



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 38 432 T2 2008.12.11**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 920 514 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 38 432.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/14719

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 938 497.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/007865

(86) PCT-Anmeldetag: 21.08.1997

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 26.02.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.06.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 02.01.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11.12.2008

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/34 (2006.01)**

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

701124 21.08.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Genvec, Inc., Rockville, Md., US

(72) Erfinder:

WICKHAM, Thomas J., Falls Church, VA 22043,
US; ROELVINK, Petrus W., Olney, MD 20832, US;
KOVESDI, Imre, Rockville, MD 20852, US

(74) Vertreter:

HOEGER, STELLRECHT & PARTNER
Patentanwälte, 70182 Stuttgart

(54) Bezeichnung: **TARGETING VON ADENOVIREN MIT HILFE VON KONFORMATIONSBECHRÄNKTEM PEPTID-MOTIVEN**

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 eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung**TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein, welches eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz umfasst. Die nicht-native Aminosäuresequenz codiert ein Peptid-Motiv, welches ein Epitop für einen Antikörper oder einen Liganden für einen Zelloberflächenrezeptor umfasst, welches zum Zell-Targeting verwendet werden kann. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, welche ein derartiges chimäres Adenovirus-Fiberprotein umfassen, und Verfahren zur Verwendung derartiger Vektoren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Trotz ihrer vorher schlechten Reputation als Hauptkrankheitserreger, welche zu zahlreichen Infektionskrankheiten führen, haben Adenoviren (und insbesondere replikationsdefiziente Adenoviren) in jüngerer Zeit beträchtliche Anerkennung als hocheffektive virale Vektoren für die Gentherapie erlangt. Adenovirale Vektoren bieten aufregende Möglichkeiten auf diesem neuen Gebiet der Therapeutik, basierend auf ihrer hohen Gentransfereffizienz, ihrer beträchtlichen Transportkapazität und ihrer Fähigkeit, ein breites Spektrum an Zelltypen zu infizieren (Crystal, *Science*, 270, 404–410 (1995); (Curiel et al., *Human Gene Therapy*, 3, 147–154 (1992); Internationale Patentanmeldung WO 95/21259).

[0003] Aufgrund dieser wünschenswerten Eigenschaften von Adenoviren hat man rekombinante adenovirale Vektoren für den zellgerichteten Transfer eines oder mehrerer rekombinanter Gene in erkrankte Zellen oder Gewebe, die der Behandlung bedürfen, verwendet. Mit Bezug auf die allgemeine Struktur eines Adenovirus unter dem Elektronenmikroskop ähnelt ein Adenovirus-Partikel einer Raumkapsel mit abstehenden Antennen (Xia et al., *Structure*, 2, 1259–1270 (1994)). Das virale Kapsid umfasst mindestens sechs verschiedene Polypeptide, umfassend 240 Kopien des trimeren Hexons (d. h. Polypeptid II) und jeweils 12 Kopien der pentameren Penton-(Polypeptid III)-Basis und der trimeren Fiber (Xia et al., *supra*).

[0004] Ein Adenovirus verwendet zwei separate Zellrezeptoren, die beide präsent sein müssen, um an eine Zelle anzuheften und sie zu infizieren (Wickham et al., *Cell*, 73, 309–319 (1993)). Als Erstes heftet das Adenovirus-Fiberprotein das Virus an eine Zelle durch Bindung an einen bisher noch unidentifizierten Rezeptor. So dann bindet die Pentonbasis an α_v -Integrine, die eine Familie von heterodimeren Zelloberflächenrezeptoren sind, welche zelluläre Adhäsion an die extrazellulären Matrixmoleküle sowie andere Moleküle vermitteln (Hynes, *Cell*, 69, 11–25 (1992)). Wenn ein Adenovirus einmal an eine Zelle angeheftet ist, durchläuft es Rezeptor-vermittelte Internalisierung in Clathrin-“coated” endozytische Vesikel und wird schrittweise zerlegt bis auf das virale doppelsträngige Genom, und sodann wird das Genom (und einige begleitende virale Komponenten) zu dem Zellkern transportiert und somit eine Infektion initiiert (Svensson et al., *J. Virol.*, 51, 687–694 (1984); Chandonnet et al., *Virology*, 40, 462–477 (1970); Greber et al., *Cell*, 75, 477–486 (1993); Fitzgerald et al., *Cell*, 32, 607–617 (1983)).

[0005] Das Fiber-Monomer besteht aus einem aminoterminalen Schwanz (welcher nicht-kovalent an die Pentonbasis anheftet), einem Schaft (dessen Länge zwischen verschiedenen Virus-Serotypen variiert), und einer carboxyterminalen globulären Knob-Domäne (die notwendig und ausreichend ist für Wirtszellbindung) (Devaux et al., *J. Molec. Biol.*, 215, 567–588 (1990); Xia et al., *supra*; Green et al., *EMBO J.*, 2, 1357–1365 (1983); Henry et al., *J. Virology*, 68(8), 5239–5246 (1994)). Die Regionen, welche notwendig sind für die Fiber-Trimerisierung (die für die Pentonbasis-Bindung erforderlich ist), sind ebenfalls in der Knob-Region des Proteins lokalisiert (Henry et al. (1994), *supra*; Novelli et al., *Virology*, 185, 365–376 (1991)). Die Fiber und das Hexon bestimmen zusammen die Serotyp-Spezifität des Virus und umfassen ferner die Haupt-Antigendeterminanten des Virus (Watson et al., *J. Gen. Virol.*, 69, 525–535 (1988)).

[0006] Diese Fähigkeit der adenoviralen Fiber und des Hexon-Proteins, als Ziele für eine Wirtszimmunantwort zu fungieren, hat anfänglich die Versuche zur adenoviralen Gentherapie behindert. Namentlich sind Änderungen in der Genexpression, welche durch Adenovirus vermittelt wird, nicht permanent, weil der Vektor nicht stabil aufrechterhalten wird. Jedoch können nach einer Readministration des adenoviralen Vektors, um die therapeutische Antwort zu prolongieren, neutralisierende Antikörper gegen die adenovirale Fiber und/oder Hexon-Proteine hervorgerufen werden und so die Proteinproduktion umgangen werden (Wohlfart, *J. Virology*, 62, 2321–2328 (1988); Wohlfart et al., *J. Virology*, 56, 896–903 (1985)). Glücklicherweise wird eine derartige Immunantwort nicht bei allen Verwendungen von adenoviralen Vektoren erzeugt. Ähnlich ist nun bekannt, dass, wenn die Gegenwart derartiger neutralisierender Antikörper adenovirale Vektoren vermitteltes intrazelluläres Delivery verhindert, statt dessen ein anderer adenoviraler Vektor, z. B. ein adenoviraler Vektor anderen Serotyps

oder ein anderer Adenovirus-Vektor, dem das Epitop fehlt, gegen das der Antikörper gerichtet ist, verwendet werden kann (Crompton et al., J. Gen. Virol., 75, 133–139 (1994)). Ferner tauchen ständig neuere und effektive Techniken auf, um zu verhindern, dass eine Antikörperantwort gegen das Virus eine effektive Readministration eines adenoviralen Vektors ausschließt (siehe z. B. die Internationale Patentanmeldung WO 96/12406; Mistrangeli et al., Human Gene Therapy, 7, 79–87 (1996)).

[0007] Die adenovirale vermittelte Gentherapie bleibt also weiterhin sehr vielversprechend, insbesondere mit Bezug auf das Umdirigieren des Adenovirus-Tropismus. Namentlich, obschon Adenovirus in eine beeindruckende Vielfalt von Zelltypen eintreten kann (siehe z. B. Rosenfeld et al., Cell, 68, 143–155 (1992); Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 2581–2584 (1992); Lemarchand et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6482–6486 (1992); Anton et al., J. Virol., 69, 4600–4606 (1995); LaSalle et al., Science, 259, 988–990 (1993)), scheint es immer noch Zellen zu geben (z. B. Lymphocyten), die nicht leicht zugänglich sind für Adenovirus-vermitteltes Gen-Delivery (siehe z. B. Grubb et al., Nature, 371, 802–806 (1994); Dupuit et al., Human Gene Therapy, 6, 1185–1193 (1995); Silver et al., Virology, 165, 377–387 (1988); Horvath et al., J. Virol., 62(1), 341–345 (1988)). Ähnlich hat man auch beim Targeting auf Zellen, die leicht von Adenovirus infiziert werden, in vielen Fällen sehr hohe Levels von Adenovirus-Partikeln verwendet, um Transduktion zu erzielen. Dies ist nachteilig insofern, als jegliche Immunantwort, die mit adenoviraler Infektion assoziiert ist, zwangsläufig verschlimmert würde bei Verwendung solch hoher Levels.

[0008] Demgemäß suchen Forscher nach neuen Wegen zum selektiven Einführen von Adenoviren in Zellen, welche durch Adenoviren nicht infiziert werden können, und zum Erhöhen der Effektivität von adenoviralem Delivery in Zellen, welche von Adenoviren infiziert werden. Das allgemeine Prinzip des Umdirigierens des Adenovirus-Tropismus ist "straightforward". Bei einem üblichen Ansatz kann durch Inkorporation von Peptidbindungsmodulen in ein Adenovirus-Coat-Protein, z. B. Fiberprotein, das Virus so umdirigiert werden, dass es an eine Zelloberflächen-Bindungsstelle bindet, an die es normalerweise nicht bindet (siehe z. B. Michael et al., Gene Therapy, 2, 660–668 (1995); Internationale Patentanmeldung WO 95/26412; Internationale Patentanmeldung WO 94/10323; Internationale Patentanmeldung WO 95/05201). Ein Peptidbindungsmodul ist eine kurze Sequenz von Aminosäuren, z. B. ein Epitop für einen Antikörper (z. B. einen spezifischen Antikörper), oder ein Ligand für eine Zelloberflächen-Bindungsstelle (z. B. einen Rezeptor), welches zum Zell-Targeting verwendet werden kann. Wenn das Peptidmodul bindet, z. B. an seine korrespondierende Zelloberflächen-Bindungsstelle, an die Adenovirus normalerweise nicht oder nur mit geringer Affinität bindet, dann kann das Adenovirus, welches das Peptidmodul trägt, auf spezifische und/oder effizientere Weise selektiv Gene in die Zelle liefern, welche diese Bindungsstelle umfasst.

[0009] Jedoch ist die Maßnahme, ein bekanntes Peptidmodul einfach in das Fiberprotein eines Adenovirus zu inkorporieren, möglicherweise nicht ausreichend, um dem Virus zu gestatten, eine Zielzelle zu binden und sie effektiv zu transduzieren. Die Effektivität des Peptidmoduls beim Umdirigieren der Virusbindung auf eine neue Zelloberflächen-Bindungsstelle hängt von mehreren Faktoren ab, einschließlich der Verfügbarkeit des Peptidmoduls zum Binden an den Zelloberflächenrezeptor, der Affinität des Peptidmoduls für die Zelloberflächen-Bindungsstelle und der Anzahl von Zielbindungsstellen (z. B. Rezeptoren), welche auf der Zelle präsent sind, auf die das Gen-Delivery zielgerichtet ist. Während der letztgenannte Faktor derzeit nicht manipuliert werden kann in in-vivo-Applikationen, scheinen die beiden erstgenannten Raum für Verbesserungen zu bieten hinsichtlich der vorherrschenden adenovirale vermittelten Gentherapie. Zum Beispiel haben frühere Forscher nicht berücksichtigt, dass, wenn das Peptidmodul innerhalb der Struktur des Fiberproteins verdeckt ("buried") und/oder durch die umgebende Struktur des Proteins maskiert ist, das Peptidmodul nicht in der Lage sein wird, mit seinem Ziel zu interagieren und es zu binden. Ähnlich haben frühere Forscher nicht angesprochen, dass es die Affinität des Peptidmoduls für die Zelloberflächen-Bindungsstelle (z. B. den Rezeptor) ist, die bestimmt, wie effizient das Virus einen Bindungskontakt mit dem Zielrezeptor initiieren und aufrechterhalten kann, so dass Zellinfektion/-transduktion resultiert.

