(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 178 T2** 2006.12.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 784 690 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 178.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/07341**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 923 019.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/034671**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.06.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **21.12.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.07.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.08.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/86*** (2006.01)
C07K 14/075 (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
258416 **10.06.1994** **US**

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

(73) Patentinhaber:
GenVec, Inc., Gaithersburg, Md., US

(74) Vertreter:
HOEGER, STELLRECHT & PARTNER Patentanwälte, 70182 Stuttgart

(72) Erfinder:
KOVESDI, Imre, Rockville, MD 20852, US;
BROUGH, E., Douglas, Olney, MD 20832, US;
McVEY, L., Duncan, Derwood, MD 20855, US;
BRUDER, T., Joseph, New Market, MD 21774, US;
LIZONOVA, Alena, Rockville, MD 20852, US

(54) Bezeichnung: **ADENOVIREN-VEKTOR SYSTEME UND ZELLLINIEN**

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

Zugehörige Anmeldung

[0001] Dies ist eine Continuation-in-Part der US-Patentanmeldung Serial Nr. 08/258 416, die am 10. Juni 1994 eingereicht wurde.

Technisches Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf rekombinante, mehrfach defiziente adenovirale Vektoren und auf komplementierende Zelllinien, die zum Kultivieren solcher Vektoren nützlich sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die therapeutische Verwendung solcher Vektoren.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Im Winter und Frühling 1952-1953 haben Rowe und seine Kollegen an den National Institutes of Health (NIH) Adenoide, die von kleinen Kindern in der Gegend von Washington D.C. chirurgisch gewonnen wurden, erhalten und in Gewebekultur gebracht (Rowe et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 570-573 (1953)). Nach mehreren Wochen zeigte sich bei vielen Kulturen fortschreitende Degenerierung, die durch Zerstörung von Epithelzellen gekennzeichnet war. Dieser zytopathische Effekt konnte seriell durch filtrierte Kulturflüssigkeiten auf etablierte Gewebekulturen humaner Zelllinien übertragen werden. Das zytopathische Mittel wurde als „Adenoid degenerierendes" (Ad) Mittel bezeichnet. Der Name „Adenovirus" wurde schließlich für diese Mittel üblich. Auf diese anfänglichen Entdeckungen folgte die Entdeckung vieler prototypischer Adenovirus-Stämme, von denen einige Atemwegserkrankungen verursachten (Rowe et al., supra; Dingle et al., Am. Rev. Respir. Dis., 97, 1-65 (1968); besprochen in Horwitz, „Adenoviridae und Their Replication", in Virology (Fields et al., Hgg., Raven Press Ltd., New York, NY, 2. Aufl., 1990), pp. 1679-1721).

[0004] Es wurden über 40 adenovirale Subtypen von Menschen und über 50 weitere Subtypen von anderen Säugern und Vögeln isoliert (besprochen in Ishibashi et al., „Adenoviruses of animals", In The Adenoviruses, Ginsberg, Hg., Plenum Press, New York, NY, pp. 497-562 (1984); Strauss, „Adenovirus infections in humans", in The Adenoviruses, Ginsberg, Hg., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984)). Alle diese Subtypen gehören zur Familie Adenoviridae, die derzeit in zwei Gattungen unterteilt ist, nämlich Mastadenovirus und Aviadenovirus.

[0005] Alle Adenoviren sind morphologisch und strukturell ähnlich. Bei Menschen haben die Adenoviren jedoch divergierende immunologische Eigenschaften und sind daher in Serotypen eingeteilt. Zwei humane Adenovirus-Serotypen, nämlich Ad2 und Ad5, wurden gründlich untersucht. Diese Studien haben allgemein den Großteil der Informationen über Adenoviren bereitgestellt.

[0006] Adenoviren sind unbehüllte, regelmäßige Icosaeder mit 65-80 nm Durchmesser, bestehend aus einem äußeren Kapsid und einem inneren Kern. Das Kapsid ist aus 20 dreieckigen Flächen oder Facetten und 12 Scheitelpunkten zusammengesetzt (Horne et al., J. Mol. Biol., 1, 84-86 (1959)). Die Facetten bestehen aus Hexonen und die Scheitelpunkte aus Pentonen. Eine Fiber erstreckt sich von jedem Scheitelpunkt. Zusätzlich zu den Hexonen, Pentonen und Fibern gibt es 8 kleinere Strukturpolypeptide, wobei für die meisten davon die genaue Position nicht klar ist. Eine kleinere Polypeptidkomponente, nämlich Polypeptid IX, bindet an Positionen, wo es Hexon-Hexon-Kontakte am so genannten 9er-Gruppe-Zentrum jeder Facette stabilisieren kann (Furcinitti et al., EMBO, 8, 3563-3570 (1989)). Es wird angenommen, dass die kleineren Polypeptide VI und VIII Hexon-Hexon-Kontakte zwischen benachbarten Facetten stabilisieren. Von Stewart et al. (Cell, 67, 145-154 (1991)) wurde angenommen, dass das kleinere Polypeptid IIIA, von dem man weiß, dass es sich in den Regionen der Scheitelpunkte befindet, Kapsid und Kern verbindet.

[0007] Der Viruskern enthält ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül mit umgekehrten terminalen Repetitionen (inverted terminal repeats, ITRs), die in verschiedenen Isolaten hinsichtlich der Länge von 103 by bis 163 by variieren (Garon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2391-2394 (1972); Wolfson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3054-3057 (1972); Arrand et al., J. Mol. Biol., 128, 577-594 (1973); Steenberg et al., Nucleic Acids Res., 4, 4371-4389 (1977); und Tooze, DNA Tumor Viruses, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 943-1054 (1981)). Die ITRs beherbergen DNA-Replikationsursprünge (Garon et al., supra; Wolfson et al., supra; Arrand et al., supra; Steenberg et al., supra).

[0008] Die virale DNA ist mit 4 Polypeptiden, nämlich V, VII, μ und dem terminalen Polypeptid (TP) verbunden.

Das 55 kd TP ist über ein dCMP kovalent an die 5'-Enden der DNA gebunden (Rekosh et al., Cell, 11, 283-295 (1977); Robinson et al., Virology, 56, 54-69 (1973)). Die anderen drei Polypeptide sind nicht-kovalent an die DNA gebunden und falten sie derart, dass sie in das kleine Volumen des Kapsids passt. Die DNA scheint in eine Struktur verpackt zu sein, die ähnlich den zellulären Nucleosomen ist, wie man sie von Nuclease-Verdauungsmustern kennt (Corden et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 401-404 (1976); Tate et al., Nucleic Acids Res., 6, 2769-2785 (1979); Mirza et al., Biochim. Biophys. Acta, 696, 76-86 (1982)).

[0009] Die Gesamtorganisation des adenoviralen Genoms ist unter Serotypen konserviert, so dass spezifische Funktionen ähnlich positioniert sind. Das Ad2- und das Ad5-Genom wurden vollständig sequenziert und Sequenzen ausgewählter Regionen von Genomen anderer Serotypen sind ebenfalls verfügbar.

[0010] Ein Adenovirus beginnt eine Zelle durch Anheften der Fiber an einen spezifischen Rezeptor auf der Zellmembran zu infizieren (Londberg-Holm et al., J. Virol., 4, 323-338 (1969); Morgan et al., J. Viral., 4, 777-796 (1969); Pastan et al., „Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem", In Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins et al., Hgg., Springer-Verlag, New York, NY, pp. 141-146 (1987)). Dann bindet die Pentonbasis an einen adenoviralen Integrin-Rezeptor. Das Rezeptor-gebundene Virus wandert dann von der Plasmamembran zu Clathrin-beschichteten Einbuchtungen (pits), die endocytische Vesikel oder Rezeptosomen bilden, wo der pH auf 5,5 fällt (Pastan et al., Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins und Oldstone, Hgg. Springer-Verlag, New York. pp. 141-146 (1987)). Es wird angenommen, dass der Abfall des pH die Oberflächenkonfiguration des Virus ändert, was zu Rezeptosomenbruch und Freisetzung von Virus in das Cytoplasma der Zelle führt. Die virale DNA ist teilweise unbehüllt, i.e. teilweise von assoziierten Proteinen befreit, im Cytoplasma, während sie zum Kern transportiert wird.

[0011] Wenn das Virus die Kernporen erreicht, tritt die virale DNA in den Kern ein, wobei sie den Großteil des verbleibenden Proteins im Cytoplasma zurücklässt (Philipson et al., J. Virol., 2, 1064-1075 (1968)). Die virale DNA ist jedoch insofern nicht vollkommen proteinfrei, als mindestens ein Teil der viralen DNA mit mindestens vier viralen Polypeptiden assoziiert ist, nämlich V, VII, TP und μ, und wird in einen Virus-DNA-Zellhiston-Komplex übergeführt (Tate et al., Nucleic Acids Res., 6, 2769-2785 (1979)).

[0012] Der Zyklus von der Infektion der Zelle bis zur Produktion viraler Partikel dauert 1-2 Tage und führt zur Produktion von bis zu 10 000 infektiösen Partikeln pro Zelle (Green et al., Virolo, 13, 169-176 (1961)). Der Infektionsprozess des Adenovirus ist in frühe (early, E) und späte (late, L) Phasen unterteilt, die durch Virus-DNA-Replikation getrennt sind, obwohl einige Ereignisse, die während der frühen Phase stattfinden, auch während der späten Phase stattfinden und umgekehrt. Es wurden weitere Unterteilungen vorgenommen, um die temporale Expression viraler Gene vollständig zu beschreiben.

[0013] Während der frühen Phase wird virale mRNA, die einen kleineren Anteil der gesamten in der Zelle vorhandenen RNA darstellt, aus beiden Strängen der im Zellkern vorhandenen adenoviralen DNA synthetisiert. Mindestens fünf Regionen, die mit E1, E2, E3, E4 und MLP-L1 bezeichnet werden, werden transkribiert (Lewis et al., Cell, 7, 141-151 (1976); Sharp et al., Virology, 75, 442-456 (1976); Sharp, „Adenovirus transcription", in The Adenoviruses, Ginsberg, Hg., Plenum Press, New York, NY, pp. 173-204 (1984)). Jede Region hat mindestens einen unterschiedlichen Promotor und wird prozessiert, um mehrfache MRNA-Species zu erzeugen.

[0014] Die Produkte der frühen (E) Regionen (1) haben regulatorische Rollen für die Expression anderer viraler Komponenten, (2) sind in das allgemeine Abschalten der zellulären DNA-Replikation und Proteinsynthese involviert und (3) sind für die Virus-DNA-Replikation erforderlich. Die komplexe Serie von Ereignissen, die die frühe mRNA-Transkription reguliert, beginnt mit der Expression bestimmter sehr früher (immediate early) Regionen, einschließlich E1A, L1 und 13,5 kd Gen (besprochen in Sharp (1984), supra; Horwitz (1990), supra). Die Expression der verzögert frühen (delayed early) Regionen E1B, E2A, E2B, E3 und E4 hängt von den E1A-Genprodukten ab. Drei Promotoren, der E2-Promotor bei 72 Karteneinheiten (map units, mu), der Protein-IX-Promotor und der IVa-Promotor, werden durch das Einsetzen der DNA-Replikation verstärkt, hängen aber nicht davon ab (Wilson et al., Virology, 94, 175-184 (1979)). Ihre Expression charakterisiert eine Zwischenphase der viralen Genexpression. Das Ergebnis der Kaskade früher Genexpression ist der Start der Virus-DNA-Replikation.

[0015] Die adenovirale DNA-Replikation verdrängt einen parentalen Einzelstrang durch kontinuierliche Synthese in 5'-zu-3'-Richtung von Replikationsursprüngen am Ende des Genoms (besprochen in Kelly et al., „Initiation of viral DNA replication", In Advances in Virus Research, Maramorosch et al., Hgg., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 34, 1-42 (1988); Horwitz (1990), supra; van der Vliet, „Adenovirus DNA replication in vitro", in The Eukaryotic Nucleus, Strauss et al., Hgg., Telford Press, Caldwell, NJ, 1, 1-29 (1990)). Drei virale Prote-

ine, die von E2 codiert werden, sind essentiell für die adenovirale DNA-Synthese: (1) das einzelsträngige DNA-Bindungsprotein (DBP), (2) die adenovirale DNA-Polymerase (Ad pol) und (3) das präterminale Protein (pTP). Zusätzlich zu diesen essentiellen Proteinen wurden in Experimenten in vitro viele Wirtszellfaktoren identifiziert, die für die DNA-Synthese erforderlich sind.

[0016] Die DNA-Synthese wird durch kovalente Anbindung eines dCMP-Moleküls an einen Serinrest von pTP initiiert. Der pTP-DCMP-Komplex fungiert dann als Primer für Ad pol zur Verlängerung. Der verdrängte parentale Einzelstrang kann durch Basenpaarung der umgekehrten terminalen Repetitionen eine „Panhandle"-Struktur bilden. Diese terminale Duplexstruktur ist zu den Enden des parentalen Genoms identisch und kann als Ursprung der Initiation der Synthese des komplementären Strangs fungieren.

[0017] Die Initiation der viralen DNA-Replikation scheint für den Eintritt in die späte Phase essentiell zu sein. Die späte Phase der Virusinfektion ist gekennzeichnet durch die Produktion großer Mengen der viralen strukturellen Polypeptide und der nicht strukturellen Proteine, die in den Kapsidzusammenbau involviert ist. Der Major-late-Promotor (MLP) wird voll aktiv und produziert Transkripte, die ihren Ursprung bei 16,5 mu haben und nahe dem Ende des Genoms enden. Posttranskriptionales Processing dieses langen Transkripts führt zu fünf Familien später mRNA, die mit L1 bis L5 bezeichnet werden (Shaw et al., Cell, 22, 905-916 (1980)). Die Mechanismen, welche den Übergang von der frühen zur späten Phase regulieren und zu einem solchen dramatischen Übergang bei der transkriptionalen Verwendung führen, sind unklar. Das Erfordernis für die DNA-Replikation kann eine cis-Eigenschaft der DNA-Matrize sein, weil die späte Transkription bei einem superinfizierenden Virus zu einer Zeit, wo die späte Transkription des primär infizierenden Virus aktiv ist, nicht vorkommt (Thomas et al., Cell, 22, 523-533 (1980)).

[0018] Der Zusammenbau des Virions ist ein komplexer Prozess ab dem ersten Schritt des Zusammenbaus größerer struktureller Einheiten aus individuellen Polypeptidketten (besprochen in Philipson, „Adenovirus Assembly", in The Adenoviruses, Ginsberg, Hg., Plenum Press, New York, NY (1984), pp. 309-337; Horwitz (1990), supra). Hexon, Pentonbasis und Fiber assemblieren in trimere Homopolymerformen nach der Synthese im Cytoplasma. Das 100 kd Protein scheint als Gerüstprotein (scaffolding protein) für die Hexontrimerisierung zu fungieren, und das resultierende Hexontrimer wird als Hexon-Kapsomer bezeichnet. Die Hexon-Kapsomere können sich spontan zusammenbauen (self-assemble) zur Bildung der Hülle eines leeren Kapsids, und die Pentonbasis- und Fiber-Trimere können sich zusammenschließen, um das Penton zu bilden, wenn die Komponenten im Kern sind. Die Facette des Icosaeders ist aus drei Hexon-Kapsomeren gebildet, die durch Dissoziation des Kapsids zu sehen sind, aber der Zwischenschritt der Bildung der 9er-Gruppen-Hexons wurde noch nicht beobachtet. Mehrere Zwischenstufen des Zusammenbaus wurden in Experimenten mit temperaturempfindlichen Mutanten gezeigt. Der Fortschritt des Kapsidzusammenbaus scheint von den Gerüstproteinen 50 kd und 30 kd abhängig zu sein. Die nackte DNA tritt am wahrscheinlichsten in das fast fertige Kapsid durch eine Öffnung an einem der Scheitelpunkte ein. Der letzte Schritt des Prozesses involviert das proteolytische Schneiden (trimming) der Vorläufer-Polypeptide pVI, pVII, pVIII und pTP, das die Kapsidstruktur stabilisiert, die DNA unempfindlich gegenüber Nucleasebehandlung macht und ein reifes Virion ergibt.

[0019] Bestimmte rekombinante adenovirale Vektoren werden in der Gentherapie verwendet. Die Verwendung eines rekombinanten adenoviralen Vektors zum Transferieren eines oder mehrerer rekombinanter Gene ermöglicht eine zielgerichtete Abgabe des Gens oder der Gene an ein Organ, Gewebe oder Zellen, das/die dieser Behandlung bedarf/bedürfen, wobei das Abgabeproblem gelöst wird, das mit den meisten Arten somatischer Gentherapie verbunden ist. Ferner erfordern rekombinante adenovirale Vektoren keine Wirtszellproliferation für die Expression adenoviraler Proteine (Horwitz et al., in Virology, Raven Press, New York, 2, 1679-1721 (1990); und Berkner, BioTechnigues, 6, 616 (1988)). Wenn außerdem das erkrankte Organ, das der Behandlung bedarf, die Lunge ist, hat die Verwendung eines Adenovirus als Vektor der genetischen Information den zusätzlichen Vorteil, dass das Adenovirus normal trophisch für das Atemepithel ist (Straus, in Adenoviruses, Plenum Press, New York, pp. 451-496 (1984)).

