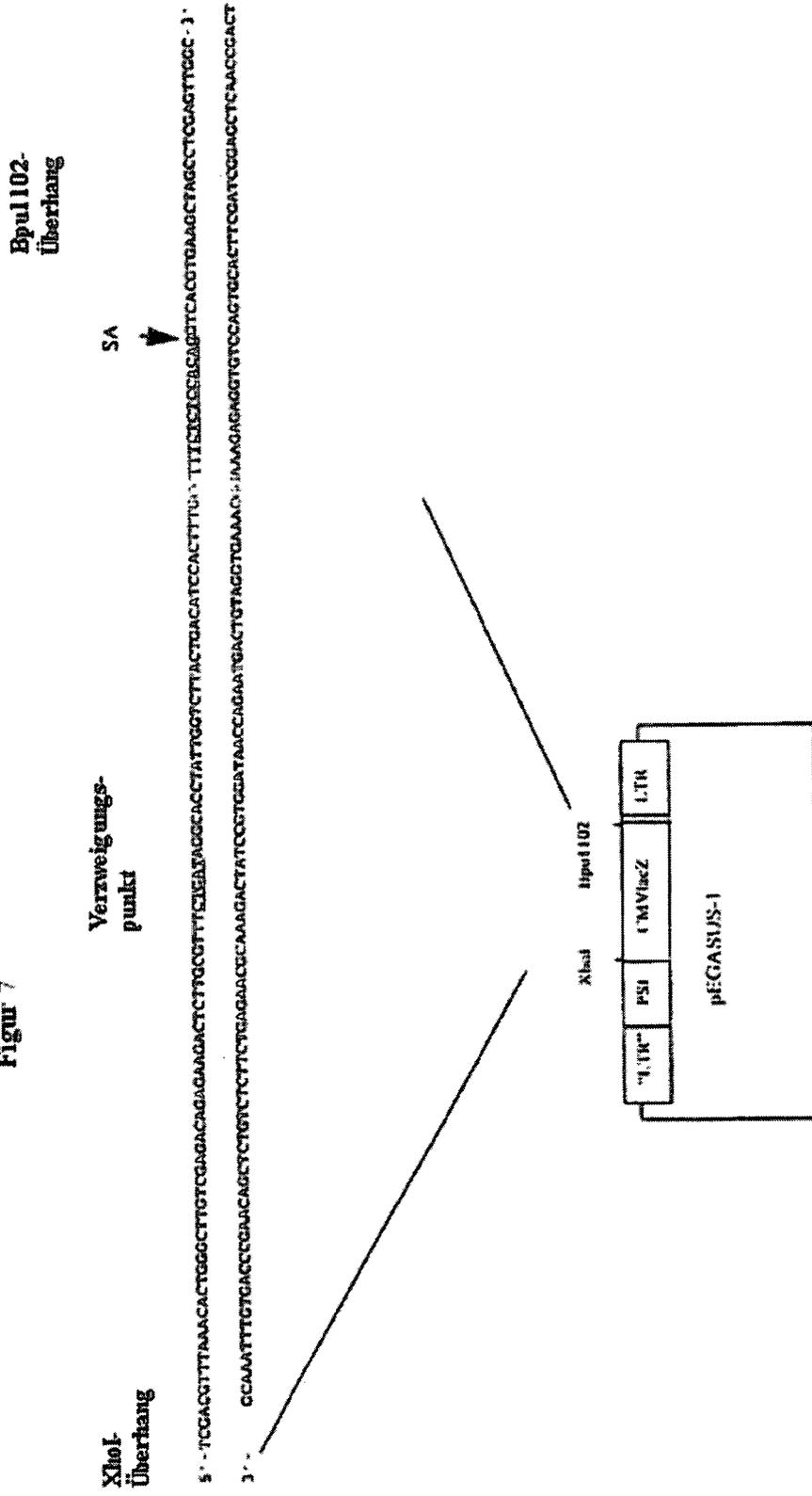


SpeI

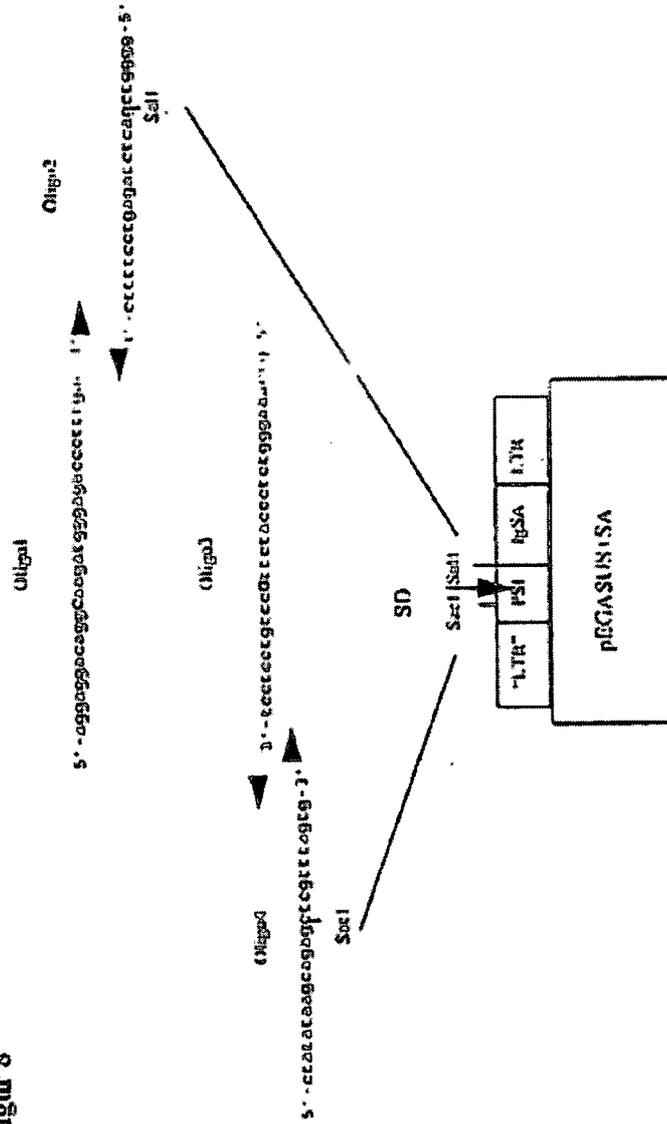
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