[0010] Es besteht also weiterhin Bedarf an verbesserten Verfahren zum Zell-Targeting und an adenoviralen Vektoren, durch welche dieses erreicht werden kann. Die vorliegende Erfindung sucht mindestens einige der im Vorstehenden genannten Probleme rekombinanter adenoviraler Gentherapie zu überwinden. Insbesondere liegt ein Ziel der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung besserer Vektoren und Verfahren zum Zell-Targeting durch Bereitstellung eines chimären Adenovirus-Fiberproteins, welches ein eingeschränktes Peptidmodul umfasst. Diese und weitere Ziele und Vorteile der vorliegenden Erfindung sowie zusätzliche erfindungsgemäße Merkmale ergeben sich aus der nachfolgenden Detailbeschreibung.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein bereit, welches sich von dem wildtypischen (d. h. nativen) Adenovirus-Fiberprotein unterscheidet durch die Einführung einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in einer konformationell beschränkten (d. h. eingeschränkten) Weise, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz durch die Anwesenheit einer RGD-Sequenz und eines oder mehrerer Cystein-Paare eingeschränkt ist und wobei die nicht-native Aminosäuresequenz zur Bildung einer nicht-präexistierenden Schleife infolge Interaktion zwischen den Cysteinen befähigt ist oder in die oder an Stelle der nativen Aminosäuresequenz einer präexistierenden Schleife des Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins inseriert ist.

[0012] Die Einführung resultiert in der Insertion oder Erzeugung eines eingeschränkten Peptidmotivs, welches dem resultierenden chimären Adenovirus-Fiberprotein eine Fähigkeit verleiht, einen Zelleintritt eines Vektors zu dirigieren, welcher das chimäre Fiberprotein umfasst, der effizienter ist als der Zelleintritt eines Vektors, welcher bis auf die Tatsache, dass er ein Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein umfasst, identisch ist, und/oder eine Fähigkeit, den Eintritt in Zellen zu dirigieren, die Adenovirus, welches das Wildtyp-Fiberprotein umfasst, typischerweise nicht infiziert/transduziert. Die vorliegende Erfindung stellt ferner Vektoren bereit, welche das chimäres Adenovirus-Fiberprotein umfassen, und Verfahren zur Konstruktion und Verwendung derartiger Vektoren.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0013] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, welches das erfindungsgemäße Verfahren illustriert zum Targeting von Adenovirus durch konformationelle Beschränkung einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in einer exponierten Schleife des Fiber-Knob, um ein Peptidbindungsmotiv zu umfassen.

[0014] [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, welches das erfindungsgemäße Verfahren illustriert zum Targeting von Adenovirus durch Inkorporieren einer konformationell eingeschränkten nicht-nativen Aminosäuresequenz (d. h. einer Sequenz, welche eine nicht-präexistierende Schleife umfasst) in den C-Terminus des Fiberproteins, um ein Peptidbindungsmotiv zu umfassen.

[0015] [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, welches das Plasmid p193(F5*) zeigt, das zur Konstruktion von Adenovirus-Fiber-Chimären verwendet wird.

[0016] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, welches das Plasmid p193 F5F2K zeigt, das ein chimäres Fiberprotein codiert.

[0017] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, welches das Plasmid p193 F5F2K(RKKK2) zeigt, das ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein codiert, umfassend die Heparin-Bindungsdomäne (d. h. RKKKRKKK) oder Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys [SEQ ID NO:1]) in der exponierten HI-Schleife des Ad2-Fiber-Knob.

[0018] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm, welches das Plasmid p193 F5F2K(FLAG) zeigt, das ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein codiert, umfassend das FLAG-Epitop (d. h. DYKDDDDK oder Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys [SEQ ID NO:2]) in der exponierten HI-Schleife des Ad2-Fiber-Knob.

[0019] [Fig. 7](#) ist ein Balkendiagramm, welches β -Galactosidase-Expression (% Kontrolle) in 293-Zellen zeigt, transduziert entweder mit AdZ.F5F2K(RKKK2) (geschlossene Balken) oder AdZ (offene Balken) in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit (Fiber) von löslichem Fiberprotein.

[0020] [Fig. 8](#) zeigt das Transfer-Plasmid p193(F5)RGD, welches zur Erzeugung des Adenovirus-Vektors AdZ.RGD verwendet wurde.

[0021] [Fig. 9](#) zeigt das Transfer-Plasmid p193(F5)pLDV, welches zur Erzeugung des Adenovirus-Vektors AdZ.pLDV verwendet wurde.

[0022] [Fig. 10](#) zeigt das Transfer-Plasmid p193(F5)pYIGSR, welches zur Erzeugung des Adenovirus-Vektors AdZ.pYIGSR verwendet wurde.

[0023] [Fig. 11](#) ist eine Auftragung von Tage post Infektion gegen FFU/Zelle für 293-Zellen, infiziert mit AdZ (offene Kreise) oder AdZ.RGD (geschlossene Quadrate).

[0024] [Fig. 12](#) ist eine Auftragung von zugegebenen Viruspartikeln (pro 6 cm-Platte) gegen β -Galactosidase-Expression (RLU/0,3 μ l/7 min) für A549-Zellen, infiziert mit AdZ (geschlossene Kreise) oder AdZ.RGD (geschlossene Dreiecke).

[0025] [Fig. 13](#) ist eine Auftragung von zugegebenen Viruspartikeln (pro 6 cm-Platte) gegen β -Galactosidase-Expression (RLU/0,3 μ l/7 min) für CPAE-Zellen, infiziert mit AdZ (geschlossene Kreise) oder AdZ.RGD (geschlossene Dreiecke).

[0026] [Fig. 14](#) ist eine Auftragung von zugegebenen Viruspartikeln (pro 6 cm-Platte) gegen β -Galactosidase-Expression (RLU/0,3 μ l/7 min) für HISM-Zellen, infiziert mit AdZ (geschlossene Kreise) oder AdZ.RGD (geschlossene Dreiecke).

[0027] [Fig. 15](#) ist ein Balkendiagramm, welches die Bindung von AdZ.RGD (geschlossene Balken) und AdZ (offene Balken) zeigt, ausgedrückt als % Input von zellgebundenem Vektor in 835-Nierenzellen entweder in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit von kompetierendem Fiberprotein (F5), Pentonbasis-Protein (PB) oder sowohl Fiber- als auch Pentonbasis-Protein (F5/PB).

[0028] [Fig. 16](#) ist ein Balkendiagramm, welches die Bindung von AdZ.RGD (geschlossene Balken) und AdZ (offene Balken) zeigt, ausgedrückt als % Input von zellgebundenem Vektor in A10-Glattmuskelzellen entweder in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit von kompetierendem Fiberprotein (F5), Pentonbasis-Protein (PB) oder sowohl Fiber- als auch Pentonbasis-Protein (F5/PB).

[0029] [Fig. 17](#) ist ein Balkendiagramm, welches die Bindung von AdZ.RGD (geschlossene Balken) und AdZ (offene Balken) zeigt, ausgedrückt als % Input von zellgebundenem Vektor in CPAE-Endothelzellen entweder in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit von kompetierendem Fiberprotein (F5), Pentonbasis-Protein (PB) oder sowohl Fiber- als auch Pentonbasis-Protein (F5/PB).

[0030] [Fig. 18](#) ist ein Balkendiagramm, welches β -Galactosidase-Expression (% Kontrolle) in A549-Zellen, transduziert entweder mit AdZ.pYIGSR (geschlossene Balken) oder AdZ (offene Balken) in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit (Fiber) von löslichem Fiberprotein zeigt.

[0031] [Fig. 19](#) ist ein Balkendiagramm, welches β -Galactosidase-Expression (% Kontrolle) in Ramos-Zellen, transduziert entweder mit AdZ.pLDV (geschlossene Balken) oder AdZ (offene Balken) in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit (Fiber) von löslichem Fiberprotein oder Fiberprotein und EDTA (Fiber + EDTA) zeigt.

[0032] [Fig. 20](#) ist ein Balkendiagramm, welches β -Galactosidase-Expression (% Kontrolle) in 293-Zellen, transduziert entweder mit AdZ.RGD (geschlossene Balken), AdZ.pRGD (gestrichelte Balken) oder AdZ (offene Balken) in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit (Fiber) von löslichem Fiberprotein zeigt.

DETAILBESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt u. a. ein rekombinantes Adenovirus bereit, welches ein chimäres Fiberprotein umfasst. Das chimäre Fiberprotein umfasst eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz zusätzlich zu oder an Stelle einer nativen Aminosäuresequenz. Diese nicht-native Aminosäuresequenz erlaubt der chimären Fiber (oder einem Vektor, welcher die chimäre Fiber umfasst), effizienter an Zellen zu binden und in sie einzutreten.

Chimäres Adenovirus-Fiberprotein

[0034] Ein "Fiberprotein" gemäß der Erfindung umfasst vorzugsweise ein adenovirales Fiberprotein. Ein beliebiger der Serotypen von humanem oder nicht-humanem Adenovirus (wie später im Kontext des Vektors, welcher ein chimäres Fiberprotein umfasst, beschrieben) kann als Quelle für das Fiberprotein oder Fiber-Gen verwendet werden. Optimalerweise aber ist das Adenovirus ein Ad2- oder Ad5-Adenovirus.

[0035] Das Fiberprotein ist "chimär" insofern, als es Aminosäurereste umfasst, welche nicht typischerweise in dem Protein gefunden werden, wie es aus Wildtyp-Adenovirus (d. h. umfassend das native Protein oder Wildtyp-Protein) isoliert wird. Das Fiberprotein umfasst also eine "nicht-native Aminosäuresequenz". Mit "nicht-native Aminosäuresequenz" ist eine Sequenz von beliebiger geeigneter Länge, vorzugsweise ca. 3 bis ca. 200 Aminosäuren, optimalerweise ca. 3 bis ca. 30 Aminosäuren, gemeint. Wünschenswerterweise wird die

nicht-native Aminosäuresequenz in das Fiberprotein auf der Genexpressionsebene eingeführt (d. h. durch Einführung einer "Nucleinsäuresequenz, welche eine nicht-native Aminosäuresequenz codiert"). Eine derartige nicht-native Aminosäuresequenz wird entweder an Stelle von adenoviralen Sequenzen oder zusätzlich zu adenoviralen Sequenzen eingeführt. Unabhängig von der Natur der Einführung resultiert ihre Integration in ein adenovirales Fiberprotein auf der Ebene von entweder DNA oder Protein in der Erzeugung eines Peptidmotivs (d. h. eines Peptidbindungsmotivs) in dem resultierenden chimären Fiberprotein.