[0020] Andere Vorteile von Adenoviren als potentiellen Vektoren für die Gentherapie beim Menschen sind wie folgt: (i) Rekombination ist selten; (ii) es gibt keine bekannten Verbindungen zwischen Malignität beim Menschen und Adenovirusinfektionen trotz bekannter Infektion mit Adenoviren beim Menschen; (iii) das Adenovirusgenom (das lineare, doppelsträngige DNA ist) kann jetzt manipuliert werden, dass es Fremdgene bis zu einer Größe von 7,0-7,5 kb Länge aufnimmt; (iv) ein adenoviraler Vektor inseriert seine DNA nicht in das Chromosom einer Zelle, so dass seine Wirkung nicht dauerhaft ist und es unwahrscheinlich ist, dass er die normale Zellfunktion beeinträchtigt; (v) das Adenovirus kann sich nicht teilende oder fertig ausdifferenzierte Zellen infizieren, wie Zellen im Gehirn und in den Lungen; und (vi) ein lebendes Adenovirus, dessen essentielles Merkmal die Fähigkeit zur Replikation ist, wurde problemlos als Vakkzin beim Menschen eingesetzt (Horwitz et al.,

supra; Berkner et al., J. Virol., 61, 1213-1220 (1987); Straus supra; Chanock et al., JAMA, 195, 151 (1966); Haj-Ahmad et al., J. Virol., 57, 267 (1986); und Ballay et al., EMBO, 4, 3861 (1985)).

[0021] Fremdgene wurden in zwei größere Regionen des Adenovirusgenoms zur Verwendung als Expressionsvektoren inseriert, nämlich in die E1- und E3-Region, wodurch einfach defizientes Adenovirus und davon abgeleitete Vektoren erhalten wurden. Die Insertion in die E1-Region führt zu defektiven Nachkommen, die die Vermehrung in komplementären Zellen oder das Vorhandensein eines intakten Helfervirus erfordern, was beides dazu dient, die Funktion der beeinträchtigten oder nicht vorhandenen ElRegion zu ersetzen (Berkner et al., supra; Davidson et al., J. Virol., 61, 1226-1239 (1987); und Mansour et al., Mol. Cell Biol., 6, 2684-2694 (1986)). Diese Region des Genoms wurde am häufigsten für die Expression von Fremdgenen verwendet.

[0022] Die in die E1-Region inserierten Gene wurden unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gebracht, und die meisten produzieren große Mengen des Fremdgenproduktes, in Abhängigkeit von der Expressionskassette. Diese adenoviralen Vektoren vermehren sich jedoch nicht in nicht komplementierenden Zelllinien. Derzeit gibt es nur einige wenige Zelllinien, die essentielle Funktionen komplementieren, die einem einfach defizienten Adenovirus fehlen. Beispiele für solche Zelllinien schließen HEK-293 (Graham et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 637-650 (1975)), W162 (Weinberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5383-5386 (1983)) und gMDBP (Klessig et al., Mol. Cell. Biol., 4, 1354-1362 (1984); Brough et al., Virology, 190, 624-634 (1992)) ein.

[0023] Die E3-Region, die andere Region, von der oben angemerkt wurde, dass sie zum Inserieren von Fremdgenen nützlich ist, ist für die Vermehrung des Virus in Gewebekultur nicht essentiell, und der Ersatz dieser Region durch eine Fremdgen-Expressionskassette führt zu einem Virus, das sich produktiv in einer nicht komplementierenden Zelllinie vermehren kann. Beispielsweise wurde über das Inserieren und die Expression des Hepatitis-B-Oberflächenantigens in der E3-Region mit anschließendem Impfen und Antikörperbildung beim Hamster berichtet (Morin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4626-4630 (1987)).

[0024] Das Problem bei einfach defizienten adenoviralen Vektoren besteht darin, dass sie den nutzbaren Raum im Adenovirusgenom für das Inserieren und die Expression eines Fremdgens limitieren. Aufgrund von Ähnlichkeiten oder Überlappung in den viralen Sequenzen, die in einfach defizienten adenoviralen Vektoren vorhanden sind, und den komplementierenden Zelllinien, die derzeit existieren, können Rekombinationsereignisse (die, wie oben angemerkt, normalerweise sehr selten sind) stattfinden und replikationskompetente Viren in einem so vermehrten Vektor-Stock erzeugen. Dieses Ereignis kann einen Vektor-Stock für Gentherapiezwecke unbrauchbar machen.

[0025] WO 94/08026 offenbart rekombinante Vektoren, die in der E1A- und E1B-Region und gegebenenfalls in der E3-Region des Adenovirusgenoms defektiv sind.

[0026] Ein anderer adenoviraler Vektor wird in der WO 94/12649 beschrieben, einschließlich Deletionen in der E4-Region und gegebenenfalls in der E1- und/oder E3-Region.

[0027] WO 94/11506 offenbart einen adenoviralen Vektor, dem sowohl die E1- als auch die E3-frühe Gen-Region fehlt.

[0028] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, mehrfach defiziente adenovirale Vektoren bereitzustellen, die Insertion und Expression größerer Stücke Fremd-DNA aufnehmen können. Es ist ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung, Zelllinien bereitzustellen, die die erfindungsgemäßen mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren komplementieren. Es ist auch ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Rekombinanten mehrfach defizienter adenoviraler Vektoren und therapeutische Verfahren, insbesondere in Bezug auf Gentherapie, Impfung und dergleichen, die die Verwendung solcher Rekombinanten beinhalten, bereitzustellen. Diese und andere Ziele und Vorteile der vorliegenden Erfindung sowie weitere erfinderische Merkmale werden anhand der folgenden detaillierten Beschreibung klar.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt mehrfach defiziente adenovirale Vektoren und komplementierende Zelllinien bereit. Die mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren können Insertion und Expression größerer Fragmente von Fremd-DNA aufnehmen, als das mit bisher verfügbaren einfach defizienten adenoviralen Vektoren möglich ist. Die mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren sind auch replikationsdefizient und gegenüber Rekombination resistent, wenn sie in komplementierenden Zelllinien vermehrt oder kultiviert werden, wo-

bei diese Merkmale besonders für die Gentherapie und andere therapeutische Zwecke wünschenswert sind. Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung auch rekombinante mehrfach defiziente adenovirale Vektoren und therapeutische Verfahren, z.B. in Bezug auf Gentherapie, Impfung und dergleichen, die mit der Verwendung solcher Rekombinanten einhergehen, bereit.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0030] Fig. 1 ist ein Satz schematischer Diagramme der viralen Vektoren Ad_{GV}CFTR.10L und Ad_{GV}CFTR.10R.

[0031] Fig. 2 ist ein Satz schematischer Diagramme der viralen Vektoren Ad_{GV}CFTR.11.

[0032] Fig. 3 ist ein schematisches Diagramm des viralen Vektors Ad_{GV}CFTR.12.

[0033] Fig. 4 ist ein schematisches Diagramm des viralen Vektors Ad_{GV}CFTR.13.

[0034] Fig. 5 ist ein schematisches Diagramm eines E2A-Expressionsvektors.

[0035] Fig. 6 ist eine Darstellung eines zum Screenen hinsichtlich des Levels induzierter DBP-Expression in bestimmten klonalen 293/E2A-Zelllinien verwendeten Immunoblot.

[0036] Fig. 7 ist eine Darstellung eines zum Analysieren der Akkumulation von DBP durch bestimmte klonale 293/E2A-Zelllinien über die ersten 24 Stunden der Induktion verwendeten Immunoblot.

[0037] Fig. 8 ist ein Satz schematischer Diagramme der viralen Vektoren Ad_{GV}CFTR.10L und Ad_{GV}CFTR.12B.

[0038] Fig. 9 ist eine Photographie mit reversem Kontrast von einem mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Gel und stellt Daten in Bezug auf die PCR-Detektion des viralen Vektors Ad_{GV}CFTR.12B aus passagierten Transfektionslysaten bereit.

[0039] Fig. 10 ist ein schematisches Diagramm des viralen Vektors Ad_{GV}Luc;E2GUS.

[0040] Fig. 11 ist ein schematisches Diagramm eines E4-ORF6-Expressionsvektors.

[0041] Fig. 12 ist eine Photographie mit reversem Kontrast von einem mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Gel und stellt Daten in Bezug auf die PCR-Detektion der E4-Deletionsregion in passagierten Lysaten von Ad_{GV}βgal.12 bereit.

[0042] Fig. 13 ist ein Balkendiagramm, das den Level der PFU/Zelle (y-Achse) pro bestimmte Zelllinie (x-Achse) nach Transfektion angibt.

[0043] Fig. 14 ist ein schematisches Diagramm des viralen Vektors Ad_{GV}βgal.12.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0044] Die vorliegende Erfindung stellt unter anderem mehrfach defiziente adenovirale Vektoren für Genklonieren und Expression bereit. Die erfindungsgemäßen mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren unterscheiden sich von bisher verfügbaren einfach defizienten adenoviralen Vektoren darin, dass sie in mindestens zwei Regionen des Adenovirusgenoms defizient sind und dass sie in der Lage sind, größere Stücke Fremd-DNA zu akzeptieren und zu exprimieren. Der Ausdruck „Fremd-DNA" wird hier verwendet, um auf irgendeine DNA-Sequenz Bezug zu nehmen, die in einen erfindungsgemäßen Vektor inseriert wurde und für das Adenovirusgenom fremd ist. Solche Fremd-DNA kann Gene, Teile von Genen oder irgendeine andere DNA-Sequenz, einschließlich Sequenzen, die RNA, Antisense-RNA und/oder Polypeptide codieren, aber nicht darauf eingeschränkt, darstellen.

[0045] Eine Region des adenoviralen Genoms umfasst ein oder mehrere Gene. Horwitz (1990), supra. Solche Gene codieren für Genprodukte, welche die verschiedenen Komponenten oder Aktivitäten des Adenovirus vermitteln, fördern, bewirken oder sind, wie Anheftung, Penetration, Enthüllung, Replikation, Core-Protein, Hexon, Fiber, Hexon-assoziiertes Protein und dergleichen. Ein Effekt einer defizienten Region kann z.B. das Unvermögen des Adenovirus zur Vermehrung sein, das irgendeine oder alle der genannten Komponenten oder Aktivitäten involvieren kann. Die oben genannten Komponenten oder Aktivitäten werden hier als Genfunktio-

nen bezeichnet.

[0046] Eine Defizienz in einem Gen oder einer Genfunktion, i.e. ein defizientes Gen, eine defiziente Genregion oder Region, wie hier verwendet, ist definiert als Deletion von genetischem Material des Virusgenoms, die zur Schädigung oder Tilgung der Funktion des Gens, dessen DNA-Sequenz ganz oder teilweise deletiert wurde, und zur Bereitstellung von Raum oder Kapazität des Virusgenoms für das Inserieren von DNA, die für das Virusgenom fremd ist, dient. Solche Detizienzen können in Genen sein, die für die Vermehrung des adenoviralen Vektors in Gewebekultur in einem nicht komplementierenden zellulären Wirt essentiell oder nicht essentiell sein; vorzugsweise ist mindestens eines, bevorzugter mindestens zwei der defizienten Gene der erfindungsgemäßen viralen Vektoren defizient für ein Gen, das für die Vermehrung essentiell ist.

[0047] Jeder Subtyp, Mischung von Subtypen oder chimäres Adenovirus kann als Quelle der DNA zum Erzeugen der mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren verwendet werden. Da jedoch das Ad5-Genom vollständig sequenziert wurde, wird die vorliegende Erfindung in Bezug auf den Ad5-Serotyp beschrieben.

[0048] Der erfindungsgemäße adenovirale Vektor ist zumindest in Funktionen defizient, die von zwei oder mehr der frühen Regionen bereitgestellt wird, welche die frühe Region 1 (E1), die frühe Region 2 (E2), einschließlich der frühen Region 2A (E2A) und/oder der frühen Region 2B (E2B), die frühe Region 3 (E3) und die frühe Region 4 (E4) des adenoviralen Genoms einschließen. Eine Defizienz in der E1-Region ist in der Region E1A, E1B oder in E1A und E1B. Der erfindungsgemäße adenovirale Vektor ist mindestens in einer Funktion defizient, die von der Region E1 bereitgestellt wird, in Kombination mit einer Defizienz in der Region E2A und/oder E4.

[0049] Jede der deletierten Regionen kann durch eine Promotor-variable Expressionskassette ersetzt werden, um ein Fremdgenprodukt zu erzeugen, das in Bezug auf das Adenovirus fremd ist. Das Inserieren eines Fremdgens in die E2A-Region beispielsweise kann durch das Einführen einer einmaligen Restriktionsstelle erleichtert werden, so dass das Fremdgenprodukt vom E2A-Promotor exprimiert werden kann.

[0050] Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf adenovirale Vektoren eingeschränkt, die nur in Genfunktionen in der frühen Region des Genoms defizient sind. Es sind auch adenovirale Vektoren eingeschlossen, die in der frühen und der späten Region des Genoms defizient sind, sowie Vektoren, in denen im Wesentlichen das gesamte Genom entfernt wurde, in welchem Fall es bevorzugt ist, dass mindestens entweder die viralen umgekehrten terminalen Repetitionen und einige der Promotoren oder die viralen umgekehrten terminalen Repetitionen und ein Verpackungssignal intakt bleiben. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass ein desto größeres Stück exogener DNA in das Genom inseriert werden kann, je größer die Region des adenoviralen Genoms ist, die entfernt ist. Angenommen beispielsweise, dass das adenovirale Genom 36 kb ist, ist, wenn man die viralen umgekehrten terminalen Repetitionen und einige der Promotoren intakt belässt, die Kapazität des Adenovirus ungefähr 35 kb. Alternativ dazu könnte man einen mehrfach defizienten adenoviralen Vektor erzeugen, der nur die ITR und ein Verpackungssignal beinhaltet. Das könnte dann wirksam die Expression von 37-38 kb Fremd-DNA von diesem Vektor ermöglichen.

[0051] Im Allgemeinen beruht die Virusvektorkonstruktion auf dem hohen Level der Rekombination zwischen Fragmenten adenoviraler DNA in der Zelle. Zwei oder drei Fragmente adenoviraler DNA, die Regionen mit Ähnlichkeit (oder Überlappung) zwischen Fragmenten beinhalten und die gesamte Länge des Genoms darstellen, werden in eine Zelle transfiziert. Die Rekombinationsmaschinerie der Wirtszelle konstruiert das virale Vektorgenom voller Länge durch Rekombinieren der genannten Fragmente. Andere geeignete Methoden zum Konstruieren von Viren, die Veränderungen in verschiedenen einzelnen Regionen enthalten, wurden früher beschrieben (Berkner et al., Nucleic Acids Res., 12, 925-941 (1984); Berkner et al., Nucleic Acids Res., 11, 6003-6020 (1983); Brough et al., Virol., 190, 624-634 (1992)) und können verwendet werden, um mehrfach defiziente Viren zu konstruieren; noch andere geeignete Methoden schließen beispielsweise in vitro Rekombination und Ligation ein.

[0052] Der erste Schritt bei der Virusvektorkonstruktion ist das Konstruieren einer Deletion oder Modifizierung einer speziellen Region des adenoviralen Genoms in einer Plasmidkassette unter Verwendung molekularbiologischer Standardmethoden. Nach umfangreicher Analyse wird diese veränderte DNA (die Deletion oder Modifizierung enthaltend) dann in einer viel größeres Plasmid gebracht, das bis zur Hälfte des Adenovirusgenoms aufweist. Der nächste Schritt ist dann die Transfektion der Plasmid-DNA (die Deletion oder Modifizierung enthaltend) und eines großen Stücks des Adenovirusgenoms in eine Rezipientenzelle. Zusammen umfassen diese beiden Stücke DNA alles von dem Adenovirusgenom plus eine Region mit Ähnlichkeit. Innerhalb dieser Region mit Ähnlichkeit wird ein Rekombinationsereignis stattfinden, um ein rekombiniertes virales Genom zu er-

zeugen, das die Deletion oder Modifizierung einschließt. Im Falle mehrfach defizienter Vektoren wird die Rezipientenzelle nicht nur die Rekombinationsfunktionen bereitstellen, sondern auch alle fehlenden vitalen Funktionen, die in dem transfizierten vitalen Genom nicht vorhanden sind, so jedwede Defizienzen des rekombinierten viralen Genoms komplementierend. Der mehrfach defiziente Vektor kann weiter durch Änderung der ITR und/oder des Verpackungssignals weiter modifiziert werden, z.B. dass der mehrfach defiziente Vektor nur in einer komplementierenden Zelllinie funktioniert oder wächst.

[0053] Zusätzlich stellt die vorliegende Erfindung auch komplementierende Zelllinien für die Propagierung oder Vermehrung der gegenständlichen erfinderischen mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren bereit. Die bevorzugten Zelllinien gemäß der vorliegenden Erfindung sind gekennzeichnet durch Komplementieren für eine oder mehrere Genfunktionen der E1-Region und eine oder mehrere Genfunktionen der E2A- und/oder E4-Region des adenoviralen Genoms. Andere Zelllinien schließen jene ein, die adenovirale Vektoren komplementieren, welche defizient sind in mindestens einer Genfunktion aus den Genfunktionen, die die späten Regionen umfassen, jenen, die eine Kombination der frühen und späten Genfunktionen komplementieren, und jenen, die alle adenoviralen Funktionen komplementieren. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass die Zelllinie der Wahl eine ist, die spezifisch jene Funktionen komplementiert, die bei dem rekombinanten mehrfach defizienten adenoviralen Vektor von Interesse fehlen und die unter Verwendung molekularbiologischer Standardmethoden erzeugt werden. Die Zelllinien sind ferner dadurch gekennzeichnet, dass sie die komplementierenden Gene in nicht überlappender Weise enthalten, was die Möglichkeit der Rekombination des Vektorgenoms mit der zellulären DNA minimiert, praktisch eliminiert. Folglich werden replikationskompetente Adenoviren aus den Vektor-Stocks eliminiert, die daher für bestimmte therapeutische Zwecke, insbesondere Zwecke der Gentherapie, geeignet sind. Das eliminiert auch die Replikation der Adenoviren in nicht komplementierenden Zellen.