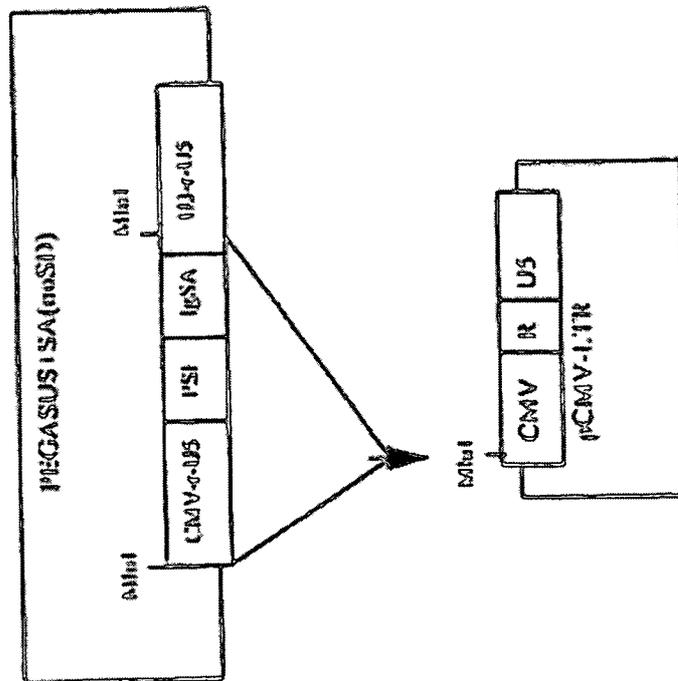
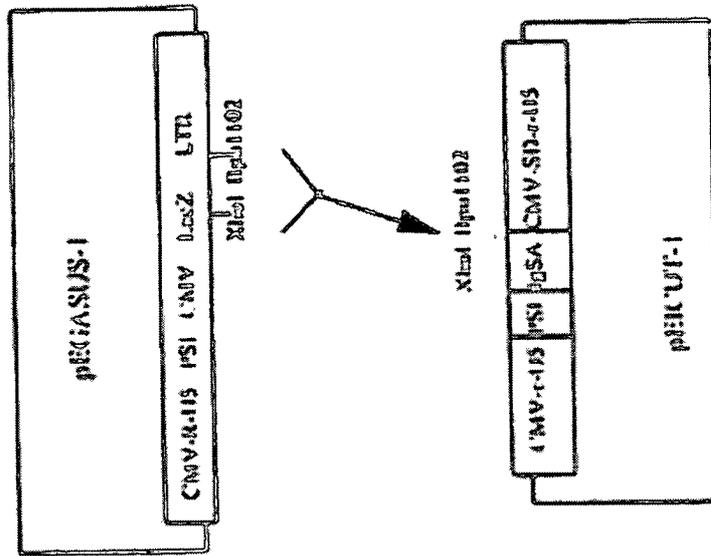
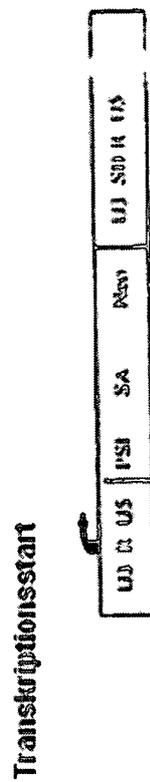


Figure 10

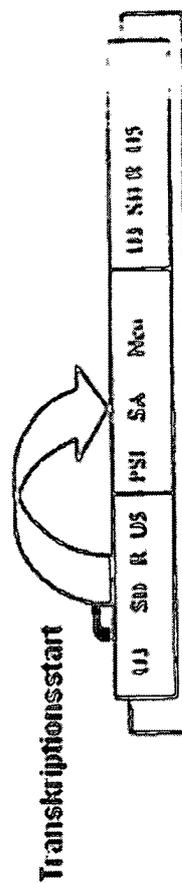


Figur 12

(A) PICUT-Vektor in transfizierten Zellen

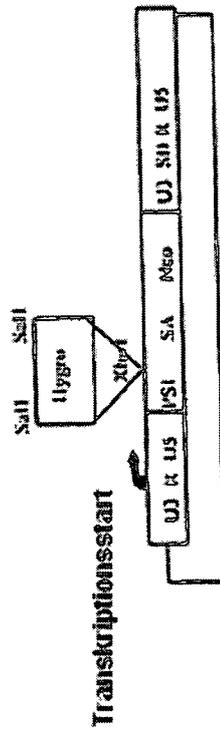


(B) PICUT-Vektor in transduzierten Zellen

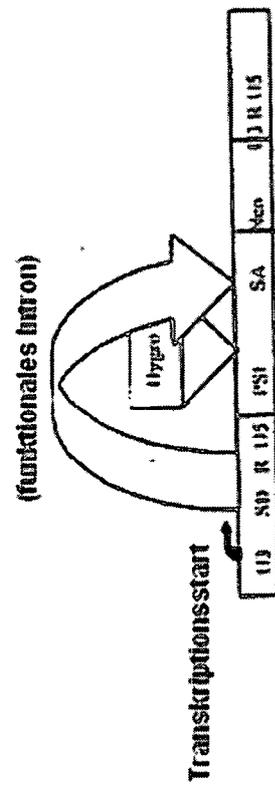


Figur 13

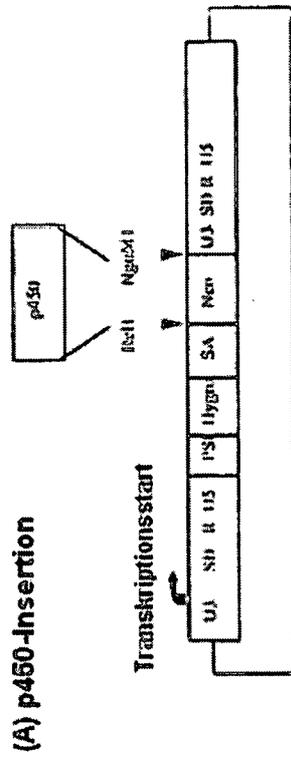
(a) Vektor-Anordnung in transfizierten Zellen



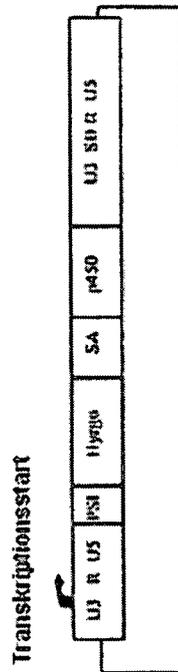
(b) Vektor-Anordnung in transduzierten Zellen