[0036] Das Peptidmotiv erlaubt Zell-Targeting, z. B. dadurch, dass es ein Epitop für einen Antikörper oder einen Liganden für eine Zelloberflächen-Bindungsstelle umfasst. Das Peptidmotiv kann optional andere Elemente zur Verwendung zum Zell-Targeting umfassen (z. B. eine "Single-Chain"-Antikörper-Sequenz). Das Peptidmotiv kann durch die Insertion generiert werden und kann z. B. native und nicht-native Sequenzen umfassen oder vollständig aus nicht-nativen Sequenzen bestehen. Das Peptidmotiv, welches aus der Insertion der nicht-nativen Aminosäuresequenz in das chimäre Fiberprotein resultiert, kann entweder ein Hochaffinitätspeptid (d. h. ein Peptid, welches seine kognate Bindungsstelle bindet, wenn es bei einer relativ niedrigen Konzentration bereitgestellt wird) oder ein Niederaffinitätspeptid (d. h. ein Peptid, welches seine kognate Bindungsstelle bindet, wenn es bei einer relativ hohen Konzentration bereitgestellt wird), sein. Vorzugsweise ist das resultierende Peptidmotiv jedoch ein Hochaffinitätsmotiv, insbesondere ein Motiv, welches von hoher Affinität für seine kognate Bindungsstelle geworden ist infolge seiner Einschränkung innerhalb des Adenovirus-Fiberproteins.

[0037] Ein "Antikörper" umfasst, ist aber nicht beschränkt auf Immunglobulin-Moleküle und immunologisch aktive Bereiche von Immunglobulin-Molekülen, z. B. Bereiche, welche ein Paratop (d. h. eine Antigen-Bindungsstelle) enthalten. Insbesondere kann ein Antikörper vorzugsweise ein bispezifischer Antikörper sein, d. h. mit einem Paratop, das auf ein Epitop des chimären Fiberproteins gerichtet ist, und einem anderen Paratop, das auf ein Epitop einer Zelloberflächen-Bindungsstelle gerichtet ist.

[0038] Eine "Zelloberflächen-Bindungsstelle" umfasst einen Rezeptor (der vorzugsweise ein Protein, Kohlenhydrat, Glycoprotein oder Proteoglycan ist) sowie ein beliebiges entgegengesetzt geladenes Molekül (d. h. entgegengesetzt geladen mit Bezug auf das chimäre Coat-Protein) oder einen anderen Typ von Molekül, mit dem das chimäre Coat-Protein interagieren kann, um die Zelle zu binden und dadurch den Zelleintritt zu fördern. Beispiele für potentielle Zelloberflächen-Bindungsstellen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: Heparin- und Chondroitinsulfatreste, welche auf Glycosaminoglycanen vorkommen; Sialinsäurereste, welche auf Mucinen, Glycoproteinen und Gangliosiden vorkommen; Haupthistokompatibilitätskomplex I-(MHC I)-Glycoproteine; die üblichen Kohlenhydrat-Komponenten, die in Membranglycoproteinen vorkommen, einschließlich Mannose, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin, Fucose, Galactose und dergleichen. Jedoch sind ein erfindungsgemäßes chimäres Fiberprotein und Verfahren zu seiner Verwendung nicht auf einen besonderen Mechanismus zellulärer Interaktion (d. h. Interaktion mit einer besonderen Zelloberflächen-Bindungsstelle) beschränkt und sind nicht so auszulegen.

[0039] Eine erfindungsgemäße Zelloberflächen-Bindungsstelle ist vorzugsweise eine Bindungsstelle, die zuvor einer Interaktion mit einem Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein nicht oder nur auf einem sehr niedrigen Niveau zugänglich war, wie es in der reduzierten Eintrittseffizienz eines Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein enthaltenden Vektors im Vergleich zu einem Vektor, welcher ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein gemäß der Erfindung umfasst, widergespiegelt wird. Die Insertion der nicht-nativen Aminosäuresequenz in das chimäre Fiberprotein verleiht dem chimären Fiberprotein also wünschenswerterweise eine Fähigkeit, an eine auf einer Zelloberfläche präsente Bindungsstelle zu binden, welche Wildtyp-Fiberprotein nicht oder nur mit sehr niedriger Affinität bindet. Dies resultiert vorzugsweise in einer Situation, worin das chimäre Adenovirus-Fiberprotein in der Lage ist, einen Zelleintritt eines Vektors zu dirigieren über die Interaktion der nicht-nativen Aminosäure – entweder direkt oder indirekt – mit einem zellulären Rezeptor, der von dem Fiber-Rezeptor verschieden ist.

[0040] Dies resultiert ferner vorzugsweise in einer Situation, worin das chimäre Adenovirus-Fiberprotein in der Lage ist, einen Zelleintritt eines Vektors zu dirigieren, welcher die chimäre Adenovirus-Fiber umfasst, der effizienter ist als der Zelleintritt eines Vektors, der bis auf die Tatsache, dass er ein Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein an Stelle des chimären Adenovirus-Proteins umfasst, identisch ist. Ferner vorzugsweise kann das chimäre Adenovirus-Fiberprotein eine Erhöhung der Targeting-Spezifität bewirken, z. B. durch Ändern der Spezifität des Fiberproteins.

[0041] Die "Eintrittseffizienz" kann durch verschiedene Mittel quantitativ bestimmt werden. Insbesondere kann die Eintrittseffizienz quantitativ bestimmt werden durch Einführen eines chimären Fiberproteins in einen Vektor, vorzugsweise in einen viralen Vektor, und Überwachen des Zelleintritts (z. B. durch Vektor-vermitteltes

Delivery eines Gens, z. B. eines Reportergens, in eine Zelle) als eine Funktion der Multiplizität der Infektion (MOI). In diesem Fall zeigt ein reduzierter erforderlicher MOI-Wert für den Zelleintritt eines Vektors, welcher ein chimäres adenovirales Fiberprotein umfasst, im Vergleich zu einem Vektor, der bis auf die Tatsache, dass er ein Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein an Stelle des chimären Adenovirus-Fiberproteins umfasst, identisch ist, einen "effizienteren" Eintritt an.

[0042] Ähnlich kann die Eintrittseffizienz quantitativ bestimmt werden mit Bezug auf die Zellbindungsähnlichkeit von Vektoren, welche chimäre oder Wildtyp-Fiberproteine enthalten, oder von den löslichen chimären oder Wildtyp-Fiberproteinen selbst. In diesem Fall ist eine erhöhte Bindung, welche für den Vektor, der ein chimäres adenovirales Fiberprotein enthält, oder das chimäre Fiberprotein selbst gezeigt wird, im Vergleich zu dem identischen Vektor, der statt dessen ein Wildtyp-Fiberprotein enthält, oder dem Wildtyp-Fiberprotein selbst, indikativ für eine erhöhte Eintrittseffizienz oder einen "effizienteren" Eintritt.

[0043] Gemäß vorliegender Erfindung ist eine nicht-native Aminosäuresequenz konformationell beschränkt oder "eingeschränkt". Eine nicht-native Aminosäuresequenz ist eingeschränkt, wenn sie in einem chimären Fiberprotein präsent ist und einer Zelle in einer solchen Weise präsentiert wird, dass die Fähigkeit des chimären Fiberproteins, an die Zelle zu binden und/oder Zelleintritt zu vermitteln, erhöht wird, z. B. relativ zu dem Wildtyp-Protein. Eine derartige Einschränkung gemäß vorliegender Erfindung wird erzielt durch die Platzierung einer nicht-native Aminosäuresequenz in einer exponierten Schleife des chimären Fiberproteins oder durch die Platzierung der Sequenz in einer anderen Lokalisation und Erzeugung einer schleifenartigen Struktur, umfassend die nicht-native Aminosäuresequenz an dieser Stelle.

[0044] Adenoviral vermitteltes Gen-Delivery in spezifische Gewebe (d. h. Zell-Targeting) ist bisher durch die Tatsache behindert worden, dass, allgemein, uneingeschränkte Peptide niedrigerer Affinität oft nicht so effektiv sind in der Vermittlung von Adenovirus-Bindung an Zielrezeptoren wie eingeschränkte Peptide. Beispielsweise werden durch Phagen-Display oder allgemein identifizierte Peptidmotive in einer eingeschränkten Umgebung präsentiert. Demgemäß stellt die vorliegende Anmeldung ein Mittel bereit zum Targeting von Adenovirus, wobei in einer Ausführungsform die Peptidmotive in der eingeschränkten Umgebung der Schleifendomänen des Knob des Adenovirus-Fiberproteins präsentiert werden.

[0045] Dieses Verfahren ist vorteilhaft, weil nicht alle Reste der exponierten Fiber-Knob-Schleifen kritisch sind für den Zusammenbau oder die Funktion des Fiberproteins und somit günstige Stellen bereitstellen, an denen die Peptidmotive inseriert werden können. Dieses Verfahren ist ferner vorteilhaft insofern, als Hinzufügungen innerhalb einer Schleife einer Proteinstruktur resistenter gegen proteolytische Degradation sein werden als Hinzufügungen am Ende eines Proteins. Weiter: insbesondere für Niederaffinitäts-Peptidmotive ist dieses Verfahren effizienter als das Verfahren, bei dem die Peptidmotive als uneingeschränkte lineare Strukturen am C-Terminus des Knob der Fiber präsentiert werden. Es ist denkbar, dass "Einschränkung" gemäß der vorliegenden Erfindung die Affinität erhöht, weil sie das Molekül in eine topologische Konformation bringt, in der es in Synchronisation mit seinem Rezeptor ist, und auf diese Weise die Bindung erleichtert. Jedoch ist die Beschreibung nicht auf einen besonderen Wirkmechanismus beschränkt und ist nicht so auszulegen.

[0046] Mit Bezug auf die Schleifendomänen des Fiber-Knob, welche im Kontext der Erfindung verwendet werden können, ist die Kristallstruktur des Fiber-Knob beschrieben worden (siehe z. B. Xia et al., supra, insbesondere [Fig. 4](#)). Das Knob-Monomer umfasst eine achtsträngige antiparallele β -Sandwich-Faltung. Die Gesamtstruktur des Fiber-Knob-Trimmers ähnelt einem dreiflügeligen Propeller, wobei bestimmte β -Stränge von jedem der drei Monomere die Flächen der Flügel bilden. Insbesondere scheinen die folgenden Reste des Ad5-Fiber-Knob wichtig für die Wasserstoffbindung in dem β -Sandwich-Motiv: 400–402, 419–428, 431–440, 454–461, 479–482, 485–486, 516–521, 529–536, 550–557 und 573–578. Die verbleibenden Reste des Proteins (die nicht kritisch zu sein scheinen für die Bildung der Fiberprotein-Sekundärstruktur) definieren die exponierten Schleifen der Protein-Knob-Domäne. Insbesondere umfassen die Reste inklusive 403–418 die AB-Schleife, die Reste inklusive 441–453 umfassen die CD-Schleife, die Reste inklusive 487–514 umfassen die DG-Schleife, die Reste inklusive 522–528 umfassen die GH-Schleife, die Reste inklusive 537–549 umfassen die HI-Schleife und die Reste inklusive 558–572 umfassen die IJ-Schleife.