[0054] Die komplementierende Zelllinie muss eine sein, die in der Lage ist, die Produkte der zwei oder mehr defizienten adenoviralen Genfunktionen auf geeignetem Level für jene Produkte zu exprimieren, um einen Stock rekombinanten adenoviralen Vektors mit hohem Titer zu erzeugen. Beispielsweise ist es für die adenovirale DNA-Replikation notwendig, das E2A-Produkt, DBP, auf stöchiometrischem Level, i.e. auf relativ hohem Level, zu exprimieren, aber das E2B-Produkt, Ad pol, ist für die adenovirale DNA-Replikation nur auf katalytischem Level nötig, i.e. auf relativ niedrigem Level. Es muss nicht nur der Level der Produkts geeignet sein, die temporale Expression des Produktes muss mit jener konsistent sein, die man bei normaler viraler Infektion einer Zelle sieht, um einen Stock mit hohem Titer des rekombinanten adenoviralen Vektors zu erzeugen. Beispielsweise müssen die für die virale DNA-Replikation erforderlichen Komponenten vor jenen exprimiert werden, die für den Virionenzusammenbau erforderlich sind. Um Zelltoxizität zu vermeiden, die oft mit hohem Level der Expression der viralen Produkte einhergeht, und um die temporale Expression der Produkte zu regulieren, werden induzierbare Promotorsysteme verwendet. Beispielsweise kann das Metallothionin-induzierbare-Promotorsystem vom Schaf verwendet werden, um die vollständige E4-Region, den offenen Leserahmen 6 der E4-Region und die E2A-Region zu exprimieren. Andere Beispiele für geeignete induzierbare Promotorsysteme schließen das bakterielle lac-Operon, das Tetracyclin-Operon, das T7-Polymerasesystem und Kombinationen und chimäre Konstrukte eukaryotischer und prokaryotischer Transkriptionsfaktoren, Repressoren und andere Komponente ein, sind aber nicht darauf eingeschränkt. Wenn das zu exprimierende virale Produkt hoch toxisch ist, ist es wünschenswert, ein bipartites induzierbares System zu verwenden, wobei der Induktor in einem viralen Vektor getragen und das induzierbare Produkt in dem Chromatin der komplementierenden Zelllinie getragen ist. Reprimierbare/induzierbare Expressionssysteme, wie das Tetracyclin-Expressionssystem und lac-Expressionssystem, können ebenfalls verwendet werden.

[0055] DNA, die in einen kleinen Teil transfizierter Zellen eintritt, kann in einer noch kleineren Fraktion stabil aufrechterhalten werden. Die Isolierung einer Zelllinie, die ein oder mehrere transfizierte Gene exprimiert, wird durch Einführen eines zweiten Gens (Marker-Gen), das beispielsweise Resistenz gegen ein Antibiotikum, Medikament oder eine andere Verbindung verleiht, in die gleiche Zelle erreicht. Diese Selektion basiert auf der Tatsache, dass in Gegenwart eines Antibiotikums, Medikaments oder einer anderen Verbindung die Zelle ohne transferiertes Gen stirbt, während die das transferierte Gen enthaltende Zelle überlebt. Die überlebenden Zellen werden dann klonal isoliert und als individuelle Zelllinien expandiert. Unter diesen Zelllinien sind jene, die das Marker-Gen und das Gen oder die Gene von Interesse exprimieren. Die Vermehrung der Zellen hängt von der parentalen Zelllinie und dem Verfahren der Selektion ab. Die Transfektion der Zelle hängt auch vom Zelltyp ab. Die häufigsten Techniken, die für die Transfektion verwendet werden, sind Calciumphosphat-Präzipitation, Liposomen oder DEAE-Dextran-vermittelter DNA-Transfer.

[0056] Es sind viele Modifizierungen und Variationen der vorliegenden illustrativen DNA-Sequenzen und Plasmide möglich. Beispielsweise ermöglicht die Degeneriertheit des genetischen Codes die Substitution von

Nucleotiden in Polypeptid codierenden Regionen sowie im translationalen Stoppsignal, ohne Änderung der codierten Polypeptid codierenden Sequenz. Solche substituierbare Sequenzen können von der bekannten Aminosäure- oder DNA-Sequenz eines gegebenen Gens abgeleitet und nach herkömmlichen synthetischen Methoden oder Methoden der ortsspezifischen Mutagenese konstruiert werden. Synthetische DNA-Methoden können im Wesentlichen gemäß den Methoden von Itakura et al., Science, 198, 1056 (1977) und Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978), durchgeführt werden. Ortsspezifische Mutagenesemethoden werden in Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (2. Aufl., 1989), beschrieben. Daher ist die vorliegende Erfindung keineswegs auf die DNA-Sequenzen und Plasmide eingeschränkt, die hier speziell als Beispiele angeführt werden. Beispielsweise angeführte Vektoren sind für die Gentherapie von zystischer Fibrose und enthalten und exprimieren daher das Regulatorgen der Transmembran bei zystischer Fibrose (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR), doch die beschriebenen Vektoren sind leicht umwandelbar, um andere Erkrankungen zu behandeln, einschließlich anderer chronischer Lungenerkrankungen, wie Emphysem, Asthma, ARDS (adult respiratory distress syndrome) und chronischer Bronchitis, sowie Krebs, koronarer Herzkrankheit und anderer Beschwerden, die durch Gentherapie, Impfung und dergleichen geeignet behandelt oder verhindert werden können, aber nicht darauf eingeschränkt. Demgemäß kann jede Gen- oder DNA-Sequenz in einen mehrfach defizienten adenoviralen Vektor inseriert werden. Die Wahl der Gen- oder DNA-Sequenz ist eine, die einen therapeutischen und/oder prophylaktischen Effekt erzielt, beispielsweise im Zusammenhang mit Gentherapie, Impfung und dergleichen.

[0057] Ein Fachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass geeignete Methoden zur Verabreichung eines erfindungsgemäßen mehrfach defizienten adenoviralen Vektors an ein Lebewesen zu therapeutischen oder prophylaktischen Zwecken, z.B. Gentherapie, Impfung und dergleichen (siehe z.B. Rosenfeld et al., Science, 252, 431-434 (1991), Jaffe et al., Clin. Res., 39(2), 302A (1991), Rosenfeld et al., Clin. Res., 39 2, 311A (1991), Berkner, BioTechnigues, 6, 616-629 (1988)), verfügbar sind und dass, obschon mehr als ein Weg zur Verabreichung des Vektors verwendet werden kann, ein spezieller Weg eine unmittelbarere und effektivere Reaktion ergeben kann als ein anderer Weg. Pharmazeutisch unbedenkliche Exzipienten sind den Fachleuten auf dem Gebiet ebenfalls bekannt und leicht verfügbar. Die Wahl des Exzipienten wird zum Teil von der speziellen Methode bestimmt, die zur Verabreichung der Zusammensetzung verwendet wird. Folglich gibt es eine Vielzahl geeigneter Formulierungen der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung. Die folgenden Formulierungen und Methoden sind bloß beispielhaft und in keiner Weise einschränkend. Es werden jedoch orale Formulierungen, injizierbare Formulierungen und Aerosol-Formulierungen bevorzugt.

[0058] Für die orale Verabreichung geeignete Formulierungen können aus (a) flüssigen Lösungen, wie einer wirksamen Menge der Verbindung gelöst in Verdünnungsmitteln, wie Wasser, Kochsalzlösung oder Orangensaft, (b) Kapseln, Säckchen oder Tabletten, die jeweils eine vorbestimmte Menge Wirkstoff als Feststoff oder Körner enthalten, (c) Suspensionen in einer geeigneten Flüssigkeit und (d) geeigneten Emulsionen bestehen. Tablettenformen können eine oder mehrere Substanzen aus Lactose, Mannit, Maisstärke, Kartoffelstärke, mikrokristalliner Cellulose, Gummi arabicum, Gelatine, kolloidalem Siliciumdioxid, Croscarmellose-Natrium, Talk, Magnesiumstearat, Stearinsäure und andere Exzipienten, Färbemittel, Verdünnungsmittel, Puffer, Feuchthaltemitel, Konservierungsmittel, Aromastoffe und pharmakologisch kompatible Exzipienten enthalten. Pastillenformen können den Wirkstoff in einem Aromastoff, üblicherweise Saccharose und Gummi arabicum oder Tragant, enthalten sowie Pastillen, die den Wirkstoff in einer inerten Basis, wie Gelatine und Glycerin oder Saccharose und Gummi arabicum enthalten, Emulsionen, Gele und dergleichen, die zusätzlich zum Wirkstoff solche Exzipienten enthalten, wie sie auf dem Gebiet bekannt sind.

[0059] Die erfindungsgemäßen Vektoren, allein oder in Kombination mit anderen geeigneten Komponenten, können als Aerosol-Formulierungen bereitet werden, um über Inhalation verabreicht zu werden. Diese Aerosol-Formulierungen können in unter Druck stehende unbedenkliche Treibmittel gebracht werden, wie Dichlordifluormethan, Propan, Stickstoff und dergleichen. Sie können auch als Pharmaka für nicht unter Druck stehende Zubereitungen bereitet werden, wie in einem Zerstäuber oder Vernebler.

[0060] Für die parenterale Verabreichung geeignete Formulierungen schließen wässrige und nicht-wässrige, isotone sterile Injektionslösungen ein, die Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und gelöste Stoffe, welche die Formulierung mit dem Blut des intendierten Empfängers isoton machen, enthalten können, und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, welche Suspendiermittel, Solubilisatoren, Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Konservierungsmittel einschließen können. Die Formulierungen können in Einzeldosisform oder in Mehrfachdosisform in verschlossenen Behältern, wie Ampullen und Vials, vorliegen und sie können in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, der für Injektionen nur die Zugabe des sterilen flüssigen Exzipienten, z.B. Wasser, unmittelbar vor der Verwendung erfordert. Unvorbereitete Injektionslösungen und -suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulat und Tabletten der vorher beschriebenen Art herge-

stellt werden.

[0061] Außerdem können die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Vektoren zu Suppositorien verarbeitet werden, indem eine Anzahl von Basisstoffen, wie Emulsionsbasen und wasserlösliche Basen, damit vermischt werden.

[0062] Für die vaginale Verabreichung geeignete Formulierungen können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayformulierungen vorliegen, die zusätzlich zum Wirkstoff solche Träger enthalten, wie sie auf dem Gebiet als geeignet bekannt sind.

[0063] Die an ein Lebewesen, insbesondere einen Menschen, verabreichte Dosis variiert im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung je nach Gen oder anderer Sequenz von Interesse, der verwendeten Zusammensetzung, der Verabreichungsmethode und der speziellen Stelle und des Organismus, die/der behandelt wird. Die Dosis sollte ausreichend sein, um die gewünschte Reaktion, z.B. eine therapeutische oder prophylaktische Reaktion, in einem zweckmäßigen Zeitrahmen zu erzielen.

[0064] Die mehrfach defizienten adenoviralen Vektoren und komplementierenden Zelllinien der vorliegenden Erfindung sind auch in vitro nützlich. Beispielsweise können sie verwendet werden, um adenovirale Genfunktion oder Zusammenbau oder die Expression von Fremd-DNA in einer geeigneten Zielzelle zu studieren. Der Durchschnittsfachmann kann eine geeignete Zielzelle identifizieren, indem er eine auswählt, die mit dem erfindungsgemäßen adenoviralen Vektor transfiziert und/oder durch adenovirale Partikel infiziert werden kann, was zur Expression des dabei inserierten adenoviralen DNA-Komplements führt. Vorzugsweise wird eine geeignete Zielzelle ausgewählt, die Rezeptoren für die Befestigung und die Penetration des Adenovirus in eine Zelle hat. Solche Zellen schließen jene ein, die ursprünglich von irgendeinem Säuger isoliert werden, sind aber nicht darauf eingeschränkt. Wenn einmal die geeignete Zielzelle ausgewählt wurde, wird die Zielzelle mit einem Fremd-DNA enthaltenden rekombinanten mehrfach defizienten adenoviralen Vektor oder adenoviralen Partikeln gemäß der Erfindung in Kontakt gebracht. wodurch Transfektion bzw. Infektion erfolgt. Expression, Toxizität und andere Parameter, die sich auf die Insertion und Aktivität der Fremd-DNA in der Zielzelle beziehen, werden dann unter Verwendung herkömmlicher Methoden, die auf dem Gebiet bekannt sind, gemessen. Dadurch können Forscher die Phänomenologie bezüglich adenoviraler Infektion sowie die Effizienz und die Wirkung der Expression verschiedener Sequenzen an Fremd-DNA, die in den erfindungsgemäßen Vektor eingeführt wurde, in verschiedenen Zelltypen, die von verschiedenen Organismen explantiert und in Gewebekultur untersucht werden, lernen und aufklären.

[0065] Außerdem können von einem Patienten, der eine geeignet mit Gentherapie behandelte Krankheit hat, explantierte oder entnommene Zellen im Kontext der vorliegenden Erfindung nützlich in vitro manipuliert werden. Beispielsweise werden Zellen von einem solchen Individuum, die in vitro kultiviert werden, mit einem erfindungsgemäßen adenoviralen Vektor unter geeigneten Bedingungen zum Bewirken einer Transfektion, die leicht von einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet bestimmt werden, in Kontakt gebracht, wobei der Vektor eine geeignete Fremd-DNA aufweist. Ein solches Inkontaktbringen führt geeigneterweise zur Transfektion des Vektors in die kultivierten Zellen, wo die transfizierten Zellen unter Verwendung eines geeigneten Markers und selektiver Kultivierungsbedingungen selektiert werden. Indem man dies unter Anwendung von Standardmethoden zum Testen der Vitalität der Zellen macht und somit die Toxizität misst und in Bezug auf das Vorhandensein von Genprodukten des Fremdgens oder der Fremdgene des interessierenden Vektors untersucht und somit die Expression misst, werden die Zellen des Individuums hinsichtlich der Kompatibilität mit, der Expression an und der Toxizität von dem Fremdgen enthaltenden Vektor von Interesse geprüft, wobei Informationen hinsichtlich der Eignung und Effizienz der Behandlung des Individuums mit dem so geprüften Vektor/Fremd-DNA-System bereitgestellt werden. Solche explantierten und transfizierten Zellen können, zusätzlich dazu, dass sie zum Testen der potentiellen Effizienz/Toxizität eines gegebenen Gentherapieschemas dienen, auch in eine Position in vivo im Körper des Individuums zurückgeführt werden. Solche so in das Individuum zurückgeführte Zellen können unverändert und schlicht, abgesehen von der in vitro Transfektion, zurückgeführt werden, oder sie können von einer Matrix, die sie von anderen Geweben und Zellen des Körpers des Individuums getrennt hält, umschlossen oder in diese eingebettet werden. Eine solche Matrix kann jedwedes biokompatible Material sein, einschließlich Kollagen, Cellulose und dergleichen. Natürlich kann alternativ oder zusätzlich dazu, sobald man einmal eine positive Reaktion auf den in vitro Test festgestellt hat, die Transfektion durch oben spezifizierte Verabreichungsmittel in situ implementiert werden.

[0066] Die folgenden Beispiele illustrieren die vorliegende Erfindung weiter und sind natürlich nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung anzusehen. Enzyme, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, sind, sofern nichts anderes angegeben ist, von Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg,

MD 20877, New England Biolabs Inc. (NEB), Beverly, MA 01915, oder Boehringer Mannheim Biochemicals (BMB), 7941 Castleway Drive, Indianapolis, IN 46250, erhältlich und werden im Wesentlichen gemäß den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Viele der hier verwendeten Methoden sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Molekularbiologische Methoden werden im Detail in geeigneten Laboratoriumshandbüchern beschrieben, wie Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (2d ed. 1989), und Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Hgg. (1987)). Der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass alternative Methoden anstelle verschiedener nachstehend angeführter Methoden verwendet werden können. Obwohl die Beispiele und Figuren auf Ad_{GV}.10, Ad_{GV}.11, Ad_{GV}.12 und Ad_{GV}.13 bezogen sind, die das Regulatorgen der Transmembran bei zystischer Fibrose (CFTR) enthalten, nämlich Ad_{GV}CFTR.10, Ad_{GV}CFTR.11, Ad_{GV}CFTR.12 und Ad_{GV}CFTR.13, sind diese Vektoren nicht auf die Expression des CFTR-Gens beschränkt und können verwendet werden, um andere Gene und DNA-Sequenzen zu exprimieren. Die vorliegende Erfindung umfasst daher beispielsweise solche Vektoren, die jedwede geeignete DNA-Sequenz beinhalten, die ein Fremdgen, ein Fragment davon oder irgendeine andere DNA-Sequenz sein kann. Eine solche geeignete DNA-Sequenz kann in der Gentherapie nützlich sein, um eine Krankheit zu behandeln, die durch Gentherapie geeignet behandelt wird. Alternativ dazu kann eine geeignete DNA-Sequenz auch prophylaktisch von Nutzen sein, wie wenn die DNA-Sequenz in der Lage ist, in einem Säuger exprimiert zu werden, was beispielsweise zu einem Polypeptid führt, das in der Lage ist, eine Immunantwort auf das Polypeptid auszulösen, wie das in Impfungen verwendet wird. Noch eine andere alternative Verwendung einer geeigneten DNA-Sequenz, die in einem Säuger exprimiert werden kann, ist die Bereitstellung irgendeines anderen geeigneten therapeutischen und/oder prophylaktischen Mittels, wie ein Antisense-Molekül, insbesondere ein Antisense-Molekül, das aus der aus MRNA und einem synthetischen Oligonucleotid bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Beispiel 1

[0067] Dieses Beispiel beschreibt die Bildung einer Ausführungsform, wobei AD_{GV}.10 involviert ist, nämlich Ad_{GV}CFTR.10, das in der E1- und E3-Region defizient ist.

[0068] Ad_{GV}CFTR.10 exprimiert das CFTR-Gen des frühen Promotors von Cytomegalovirus (CMV). Zwei Generationen dieses Vektors wurden konstruiert, und sie werden als Ad_{GV}CFTR.10L und Ad_{GV}CFTR.10R bezeichnet, je nach der Richtung, in welcher die CFTR-Expressionskassette in der E1-Region in Relation zum Vektorgenom angeordnet ist, wie in **Fig. 1** gezeigt, die ein Satz schematischer Diagramme von Ad_{GV}CFTR.10L und Ad_{GV}CFTR.10R ist.