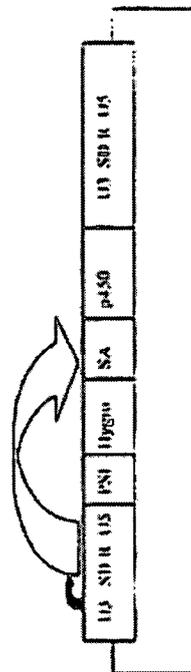
Figur 14



(B) Hygromycin-Expression in transfizierten Zellen



(C) p450-Expression in transduzierten Zellen



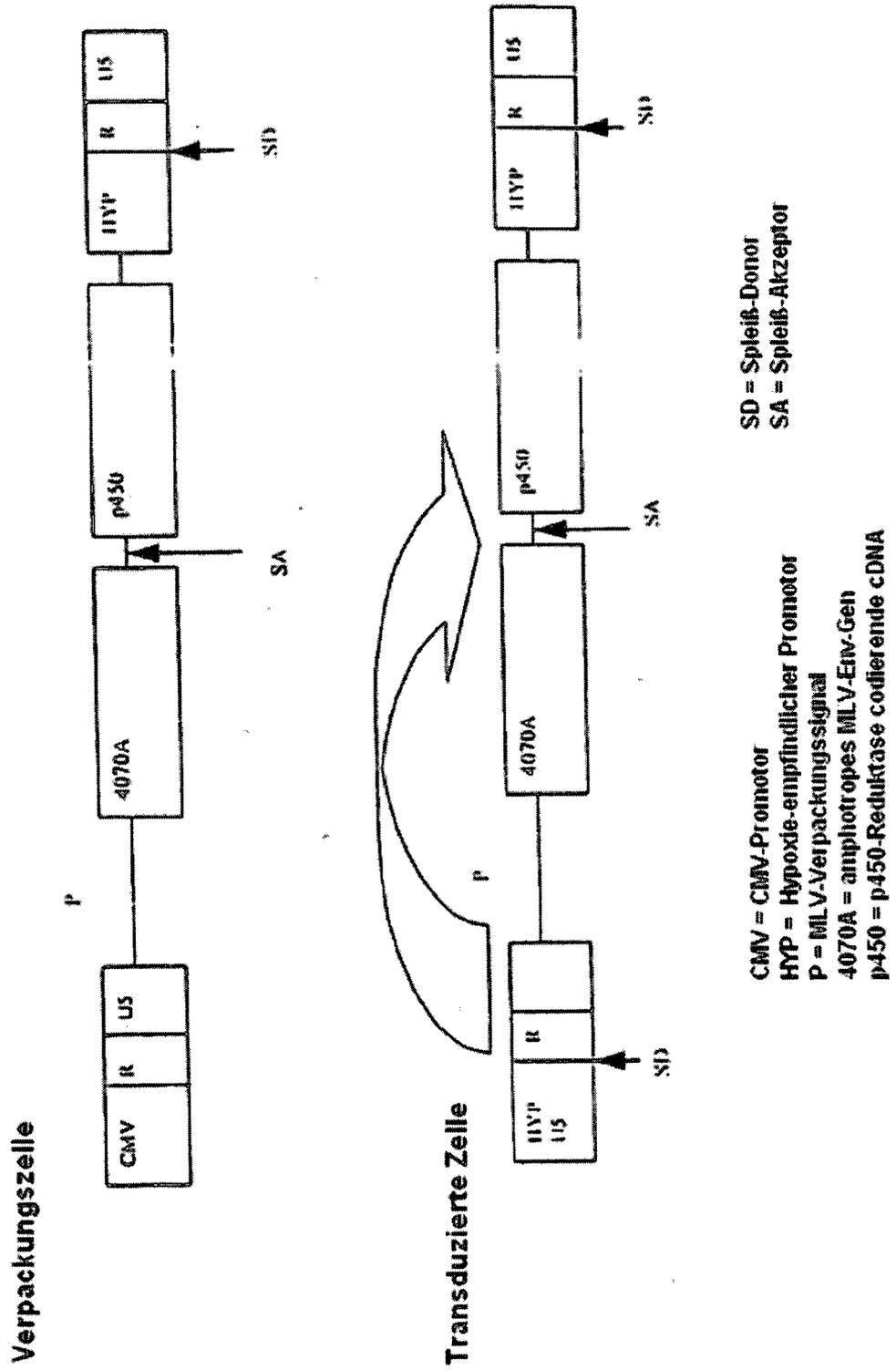
Figur 15

3'-Ende von pol	5'-ATG CGT TCA ACG CTC TCA ANA CCC CTT AAA AAT AAG
5' verändertes 4070A	5'-ATG GCC AGA AGC ACC CTG AGC AAG CTA CCC CAG GAC
	CTT AAC CCG CGA GGC CCC CTA ATC CAC-3'
	AAA AAT CCC TGG AAA CCT CTG ATC CAC-3'