[0047] Gemäß vorliegender Erfindung ist "Schleife" in dem generischen Sinne gemeint, dass sie eine Spanne von Aminosäureresten definiert (d. h. mehr als eine, vorzugsweise weniger als 200 und noch mehr bevorzugt weniger als 30), welche mit der nicht-native Aminosäuresequenz substituiert werden können, um ein Peptidmotiv zu umfassen, welches Zell-Targeting erlaubt. Während derartige Schleifen hierin mit Bezug auf die Ad5-Sequenz definiert sind, ist das Sequenz-Alignment anderer Fiber-Spezies beschrieben worden (siehe z. B. Xia et al., supra). Für diese anderen Spezies (insbesondere Ad2, Ad3, Ad7, Ad40 und Ad41, beschrieben

von Xia et al., *supra*) scheinen die korrespondierenden Schleifenregionen der Knob-Domänen vergleichbar zu sein.

[0048] Ferner scheinen die korrespondierenden Reste, welche in dem Fiber-Knob für die Proteinbindung/-faltung wichtig sind, zwischen Fiberproteinen unterschiedlicher adenoviraler Serotypen konserviert zu sein (Xia et al., *supra*). Dies legt nahe, dass auch für diejenigen adenoviralen Spezies, bei denen die Kristallstruktur des Fiberproteins nicht bekannt ist, außerhalb dieser konservierten Reste nicht-konservierte Regionen oder Regionen, welche nicht den hohen Grad an Konservierung zeigen, der für die Reste beobachtet wird, welche für die Proteinfunktionalität kritisch sind, liegen werden. Wahrscheinlich wird die Sequenz des Fiber-Knob-Proteins in diesen nicht-konservierten Regionen als eine Schleife präsent sein infolge der Abwesenheit von wichtigen intramolekularen Interaktionen in dieser Region des Proteins. Die Schleifensequenzen, welche diese nicht-konservierten Regionen umfassen, können ähnlich mutiert werden wie hierin beschrieben durch Inkorporation von Peptidmotiven, welche Zell-Targeting erlauben. Diese sogenannten nicht-konservierten Sequenzen umfassen wahrscheinlich jegliche Aminosäuren, welche außerhalb der konservierten Regionen vorkommen (d. h. die Reste nicht-inklusive derjenigen, welche zu den Ad5-Resten 400–402, 419–428, 431–440, 454–461, 479–482, 485–486, 516–521, 529–536, 550–557 und 573–578 korrespondieren).

[0049] Allgemeiner werden die nicht-konservierten Regionen hydrophobe Reste umfassen, welche typischerweise im Inneren eines Proteins gefunden werden. Derartige hydrophobe Reste umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Ile, Val, Leu, Trp, Cys und Phe. Demgegenüber werden die konservierten Regionen allgemein hydrophile Reste umfassen, z. B. geladene Reste (z. B. Arg, Lys, Glu, Asp und dergleichen) oder polare Reste oder Reste, welche eine Hydroxyl-Gruppe umfassen (z. B. Thr, Ser, Asn, Gln etc.). Dies bedeutet, dass eine grobe Approximation für die exponierten und verdeckten Aminosäuren des Fiberproteins abgeleitet werden kann auf Basis seines Hydrophobizitäts-/Hydrophilizitäts-Diagramms.

[0050] Die vorliegende Erfindung stellt also ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein bereit, welches eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz umfasst. Vorzugsweise ist die nicht-native Aminosäuresequenz eingeschränkt durch ihre Anwesenheit in einer Schleife des Knob des chimären Fiberproteins. Insbesondere ist die nicht-native Aminosäuresequenz wünschenswerterweise in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz in einer Schleife des Knob des chimären adenoviralen Fiberproteins inseriert. Optional ist die Fiberprotein-Schleife ausgewählt aus der Gruppe, welche aus den AB-, CD-, DG-, GH-, und IJ-Schleifen besteht und ist wünschenswerterweise die HI-Schleife. Ferner umfasst die Schleife vorzugsweise Aminosäurereste in dem Fiber-Knob, welche von den Ad5-Resten 400–402, 419–428, 431–440, 454–461, 479–482, 485–486, 516–521, 529–536, 550–557 und 573–578 verschieden sind. Wünschenswerterweise umfasst die Schleife Aminosäurereste, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus den Resten 403–418, 441–453, 487–514, 522–528, 537–549 und 558–572 besteht.

[0051] Insbesondere ist es bevorzugt, wenn die in der Schleife präsente nicht-native Aminosäuresequenz eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, welche besteht aus: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:59 und SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:79, und wobei die Sequenz entweder am C- oder am N-Terminus um 1, 2 oder 3 Reste deletiert sein kann. Die nicht-native Aminosäuresequenz kann ferner wünschenswerterweise konservative Aminosäuresubstitutionen dieser Sequenzen umfassen, wie hierin weiter beschrieben. Optional können diese Sequenzen in dem chimären Protein präsent sein, wie z. B. in [Fig. 4](#), [Fig. 5](#), [Fig. 6](#), [Fig. 8](#), [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) gezeigt.

[0052] Die Erfindung stellt ferner ein Mittel bereit zum Targeting von Adenovirus, wobei die Peptidmotive in einer eingeschränkten Umgebung am C-Terminus des Fiberproteins in der Region des Fiber-Knob präsentiert werden. Dieses Verfahren umfasst die Generierung von Schleifen (d. h. "nicht präexistierenden Schleifen") durch Bindung zwischen Cystein-Resten, um dadurch eine schleifenähnliche Sekundärstruktur in der Domäne des Proteins zu erzeugen, in welche das Peptidmotiv inseriert wird. Allgemein wird erfindungsgemäß die hinzugefügte nicht-native Aminosäuresequenz selbst eine schleifenähnliche Struktur bilden (durch Disulfidbindung zwischen Cystein-Resten, welche *in vivo* vorkommen). Es ist jedoch auch möglich, dass die Schleife gebildet wird infolge Bindung zwischen einem Cystein-Rest, welcher in der nicht-native Aminosäuresequenz präsent ist, und einem Cystein-Rest in dem Wildtyp-Fiberprotein. In diesem Sinne ist die Schleifenbildung der Sequenz nicht inhärent, aber potentiell.

[0053] Insbesondere umfasst ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein gemäß der Erfindung eine nicht-native Aminosäuresequenz, welche durch ihren Besitz eines RGD-Peptids (oder eines anderen ähnlichen Peptids, z.

B. LDV, wie hierin beschrieben) und eines oder mehrerer Cystein-Paare eingeschränkt ist. Gemäß vorliegender Erfindung umfasst ein "Paar" zwei Cysteine, welche durch mindestens eine intervenierende Aminosäure getrennt sind. Wenn die Sequenz nur ein einziges Paar umfasst, sind die Cysteine wünschenswerterweise durch die RGD-Sequenz (oder eine andere ähnliche Sequenz, welche verwendet werden kann, um Zell-Targeting zu bewirken, und die vorzugsweise weniger als 30 Aminosäuren umfasst) getrennt, derart, dass die nicht-präexistierende Schleife erzeugt werden kann, d. h. durch Disulfidbindung. Vorzugsweise sind die Cystein-Reste in diesem Falle durch weniger als 30 Aminosäuren getrennt, z. B. durch eine Mischung von Glycin- und Serin-Resten wie in [SEQ ID NO:72]. Unabhängig davon, welche nicht-native Aminosäuresequenz verwendet wird: sie muss eine schleifenartige Sekundärstruktur umfassen.

[0054] Mit Bezug auf diese nicht-präexistierende Schleife sind ein potentielles Peptidmotiv und Variationen desselben hierin beschrieben worden. Jedoch sind andere RGD-haltige cyclische Peptide in der Literatur beschrieben worden und können im Kontext der Erfindung als die nicht-native Aminosäuresequenz Verwendung finden (siehe z. B. Koivunen et al., Bio/Technology, 13, 265–270 (1995)). Insbesondere kann eine weitere nicht-native Aminosäuresequenz gemäß der Erfindung die Sequenz CDCRGDCFC (d. h. Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys [SEQ ID NO:3]) umfassen. Die nicht-native Aminosäuresequenz umfasst jedoch vorzugsweise Cys Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Xaa Cys [SEQ ID NO:4] (worin "Xaa" eine beliebige Nucleinsäure ist) oder Cys (Xaa)_A Cys Arg Gly Asp Cys (Xaa)_B Cys [SEQ ID NO:5], worin "A" und "B" unabhängig voneinander variieren können und eine beliebige Zahl von 0 bis 8 sein können, solange entweder A oder B 1 ist. Insbesondere umfasst die nicht-native Aminosäuresequenz vorzugsweise die Sequenz Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys [SEQ ID NO:5], wobei Deletionen von Aminosäureresten, welche von Cystein verschieden sind, auf einer oder beiden Seiten der RGD-(d. h. Arg Gly Asp-)Sequenz von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Resten erzeugt werden können.

[0055] Wünschenswerterweise wird also die nicht-native Aminosäuresequenz, welche die nicht-präexistierende Schleife umfasst, in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz am C-Terminus des chimären Adenovirus-Fiberproteins inseriert. Vorzugsweise wird die nicht-native Aminosäuresequenz, welche die nicht-präexistierende Schleife umfasst, in eine Schleife des Knob des chimären adenoviralen Fiberproteins inseriert. Optimalerweise umfasst die nicht-native Aminosäuresequenz eine Sequenz, ausgewählt aus der Gruppe, welche aus SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 besteht, wobei die Sequenz entweder am C- oder am N-Terminus um 1, 2 oder 3 Reste deletiert sein kann. Die Aminosäuresequenz kann ferner wünschenswerterweise konservative Aminosäuresubstitute dieser Sequenzen umfassen, wie hierin weiter beschrieben.

[0056] Optional ist die nicht-präexistierende Schleife an den C-Terminus des Fiberproteins oder in einer Fiber-Knob-Schleife mittels einer sogenannten "Spacer"-Sequenz angeheftet. Die Spacer-Sequenz kann einen Teil der nicht-nativen Aminosäuresequenz selbst umfassen oder eine völlig separate Sequenz sein. Insbesondere ist eine Spacer-Sequenz eine Sequenz, welche vorzugsweise zwischen der nativen Proteinsequenz und der nicht-nativen Sequenz, zwischen einer nicht-nativen Sequenz und einer weiteren nicht-nativen Sequenz oder zwischen einer nativen Sequenz und einer weiteren nativen Sequenz interveniert. Wünschenswerterweise ist eine derartige Sequenz in das Protein inkorporiert, um zu gewährleisten, dass die nicht-native Sequenz, welche das Epitop für einen Antikörper oder eine Zelloberflächen-Bindungsstelle umfasst, von der dreidimensionalen Struktur der chimären Fiber derart hervorragt, dass sie mit Zellen interagieren und an dieselben binden kann. Eine Spacer-Sequenz kann eine beliebige geeignete Länge aufweisen, vorzugsweise von ca. 3 bis ca. 30 Aminosäuren, und umfasst beliebige Aminosäuren, z. B. eine Mischung von Glycin- und Serin-Resten wie in [SEQ ID NO:72]. Optimalerweise interferiert die Spacer-Sequenz nicht mit der Funktion des Fiberproteins.