[0069] Die CFTR-Expressionskassette wurde wie folgt konstruiert. pRK5 (Genentech Inc., South San Francisco, CA) wurde mit KpnI (New England Biolabs (NEB), Beverly, MA) verdaut, mit Mungobohnen-Nuclease (NEB) glattendig gemacht („blunt-ended"), und ein XhoI-Linker (NEB) wurde an Stelle der KpnI-Stelle ligiert. Der resultierende Vektor wurde mit pRK5-XhoI bezeichnet. pRK5-XhoI wurde dann mit SmaI (NEB) und HindIII (NEB) verdaut und mit Mungobohnen-Nuclease glattendig gemacht. Ein das CFTR-Gen enthaltendes Plasmid, pBQ4.7 (Dr. Lap-Chee Tsui, Hospital for Sick Children, Toronto, Kanada), wurde mit AvaI (NEB) und SacI (NEB) verdaut und mit Mungobohnen-Nuclease glattendig gemacht. Diese beiden Fragmente wurde isoliert und zusammen ligiert, um pRK5-CFTR1, die CFTR-Expressionskassette, herzustellen.

[0070] pRK5-CFTR1 wurde mit SpeI (NEB) und XhoI verdaut und mit Klenow (NEB) glattendig gemacht. pAd60.454 (Dr. L.E. Babiss, The Rockefeller University, New York, NY), worin Ad5-Sequenzen von 1-454/3325-5788 enthalten sind, wurde mit BgIII (NEB) verdaut und mit Klenow glattendig gemacht. Diese beiden Fragmente wurden von Vektorsequenzen durch Techniken mit niedrig schmelzender Agarose gereinigt (Maniatis et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (2. Aufl., 1989)) und zusammen ligiert, um die Linksarm-Plasmide pGVCFTR.10L und pGVCFTR.10R zu erzeugen.

[0071] Das Linksarm-Plasmid von pGVCFTR.10L oder pGVCFTR.10R wurde mit NheI (NEB) verdaut. Der rechte Arm des Virus wurde durch Verdau von Ad5d1324 (Dr. Thomas E. Shenk, Princeton University, Princeton, NJ) mit ClaI (NEB) erzeugt. Die beiden Fragmente, ein kleines 918-bp-Fragment und ein großes ca. 32 800-bp-Fragment, wurden durch Saccharosegradientenzentrifugation (Maniatis et al., supra) getrennt. Das große Fragment wurde mit den Linksarm-Plasmid-Fragmenten gemischt und in 293-Zellen nach einem Standard-Calciumphosphatprotokoll transfiziert (Graham et al., Virologv, 52, 456 (1973)). Die resultierenden rekombinanten Viren wurden auf 293-Zellen Plaque-gereinigt, und virale Stocks wurden unter Verwendung von Standardmethoden der Virologie etabliert (z.B. Berkner et al., (1983) und (1984), supra).

Beispiel 2

[0072] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von Ad_{GV}CFTR.11, das in der E1-, E3- und E4-Region defizient ist.

[0073] Ad_{GV}CFTR.11 wurde erzeugt mittels einer einzelnen in vivo Rekombination zwischen 1-27082, i.e. dem linken Arm von Ad_{GV}CFTR.10, und einem Plasmid (pGV11A, pGV11B, pGV11C oder pGV11D; nachstehend im Detail beschrieben), das 21562-35935 enthielt, i.e. dem rechten Arm von Ad5, linearisiert mit BamHI (NEB) und SalI (NEB), und worin verschiedene E3- und E4-Veränderungen, wie nachstehend beschrieben, eingeführt wurden.

[0074] Der linke Arm von Ad_{GV}CFTR.10 wurde auf einem konkaven 10-40% Saccharosegradienten, worin 1/4 der Gesamtlösung 40% war, isoliert, nachdem intaktes Ad_{GV}CFTR.10 mit SpeI (NEB) und SrfI (Stratagene, La Jolla, CA) verdaut wurde, um das 1-27082 bp-Fragment zu erhalten.

[0075] Der rechte Arm wurde durch BamHI-SalI-Verdau eines modifizierten pGEM-Vektors (pGBS) erhalten. pGBS wurde wie folgt erzeugt. pGemI (Promega, Madison, WI) wurde mit EcoRI verdaut und mit Klenow glattendig gemacht, und ein SalI-Linker wurde in den Vektor ligiert. Die resultierende DNA wurde dann mit SalI verdaut und religiert, wobei die Eco-RI-Stelle durch eine SalI-Stelle ersetzt wurde und die Sequenz zwischen den beiden SalI-Stellen deletiert wurde, um pGEMH/P/S zu erzeugen, das mit HindIII verdaut und mit Klenow glattendig gemacht wurde, und ein BamHI-Linker wurde in den Vektor ligiert, um pGEMS/B zu erzeugen. pGEMS/B wurde mit BamHI und SalI verdaut und mit einem ~14 kb BamHI-SalI-Fragment (21562-35935 von Ad5) von einem pBR-Plasmid, p50-100 genannt (Dr. Paul Freimuth, Columbia University, NY), ligiert, um pGBS zu erzeugen.

[0076] Drei verschiedene Versionen des Rechtsarm-Plasmids wurden konstruiert, um in den adenoviralen Vektor zwei Ad E3-Genprodukte mit Antiimmunität- und Antientzündungseigenschaften einzuführen. Die große E3-Deletion in pGBSΔE3ORF6, als pGV11(0) bezeichnet (Beispiel 7), wurde im Wesentlichen durch drei verschiedene Versionen einer Expressionskassette ersetzt, die den RSV-LTR-Promotor (Rous sarcoma virus long terminal repeat) enthielt, der die Expression einer bicistronischen mRNA antreibt, die am 5'-Ende das Ad2 E3 19 kDa Antümmunitäts-Genprodukt und am 3'-Ende das Ad5 E3 14,7 Kda Antientzündungs-Genprodukt hat. Es wurde ein weiteres Virus durch Deletion des 19 kDa cDNA Fragment durch BstBI (NEB)-Fragment-Deletion konstruiert. Dieses Virus, das als Ad_{GV}CFTR.11(D) bezeichnet wurde, enthält den RSV-LTR-Promotor, der die Expression einer monocistronischen mRNA treibt, die nur das E3 14,7 kDa Antientzündungs-Genprodukt aufweist.

[0077] Das SpeI (27082)-NdeI (31089)-Fragment von pGBSΔE3 (Beispiel 5) wurde in pUC19 subkloniert, indem zuerst das EcoRI (27331)-NdeI (31089)-Fragment in identische Stellen in dem PUC 19-Polylinker kloniert wurde. Ein HindIII (26328)-EcoRI (27331)-Fragment, das aus pGBS erzeugt wurde, wurde dann in die Eco-RI-Stelle dieses Klons kloniert, um pHNΔE3 zu erzeugen. Unter Verwendung geeigneter Primer wurde ein PCR-Fragment mit flankierenden XbaI-Stellen erzeugt, worin der RSV-LTR-Promotor, das Ad2 E3 19 kDa-Genprodukt und das Ad5 E3 14,7 kDa-Genprodukt enthalten war. Das amplifizierte Fragment wurde mit XbaI verdaut und in pUC 19 subkloniert, um pXA zu erzeugen. Nach der Analyse des XbaI-Fragments wurde das Fragment in pHNΔE3 ligiert, um pHNRA zu erzeugen.

[0078] Unter Verwendung geeigneter Primer wurden zwei PCR-Fragments mit flankierenden BstBI-Stellen erzeugt, die interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) codieren, von denen bekannt ist, dass sie die Translation von mRNAs, die sie enthalten, verstärken (Jobling et al., Nature, 325, 622-625 (1987); Jang et al., Genes and Development, 4, 1560-1572 (1990)). Ein Fragment (Version B) enthält eine 34 bp IRES vom nichttranslatierten Leader der Hüllprotein-mRNA von Alfalfa-Mosaikvirus (AMV RNA 4 Leader) (Jobling et al., supra). Das andere Fragment (Version C) enthält eine 570 by IRES von der 5'-nicht-translatierten Region von Encephalomyocarditisvirus(EMCV)mRNA (Jang et al., supra). Jedes BstBI-Fragment der Version B oder C wurde an Stelle des BstBI-Fragments in pXA kloniert. Die resultierenden Plasmide, die pXB bzw. pXC genannt werden, wurden nach Sequenzanalyse der XbaI-Fragmente in pHNΔE3 gebracht, um pHNRB bzw. pHNRC zu erzeugen.

[0079] Das SpeI (27082)-NdeI (31089)-Fragment von pGBSΔE3ORF6 wurde durch die SpeI-NdeI-Fragmente von pHNRA, pHNRB, pHNRC und pHNRD ersetzt, um jeweils pGV11A, pGV11B, pGV11C und pGV11D zu erzeugen.

[0080] Die pGBV-Plasmid-DNA wurde mit BamHI und SalI linearisiert und mit dem gereinigten Links-

arm-DNA-Fragment in variierenden Konzentrationen gemischt, um etwa 20 µg total DNA zu erhalten, wobei Lachssperma- oder Kalbsthymus-DNA (Life Technologies, Gaithersburg, MA) verwendet wurde, um die DNA-Menge auf etwa 20 µg, wie benötigt, zu bringen. Die gemischten Fragments wurden dann in 293-Zellen unter Verwendung von Standard-Calciumphosphatmethoden transfiziert (Graham et al., supra).

[0081] Fünf Tage nach der Transfektion wurde die Zellmonoschicht durch dreimaliges Gefrieren-Auftauen geerntet. Das resultierende Hybridvirus wurde auf 293-Zellen titriert und isolierte Plaques wurden genommen. Die Methode der Plaqueisolierung wurde noch zweimal wiederholt, um sicherzustellen, dass ein einzelnes rekombinantes Virus in dem Ausgangsplaquestock existierte. Der Plaqueisolatstock wurde dann nach Standardmethoden der Virologie, wie in Burlseson et al., Virology: a Laboratory Manual, Academic Press Inc. (1992), beschrieben, zu einem großen viralen Stock amplifiziert.

[0082] Fig. 2 ist ein Satz schematischer Diagramme der verschiedenen viralen Vektoren AD_{GV}CFTR.11. Die Diagramme sind zum Vergleich an dem von AD_{GV}CFTR.10L ausgerichtet.

Beispiel 3

[0083] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von Ad_{GV}CFTR.12, welches in der E1-, E3-und E4-Region defizient ist.

[0084] Ad_{GV}.12 ist durch vollständige Eliminierung der E4-Region gekennzeichnet. Diese große Deletion ermöglicht das Inserieren von bis zu etwa 10 kb exogener DNA. Wichtiger ist, dass eine andere Region des Genoms zum Einführen von Fremd-DNA-Expressionskassetten unter Verwendung der Ad_{GV}CFTR.12-Vektoren zugänglich ist. Diese Deletion ermöglicht nun das Einbringen größerer Expressionskassetten für andere Produkte. Beispielsweise lösliche Rezeptoren, i.e. TNF oder IL-6 ohne eine Transmembran-Domäne, so dass sie nun nicht an die Membran gebunden sind, und Antisense-Moleküle, z.B. jene, die gegen Zellzyklus-regulierende Produkte gerichtet sind, wie cdc2, cdk-Kinasen, Cycline, i.e. Cyclin E oder Cyclin D, und Transkriptionsfaktoren, i.e. E2F oder c-myc, um Entzündungs- und Immunantworten zu eliminieren.

[0085] pGV11(0) wird verändert, um ein Rechtsarm-Plasmid zu erzeugen, in dem die gesamte E4-Region deletiert ist. Das resultierende Plasmid, in welchem die gesamte E3- und E4-Region deletiert sind, wird pGV12(0) genannt. Dies erfolgt durch Einführen einer PacI-Restriktionsstelle an der AflIII-Stelle bei 32811 und der BsgI-Stelle bei 35640. Die Deletion des PacI-Fragments zwischen diesen beiden Stellen eliminiert wirksam alle E4-Sequenzen, einschließlich des E4-TATA-Elements im E4-Promotor und der E4-polyA-Stelle.

[0086] Die Viruskonstruktion erfolgt wie zuvor beschrieben wie zuvor beschrieben, außer dass die 293/E4-Zelllinie oder die 293/ORF6-Zelllinie verwendet wird. Der linke Arm von Ad_{GV}CFTR.10L, das Rechtsarm-pGV12(0)-Plasmid und alle anderen allgemeinen Methoden sind im Beispiel 2 beschrieben. Da E4 essentielle Genprodukte enthält, die für das virale Wachstum erforderlich sind, kann das resultierende E4-Deletion-Mutantenvirus in Abwesenheit von exogen exprimiertem E4 nicht wachsen. Daher werden alle Manipulationen hinsichtlich der viralen Konstruktion in der neuen 293/E4-Zelllinie oder 293/ORF6-Zelllinie durchgeführt (beschrieben im Beispiele 8 bzw. 9). Das resultierende Virus ist Ad_{GV}CFTR.12, das schematisch in der Fig. 3 dargestellt ist, zum Vergleich zusammen mit Ad_{GV}CFTR.10L.

Beispiel 4

[0087] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von Ad_{GV}CFTR.13, welches in der E1-, E2A-, E3- und E4-Region defizient ist.

[0088] Ad_{GV}.13 ist nicht nur durch vollständige Eliminierung von E1 und E4 (wie in AD_{GV}.12) gekennzeichnet, sondern auch durch vollständige Eliminierung von E2A. Die vollständige codierende Region von E2A wird deletiert durch Verschmelzen der DNA von zwei E2A-mutierten Viren, nämlich H5in800 und H5in804, die Insertionen von ClaI-Restriktionsstellen an beiden Enden des offenen Leserahmens haben (Vos et al., Virology, 172, 634-642 (1989); Brough et al., Virology, 190, 624-634 (1992)). Die ClaI-Stelle von H5in800 ist zwischen den Codons 2 und 3 des Gens, und die ClaI-Stelle von H5in804 ist innerhalb des Stoppcodons des E2A-Gens. Das resultierende Virus enthält einen offenen Leserahmen, der aus 23 Aminosäuren besteht, die keine Ähnlichkeit mit dem E2A-Leserahmen haben. Wichtiger ist noch, dass diese Kassette noch eine andere Region des Virusgenoms bietet, in welche ein einmaliges Gene eingeführt werden kann. Das kann man tun, indem das interessierende Gen in den passenden Leserahmen des existierenden mini-ORF inseriert oder noch eine andere Expressionskassette einführt, die ihre eigenen Promotorsequenzen, Polyadenylierungssignale und Stoppse-

quenzen hat, zusätzlich zu dem interessierenden Gen.

[0089] Adenovirus-DNA wird aus H5in800 und H5in804 bereitet. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym HindIII (NEB) werden die HindIII-A-Fragments von H5in800 und H5in804 in pKS+ (Stratagene) kloniert. Die resultierenden Plasmide werden pKS+H5in800HindIIIA bzw. pKS+H5in804HindIIIA genannt. Das ClaI(NEB)-Fragment von pKS+H5in800HindIIIA wird dann isoliert und an Stelle des identischen ClaI-Fragments von PKS+H5in804HindIIIA kloniert. Dieses chimäre Plasmid, pHindIIIAΔE2A, entfernt wirksam alles vom E2A-Leserahmen, wie oben beschrieben. An dieser Stelle wird die E2A-Deletion an BamHI- (NEB) und SpeI (NEB)-Restriktionsstellen gebracht, um die Wildtyp-Sequenzen in pGV12(0) zu ersetzen, um pGV13(0) zu konstruieren.

[0090] Ad_{GV}CFTR.13-Virus (siehe **Fig. 4**) wird wie zuvor beschrieben konstruiert, indem Ad_{GV}CFTR.10 Linksarm-DNA und pGV13(0) Rechtsarm-Plasmid-DNA verwendet werden. Die Rezipientenzelllinie für diese Viruskonstruktion ist jedoch die dreifach komplementierende Zelllinie 293/E4/E2A. **Fig. 4** ist ein schematisches Diagramm des viralen Vektors Ad_{GV}CFTR.13. Das Diagramm ist zum Vergleich mit dem von Ad_{GV}CFTR.10L ausgerichtet.

Beispiel 5

[0091] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von pGBSΔE3.

[0092] Dieses Plasmid wurde erzeugt, um den Großteil der E3-Region in pGBS zu entfernen, einschließlich des E3-Promotors und existierender E3-Gene, um Platz für andere Konstrukte zu machen und das Einführen von E3-Expressionskassetten zu erleichtern. Dieses Plasmid enthält eine Deletion von 28331 bis 30469.

[0093] Ein PCR-Fragment wurde mit Ad5s(27324) und A5a(28330)X als Primer und pGBS als Matrize erzeugt. Das resultierende Fragment wurde mit EcoRI (27331) und XbaI (28330) verdaut und Gel-gereinigt. Dieses Fragment wurde dann in pGBS an der EcoRI- (27331) und XbaI- (30470) Stelle eingeführt.

Beispiel 6

[0094] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von pGBSΔE3ΔE4.

[0095] Eine große Deletion des Ad5 E4-Region wurde in pGBSΔE3 eingeführt, um die Bewegung zusätzlicher exogener Sequenzen in das adenovirale Genom zu erleichtern. Die 32830-35566 E4 codierende Sequenz wurde deletiert.