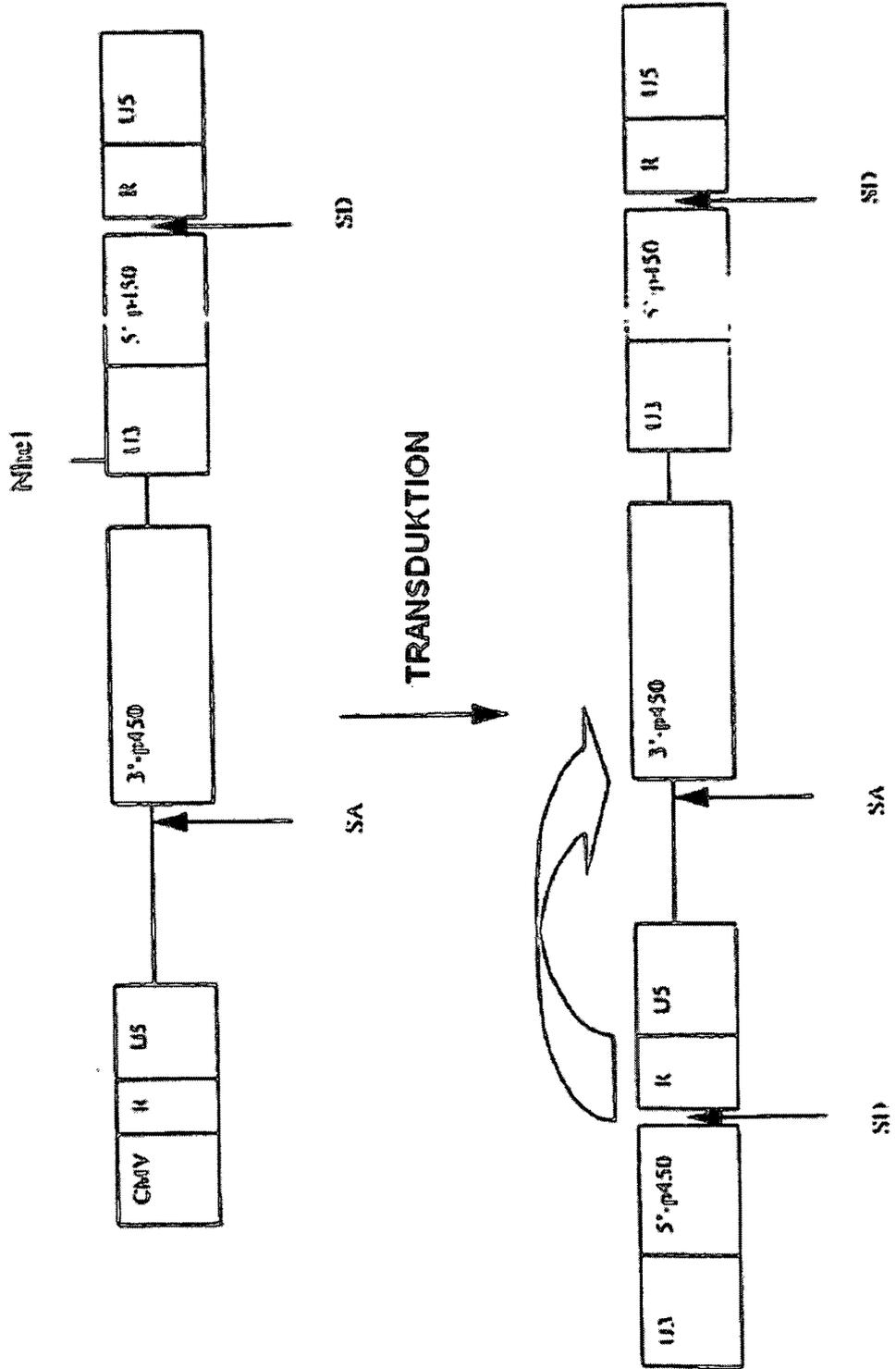
Figur 16

ATGCGCAGAA GCAATCTGAA CAAAGCAGCC GAGACAAA TCAATCTT: GAAATCTT NI
 ATCGTCATG GATCTCTGTT AGAATCTAGG ATGACAGAA GCGCGAAT MHTL
 TTTAATGTA CTGAGAGAT TCCACCTCC CTGCTGAA CTGTAAAGA TGCTTTLLA
 ATGACTGGC CTAGCGGCA TCGATCTGTC GCGACCTTC GCGACCTTC AGACCAAGAA
 AATTAATTT TCGATCTATG EAAATACCC GCGGAGAG AGCGAGCAG GACTTTTGAC
 CCGTATGCG GGTATGECTG TACGCTAAG TCGGCTATG GCGAGCAG AGCGCCTAC
 TTTTACTGT GCGCTGGA AAGCGGGA GCGCTTAT GCGAGCAG ATCATCTT:G
 TGTGTAAAT GCGCTGGA CCGTACCC GCGCTTAT GCGAGCAG TAACTTTC
 GACTTAATCT CCTTACCG CTTCAAGTA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 YGTGCGCTT CCTACGACT CTTCAAGTA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GCGAGATGA CCTCTACT CTTCAAGTA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GCGCGCAAT CTTGCGACT GAGATCTAT CCGACAGTA GCGAGCAG TACTGAAAG
 TCGCTGAGC GCGAGCTCT TAAATGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 TTACCGAAC AAGACTCC TCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 AGCGCTTCA ATACAGTA CCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 AGTCTAGTG TCCACAGCC CCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GCGCGCTAT CCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 TTATGCTGG GACTCTTA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 TCGAGCTC GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 ACAGAGAG GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 ACCGAGAG GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 TCGAGACTG GATGACTG CCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 TGTGTATTA TTGAAGTG GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 CAGCTTGAAC AGCTAGCA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 CTAGGAGAT TACCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 ATTAAGACC AGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GAAAGTGA TTACAGCT AGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 AAGCGAGAG CCTAGATT GCTATCTTA AAGAGGAG GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GAAAGATTT GTTTTATG AGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 AGAGAGAG TTATGAGG AAGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 CTTTATATA GATCGCTG GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 GTACTCTAC TCACTTAT GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 AAGAGAGG TCACTTAT GCGCTGGA TCAATCTT GCGAGCAG TACTGAAAG
 CCTATGACT AGAGCAG A