Nucleinsäure codierend für ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein

[0057] Wie bereits angegeben, wird die nicht-native Aminosäuresequenz vorzugsweise auf der DNA-Ebene eingeführt. Demgemäß stellt die Erfindung ferner eine isolierte und gereinigte Nucleinsäure bereit, welche ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein codiert, welches eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz gemäß der Erfindung umfasst. Wünschenswerterweise umfasst die Nucleinsäuresequenz, welche die nicht-native Aminosäuresequenz codiert, eine Sequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, welche besteht aus: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 und SEQ ID NO:62, sowie konservativ modifizierte Varianten dieser Nucleinsäuresequenzen.

[0058] Eine "konservativ modifizierte Variante" ist eine Variation der Nucleinsäuresequenz, die in einer konservativen Aminosäuresubstitution resultiert. Eine "konservative Aminosäuresubstitution" ist eine Aminosäure,

welche mit einer alternativen Aminosäure ähnlicher Ladungsdichte, Hydrophilizität/Hydrophobizität, Größe und/oder Konfiguration substituiert ist (z. B. Val für Ile). Im Vergleich dazu ist eine "nicht-konservativ modifizierte Variante" eine Variation der Nucleinsäuresequenz, die in einer nicht-konservativen Aminosäuresubstitution resultiert. Eine "nicht-konservative Aminosäuresubstitution" ist eine Aminosäure, welche mit einer alternativen Aminosäure verschiedener Ladungsdichte, Hydrophilizität/Hydrophobizität, Größe und/oder Konfiguration substituiert ist (z. B. Val für Phe). Die Mittel zur Herstellung derartiger Modifikationen sind auf dem Fachgebiet wohlbekannt, sie sind in den folgenden Beispielen beschrieben und können ferner mittels kommerziell erhältlicher Kits und Vektoren erreicht werden (z. B. New England Biolabs, Inc., Beverly, MA; Clontech, Palo Alto, CA). Ferner sind die Mittel zum Abschätzen derartiger Substitutionen (z. B. hinsichtlich des Effekts auf die Fähigkeit, an Zellen zu binden und in diese einzutreten) in den hierin vorgestellten Beispielen beschrieben. Ferner sind weitere, im Stand der Technik beschriebene Ansätze verfügbar zum Identifizieren von Peptidsequenzen, welche als Liganden für einen Zelloberflächenrezeptor fungieren und somit für die vorliegende Erfindung Verwendung finden können (siehe z. B. Russell, *Nature Medicine*, 2, 276–277 (1996)).

[0059] Die Mittel zur Herstellung eines derartigen chimären Fiberproteins, insbesondere die Mittel zum Einführen der Sequenz auf der DNA-Ebene, sind auf dem Fachgebiet wohlbekannt und in den folgenden Beispielen beschrieben. Kurz gefasst umfasst das Verfahren die Einführung einer Sequenz in die das Fiberprotein codierende Sequenz, um so ein neues Peptidmotiv in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz am C-Terminus des Wildtyp-Fiberproteins oder in eine Schleife eines Knob des Wildtyp-Fiberproteins zu inserieren. Eine derartige Einführung kann in der Insertion eines neuen Peptidbindungsmotivs resultieren oder in der Erzeugung eines Peptidmotivs (wobei z. B. ein Teil der das Motiv umfassenden Sequenz bereits in dem nativen Fiberprotein präsent ist). Das Verfahren kann ferner durchgeführt werden, um Fiber-Sequenzen mit einer nicht-nativen Aminosäuresequenz gemäß der Erfindung zu ersetzen.

[0060] Allgemein kann dies erreicht werden durch Klonieren der das chimäre Fiberprotein codierenden Nucleinsäuresequenz in ein Plasmid oder einen anderen Vektor für leichte Manipulation der Sequenz. Sodann wird eine singuläre Restriktionsstelle, an der weitere Sequenzen in das Fiberprotein eingefügt werden können, identifiziert oder in die Fiber-Sequenz inseriert. Ein doppelsträngiges synthetisches Oligonucleotid wird allgemein aus überlappenden synthetischen einzelsträngigen Sense- und Antisense-Oligonucleotiden erzeugt, derart, dass das doppelsträngige Oligonucleotid die Restriktionsstellen, welche die Zielsequenz flankieren, inkorporiert und z. B. zur Inkorporation von Austausch-DNA verwendet werden kann. Das Plasmid oder der andere Vektor wird mit dem Restriktionsenzym gespalten, und die Oligonucleotid-Sequenz mit kompatiblen kohäsiven Enden wird in das Plasmid oder den anderen Vektor ligiert, um die Wildtyp-DNA zu ersetzen. Andere Mittel zur ortsgerichteten in-vitro-Mutagenese, wie sie z. B. dem Fachmann bekannt sind und (insbesondere durch PCR) z. B. mittels kommerziell erhältlicher Kits erreicht werden können, können ebenfalls Verwendung finden, um die mutierte Sequenz in die Fiberprotein-Codierungssequenz einzuführen.

[0061] Ist die mutierte Sequenz einmal in das chimäre Coat-Protein eingeführt, so kann das die Sequenz codierende Nucleinsäurefragment isoliert werden, z. B. durch PCR-Amplifizierung mittels 5'- und 3'-Primer, vorzugsweise solchen, welche in weiteren singulären Restriktionsstellen terminieren. Die Verwendung von Primer auf diese Art und Weise resultiert in einem amplifizierten, chimäre Fiber enthaltenden Fragment, welches von den singulären Restriktionsstellen flankiert ist. Die singulären Restriktionsstellen können für weiteres günstiges Subklonieren des Fragments verwendet werden. Es können auch andere Mittel zum Generieren eines chimären Fiberproteins verwendet werden. Diese Verfahren sind dem Fachmann hoch vertraut.

Vektor umfassend ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein

[0062] Ein "Vektor" gemäß der Erfindung ist ein Vehikel für den Gentransfer, wie dieser Terminus vom Fachmann verstanden wird. Drei Typen von Vektoren, welche von der Erfindung umfasst sind, sind: Plasmide, Phagen und Viren. Plasmide, Phagen und Viren können in ihrer Nucleinsäureform in eine Zelle transferiert werden (z. B. via Transfektion). Im Vergleich dazu können Phagen und Viren auch mit der Nucleinsäure in einer "Kapsel"-Form transferiert werden. Somit werden die Vektoren (z. B. in Kapselform), welche zum Gentransfer verwendet werden können, hierin allgemein als "Vektoren" bezeichnet, wobei Nucleinsäureformen im Besonderen als "Transfervektoren" bezeichnet werden. Jedoch sind Transfervektoren ebenfalls Vektoren im Kontext der Erfindung.

[0063] Vorzugsweise ist ein Vektor gemäß der Erfindung ein Virus, speziell ein Virus, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus unbehüllten Viren, d. h. unbehülltes RNA- oder DNA-Viren, besteht. Ferner kann ein Virus ausgewählt sein aus der Gruppe, welche aus behüllten Viren besteht, d. h. behüllten RNA- oder DNA-Viren. Derartige Viren umfassen vorzugsweise ein Fiberprotein oder ein analoges Coat-Protein, welches zum

Zelleintritt verwendet wird. Wünschenswerterweise ist das virale Coat-Protein ein Protein, welches von dem Kapsid nach außen vorsteht, derart, dass es mit Zellen interagieren kann. Im Falle von behüllten RNA- oder DNA-Viren ist das Coat-Protein vorzugsweise ein Lipid-Hüllglycoprotein (d. h. ein sogenanntes "Spike" oder Pепломер).

[0064] Insbesondere ist ein Vektor vorzugsweise ein unbehülltes Virus (d. h. entweder ein RNA- oder ein DNA-Virus) aus der Familie Hepadnaviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae oder Picornaviridae. Ein bevorzugtes unbehülltes Virus gemäß der Erfindung ist ein Virus der Familie Hepadnaviridae, speziell des Genus Hepadnavirus. Ein Virus der Familie Parvoviridae ist wünschenswerterweise vom Genus Parvovirus (z. B. Parvoviren von Säugetieren und Vögeln) oder Dependovirus (z. B. Adeno-assozierte Viren (AAVs)). Ein Virus der Familie Papovaviridae entstammt vorzugsweise der Subfamilie Papillomavirinae (z. B. die Papillomaviren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf humane Papillomaviren (HPV) 1–48) oder der Subfamilie Polyomavirinae (z. B. die Polyomaviren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf JC-, SV40- und BK-Virus). Ein Virus der Familie Adenoviridae ist wünschenswerterweise vom Genus Mastadenovirus (z. B. Säuger-Adenoviren) oder Aviadenovirus (z. B. Vogel-Adenoviren). Ein Virus der Familie Picornaviridae ist vorzugsweise ein Hepatitis-A-Virus (HAV), ein Hepatitis-B-Virus (HBV) oder ein Nicht-A- oder Nicht-B-Hepatitis-Virus.

[0065] Ähnlich kann ein Vektor ein behülltes Virus aus der Familie Herpesviridae oder Retroviridae sein, oder er kann ein Sindbis-Virus sein. Ein bevorzugtes behülltes Virus gemäß der Erfindung ist ein Virus der Familie Herpesviridae, speziell der Subfamilie oder des Genus Alphaherpesvirinae (z. B. Herpes-simplex-artige Viren), Simplexvirus (z. B. Herpex-simplex-artige Viren), Varicellavirus (z. B. Varicella- und Pseudowut-artige Viren), Betaherpesvirinae (z. B. die Cytomegaloviren), Cytomegalovirus (z. B. die humanen Cytomegaloviren), Gammapathogenesvirinae (z. B. die Lymphozyten-assozierten Viren) und Lymphocryptovirus (z. B. EB-artige Viren).

[0066] Ein weiteres bevorzugtes behülltes Virus ist ein RNA-Virus aus der Familie Retroviridae (d. h. ein Retrovirus), insbesondere ein Virus des Genus oder der Subfamilie Oncovirinae, Spumavirinae, Spumavirus, Lentivirinae oder Lentivirus. Ein RNA-Virus aus der Subfamilie Oncovirinae ist wünschenswerterweise ein humanes T-lymphotropes Virus Typ 1 oder 2 (d. h. HTLV-1 oder HTLV-2) oder bovinus Leukämie-Virus (BLV), ein aviäres Leukose-Sarkom-Virus (z. B. Rous-Sarkom-Virus (RSV), aviäres Myeloblastose-Virus (AMV), aviäres Erythroblastose-Virus (AEV), Rous-assoziertes Virus (RAV)-1 bis 50, RAV-0), ein C-Typ-Virus von Säugetieren (z. B. Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MuLV), Harvey-Maus-Sarkom-Virus (HaMSV), Abelson-Maus-Leukämie-Virus (A-MuLV), AKR-MuLV, felines Leukämie-Virus (FeLV), Simian-Sarkom-Virus, Reticuloendotheliose-Virus (REV), Milznekrose-Virus (SNV)), ein B-Typ-Virus (z. B. Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)) oder ein D-Typ-Virus (z. B. Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV), "SAIDS"-Viren). Ein RNA-Virus der Subfamilie Lentivirus ist wünschenswerterweise ein humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 oder 2 (d. h. HIV-1 oder HIV-2, wobei HIV-1 früher Lymphadenopathie-assoziertes Virus 3 (HTLV-III) und "Acquired-Immune-Deficiency-Syndrome-(AIDS)-related-Virus" (ARV) genannt wurde), oder ein anderes, zu HIV-1 oder HIV-2 verwandtes Virus, welches identifiziert und mit AIDS- oder AIDS-artiger Erkrankung assoziiert ist. Das Akronym "HIV" oder die Ausdrücke "AIDS-Virus" oder "humanes Immundefizienz-Virus" werden hierin in dem Sinne verwendet, dass sie sich generisch auf diese HIV-Viren und HIV-verwandte und -assozierte Viren beziehen. Ferner ist ein RNA-Virus der Subfamilie Lentivirus vorzugsweise ein Visna/Maedi-Virus (das z. B. Schafe infiziert), ein felines Immundefizienz-Virus (FIV), bovinus Lentivirus, Simian-Immundefizienz-Virus (SIV), ein equines infektiöses Anämie-Virus (EIAV) oder ein caprines Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV).