[0096] Eine PacI-Stelle wurde an Stelle der MunI-Stelle bei 32830 erzeugt durch Behandlung von pGBS MunI-verdauter DNA mit Klenow zum Glattendigmachen des Fragments und durch Ligation eines PacI-Linkers daran. Die modifizierte DNA wurde dann mit NdeI verdaut, und das resultierende 1736-bp-Fragment (NdeI 31089-PacI 32830) wurde Gel-gereinigt. Ein PCR-Fragment wurde unter Verwendung von A5 (35564)P (IDT, Coralville, IA) und T7-Primern (IDT, Coralville, IA) und pGBS als Matrize hergestellt. Das resultierende Fragment wurde mit PacI und SalI verdaut, um PacI 35566 – SalI 35935 zu erzeugen. Eine SmaI-Stelle in der Polylinkerregion von pUC 19 wurde zu einer PacI-Stelle durch Ligieren eines PacI-Linkers modifiziert. Das PacI 35566-SalI 35935-Fragment wurde in den modifizierten pUC 19-Vektor an der PacI- bzw. SalI-Stelle in der Polylinkerregion gebracht. Das modifizierte NdeI 31089 – PacI 32830-Fragment wurde in das pUC 19-Plasmid gebracht, in welches das PacI 35566 – SalI 35935-Fragment bereits inseriert worden war, an der NdeI- bzw. PacI-Stelle. Das NdeI 31089 – SalI 35935-Fragment von dem pUC 19-Plasmid wurde mittels Gelreinigung gereinigt und an Stelle der NdeI- und SalI-Stellen pGBSΔE3 kloniert, um pGBSΔE3ΔE4 zu erhalten.

Beispiel 7

[0097] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von pGBSΔE3ORF6.

[0098] Das Ad5 894 by E4 ORF-6 Gen wurde 3' des E4-Promotors in pGBSΔE3ΔE4 gebracht. ORF-6 ist das einzige absolut essentielle E4-Produkt, das für das Viruswachstum in einer nicht E4 komplementierenden Zelllinie erforderlich ist. Daher wurde dieses Produkt wieder in das Rechtsarm-Plasmid (Beispiel 2) eingeführt, unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, so dass das Ad_{GV}CFTR.11-Virus in 293-Zellen vermehrt werden kann.

[0099] Ein PCR-Fragment wurde unter Verwendung von A5s(33190)P (32 bp; 5'CACTTAATTAAACGCCTACATGGGGGTAGAGT3') (SEQ ID NO 1) und A5a(34084)P (34 bp; 5'CACTTAATTAAGGAAATATGACTACGTCCGGCGT3') (SEQ ID NO 2) als Primer (IDT, Coralville, IA) und pGBS als Matrize erzeugt. Dieses Fragment wurde mit PacI verdaut und Gel-gereinigt. Das Produkt wurde in die einzelne PacI-Stelle in pGBSΔE3ΔE4 eingeführt, um pGV11(0) zu erzeugen, welches das Plasmid war, das E3-modified war für die Expression des 19 kDa und des 14,7 kDa Ad E3 Produkts.

Beispiel 8

[0100] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung der 293/E4-Zelllinie.

[0101] Der Vektor pSMT/E4 wurde wie folgt erzeugt. Ein 2752 by MunI (Stelle 32825 von Ad2)-SphI (Polylinker)-Fragment wurde aus pE4(89-99) isoliert, welches ein pUC19-Plasmid ist, in das die Region 32264-35577 von Ad2 subkloniert wurde, glattendig gemacht mit Klenow und mit Phosphatase (NEB) behandelt. Das 2752 by MunI-SphI-Fragment wurde dann in pMT010/A^+ ligiert (McNeaII et al., Gene, 76, 81-89 (1989)), das mit BamHI linearisiert worden war, mit Klenow glattendig gemacht und mit Phosphatase behandelt, um das Expressionskassettenplasmid, pSMT/E4, zu erzeugen.

[0102] Die Zelllinie 293 (ATCC CRL 1573; American Type Culture Collection, Rockville, MD) wurde in 10% fetalem Rinserserum-Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (Life Technologies, Gaithersburg, MA) kultiviert. Die 293-Zellen wurden dann mit pSMT/E4 transfiziert, das mit EcoRI nach der Calciumphosphatmethode linearisiert wurde (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Ungefähr 24-48 Stunden nach der Transfektion wurde ein Medium (wie oben) zugesetzt, das 100 µM Methotrexat und Amethopterin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) enthielt. Das Vorhandensein von Methotrexat in dem Medium selektioniert hinsichtlich der Expression des Dihydrofolatreduktase(DHFR)-Gens, das ein selektierbarer Marker auf dem pSMT/E4-Plasmid ist.

[0103] Das normale DHFR-Gen der Zelle wird durch eine gegebene Konzentration an Methotrexat (Zelltyp-spezifisch) inhibiert, was den Zelltod verursacht. Die Expression des zusätzlichen DHFR-Gens in transfizierten Zellen, die pSMT/E4 enthalten, bietet Resistenz gegenüber Methotrexat. Daher sind die transfizierten Zellen, welche die neuen Gene enthalten, die einzigen, die unter diesen Bedingungen wachsen (für einen Überblick siehe Sambrook et al., supra).

[0104] Wenn kleine Kolonien von Zellen aus der einzelnen Ausgangszelle mit dem selektierbaren Marker gebildet wurden, wurden sie klonal isoliert und vermehrt (für einen Überblick siehe Sambrook et al., supra). Diese Klone wurden expandiert, um Zelllinien zu produzieren, welche hinsichtlich der Expression des Produktes – in diesem Fall E4 – und hinsichtlich der Funktionalität im Komplementieren defektiver Viren – in diesem Fall E1- und E4-defektiver Viren – gescreent wurden.

[0105] Das Ergebnis dieses Prozesses erzeugte die ersten 293/E4-Zelllinien, die in der Lage sind, adenovirale Vektoren zu komplementieren, die in E1- und E4-Funktionen defizient sind, wie Ad_{GV}CFTR.12.

Beispiel 9

[0106] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung der 293/ORF-6-Zelllinie.

[0107] Die Primer A5s(33190)P und A5a(34084)P wurden in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) (PCR Protocols. A guide to Methods und Applications, Innis et al., Hgg., Academic Press, Inc. (1990)) verwendet, um das ORF-6-Gen von Ad5 E4 zu amplifizieren und PacI-Stellen an den Enden für das Klonieren zu erzeugen. Das amplifizierte Fragment wurde mit Klenow gattendig gemacht und in pCR-Script SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Das resultierende Plasmid, pCR/ORF-6, wurde sequenziert, und dann wurde das ORF-6-Insert in den pSMT/puro-Expressionsvektor transferiert, der durch Ligation des glattendigen EcoRI-HindIII-Fragments, das den SMT Promotor enthielt, in die glattendige MluI-HindIII-Stelle in pRCpuro erzeugt wurde, um pSMT/ORF-6 zu erzeugen.

[0108] Die 293-Zelllinie wurde kultiviert und mit pSMT/ORF-6 transfiziert, wie im Beispiel 8 beschrieben, außer dass die transfizierten Zellen unter Selektion hinsichtlich des Puromycin-Resistenzgens gebracht wurde, was ermöglicht, dass dieses exprimierende Zellen in Gegenwart von Puromycin wachsen. Kolonien transformierter Zellen wurden subkloniert und vermehrt und gescreent wie im Beispiel 8 beschrieben.

[0109] Diese Zelllinie ist zum Komplementieren von Vektoren geeignet, die in der E1- und E4-Region defizient sind, wie die Ad_{GV}CFTR.12-Serie von Vektoren.

Beispiel 10

[0110] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung der 293/E4/E2A-Zelllinie. Die 293/E4/E2A-Zelllinie ermöglicht, dass sich E1-, E4- und E2A-defiziente virale Vektoren vermehren.

[0111] Die E2A-Expressionskassette (siehe **Fig. 5**) zum Einführen in 293/E4-Zellen wird wie folgt erzeugt. Der erste Schritt ist die Änderung der umgebenden Basen von ATG von E2A, um einen perfekten Kozak-Konsensus zu erreichen (Kozak, J. Molec. Biol., 196, 947-950 (1987)), um die Expression von E2A zu optimieren. Zwei Primer sind gestaltet, um die 5'-Region des E2A-Gens zu ändern. AdSs(23884), ein 18-bp-Oligonucleotid (5'GCCTCATCCGCTTTT3') (SEQ ID NO 3), ist gestaltet, um die innere Region vorzubereiten („prime"), welche die SmaI-Stelle des E2A-Gens flankiert. DBP(ATG)R1, ein 32-bp-Oligonucleotid (5' CCGGAATTCCACCATGGCGAGTCGGGAAGAGG3') (SEQ ID NO 4), ist gestaltet, um die translationale Konsensussequenz um ATG des E2A-Gens einzuführen, wobei sie zu einer perfekten Kozak-extendierten Konsensussequenz wird, und um eine EcoRI-Stelle 5' einzuführen, um das Klonieren zu erleichtern. Das resultierende PCR-Produkt unter Verwendung der obigen Primer wird mit EcoRI und SmaI (NEB) verdaut und in die identischen Polylinker-Stellen von pBluescript IIKS+ (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Das resultierende Plasmid wird pKS/ESDBP genannt.

[0112] Ein SmaI-XbaI-Fragment wird aus pHRKauffman (Morin et al., Mol. Cell. Biol., 9, 4372-4380 (1989)) isoliert und in die entsprechenden SmaI- und XbaI-Stellen von pKS/ESDBP kloniert, um den E2A-Leserahmen zu vervollständigen. Das resultierende Plasmid wird pKSDBP genannt. Um alle homologen Sequenzen von dem Vektor, die in der Expressionskassette enthalten sind, zu eliminieren, wird das KpnI bis DraI-Fragment von pKSDBP in entsprechende KpnI- und PmeI-Stellen in PNEB193 (NEB) gebracht, worin die EcoRI-Stellen in dem Polylinker zerstört wurden (GenVec, Rockville, MD). Der resultierende Klon, pE2A, enthält alles vom E2A-Leserahmen ohne irgendwelche Extrasequenzen, die zu dem E2A-deletierten Vektor im Beispiel 4 homolog sind.

[0113] Eine 5'-Spleißkassette wird dann in pE2A gebracht, um entsprechendes nucleäres Processing der mRNA zu ermöglichen und die Expression von E2A weiter zu verstärken. Zu diesem Zweck wird pRK5, das im Beispiel 1 beschrieben wurde, mit SacII (NEB) verdaut, mit Mungobohnen-Nuclease (NEB) glattendig gemacht und mit EcoRI (NEB) verdaut. Das resultierende, etwa 240 by große, Fragment von Interesse, das sie Spleißsignale enthält, wird in die ClaI- (glattendig mit Klenow) bis EcoRI-Stellen von pE2A kloniert, um p5'E2A zu erzeugen. Das glattendige (Klenow) SalI- bis HindIII-Fragment von p5'E2A, das die E2A-Sequenzen enthält, wird dann in die glattendige (Klenow) XbaI-Stelle von pSMT/puro und pSMT/neo gebracht. Das resultierende E2A wird pKSE2A genannt.

[0114] Das XbaI-Fragment von pKSE2A, das alle E2A-Gene enthielt, wird dann in die XbaI-Stelle von pSMT/puro und pSMT/neo gebracht. Die resultierenden E2A-Expressionsplasmide, pSMT/E2A/puro und pSMT/E2A/neo, werden in 293/E4- bzw. 2031/ORF-6-Zellen transfiziert. Mit pSMT/E2A/puro transfizierte Zellen werden für das Kultivieren in Standardmedium plus Puromycin selektiert, und mit pSMT/E2A/neo transfizierte Zellen werden für das Kultivieren in Standardmedium plus Geneticin (G418; Life Technologies, Gaithersburg, MD) selektiert. Die klonale Expansion isolierter Kolonien ist wie im Beispiel 8 beschrieben. Die resultierenden Zelllinien werden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, E1-, E4- und E2A-defiziente virale Vektoren zu komplementieren, gescreent.

[0115] Diese Zelllinien sind zum Komplementieren von Vektoren geeignet, welche in der E1-, E4- und E2A-Region des Virus defizient sind, wie jene, die in der Ad_{GV}CFTR.13-Serie viraler Vektoren beschrieben wurden.

Beispiel 11

[0116] Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung von komplementierenden Zelllinien unter Verwendung der Zelllinie A549 (ATCC) als parentaler Linie.

[0117] Ad2-Virus-DNA wird nach zuvor beschriebenen Methoden bereitet. Die genomische DNA wird mit SspI und XhoI verdaut, und das 5438 bp-Fragment wird gereinigt und in EcoRV/XhoI-Stellen von pKS+ (Stratagene) kloniert, um pKS341-5778 zu erzeugen. Nach der diagnostischen Bestimmung des Klons wird ein XhoI (glat-

tendig mit Klenow) bis EcoRI-Fragment in die NruI- (glatt) bis EcoRI-Stellen in pRC/CMVneo kloniert, um pE1neo herzustellen. Die Transformation von A549-Zellen mit diesem Klon ergibt eine komplementierende Zelllinie (ähnlich zu 293), worin zusätzliche Expressionskassetten eingeführt werden können, auf eine Art, die der für die 293-Zelle beschriebenen ähnlich ist, um multi-komplementierende Zelllinien mit ausgezeichnetem Plaqueing-Potential zu erzeugen.

Beispiel 12

[0118] Dieses Beispiel legt ein Protokoll für die Erzeugung von 293/E2A-Zelllinien und deren Verwendung zum Konstruieren eines adenoviralen Vektors, der in der E1- und der E2A-Region defizient ist, dar.

[0119] Ein E2A-Expressionskassette Vektor wurde wie im Beispiel 10 beschrieben und in **Fig. 5** dargestellt erhalten. Der E2A-Expressionskassette-Vektor beinhaltet das Gen, das Neomycin-Resistenz verleiht, als Marker für transfizierte Zellen.

[0120] Ebenfalls wie im Beispiel 10 beschrieben, wurden 293-Zellen mit pSMT/E2A/neo transfiziert, und die transfizierten Zellen wurden für das Kultivieren in Standardmedium plus G418 selektiert. Die klonal Expansion der ausgewählten Zellen erfolgte wie im Beispiel 8 beschrieben. Die resultierenden Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das DNA-Bindungsprotein (DBP; das Produkt des E2A-Gens) nach Induktion zu exprimieren, und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, E1- und E2A-defiziente virale Vektoren zu komplementieren, gescreent.

[0121] Zum Testen der Fähigkeit der Neomycin-positiven (neo^+; i.e. resistent gegen Neomycin) klonalen Isolats der 293/E2A-Zelllinien hinsichtlich ihres Vermögens, DBP zu exprimieren, wurden Zellen in Gegenwart von G418 kultiviert, um die Selektion aufrechtzuerhalten. Etablierte Monoschichten von unabhängigen klonalen Isolaten wurden mit 100 µM $ZnCl_2$ für 24 Stunden induziert, und die Expression des DBP-Gens wurde mittels Immunoblotting unter Verwendung einer Standardmethode nachgewiesen. Von den 62 getesteten Linien waren 42 % der neo^+-Zelllinien positiv für DBP-Expression (DBP^+), und alle DBP^+-Zelllinien zeigten induzierbare DBP-Expression. Die folgende Tabelle 1 zeigt die Daten von dem DBP-Expressions-Screening.

Tabelle 1

Zelllinie	DBP-Expression	Zelllinie	DBP-Expression
3	-	202	-
6	-	203	-
9	-	207	-
10	+	208	-
12	+	210	-
13	+	211	-
16	-	212	+
17	+	213	-
19	+	215	-
21	+	216	+
32	+	219	-
35	+	301	+
36	-	302	-
39	+	305	-
41	-	307	-
42	-	309	-
43	-	311	-
52	-	313	-
54	+	314	-
55	-	315	-
57	+	316	-
58	+	317	-
60	-	321	+
61	+	323	-
62	-	324	-
104	+	325	+
107	-	326	-
108	+	327	+
111	-	328	+
112	+	329	+
201	+	330	+

[0122] Die klonalen 293/E2A-Zelllinien wurden anschließend hinsichtlich des Levels der induzierten DBP-Expression über Immunoblotting unter Verwendung der Methode von Brough et al., supra, gescreent, und die Ergebnisse sind in den als Fig. 6 und Fig. 7 bezeichneten Autoradiogrammen dargestellt. Die Zelllinien, die einen ähnlichen Level DBP wie jener in den HeLa-basierenden gmDBP2-Zellen akkumulierten, wurden weiter analysiert. Wie in Fig. 6 angemerkt, basierend auf den Lysaten induzierter Zellen, variierte der Level an induzierter DBP-Expression in den klonalen Isolaten in einem weiten Bereich. Beispielsweise produzierten die Zelllinien 104, 112 und 216 eine substantielle Menge DBP nach Induktion wie oben beschrieben, wohingegen die

Zelllinien 19 und 61 nicht mehr als das produzierten, was gmDBP2-Zellen produzieren.

[0123] Die klonalen 293/E2A-Zelllinien wurden auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Akkumulation von DBP über die ersten 24 Stunden der Induktion analysiert, wobei wieder die Methode von Brough et al., supra, angewendet wurde. Wie in der Fig. 7 angemerkt, basierend auf Lysaten von Zellen, die 0, 2, 16 und 24 Stunden nach der Induktion geerntet wurden, wurde festgestellt, dass mehrere Linien über die Inkubationsdauer progressiv DBP akkumulierten, konsistent mit dem Viruswachstum.