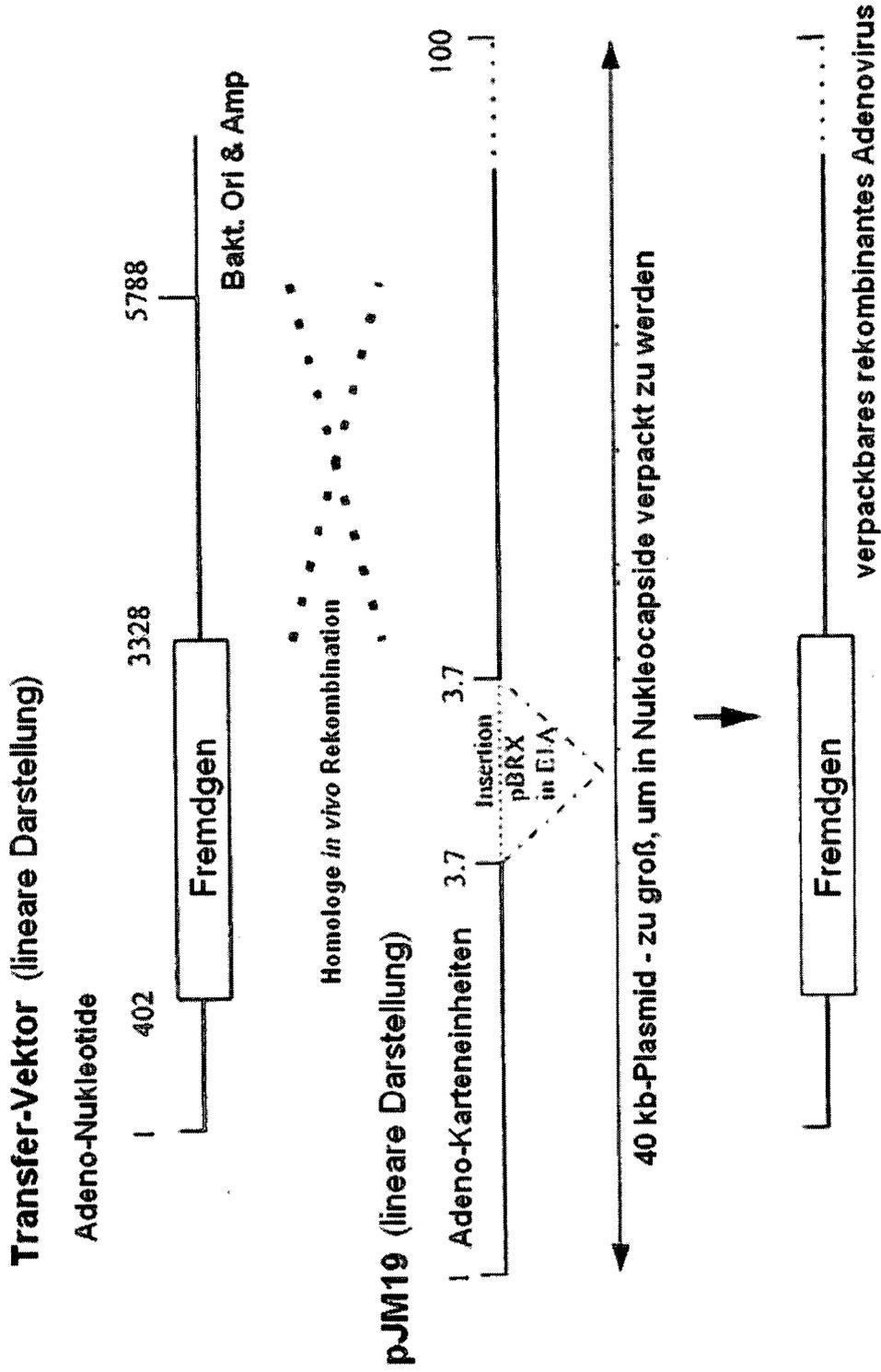
Figur 17

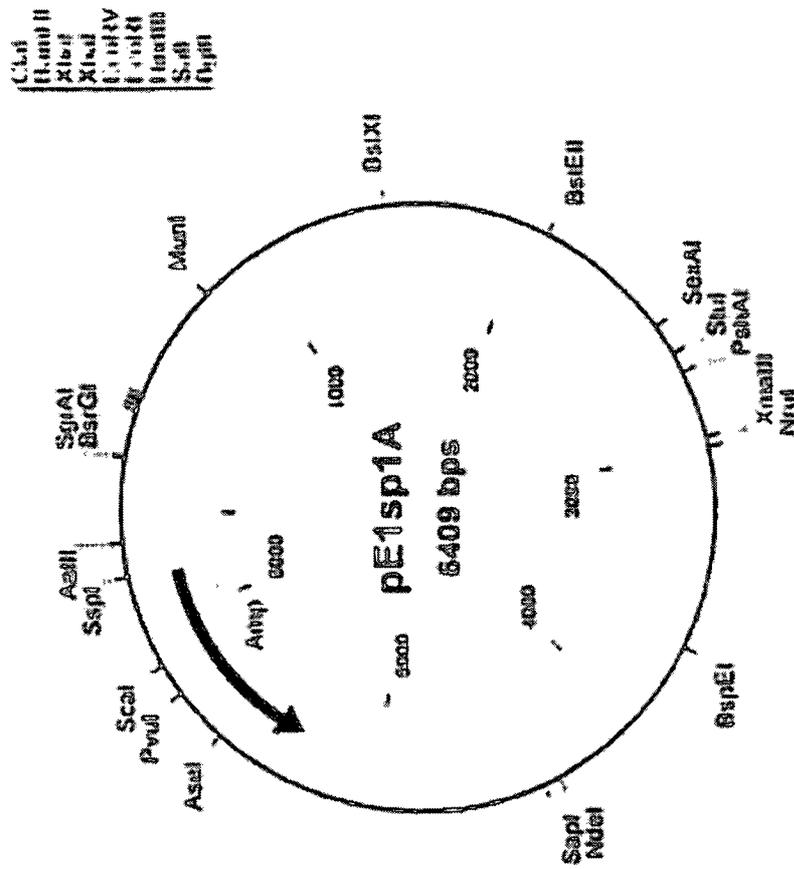


Figur 18



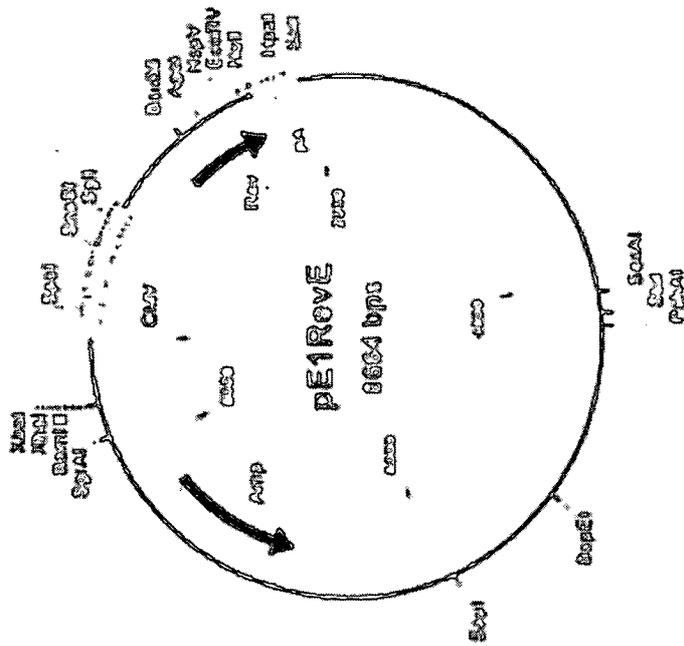
Figur 19



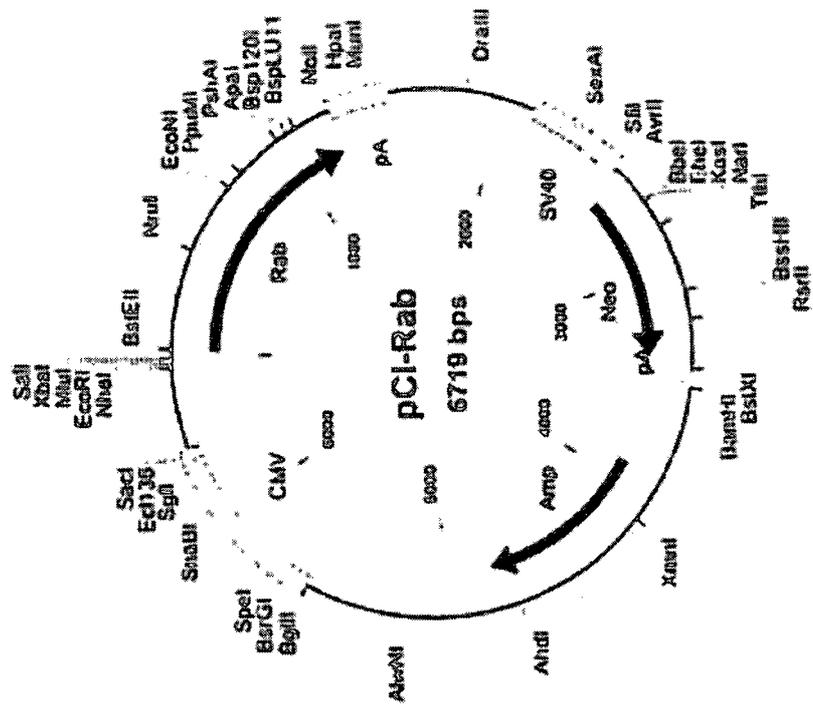


Figur 20

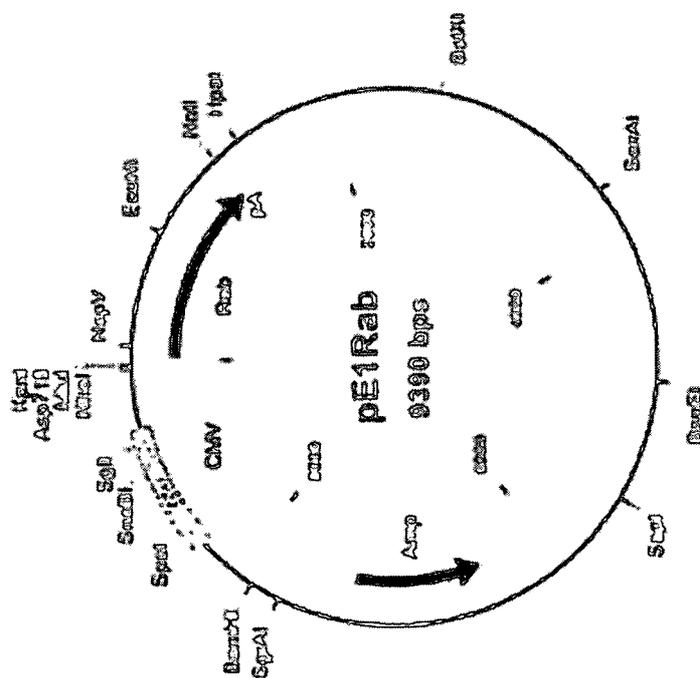
Figur 21