[0067] Ein besonders bevorzugter Vektor gemäß der Erfindung ist ein adenoviraler Vektor (d. h. ein viraler Vektor aus der Familie Adenoviridae, optimalerweise vom Genus Mastadenovirus). Wünschenswerterweise ist ein derartiger Vektor ein Ad2- oder Ad5-Vektor, wobei jedoch auch adenovirale Vektoren anderen Serotyps verwendet werden können. Adenovirale Stocks, welche gemäß der Erfindung Verwendung finden können, umfassen einen beliebigen der Adenovirus-Serotypen 1 bis 47, die derzeit von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) verfügbar sind, oder einen beliebigen anderen, von einer beliebigen anderen Quelle erhältlichen Adenovirus-Serotyp. Beispielsweise kann ein Adenovirus von einem Serotyp der Untergruppe A (z. B. Serotypen 12, 18, 31), der Untergruppe B (z. B. Serotypen 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35), der Untergruppe C (z. B. Serotypen 1, 2, 5, 6), der Untergruppe D (z. B. Serotypen 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–47), der Untergruppe E (Serotyp 4), der Untergruppe F (Serotyp 40, 41) oder von einem beliebigen anderen adenoviralen Serotyp sein.

[0068] Der zum Gentransfer verwendete adenovirale Vektor kann wildtypisch (d. h. replikationskompetent) sein. Alternativ kann der adenovirale Vektor genetisches Material umfassen mit mindestens einer Modifikation darin, welche das Virus replikationsdefizient machen kann. Die Modifikation des adenoviralen Genoms kann umfassen, ist aber nicht beschränkt auf: Hinzufügung eines DNA-Segments, "Rearrangement" eines

DNA-Segmentes, Deletion eines DNA-Segments, Austausch eines DNA-Segments oder Einführung einer DNA-Läsion. Ein DNA-Segment kann so klein sein wie ein Nucleotid und so groß wie 36 Kilobasenpaare (d. h. die ungefähre Größe des adenoviralen Genoms) oder, alternativ, gleich der maximalen Menge, welche in ein adenovirales Virion verpackt werden kann (d. h. ca. 38 kb). Bevorzugte Modifikationen des adenoviralen Genoms umfassen Modifikationen in der E1-, E2-, E3- und/oder E4-Region. Ein adenoviraler Vektor kann ferner bevorzugt ein Cointegrat sein, d. h. eine Ligation von adenoviralen genomischen Sequenzen mit anderen Sequenzen, z. B. anderen Virus-, Phagen- oder Plasmidsequenzen.

[0069] Mit Bezug auf einen viralen Vektor (z. B. insbesondere einen replikationsdefizienten adenoviralen Vektor) kann ein derartiger Vektor entweder vollständige Kapside (d. h. umfassend ein virales Genom, z. B. ein adenovirales Genom) oder leere Kapside (d. h. worin ein virales Genom fehlt oder degradiert ist, z. B. durch physikalische oder chemische Mittel) umfassen. Vorzugsweise umfasst der virale Vektor vollständige Kapside. Nach den gleichen Grundsätzen – da Verfahren zum Transferieren von Viren, Plasmiden und Phagen in Form ihrer Nucleinsäuresequenzen (d. h. RNA oder DNA) zur Verfügung stehen – kann ähnlichlicherweise ein Vektor (d. h. ein Transfervektor) RNA oder DNA in der Abwesenheit jeglichen assoziierten Proteins wie Kapsidprotein und in der Abwesenheit jeglichen Hülllipids umfassen. Während also erfindungsgemäß ein Vektor ein chimäres adenovirales Fiberprotein "umfasst", umfasst ein Transfervektor ein chimäres adenovirales Fiberprotein in dem Sinne, dass er das chimäre adenovirale Fiberprotein "codiert".

[0070] Ein erfindungsgemäßer Vektor kann zusätzliche Sequenzen und Mutationen umfassen, z. B. einige innerhalb des Fiberproteins selbst. Beispielsweise umfasst ein erfindungsgemäßer Vektor ferner vorzugsweise eine Nucleinsäure, welche ein Passagiergen umfasst.

[0071] Eine "Nucleinsäure" ist ein Polynucleotid (DNA oder RNA). Ein "Gen" ist eine Nucleinsäuresequenz, welche für ein Protein oder ein naszierendes RNA-Molekül codiert. Ein "Passagiergen" ist ein Gen, welches in einem Vektor (z. B. einem Transfervektor) gemäß der Erfindung nicht typischerweise präsent ist und in diesen subkloniert ist und welches nach Einführung in eine Wirtszelle von einer erkennbaren Änderung in der intrazellulären Umgebung begleitet ist (z. B. von einem erhöhten Level an Desoxyribonucleinsäure (DNA), Ribonucleinsäure (RNA), Peptid oder Protein oder von einer veränderten Produktions- oder Degradationsrate derselben). Ein "Genprodukt" ist entweder ein bisher untranslatiertes RNA-Molekül, transkribiert aus einem gegebenen Gen oder einer Codierungssequenz (z. B. mRNA oder Antisense-RNA), oder die Polypeptidkette (d. h. Protein oder Peptid), translatiert aus dem von dem gegebenen Gen oder der Codierungssequenz transkribierten mRNA-Molekül. Während ein Gen Codierungssequenzen plus jegliche nicht-codierende Sequenzen umfasst, umfasst eine "Codierungssequenz" keine nicht-codierende (d. h. regulatorische) DNA. Ein Gen oder eine Codierungssequenz ist "rekombinant", wenn die Basensequenz entlang dem Molekül verändert worden ist gegenüber der Sequenz, in der das Gen oder die Codierungssequenz typischerweise in der Natur gefunden wird, oder wenn die Basensequenz nicht typischerweise in der Natur gefunden wird. Gemäß vorliegender Erfindung kann ein Gen oder eine Codierungssequenz ganz oder teilweise synthetisch hergestellt sein, genomische oder komplementäre DNA-(cDNA-)Sequenzen umfassen und in der Form von entweder DNA oder RNA bereitgestellt sein.

[0072] Nicht-codierende Sequenzen oder regulatorische Sequenzen umfassen Promotor-Sequenzen. Ein "Promotor" ist eine DNA-Sequenz, welche die Bindung von RNA-Polymerase dirigiert und dadurch RNA-Synthese fördert. "Enhancer" sind cis-agierende Elemente von DNA, welche die Transkription benachbarter Gene stimulieren oder inhibieren. Ein Enhancer, der die Transkription inhibiert, wird auch "Silencer" genannt. Enhancer unterscheiden sich von DNA-Bindungsstellen für sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, welche nur in dem Promotor gefunden werden (auch "Promotor-Elemente" genannt), insofern, als Enhancer in beiden Ausrichtungen funktionieren können und über Distanzen von bis zu einigen Kilobasenpaaren, auch von einer Position stromabwärts einer transkribierten Region aus. Erfindungsgemäß ist eine Codierungssequenz "operativ verknüpft" mit einem Promotor (z. B. wenn sowohl die Codierungssequenz als auch der Promotor ein Passagiergen konstituieren), wenn der Promotor in der Lage ist, Transkription dieser Codierungssequenz zu dirigieren.

[0073] Demgemäß kann ein "Passagiergen" ein beliebiges Gen sein und ist wünschenswerterweise entweder ein therapeutisches Gen oder ein Reporter-Gen. Vorzugsweise ist ein Passagiergen in der Lage, in einer Zelle exprimiert zu werden, in die der Vektor internalisiert worden ist. Beispielsweise kann das Passagiergen ein Reportergen umfassen oder eine Nucleinsäuresequenz, welche ein Protein codiert, das in irgendeiner Weise in einer Zelle detektiert werden kann. Das Passagiergen kann ferner ein therapeutisches Gen umfassen, z. B. ein therapeutisches Gen, das seinen Effekt auf RNA- oder Proteinebene ausübt. Beispielsweise kann ein Protein, welches von einem transferierten therapeutischen Gen codiert wird, bei der Behandlung einer Erbkrankheit

heit eingesetzt werden, so z. B. die Cystische-Fibrose-Transmembran-Leitfähigkeitsregulator-cDNA für die Behandlung der cystischen Fibrose. Das von dem therapeutischen Gen codierte Protein kann seinen therapeutischen Effekt dadurch ausüben, dass es in Zelltötung resultiert. So kann z. B. die Expression des Gens selbst zu Zelltötung führen, wie z. B. bei der Expression des Diphtherietoxin-A-Gens, oder die Expression des Gens kann Zellen selektiv sensitiv für die Abtötungswirkung gewisser Arzneimittel machen; so macht z. B. die Expression des HSV-Thymidinkinase-Gens Zellen sensitiv für antivirale Verbindungen, einschließlich Acyclovir, Gancyclovir und FIAU (1-(2-Desoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracil).

[0074] Ferner kann das therapeutische Gen seinen Effekt auf der RNA-Ebene ausüben, z. B. durch Codieren einer "Antisense-Message" oder eines Ribozyme, eines Proteins, das das Spleißen oder die 3'-Prozessierung (z. B. Polyadenylierung) beeinflusst, oder es kann ein Protein codieren, welches durch Beeinflussung des Expressionslevels eines anderen Gens innerhalb der Zelle wirkt (d. h. wobei Genexpression breit, als alle Schritte von der Transkriptionsinitiation bis zur Produktion eines prozessierten Proteins umfassend betrachtet wird), eventuell u. a. durch Vermittlung einer veränderten mRNA-Akkumulationsrate, einer Veränderung des mRNA-Transports und/oder einer Veränderung in der posttranskriptionalen Regulation. Demgemäß ist es beabsichtigt, dass die Verwendung des Ausdrucks "therapeutisches Gen" diese und jegliche andere Ausführungsformen dessen umfasst, was allgemeiner als Gentherapie bezeichnet wird, wie dem Fachmann bekannt. Ähnlich kann das rekombinante Adenovirus zur Gentherapie oder zum Studium der Expressionseffekte des Gens in einer gegebenen Zelle oder einem Gewebe in vitro oder in vivo verwendet werden.

[0075] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung einen Vektor bereit, umfassend ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein, welches eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz umfasst. Ein derartiger Vektor umfasst vorzugsweise ein Passagiergen, welches optional entweder in das adenovirale Genom inseriert oder an ein Coat-Protein (z. B. Pentonbasis-, Fiber- oder Hexon-Protein) des Adenovirus mittels einer Protein/DNA-Interaktion angeheftet ist. Alternativ trägt der adenovirale Vektor vorzugsweise eine unverknüpfte DNA oder ein Proteinmolekül oder einen anderen kleinen Rest in eine Zelle mittels Adenovirus-"Bystander"-vermittelter Aufnahme dieser Moleküle (Internationale Patentanmeldung WO 95/21259).