[0124] Zum Testen der Komplementierung durch die resultierenden 293/E2A-Zelllinien wurden E2A-Deletionsviren hinsichtlich des Wachstums auf diesen Zelllinien unter Verwendung herkömmlicher Methoden geprüft. Wie auf dem Gebiet gut bekannt ist, kann das virale Wachstum halbquantitativ durch einfache Beobachtung der Plaquebildung in einer Monoschicht von Wirtszellen bestimmt werden, was auch hier gemacht wurde. Die gleichen Linien wurden hinsichtlich ihrer relativen Expression des E2A-Gens untersucht, i.e. die relative Expression von DBP wurde über Immunoblot gemäß Brough et al., Virology, 190, 624-634 (1992), gemessen. Der relative Level der Expression oder des Wachstums in Bezug auf vorgenannten Parameter (niedrigster +/- bis höchster +++++) für jede der getesteten Zelllinien ist in der Tabelle 2 dargelegt:

Tabelle 2

Zelllinie	Relativer Level der DBP-Expression	Fähigkeit zur Unterstützung eines E2A-Deletionsvirus bei Plaque-Bildung
54	++++++	+++++
61	++	+
104	+++++	-
112	++++	++++++
201	++++	++
208	-	-
212	+++	+
216	++++	+/-
325	+	-
327	+++	-
328	+++	-
330	+++++	-

[0125] Wie die Tabelle 2 widerspiegelt, zeigte das Ergebnis dieser Untersuchung, dass zwei 293/E2A-Zelllinien (nämlich 54 und 112) bei E2A-Deletionsvirus die Plaquebildung und somit Vermehrung unterstützen.

[0126] Es wurde auch gezeigt, dass die ausgewählten Zelllinien Vektoren komplementieren, die in der E1- und E2A-Region des Virus defizient sind, wobei Zellkultivierungsmethoden angewendet wurden, die auf diesem Gebiet Routine sind. Ein solcher doppelt defizienter Vektor wurde nach Methoden erzeugt, die in den Beispielen 1 und 3 dargelegt sind. Die Fig. 8 zeigt die Struktur von Ad_{GV}CFTR.12B, das ein adenoviraler Vektor ist, der hinsichtlich der E1- und E2A-Region defizient ist. Das Vorhandensein des Ad_{GV}CFTR.12B-Vektors in drei verschiedenen Lysaten transfizierter Zellen nach dem Passagieren der Zellen wurde beobachtet, indem die Sequenzen von DNA, die mit dem Vektor assoziiert ist, über einen Standard-PCR-Assay nachgewiesen wurden. Die drei verschiedenen Lysate wurden getrennt auf das Vorhandensein von CFTR-Sequenzen (mit "A" bezeichnete Spalten in Fig. 9), die Abwesenheit von E2A-Sequenzen, i.e. den Beweis der Deletion (mit "B" bezeichnete Spalten) und das Vorhandensein von Wildtyp-E2A-Sequenzen (mit "C" bezeichnete Spalten) geprüft. Das Experiment kann anhand der Photographie mit reversem Kontrast bei den Ethidiumbromid-angefärbten, Gel-getrennten Fragmenten der DNA, in Fig. 9 dargestellt, analysiert werden, was mit Hilfe von Standardmethoden erfolgte.

[0127] Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Lysate CFTR- und E2A-Deletionssequenzen enthalten, was mit der Struktur des AdGVCFTR.12B-Vektors konsistent ist. In diesen Lysaten wurden keine Wildtyp=E2A-Sequenzen nachgewiesen. In der Fig. 9 bedeutet "M" einen DNA-Marker, um die Produktgröße zu verifizieren, "+" bezeichnet eine Probe, in der die positive Matrize für das gegebene Primer-Set verwendet wurde, "-" bezeichnet einen negativen Primer, der für jedes gegebene Primer-Set verwendet wurde, und, wie oben angeführt, A, B und C stehen für die drei geprüften viralen Lysate.

[0128] Demgemäß wurde ein adenoviraler Vektor mit Deletion in der E1- und E2A-Region erzeugt, und Zelllinien mit der Fähigkeit, den doppelt defizienten Vektor zu komplementieren, wurden identifiziert.

Beispiel 13

[0129] Dieses Beispiel illustriert die Verwendung eines E2A-Deletionsplasmids für die Expression einer Fremd-DNA.

[0130] Das E2A-Deletionsplasmid pGV13(0), wie im Beispiel 4 beschrieben, wurde verwendet, um eine GV12B-Serie von Vektoren zu konstruieren. Modifizierungen des pGV13(0) beinhalteten das Substituieren einer einmaligen SceI-Restriktionsstelle für die ClaI-Stelle und eine Änderung der ATG umgebenden Region des E2A-Gens zu einer optimierten Kozak-Konsensussequenz. Ein Marker-Gen (β-Glucuronidase) mit flankierenden SceI-Restriktionsstellen wurde an Stelle des E2A-Gens inseriert, so dass das Marker-Gen als Reaktion auf alle Signale exprimiert, die zum Exprimieren des häufigsten frühen Gens, i.e. DBP, verwendet werden. Das resultierende Plasmid (pGBSE2GUS) wurde hinsichtlich der Funktionalität durch Transfektion und anschließende Prüfung der β-Glucuronidase-Aktivität untersucht; alle geprüften transfizierten Zelllinien zeigten hohe Levels der Expression von β-Glucuronidase, was durch die Erzeugung einer blauen Farbe nachgewiesen wird, wenn β-Glucuronidase eine Reaktion mit dem Substrat X-glu katalysiert.

[0131] Ein anderer viraler Vektor (Ad_{GV}Luc;E2GUS), der in Fig. 10 dargestellt ist, wurde konstruiert, um die Nützlichkeit der deletierten E2-Region für den Ersatz einer Fremd-DNA z.B. für Zwecke der Gentherapie zu demonstrieren. Der Vektor Ad_{GV}Luc;E2GUS enthält den CMV Luciferase-Marker in der E1-Region und die E2 β-Glucuronidase in der E2A-Region. Der Vorgänger-Vektor (Ad_{GV}Luc.10) wurde verwendet, um 2931E2A-Zellen zu transfizieren; nachfolgendes Anfärben der resultierenden viralen Plaques hinsichtlich β-Glucuronidase unter Verwendung von X-glu zeigte praktisch keine blaue Farbe, i.e. es wurde keine β-Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen. Plaques, die sich von 293/E2A-Zellen bildeten, die mit dem Vektor Ad_{GV}Luc;E2GUS transfiziert wurden, erzeugten eine beträchtliche Menge blauer Farbe nach der Zugabe von X-glu.

[0132] Folglich kann eine in der E2A-Region eines adenoviralen Vektors substituierte Fremd-DNA funktionieren.

Beispiel 14

[0133] Dieses Beispiel legt ein Protokoll für die Erzeugung von 293/ORF6-Zelllinien und deren Verwendung zum Konstruieren eines adenoviralen Vektors, der in der E1- und E4-Region defizient ist, dar.

[0134] Die in der Fig. 11 dargestellte E4-ORF6-Expressionskassette wurde unter Verwendung von im Beispiel 9 beschriebenen Methoden konstruiert. Die Transfektion von 293-Zellen erfolgte mit pSMT/ORF6/puro, und transfizierte Zellen wurden für das Kultivieren in Standardmedium plus Puromycin selektiert. Die klonale Expansion erfolgte wie im Beispiel 8 beschrieben. Die resultierenden Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Exprimieren von E4-ORF6 nach Induktion und ihrer Fähigkeit zum Komplementieren E1- und E4-defizienter viraler Vektoren geprüft.

[0135] Puromycin-positive ($puro^+$; i.e. Puromycin-resistent) klonale Isolate von 293/ORF6-Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Exprimieren von ORF6 geprüft. Zellen wurden in Gegenwart von Puromycin vermehrt, um die Selektion aufrechtzuerhalten. Etablierte Monoschichten unabhängiger klonaler Isolate wurden 24 Stunden mit 100 μM $ZnCl_2$ induziert. Die Expression des ORF6-Gens wurde durch Northern-Blotting nachgewiesen, wobei das RNA-Transkript identifiziert wurde. Der relative Level der Expression (niedrigster (+) bis höchster +++++) jeder der geprüften Zelllinien ist in der Tabelle 3 dargelegt:

Tabelle 3

Zelllinie	ORF6-Expression	Zelllinie	ORF6-Expression
A2	+++	B8	++
A2-1	(+)	B8-1	(+)
A2-2	(+)	B8-2	+++
A2-3	-	B8-3	+
A2-4	(+)	B8-4	+
A2-5	(+)	B8-5	(+)
A2-6	-	B8-6	-
A2-7	(+)	B8-7	+
A2-8	-	B8-8	++
A2-9	(+)	B8-9	++
A2-10	-	B8-10	(+)
A2-11	-	B8-14	(+)
A2-12	+	B8-16	-
A2-13	-	B8-18	-
A2-14	+++++	B8-19	-
A2-24	-	B8-20	-
A2-59	-	B8-21	-
B8-22	-	B8-23	-
B8-24	-	B8-27	-

[0136] Das Ergebnis des Tests bezüglich der Expression des ORF6-Gens war, dass 53 % der Puromycin-resistenten Zelllinien positiv hinsichtlich der ORF6-Transkripte waren, und es wurde gezeigt, dass alle solchen positiven ORF6-Zelllinien für ORF6-Expression induzierbar waren.

[0137] PCR wurde auch verwendet, um die Insertion eines Gens in der E4-Deletionsregion eines adenoviralen Vektors nachzuweisen, wobei die Ergebnisse in der Fig. 12 dargestellt sind. Passagierte Lysate von Ad_{GV}-βgal.12-transfizierten Zellen wurden PCR unterworfen, die bestimmte Gensequenzen amplifizierte, die mit Wildtyp-E4 assoziiert sind, nämlich 3087 bp- und 367 bp-Fragmente. DNA von den Lysaten scheininfizierter 293/ORF6-Zellen (Bahn 1), Ad_{GV}βgal.10-infizierter Zellen (Bahn 2) und Ad_{GV}βgal.12-infizierter Zellen (Bahn 3) wurden einer Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Anfärbung unterworfen. Die Photographie mit reversem Kontrast, die in der Fig. 12 gezeigt ist, die von dem resultierenden angefärbten Gel ist, zeigt an, dass dem Ad_{GV}βgal.10-Vektor der Teil der E4-Region fehlt, der die 367-bp-Sequenz enthält, und dass dem Ad_{GV}βgal.12-Vektor der Teil der E4-Region fehlt, der die 3087-bp-Sequenz enthält.

[0138] Vermehren eines E4-deletierten Vektors wurde in den 293/ORF6-Zelllinien beobachtet. Die Zellen wurden bei einer Multiplizität der Infektion (moi) von 10 infiziert, und die Menge der Virusvermehrung wurde durch komplementäre Plaqueanalyse nach 5 Tagen Vermehrung aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in der Fig. 13 dargestellt, die ein Balkendiagramm zeigt, das die Plaque-bildenden Einheiten (PFU) pro Zelle auf der y-Achse und die geprüfte Zelllinie auf der x-Achse angibt. Für eine positive Kontrollvermehrung wurde die Zelllinie W162 verwendet, die eine Zelllinie ist, von der bekannt ist, dass sie die E4-Funktion komplementiert. Für die negative Kontrolle wurde die 293-Zelllinie verwendet, von der bekannt ist, dass die nur die E1-Funktion komplementiert. Die Zelllinien A2, B8, 216 und 406 unabhängige Isolate von 293/ORF6-Zelllinien, die variierende quantitative Komplementierung des E4-Deletionsvirus (d1366) zeigen.

[0139] Demgemäß wurden Zelllinien identifiziert, welche die E4-Funktion komplementieren, wobei die Vermehrung von E4-Deletionsvirus ermöglicht wird, von dem gezeigt wurde, dass es in der Lage ist, funktionie-

rende Fremd-DNAs zu beherbergen. Diese Zelllinien sind zum Komplementieren von Vektoren geeignet, die in der E1- und E4-Region des Virus doppelt defizient sind, wie jene, die in der obigen Ad_{GV}CFTR.12-Serie beschrieben und in **Fig. 14** gezeigt sind, die eine schematische Darstellung des Ad_{GV}β-gal.12-Vektors ist. Der Ad_{GV}β-gal.12-Vektor hat das β-Galactosidase-Gen in der E1-Region inseriert und eine deletierte E4-Region.

Beispiel 15

[0140] Dieses Beispiel illustriert Verwendungen adenoviraler Vektoren mit E1- und E4-Deletionen.

[0141] Das E4-Deletionsplasmid, pGBSΔE4, wurde so modifiziert, dass es mehrere einmalige Restriktionsstellen enthält. Diese Stellen werden verwendet, um irgendeine geeignete Fremd-DNA in diese Region zu klonieren, wobei der adenovirale E4-Promotor für die Expression verwendet wird. Wie oben angeführt, führte das Klonieren von β-Glucuronidase in dieser Region zu einem perfekt funktionalen und Fremd-DNA exprimierenden viralen Vektor. Demgemäß kann eine geeignete Fremd-DNA, die in die E1-Region gebracht ist, und eine andere geeignete Fremd-DNA in der E4-Region, beides im selben viralen Vektor, die jeweiligen Fremd-DNAs unter Verwendung der Kontrolle der E1- und E4-Promotoren oder, auf Wunsch, anderer Promotoren exprimieren.

[0142] Eine zweite Modifizierung der E4-Region ermöglicht die Expression einer geeigneten Fremd-DNA von einer Vielzahl heterologer Steuerelemente. Das Plasmidkonstrukt wurde so gebaut, dass mehrere Austausche geeignet gemacht werden können. Das Multiplasmid enthält die folgenden Merkmale, die geeignet ausgetauscht werden können:

1. ein adenovirales Segment, verwendet für homologe Rekombination, Ligation, um Fremd-DNA am E1-Ende oder E4-Ende des Vektors zu platzieren;
2. ein Promotorsegment;
3. ein Spleißsignalsegment;
4. ein Fremd-DNA-Segment;
5. ein Polyadenylierungssegment;
6. die adenovirale Verpackungssequenz;
7. die adenovirale ITR; und
8. alle Plasmid-DNA-Sequenzen, die nötig sind, um das Plasmid zu selektieren und in einem Bakterium sowie Gewebekultur eines Säugers zu kultivieren.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) Anmelder: GENVEC, Inc.

(ii) Titel der Erfindung: Komplementäre adenovirale Vektorsysteme und Zelllinien

(iii) Anzahl der Sequenzen: 4

(iv) Computerlesbare Form:

(A) Medientyp: Diskette

(B) Computer: IBM PC kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(v) Aktuelle Anmeldedaten

(A) Anmeldenummer: WO PCT/US95/07341

(B) Anmeldetag: 7. Juni 1995

(C) Klassifikation:

(vi) Frühere Anmeldedaten:

(A) Anmeldenummer: US 258416

(B) Anmeldetag: 10. Juni 1994

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO 1:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 32 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (synthetisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO 1:

CACTTAATTA AACGCCTACA TGGGGGTAGA GT

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO 2:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (synthetisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO 2:

CACTTAATTA AGGAAATATG ACTACGTCCG GCGT

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO 3:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 18 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (synthetisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO 3:

GCCGCCTCAT CCGCTTTT

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO 4:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 32 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strängigkeit: einzeln

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (synthetisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO 4:

CCGGAATTCC ACCATGGCGA GTCGGGAAGA GG

Patentansprüche

1. System, umfassend:
(i) einen adenoviralen Vektor, der ein adenovirales Genom aufweist, das eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen in der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms und gegebenenfalls eine Defizienz in der E3-Region des adenoviralen Genoms hat, und
(ii) eine Zelle mit einem zellulären Genom, das die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen in der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert,
wobei es keine Überlappung zwischen dem zellulären Genom und dem adenoviralen Genom gibt, um ein Rekombinationsereignis zwischen dem zellulären Genom und dem adenoviralen Genom zu vermitteln.

2. System nach Anspruch 1, worin der adenovirale Vektor ein adenovirales Genom mit einer Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und einer Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region des adenoviralen Genoms aufweist und die

Zelle ein zelluläres Genom hat, das die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert.

3. System nach Anspruch 1 oder 2, worin das zelluläre Genom eine Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E2A-Region, der E4-Region oder der E2A- und der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert.

4. System nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Zelle mindestens den offenen Leserahmen (ORF) 6 der R4-Region des adenoviralen Genoms aufweist.

5. System nach Anspruch 4, worin die Zelle mindestens ORF6 und keinen anderen ORF der E4-Region des adenoviralen Genoms aufweist.

6. System nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der adenovirale Vektor ein adenovirales Genom aufweist, das eine Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region hat, und die Zelle ein zelluläres Genom hat, das die Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region in trans komplementiert.

7. System nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Zelle eine 293-Zelle ist.

8. System nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Zelle eine A549-Zelle ist.

9. System nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin das adenovirale Genom ein humanes adenovirales Genom ist.

10. System nach Anspruch 9, worin das adenovirale Genom ein Ad5 adenovirales Genom ist.

11. Verfahren zum Vermehren eines adenoviralen Vektors, welches Verfahren umfasst:
(a) Bereitstellen eines adenoviralen Vektors, der ein adenovirales Genom aufweist, das eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen in der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms und gegebenenfalls eine Defizienz in der E3-Region des adenoviralen Genoms hat,
(b) Bereitstellen einer Zelle mit einem zellulären Genom, das die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen in der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert, wobei es keine Überlappung zwischen dem zellulären Genom und dem adenoviralen Genom gibt, um ein Rekombinationsereignis zwischen dem zellulären Genom und dem adenoviralen Genom zu vermitteln, und
(c) Vermehren des adenoviralen Vektors in der Zelle.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der adenovirale Vektor ein adenovirales Genom mit einer Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und einer Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region aufweist und die Zelle ein zelluläres Genom hat, das die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms und die Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen in der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das zelluläre Genom eine Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E2A-Region, der E4-Region oder der E2A- und der E4-Region des adenoviralen Genoms in trans komplementiert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei die Zelle mindestens den offenen Leserahmen (ORF) 6 der R4-Region des adenoviralen Genoms aufweist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Zelle mindestens ORF6 und keinen anderen ORF der E4-Region des adenoviralen Genoms aufweist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei der adenovirale Vektor ein adenovirales Genom aufweist, das eine Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region hat, und die Zelle ein zelluläres Genom hat, das die Defizienz in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region in trans komplementiert.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei die Zelle eine 293-Zelle ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei die Zelle eine A549-Zelle ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 18, wobei das adenovirale Genom ein humanes adenovirales Genom ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das adenovirale Genom ein Ad5 adenovirales Genom ist.