Figur 25

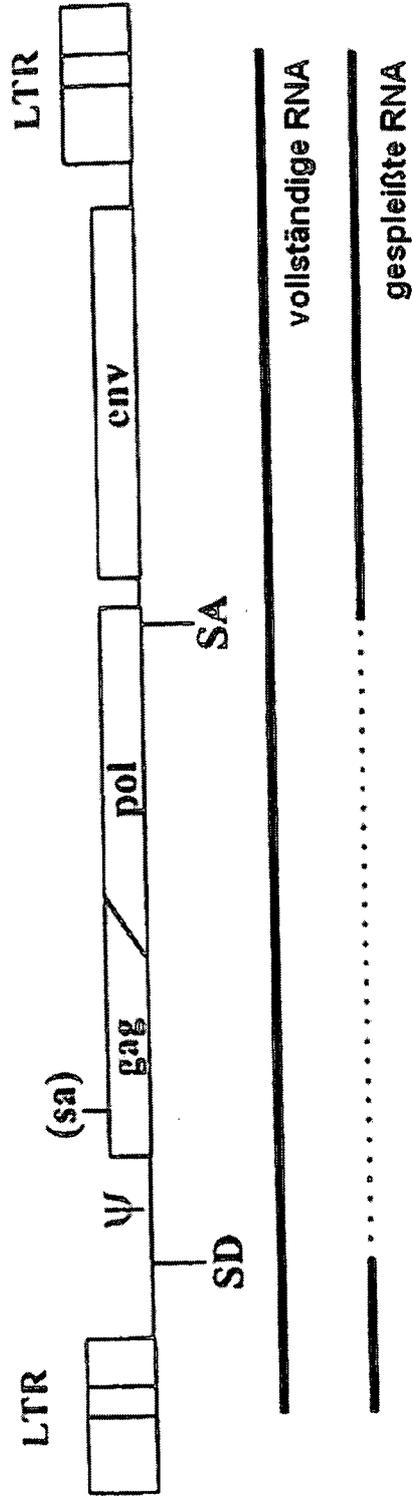


Figur 26



Figur 27a

A) Natürliche Spleiß-Konfiguration

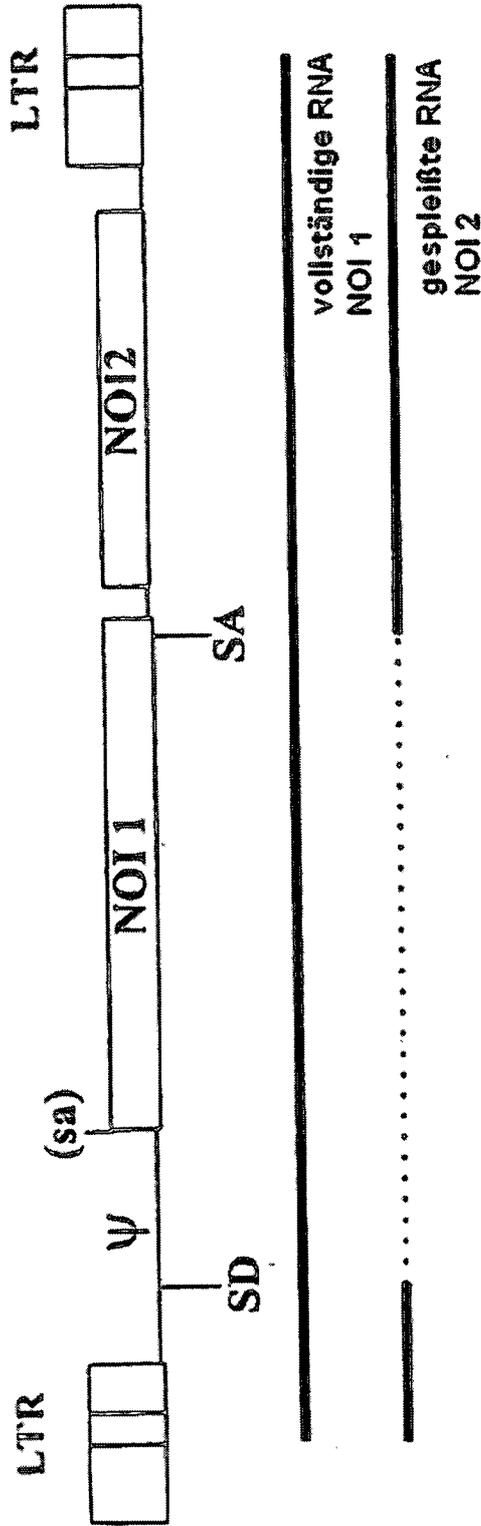


SD = Spleiß-Donor
 SA = Spleiß-Akzeptor
 (sa) = kryptischer Spleiß-Akzeptor
 ψ = Verpackungsstelle