[0076] Nach diesen Grundsätzen kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden zum Transferieren von Nucleinsäuresequenzen, welche als Teil des adenoviralen Genoms transportiert werden (d. h. codiert durch Adenovirus), und zum Transferieren von Nucleinsäuresequenzen, welche an die Außenseite des adenoviralen Kapsids angeheftet sind (Curie) et al., supra), sowie unangehefteter DNA, Protein oder anderen kleinen Molekülen, welche ähnlich durch adenovirale "Bystander"-vermittelte Aufnahme transportiert werden können (Internationale Patentanmeldung WO 95/21259). Das Verfahren kann verwendet werden zur Vermittlung von Gen- und/oder Protein-Delivery entweder ex vivo oder in vivo, wie hierin beschrieben.

[0077] Wünschenswerterweise ist ein Vektor ein viraler Vektor, ausgewählt aus der Gruppe, welche aus unbeküllten Viren besteht. Ein derartiger Vektor umfasst wünschenswerterweise eine nicht-native Aminosäuresequenz gemäß der Erfindung und/oder eine Nucleinsäuresequenz, welche eine derartige nicht-native Aminosäuresequenz codiert. Optimalerweise ist der Vektor ein adenoviraler Vektor, insbesondere ein adenoviraler Vektor, ausgewählt aus der Gruppe, welche besteht aus AdZ.FLAG, AdZ.RKKK2, AdZ.pGS, AdZ.RGD, AdZ.pRGD, AdZ.pLDV und AdZ.pYIGSR.

[0078] Die Mittel zur Herstellung der rekombinanten adenoviralen Vektoren gemäß der Erfindung sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können rekombinantes Adenovirus, welches ein chimäres Fiberprotein umfasst, und das rekombinante Adenovirus, welches zusätzlich ein Passagiergen oder Gene, welche in der Lage sind, in einer bestimmten Zelle exprimiert zu werden, umfasst, mittels eines Transfervektors generiert werden, vorzugsweise mittels eines viralen oder plasmidischen Transfervektors gemäß vorliegender Erfindung. Ein derartiger Transfervektor umfasst vorzugsweise eine chimäre adenovirale Fiber-Sequenz, wie früher beschrieben. Die chimäre Fiberprotein-Gensequenz umfasst eine nicht-native (d. h. Nicht-Wildtyp-)Sequenz an Stelle der nativen Sequenz, welche deletiert worden ist, oder zusätzlich zu der nativen Sequenz.

[0079] Eine rekombinante chimäre Fiberprotein-Gensequenz kann in einen oder von einem adenoviralen Vektor von oder in ein Baculovirus oder einen geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionsvektor überführt werden zur Expression und Evaluierung von Rezeptor- oder Proteinspezifität und -avidität, Trimersierungspotential, Pentonbasis-Bindung und anderen biochemischen Charakteristika. Insbesondere kann das Verfahren zur Proteinproduktion in Baculovirus verwendet werden wie in den folgenden Beispielen dargestellt und wie von Wickham et al. (1995), supra, beschrieben.

[0080] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ferner rekombinante baculovirale und prokaryotische und

eukaryotische Expressionsvektoren bereit, umfassend eine chimäre adenovirale Fiberprotein-Gensequenz, welche ebenfalls Transfervektoren sein können. Die vorliegende Erfindung stellt ferner Vektoren bereit, welche unter eine allgemein gebräuchliche Definition von Transfervektoren fallen, z. B. Vektoren, die Adenovirus-Sequenzen enthaltende Plasmide sind, welche zur Erzeugung neuer Adenovirus-Vektoren verwendet werden. Die chimäre Fiberprotein-Gensequenz umfasst eine nicht-native Sequenz zusätzlich zu oder an Stelle einer nativen Aminosäuresequenz. Dies erlaubt dem resultierenden chimären Fiberprotein, an eine Bindungsstelle zu binden, welche von einer Bindungsstelle, die von der nativen Sequenz gebunden wird, verschieden ist. Durch Überführen des chimären Gens von einem adenoviralen Transfervektor in Baculovirus oder einen prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionsvektor ist eine hohe Proteinexpression erzielbar (wobei die chimäre Fiber ca. 5–50% des Gesamtproteins ausmacht). Bevorzugte Transfervektoren gemäß der Erfindung sind ausgewählt aus der Gruppe, welche besteht aus: p193(F5*), p193 F5F2K(FLAG), p193 F5F2K, p193 F5F2K(RKKK2), p193(F5)pGS(RGD), p193(F5)pLDV, p193(F5)pYIGSR und p193(F5*)RGD.

[0081] Ferner kann ein erfindungsgemäßer Vektor entweder innerhalb, an Stelle oder außerhalb der Codierungssequenz eines Fiberproteins zusätzliche Sequenzen umfassen, welche die Trimerisierungsfähigkeit des Fiberproteins beeinflussen, oder er kann eine Protease-Erkennungssequenz umfassen. Eine Sequenz, welche die Fähigkeit zur Trimerisierung beeinflusst, umfasst eine oder mehrere Sequenzen, welche Fiber-Trimerisierung erlauben. Eine Sequenz, welche eine Protease-Erkennungssequenz umfasst, ist eine Sequenz, welche durch eine Protease gespalten werden kann, wodurch die Entfernung des chimären Coat-Proteins (oder eines Teils desselben) und Anheftung des rekombinanten Adenovirus an eine Zelle mittels eines anderen Coat-Proteins bewirkt wird. Bei Verwendung mit einem Fiberprotein beeinflusst die Protease-Erkennungsstelle die Fiber-Trimerisierung oder Rezeptor-Spezifität des Fiberproteins vorzugsweise nicht. Beispielsweise wird bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vorzugsweise das Fiberprotein oder ein Teil desselben mittels einer Protease-Erkennungssequenz deletiert, und sodann befehligt das Pentonbasis-Protein oder ein anderes Protein Zellbindung/Zelleintritt.

[0082] Mit Bezug auf die Produktion von Vektoren und Transfervektoren gemäß der Erfindung werden Transfervektoren mittels molekularer und genetischer Standardtechniken, wie sie dem Fachmann bekannt sind, konstruiert. Vektoren, welche Virionen und Viruspartikel umfassen, werden mittels viralen Vektoren in den geeigneten Zelllinien produziert. Ähnlich werden die adenovirale Fiber-Chimäre enthaltenden Partikel in Standardzelllinien produziert, z. B. solchen, wie sie derzeit für adenovirale Vektoren verwendet werden. Nach Produktion und Reinigung werden die Partikel, in denen Fiber zu deletieren ist, fiberlos gemacht durch Verdau der Partikel mit einer geeigneten sequenzspezifischen Protease, welche die Fiberproteine spaltet und sie von den viralen Partikeln trennt, um fiberlose Partikel zu generieren.

Illustrative Verwendungen

[0083] Die vorliegende Erfindung stellt ein chimäres Fiberprotein bereit, welches in der Lage ist, mit hoher Effizienz an Zellen zu binden und Zelleintritt zu vermitteln, sowie Vektoren und Transfervektoren, welche dasselbe umfassen. Das chimäre Fiberprotein selbst hat multiple Verwendungen, z. B. als ein Werkzeug für in-vitro-Studien von Adenovirus-Bindung an Zeilen (z. B. durch Scatchard-Analyse, wie früher von Wickham et al. (1993), supra, gezeigt), zum Blockieren von Adenovirus-Bindung an Rezeptoren in vitro (z. B. mit Hilfe von Antikörpern, Peptiden und Enzymen, wie in den Beispielen hierin beschrieben und wie auf dem Fachgebiet bekannt) und, unter Verwendung einiger chimärer Fiberproteine, welche bestimmte Peptidmotive umfassen, zum Schutz gegen adenovirale Infektion in vivo durch Kompetition um die Bindung an die Bindungsstelle, durch die Adenovirus Zelleintritt bewirkt.

[0084] Ein Vektor, welcher ein chimäres Fiberprotein umfasst, kann ferner zur Stammgenerierung und als ein Mittel zum Herstellen neuer Vektoren verwendet werden. Beispielsweise kann die nicht-native Aminosäuresequenz intrazellulär eingeführt werden als ein Mittel zur Generierung neuer Vektoren via Rekombination. Ähnlich kann ein Vektor in der Gentherapie verwendet werden. Beispielsweise kann ein Vektor gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden zur Behandlung einer Anzahl von Erkrankungen durch Delivery von korrekter DNA, d. h. DNA, die eine Funktion codiert, welche entweder fehlt oder beeinträchtigt ist, oder eines diskreten "Killing"-Agens, z. B. DNA, die ein Cytotoxin codiert, welches z. B. nur intrazellulär aktiv ist, in Zielzellen. Erkrankungen, die Kandidaten für eine derartige Behandlung sind, umfassen beispielsweise Krebs, z. B. Melanom, Gliom oder Lungenkrebs; genetische Störungen, z. B. cystische Fibrose, Hämophilie oder Muskeldystrophie; pathogene Infektionen, z. B. HIV, Tuberkulose oder Hepatitis; Herzerkrankungen, z. B. die Verhinderung von Restenose nach Angioplastie oder die Förderung von Angiogenese zur Reperfusion von nekrotischem Gewebe; und Autoimmunkrankheiten, z. B. Crohn'sche Krankheit, Koliitis oder rheumatoide Arthritis.

[0085] Insbesondere kann Gentherapie durchgeführt werden bei der Behandlung von Krankheiten, Störungen oder Zuständen, welche mit verschiedenen Geweben assoziiert sind, an die Adenovirus vor der vorliegenden Erfindung nicht oder nur mit niedriger Affinität und/oder Spezifität binden und eintreten konnte. Beispielsweise kann das Verfahren verwendet werden zum Inkorporieren einer Targeting-Sequenz, welche eine erhöhte Effizienz des Gen-Delivery in verschiedene Gewebe erlaubt. Derartige Targeting-Sequenzen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: eine Heparin-Bindungsdomäne (z. B. polyK, polyR oder Kombinationen hiervon); eine Integrin-Bindungsdomäne (z. B. RGD, LDV und dergleichen); eine Laminin-Rezeptordomäne (z. B. YIGSR [SEQ ID NO:66]); eine DNA-Bindungsdomäne (z. B. polyK, polyR oder Kombinationen hiervon); Antikörper-Epitope (z. B. das FLAG-Peptid DYKDDDDK [SEQ ID NO:2] oder ein anderes Epitop); eine gehirn spezifische Targeting-Domäne (z. B. SLR); und eine beliebige andere Peptid-Domäne, welche an einen Rezeptor bindet (z. B. insbesondere eine Peptid-Domäne im Bereich von ca. 2 bis 200 Aminosäuren).