21. Zelle mit einem zellulären Genom, das eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region eines Adenovirus und eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region eines Adenovirus in trans komplementiert, welche Zelle mit 293/E4 bezeichnet wird.

22. Zelle mit einem zellulären Genom, das eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region eines Adenovirus und eine Defizienz in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E2A-Region und der E4-Region eines Adenovirus in trans komplementiert, welche Zelle mit 293/E4/E2A bezeichnet wird.

23. 293-Zelllinie, in deren nukleäres Genom der offene Leserahmen 6 (ORF-6) und kein anderer offener Leserahmen der E4-Region eines adenoviralen Genoms inseriert ist, operativ verknüpft mit einem induzierbaren Promotor oder einem reprimierbaren Promotor, welche Zelllinie einen adenoviralen Vektor, der ein adenovirales Genom mit einer Deletion der E1- und E4-Region des adenoviralen Genoms aufweist, in trans komplementiert.

24. 293-Zelllinie nach Anspruch 23, die mit 293/ORF-6 bezeichnet wird.

25. Plasmid, das einen Leserahmen ORF6 einer E4-Region eines Adenovirusgenoms unter der Kontrolle eines heterologen induzierbaren Promotors aufweist.

26. Replikationskompetenter adenovirenfreier Stock eines rekombinanten adenoviralen Vektors, wobei der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region und einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms sowie gegebenenfalls in der E3-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

27. Stock nach Anspruch 26, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E2A-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

28. Stock nach Anspruch 26, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

29. Stock nach einem der Ansprüche 26 bis 28, worin der adenovirale Vektor in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

30. Stock nach einem der Ansprüche 26 bis 28, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region, der E2A-Region und der E4-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

31. Stock nach einem der Ansprüche 26 bis 30, worin der adenovirale Vektor in einer Zelle hergestellt wird, welche die defizienten essentiellen Genfunktionen des adenoviralen Vektors in trans komplementiert, wobei es keine Überlappung zwischen dem Genom der Zelllinie und des adenoviralen Vektors gibt, um ein Rekombinationsereignis zu vermitteln, wodurch es zu einem replikationskompetenten adenoviralen Vektor kommt.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung, die rekombinante adenovirale Vektoren und einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger enthält, wobei jeder rekombinante adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region und einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E2A-Region und/oder der E4-Region des adenoviralen Genoms sowie gegebenenfalls in der E3-Region des adenoviralen Genoms defizient ist und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung keine replikationskompetenten Adenoviren enthält.

33. Zusammensetzung nach Anspruch 32, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiel-

len Genfunktionen der E2A-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

34. Zusammensetzung nach Anspruch 32, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E4-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

35. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 32 bis 34, worin der adenovirale Vektor in allen essentiellen Genfunktionen der E1-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

36. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 32 bis 34, worin der adenovirale Vektor in einer oder mehreren essentiellen Genfunktionen der E1-Region, der E2A-Region und der E4-Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

37. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 32 bis 36, worin der adenovirale Vektor in einer Zelle hergestellt wird, welche die defizienten essentiellen Genfunktionen des adenoviralen Vektors in trans komplementiert, wobei es keine Überlappung zwischen dem Genom der Zelllinie und des adenoviralen Vektors gibt, um ein Rekombinationsereignis zu vermitteln, wodurch es zu einem replikationskompetenten adenoviralen Vektor kommt.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

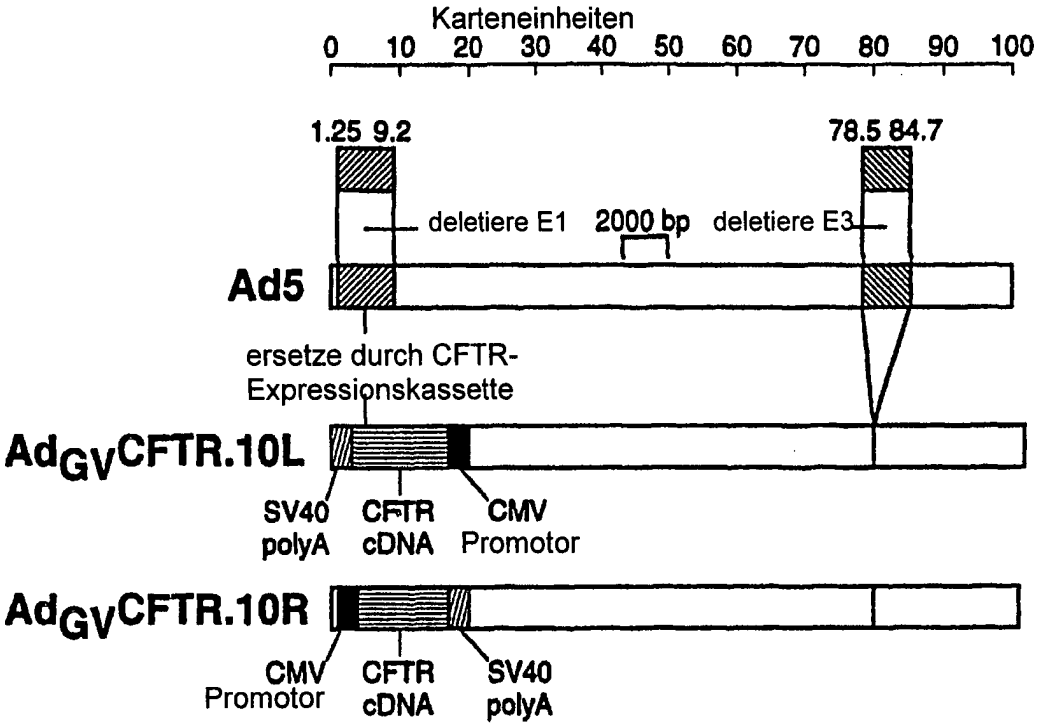


FIG.1

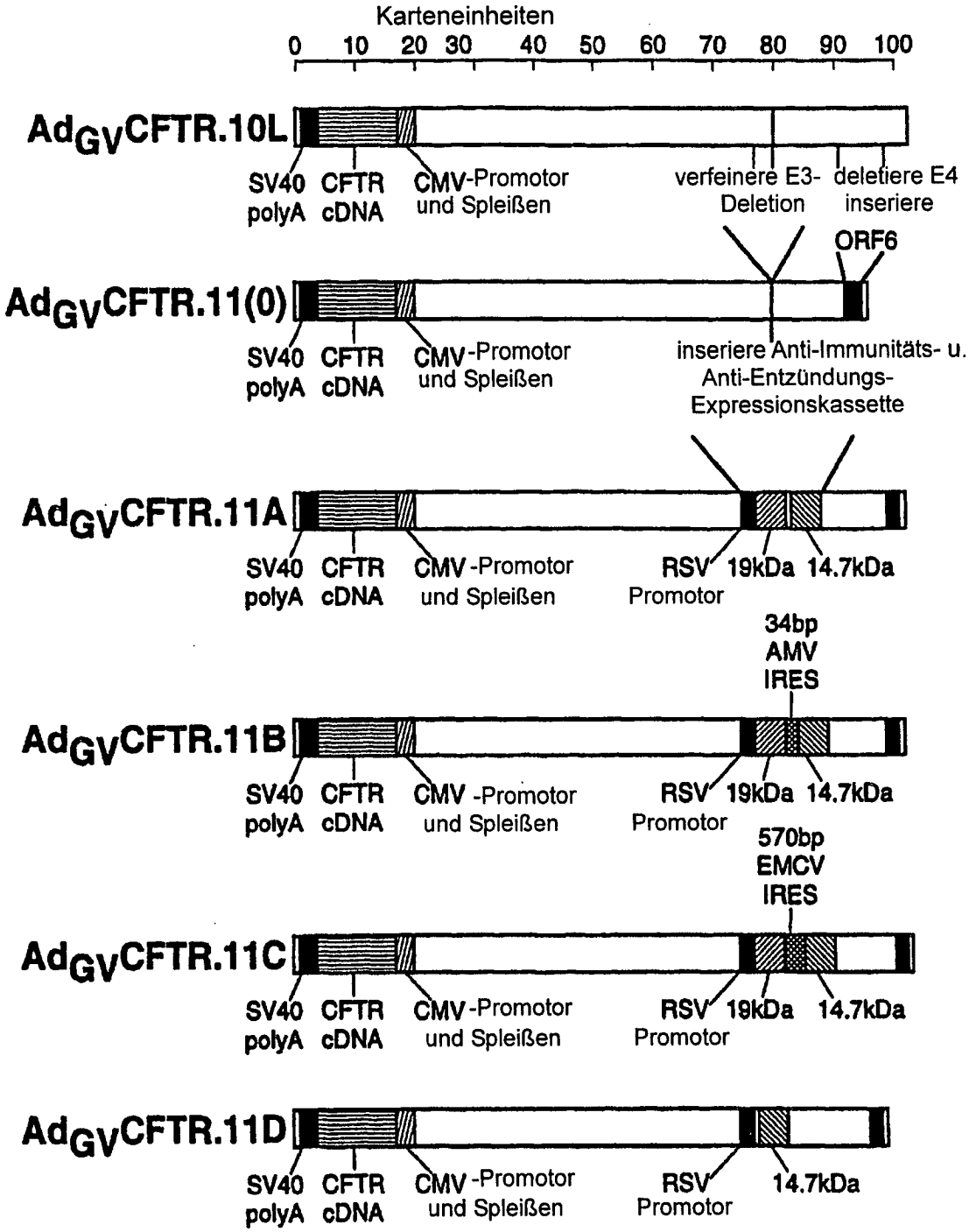

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AdGVCFTR.10L
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
verfeinere E3-Deletion
deletiere E4 inseriere
ORF6
AdGVCFTR.11(0)
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
inseriere Anti-Immunitäts- u. Anti-Entzündungs-Expressionskassette
AdGVCFTR.11A
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
RSV Promotor
19kDa
14.7kDa
34bp AMV IRES
AdGVCFTR.11B
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
RSV Promotor
19kDa
14.7kDa
570bp EMCV IRES
AdGVCFTR.11C
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
RSV Promotor
19kDa
14.7kDa
AdGVCFTR.11D
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
RSV Promotor
14.7kDa

FIG.2

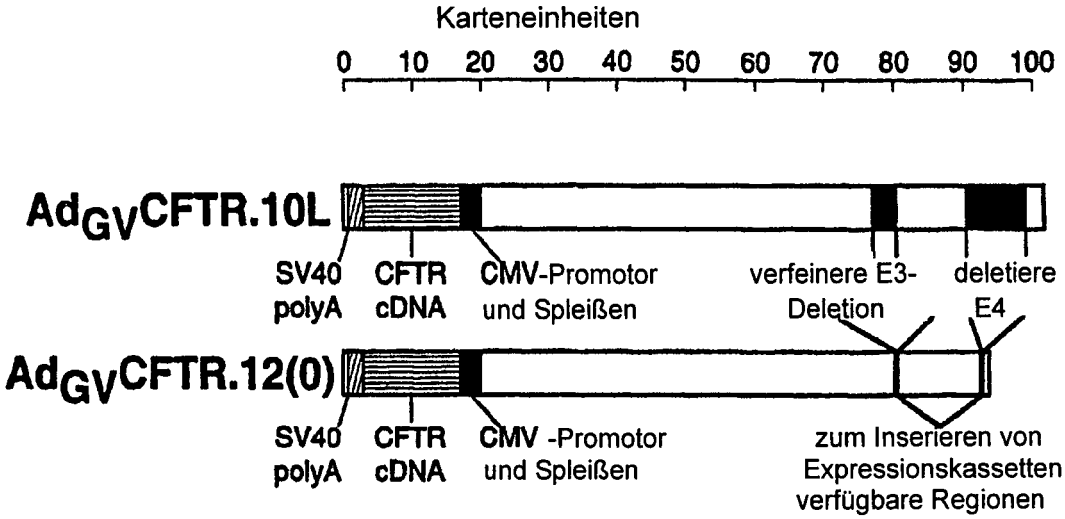

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AdGVCFTR.10L
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
verfeinere E3-Deletion
deletiere E4
AdGVCFTR.12(0)
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV -Promotor und Spleißen
zum Inserieren von Expressionskassetten verfügbare Regionen

FIG.3

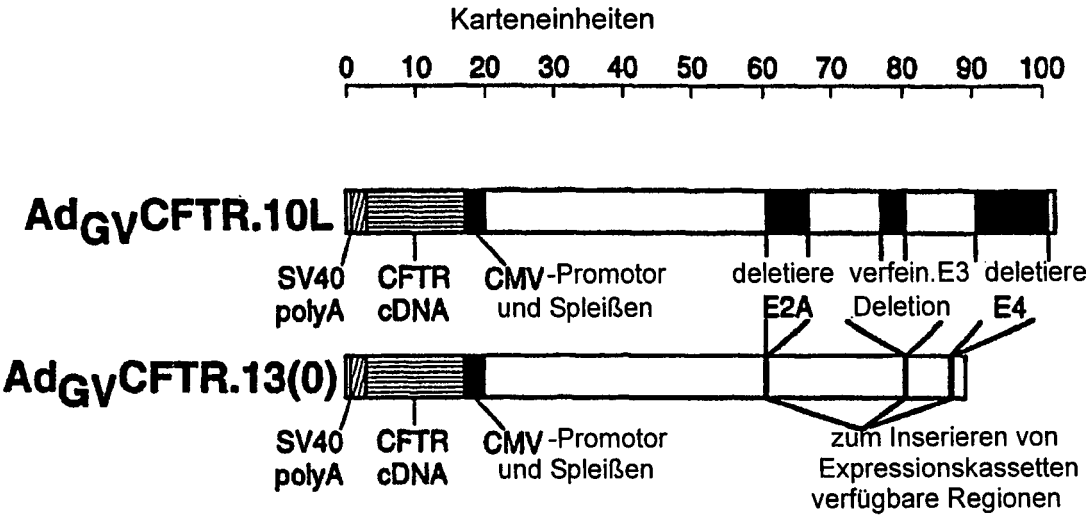

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AdGVCFTR.10L
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV-Promotor und Spleißen
deletiere E2A
verfein.E3 Deletion
deletiere E4
AdGVCFTR.13(0)
SV40 polyA
CFTR cDNA
CMV -Promotor und Spleißen
zum Inserieren von Expressionskassetten verfügbare Regionen

FIG.4

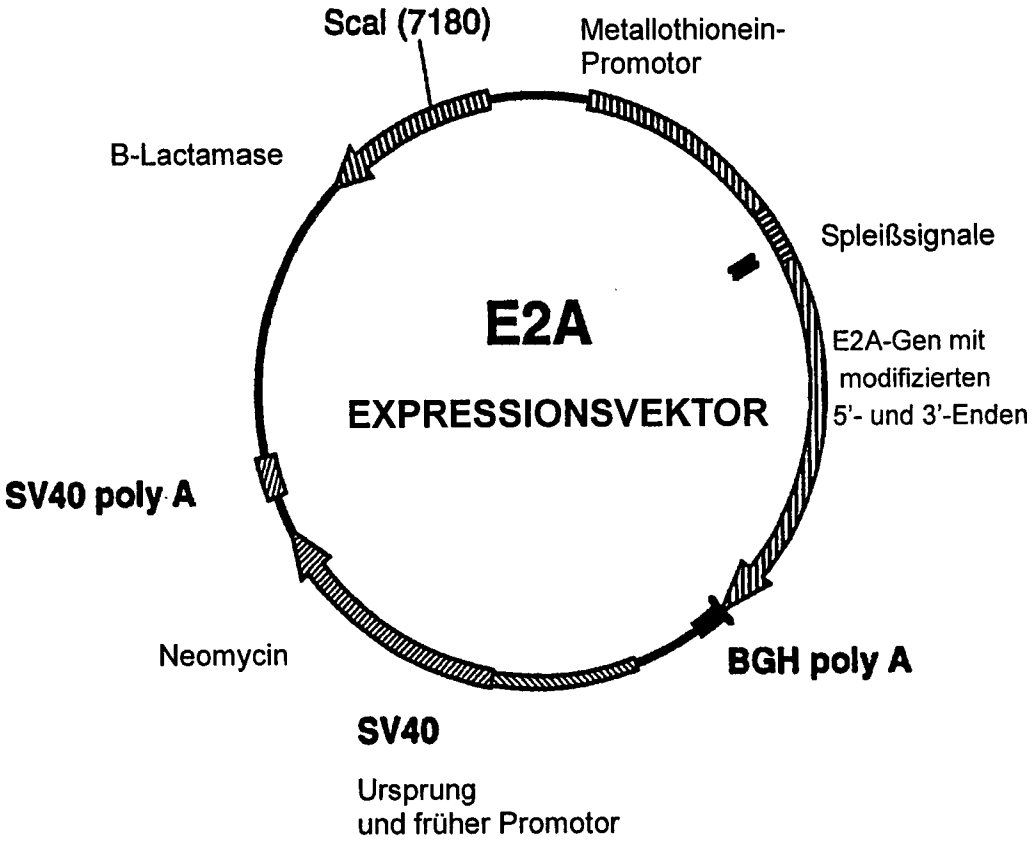

ScaI (7180)
Metallothionein-
Promotor
B-Lactamase
Spleißsignale
E2A
EXPRESSIONSVEKTOR
E2A-Gen mit
modifizierten
5'- und 3'-Enden
SV40 poly A
Neomycin
BGH poly A
SV40
Ursprung
und früher Promotor