Figur 27b

Spleiß-Anordnungen in bekannten Vektoren

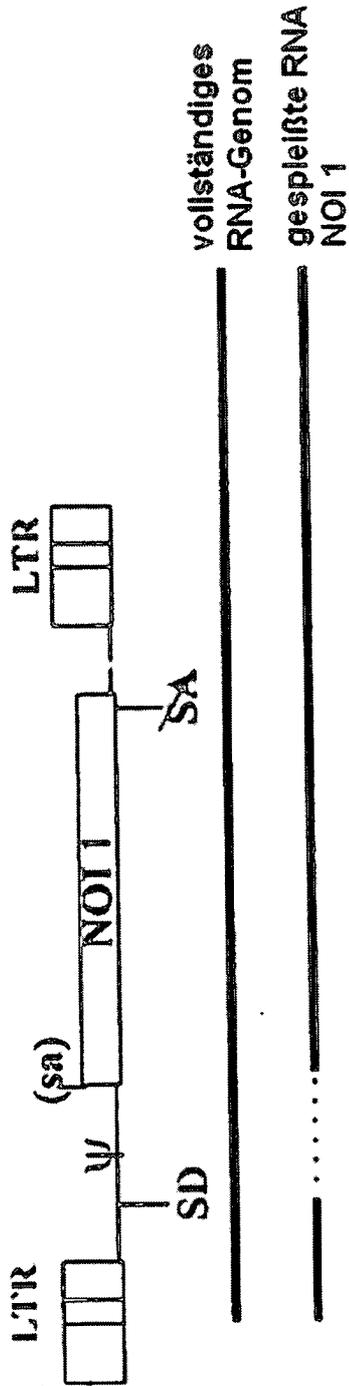
z.B. LTRSVX



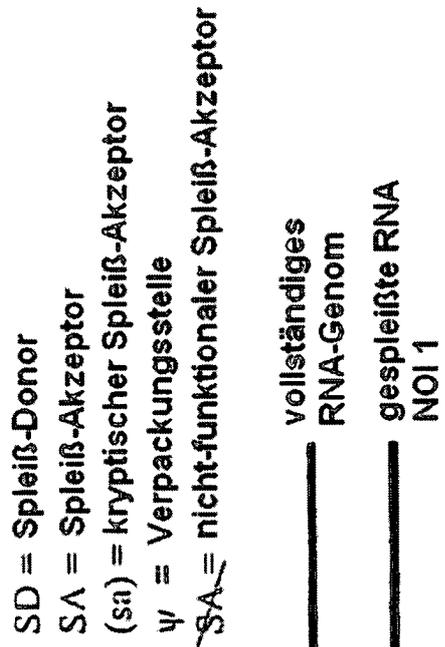
- SD = Spleiß-Donor
- SA = Spleiß-Akzeptor
- (sa) = kryptischer Spleiß-Akzeptor
- ψ = Verpackungsstelle

Figur 27b (Fortsetz.)