FIG. 5

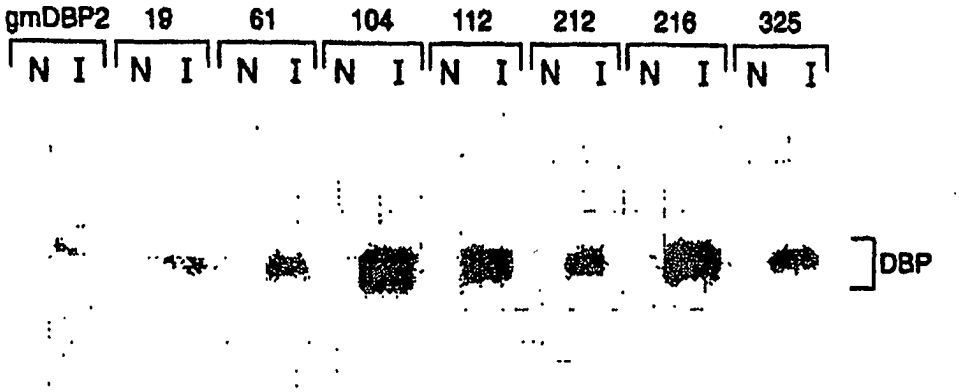

gmDBP2
19
61
104
112
212
216
325
N I N I N I N I N I N I N I N I
DBP

FIG. 6

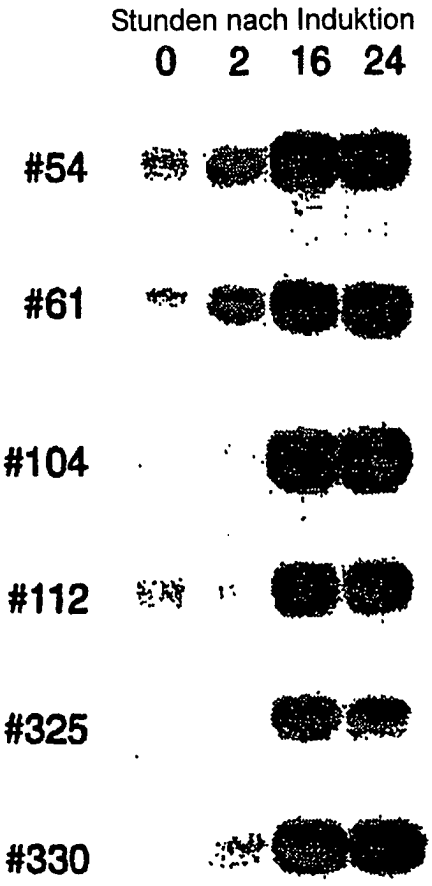

Stunden nach Induktion
0 2 16 24
#54
#61
#104
#112
#325
#330

FIG. 7

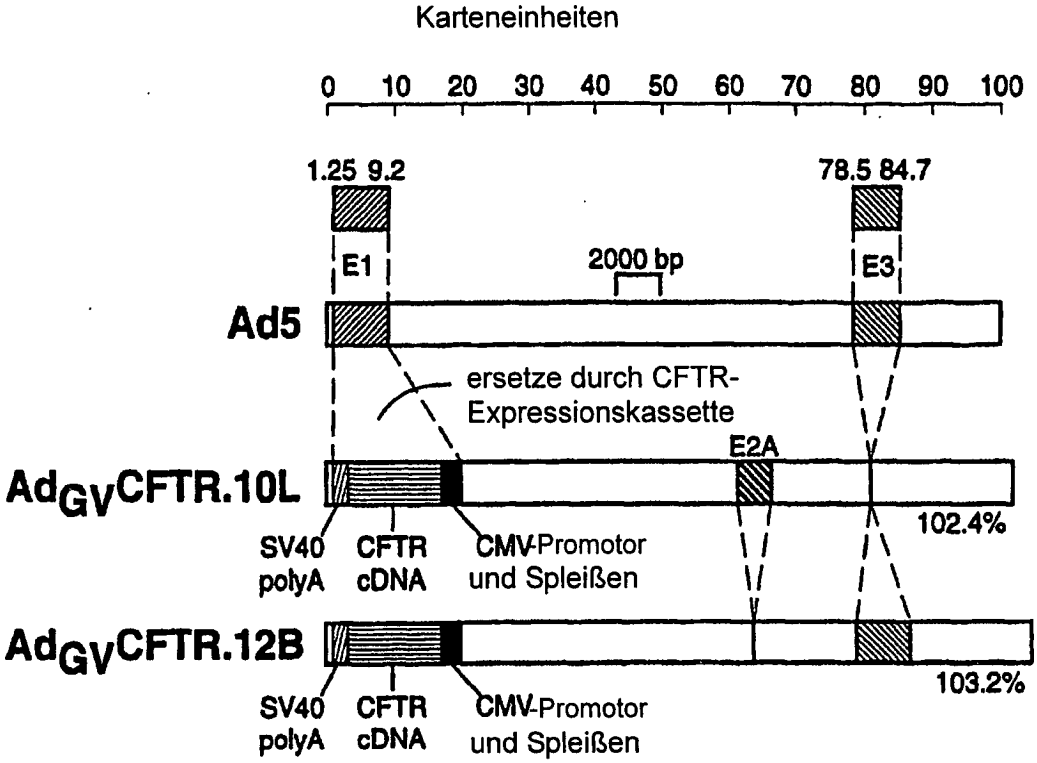

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
1.25 9.2
78.5 84.7
E1
2000 bp
E3
Ad5
ersetze durch CFTR-
Expressionskassette
E2A
AdGVCFTR.10L
102.4%
SV40
polyA
CFTR
cDNA
CMV-Promotor
und Spleißen
AdGVCFTR.12B
103.2%
SV40
polyA
CFTR
cDNA
CMV-Promotor
und Spleißen

FIG.8

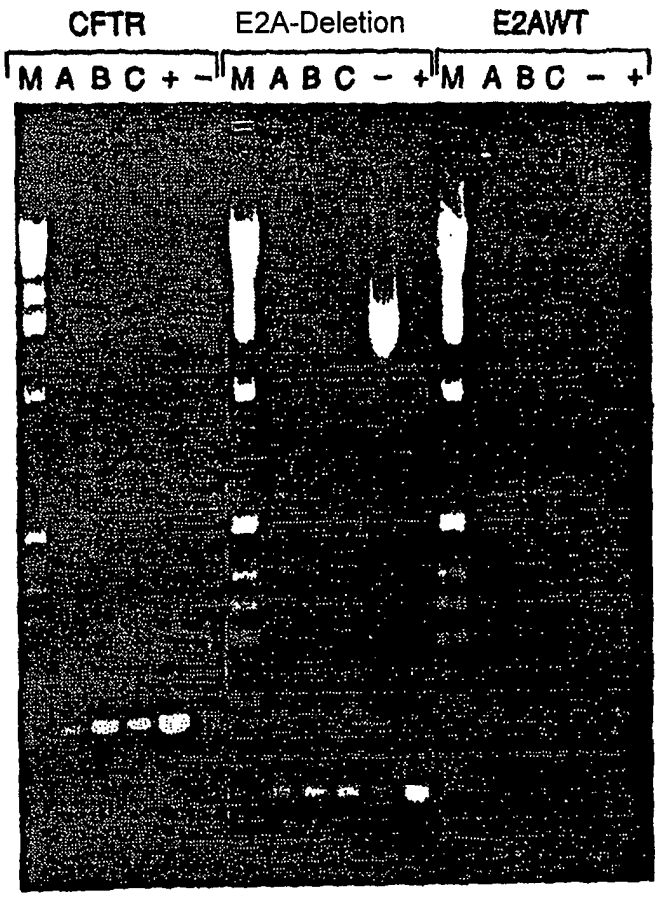


FIG. 9

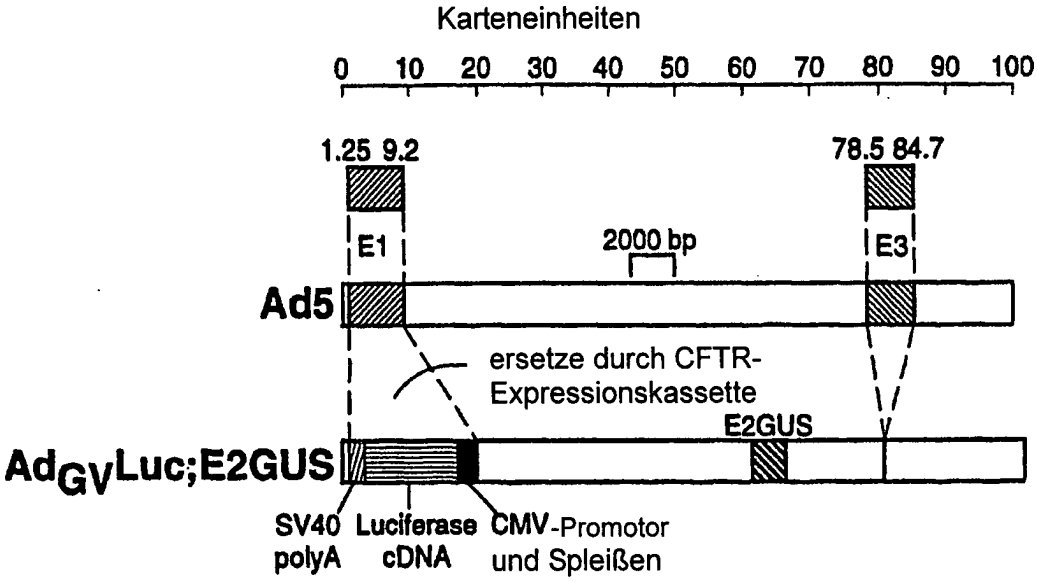

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
1.25 9.2
78.5 84.7
E1
2000 bp
E3
Ad5
ersetze durch CFTR-
Expressionskassette
E2GUS
Ad$_{GV}$Luc;E2GUS
SV40 polyA
Luciferase cDNA
CMV-Promotor und Spleißen

FIG.10

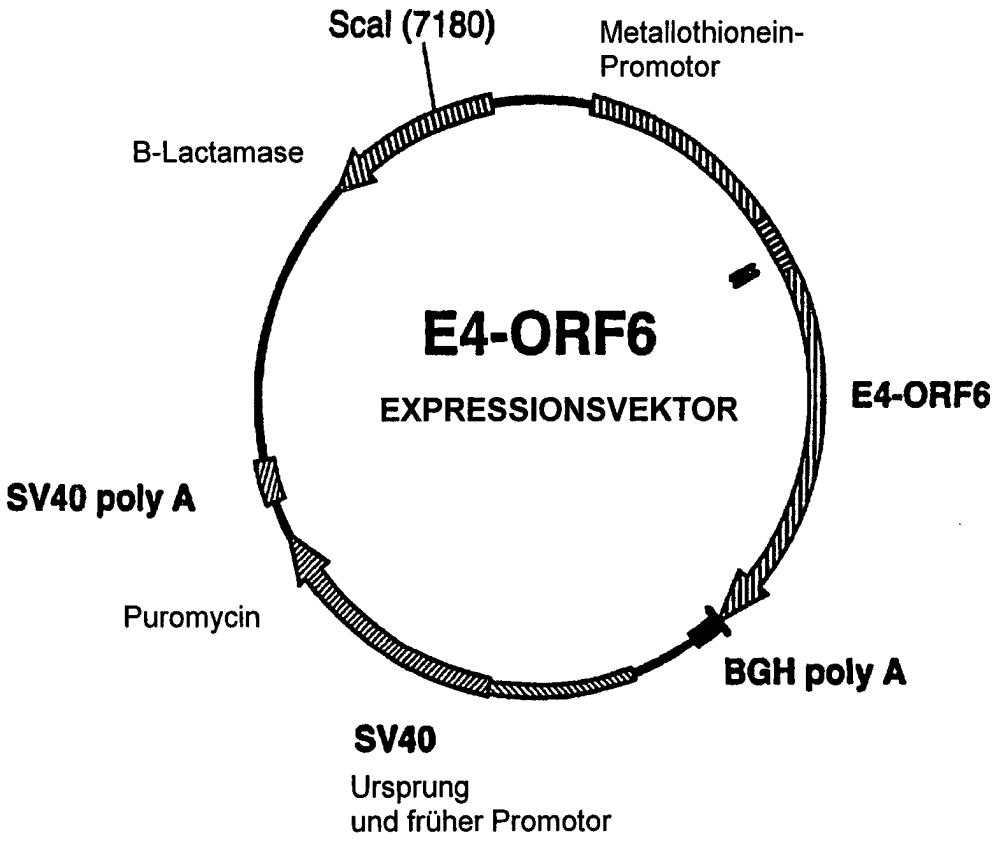

ScaI (7180)
Metallothionein-
Promotor
B-Lactamase
E4-ORF6
EXPRESSIONSVEKTOR
E4-ORF6
SV40 poly A
Puromycin
BGH poly A
SV40
Ursprung
und früher Promotor

FIG. 11

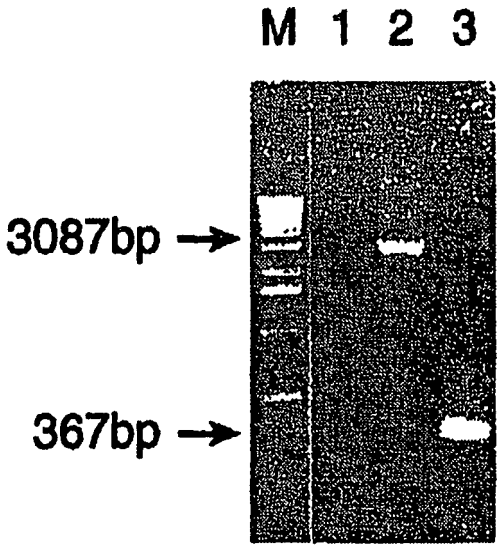


FIG. 12

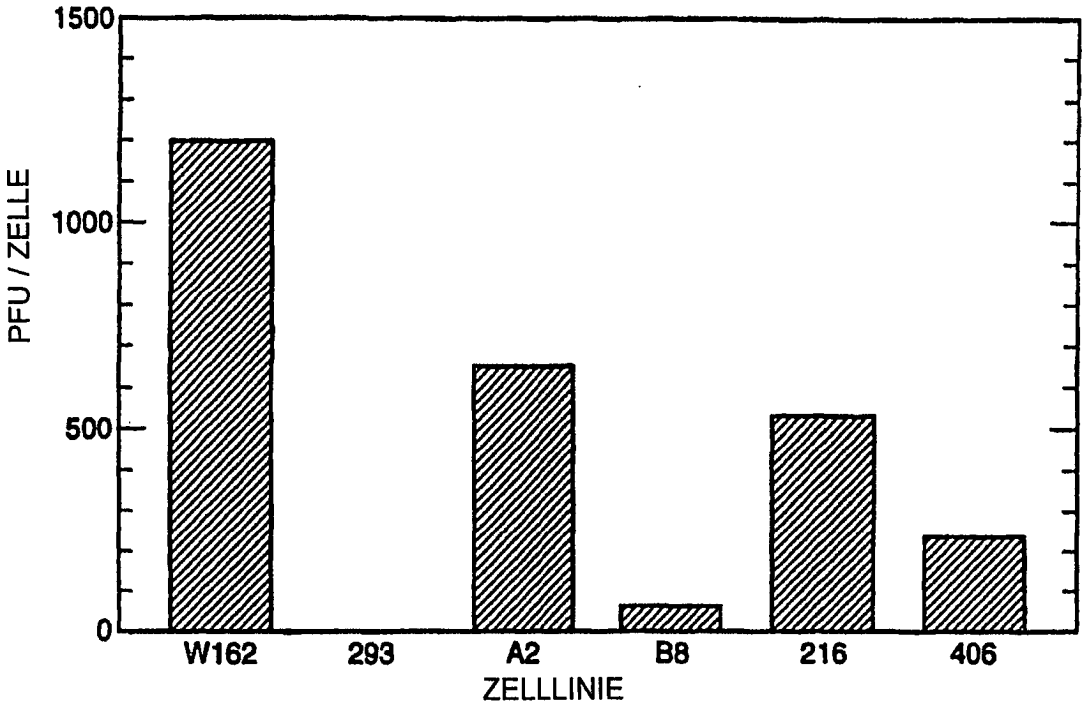


FIG. 13

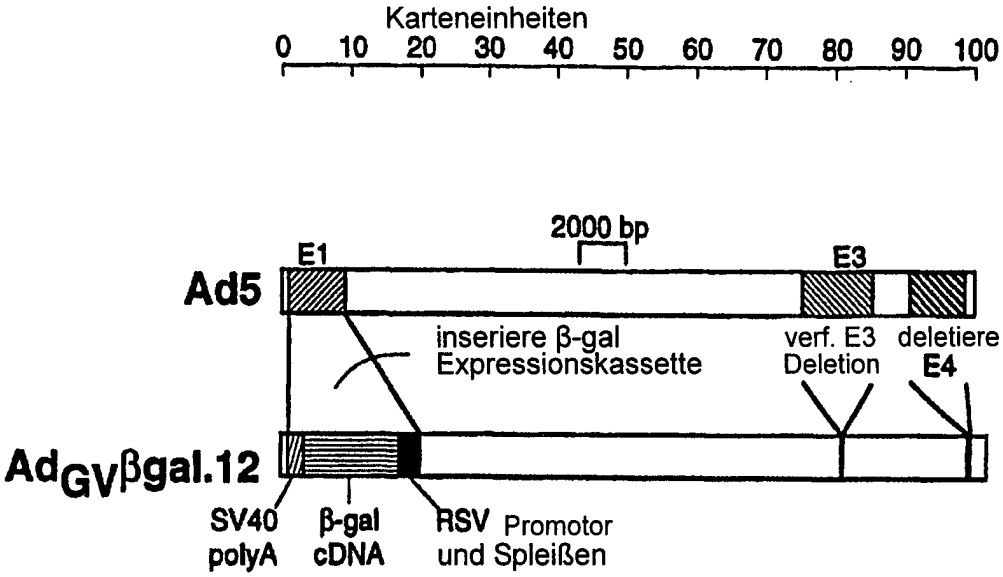

Karteneinheiten
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
2000 bp
E1
E3
Ad5
inseriere β-gal
Expressionskassette
verf. E3
Deletion
deletiere
E4
AdGVβgal.12
SV40
polyA
β-gal
cDNA
RSV Promotor
und Spleißen

FIG.14