z.B. N2

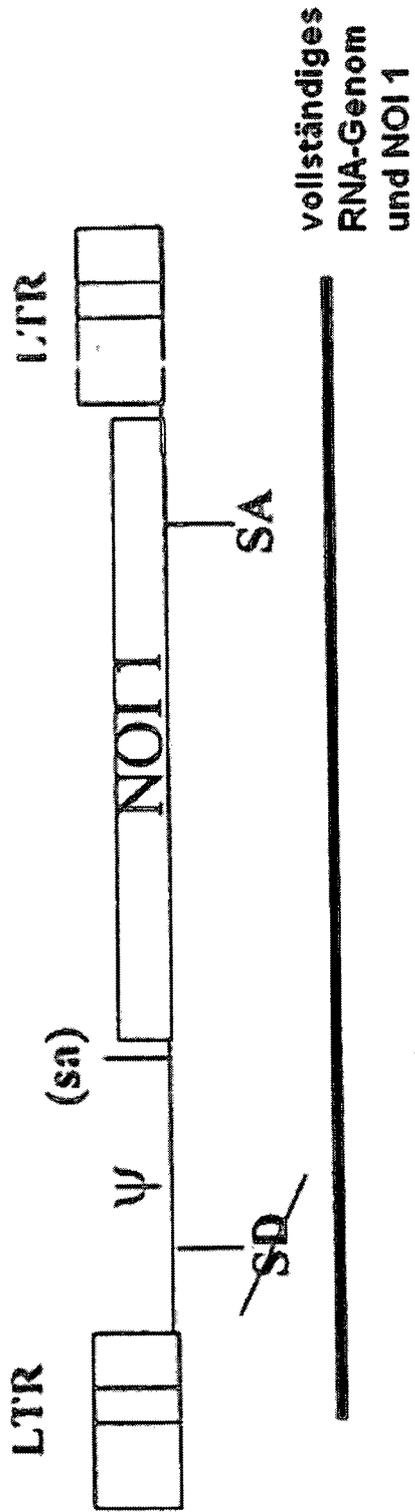


z.B. MFG



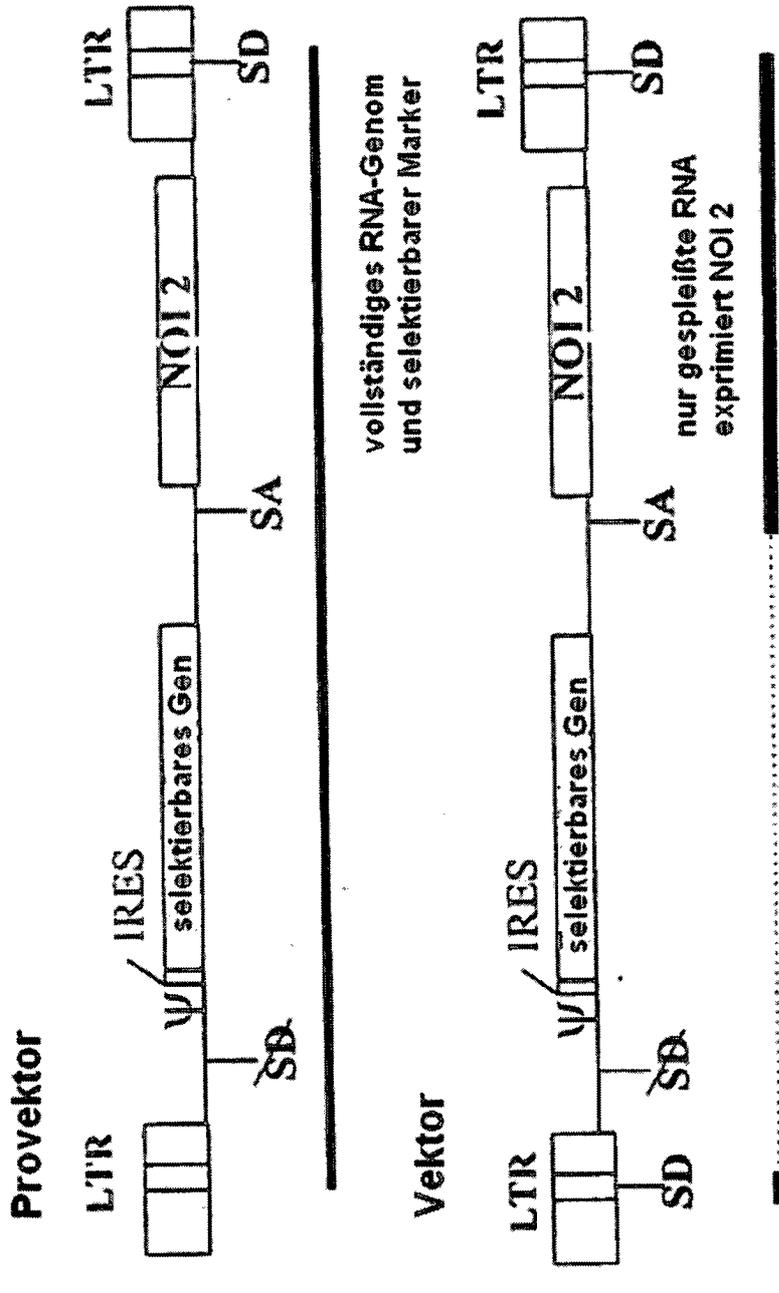
Figur 27b (Fortsetz.)

z.B. pBABE

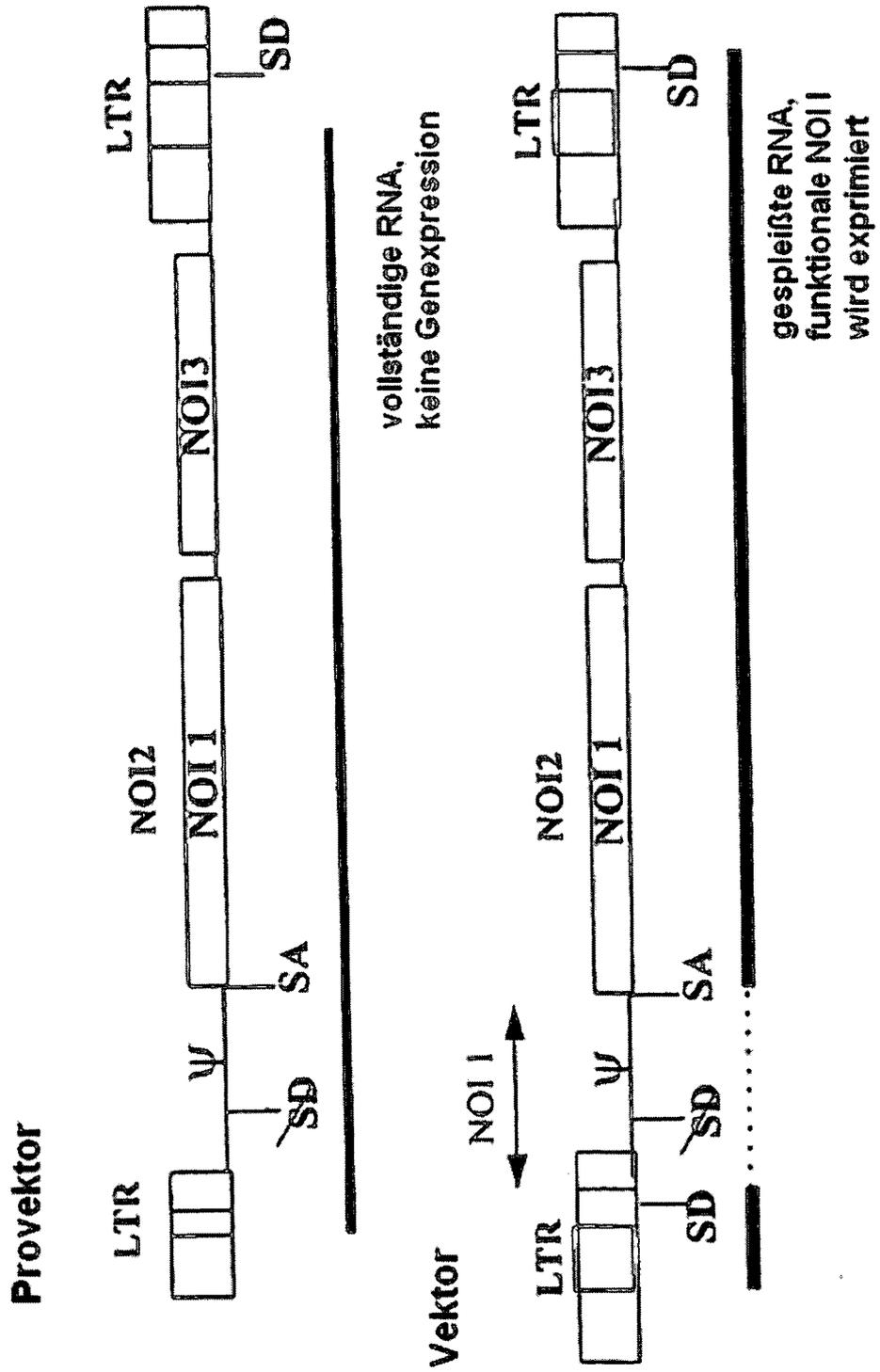


- ~~SD~~ = Nicht-funktionaler Spleiß-Donor
- SA = Spleiß-Akzeptor
- (sa) = kryptischer Spleiß-Akzeptor
- ψ = Verpackungsstelle

Figur 27c



Figur 27c (Fortsetz.)



Figur 28