[0086] Nach diesen Grundsätzen kann das Verfahren verwendet werden zur Erhöhung der Effizienz des adenoviralen vermittelten Delivery z. B. in Knochenmarkszellen, Endothel, Organe wie Lunge, Leber, Milz, Nieren, Gehirn, Auge, Herz, Muskel und dergleichen, hämatopoetische Zellen, Tumorvaskulatur und Tumorzellen. Krankheiten, Störungen oder Zustände, welche mit diesen Geweben assoziiert sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: Angiogenese, Restenose, Inflammation, Krebs, Alzheimer-Krankheit, HIV-(HIV-1-, HIV-2-)Infektion und Anämien.

[0087] Diese im Vorstehenden erwähnten illustrativen Verwendungen sind keinesfalls erschöpfend, und es ist beabsichtigt, dass die vorliegende Erfindung derartige weitere Verwendungen umfasst, die sich aus der Offenbarung ableiten, aber nicht explizit hierin angegeben sind. Ähnlich ergeben sich zahlreiche Vorteile in Zusammenhang mit der Verwendung der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung.

[0088] Beispielsweise wird bei Inkorporation von Antikörper-Epitopen in das Fiberprotein, wenn das Antikörper-Epitop in einer Schleife in der Nähe der Fiber-Rezeptor-Bindungsdomäne ist, die Bindung des spezifischen Antikörpers die normale Rezeptorbindung blockieren, wodurch die Zell-Targeting-Spezifität mittels des Antikörper-Epitops erhöht wird. Wenn die Fiber-Rezeptor-Bindungsdomäne so mutiert ist, dass sie ihren Rezeptor nicht mehr bindet, dann wird die Inkorporation von spezifischen Rezeptor-Bindungsdomänen in die Schleife ein Targeting auf jene Gewebe, welche den komplementären Rezeptor exprimieren, in der Abwesenheit jeglicher kompetierender Bindung, vermittelt durch die Wildtyp-Fiber-Rezeptor-Bindungsdomäne, erlauben.

[0089] Ähnlich kann ferner eine Domäne, welche eine Inaktivierung der Fiber für ihre normale Rezeptorbindung erlaubt, in eine exponierte Schleife des Fiberproteins inkorporiert werden. Die Inaktivierung der Fiber-Bindung an ihren normalen Rezeptor erlaubt spezifisches Targeting über ein anderes Protein oder eine andere Domäne von Adenovirus. Beispielsweise kann auf diese Weise α_v -Integrin-Targeting mit nativer Pentonbasis durchgeführt werden. Nach diesen Grundsätzen kann eine Enterokinase-Spaltstelle (z. B. DYKDDDDK [SEQ ID NO:2]) oder eine Trypsin-Spaltstelle (z. B. RKKRKKK) [SEQ ID NO:1]) in eine Fiber-Schleife inkorporiert werden, gefolgt von einer Behandlung von adenoviralen Partikeln mit Enterokinase oder Trypsin. Native Adenovirus-Partikel sind immun gegen eine derartige Enterokinase- oder Trypsin-Behandlung.

[0090] Ferner ist ein erfindungsgemäßer Vektor, insbesondere ein adenoviraler Vektor, vorteilhaft insofern, als er durch konventionelle Mittel isoliert und gereinigt werden kann. Da Änderungen in dem Vektor auf der Genom-Ebene durchgeführt werden, sind keine beschwerlichen und teuren Modifikationen nach der Produktion erforderlich, wie sie mit anderen Vektoren verbunden sind (siehe z. B. Cotten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6094–6098 (1992); Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6099–6103 (1992)). Ähnlich sind keine speziellen Adenovirus-Rezeptor exprimierenden Zelllinien erforderlich. Ein adenoviraler Vektor, welcher das chimäre Fiberprotein umfasst, kann zu ähnlichen Titern propagiert werden wie ein Wildtyp-Vektor, dem die Fiber-Modifikation fehlt.

Mittel zur Verabreichung

[0091] Die Vektoren und Transfervektoren gemäß vorliegender Erfindung können verwendet werden, um entweder in vitro oder in vivo mit Zellen in Kontakt gebracht zu werden. Erfindungsgemäß umfasst "Inkontaktbringen" beliebige Mittel, mit denen ein Vektor intrazellulär eingeführt wird; das Verfahren ist nicht von besonderen Mitteln zur Einführung abhängig und ist nicht so auszulegen. Mittel zur Einführung sind dem Fachmann wohlbekannt und sind ferner beispielhaft hierin erläutert.

[0092] Demgemäß kann die Einführung z. B. entweder in vitro (z. B. in einem ex vivo-Verfahren der Genthe-

rapie oder in Gewebekulturstudien) oder in vivo durch Elektroporation, Transformation, Transduktion, Konjugation oder "Triparental Mating", (Co-)Transfektion, (Co-)Infektion, Membranfusion mit kationischen Lipiden, Hochgeschwindigkeitsbombardement mit DNA-umhüllten Mikroprojektilen, Inkubation mit Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitat, direkte Mikroinjektion in einzelne Zellen und dergleichen bewirkt werden. Ähnlich können die Vektoren mittels kationischer Lipide, z. B. Liposome, eingeführt werden. Solche Liposome sind kommerziell erhältlich (z. B. Lipofectin®, Lipofectamine™ und dergleichen von Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Ferner können Liposome mit erhöhter Transferkapazität und/oder reduzierter Toxizität in vivo (siehe z. B. die Internationale Patentanmeldung Nr. WO 95/21259) für die vorliegende Erfindung verwendet werden. Ferner stehen andere Methoden zur Verfügung und sind dem Fachmann bekannt.

[0093] Erfindungsgemäß umfasst ein "Wirt" (und damit eine "Zelle" von einem Wirt) einen beliebigen Wirt, in den ein erfindungsgemäßer Vektor eingeführt werden kann, und umfasst somit ein Tier, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Amphibien, Vögel, Fische, Insekten, Reptilien oder nicht-menschliche Säugetiere. Optimalerweise ist ein Wirt ein Säugetier, z. B. ein Rodent, Primat (z. B. Schimpanse, lang-, kurz-, ungeschwänzte Affen, Gorilla, Orang-Utan oder Gibbon), Feline, Canine, Ungulat (z. B. Ruminant oder Schwein). Wünschenswerterweise ist eine solche Wirtszelle eine Zelle, in der ein Adenovirus für einen Zeitabschnitt (z. B. typischerweise für irgendeinen Zeitraum bis zu ca. zwei Monaten und potentiell auch länger) nach Eintritt in die Zelle existieren kann.

[0094] Eine Zelle kann als eine einzige Entität vorliegen oder sie kann Teil einer größeren Zellsammlung sein. Eine solche "größere Zellsammlung" kann z. B. umfassen: eine Zellkultur (gemischt oder rein), ein Gewebe (z. B. epitheliales oder anderes Gewebe), ein Organ (z. B. Herz, Lunge, Leber, Gallenblase, Harnblase, Auge und andere Organe), ein Organsystem (z. B. das Zirkulationssystem, das Respirationssystem, das gastrointestinale System, das Harnsystem, das Nervensystem, das Haut- und Hautanhängsystem oder ein anderes Organsystem), oder einen Organismus (z. B. Vogel, nicht-menschliches Säugetier oder dergleichen). Vorzugsweise ist das zum Zell-Targeting verwendete Peptid-Bindungsmotiv so gewählt, dass die Ziel-Organe/-Gewebe/-Zellen dem Zirkulationssystem (z. B. einschließlich, aber nicht beschränkt auf Herz, Blutgefäße und Blut), dem Respirationssystem (z. B. Nase, Pharynx, Larynx, Trachea, Bronchien, Bronchiolien, Lunge und dergleichen), dem gastrointestinalem System (z. B. einschließlich Mund, Pharynx, Ösophagus, Magen, Darm, Speicheldrüsen, Pankreas, Leber, Gallenblase u. a.), dem Harnsystem (z. B. Nieren, Ureter, Harnblase, Urethra und dergleichen), dem Nervensystem (z. B. einschließlich, aber nicht beschränkt auf Gehirn und Rückenmark und spezielle Sinnesorgane wie das Auge) und dem Haut- und Hautanhängsystem (z. B. Haut) angehören. Noch mehr bevorzugt sind die Zielzellen ausgewählt aus der Gruppe, welche aus Herz-, hämatopoetischen, Lungen-, Leber-, Milz-, Nieren-, Gehirn-, Augen-, Knochenmarks-, Endothel-, Muskel-, Tumorvaskulatur- und Tumorzellen besteht.

[0095] Für den Fachmann wird erkennbar sein, dass geeignete Verfahren zur Verabreichung eines Vektors (insbesondere eines adenoviralen Vektors) gemäß vorliegender Erfindung an ein Tier zum Zwecke der Gentherapie (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, *BioTechniques*, 6, 616–629 (1988); Crystal et al., *Human Gene Ther.*, 6, 643–666 (1995); Crystal et al., *Human Gene Ther.*, 6, 667–703 (1995)); Chemotherapie und Impfung zur Verfügung stehen und dass man zwar mehr als eine Route zur Verabreichung verwenden kann, dass aber die eine Route eine unmittelbarere und effektivere Reaktion bereitstellen kann als die andere Route. Pharmazeutisch zulässige Exzipienten sind dem Fachmann ebenfalls wohlbekannt und sind leicht verfügbar. Die Wahl des Exzipienten wird zum Teil bestimmt durch das jeweilige Verfahren, welches zur Verabreichung des rekombinanten Vektors verwendet wird. Dementsprechend gibt es eine breite Vielfalt an geeigneten Formulierungen zur Verwendung im Kontext der vorliegenden Erfindung. Die folgenden Verfahren und Exzipienten sind rein exemplarisch und in keiner Weise limitierend.

[0096] Weiter: zur Optimierung der Fähigkeit des Adenovirus zum Zelleintritt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Verfahren vorzugsweise durchgeführt in der Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern, die gegen das besondere Adenovirus, welches intrazellulär eingeführt wird, gerichtet sind. In der Abwesenheit derartiger Antikörper besteht keine Möglichkeit, dass das Adenovirus durch den Antikörper gebunden und damit an einer Bindung an die Zelle und/oder einen Eintritt in die Zelle gehindert wird. Für den Durchschnittsfachmann ist es leicht möglich, auf die Anwesenheit derartiger neutralisierender Antikörper zu testen. Techniken, welche auf dem Fachgebiet bekannt sind, können verwendet werden, um zu verhindern, dass die Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern eine effektive Proteinproduktion verhindert (siehe z. B. Crompton et al., *supra*, Internationale Patentanmeldung WO 96/12406).

[0097] Zur oralen Verabreichung geeignete Formulierungen können bestehen aus: (a) flüssigen Lösungen, z.

B. aus einer wirksamen Menge der Verbindung, gelöst in Verdünnungsmitteln wie Wasser, Kochsalzlösung oder Orangensaft; (b) Kapseln, Sachets oder Tabletten, die jeweils eine vorgegebene Menge der Aktivsubstanz als Feststoffe oder Granulen enthalten; (c) Suspensionen in einer geeigneten Flüssigkeit; und (d) geeignete Emulsionen. Tablettenformen können eine oder mehrere der folgenden Komponenten umfassen: Lactose, Mannitol, Maisstärke, Kartoffelstärke, mikrokristalline Cellulose, Acacia, Gelatine, kolloidales Siliciumdioxid, Croscarmellose-Natrium, Talkum, Magnesiumstearat, Stearinsäure und andere Exzipienten, Farbmittel, Verdünnungsmittel, Pufferagentien, Feuchthaltemittel, Konservierungsmittel, Geschmackstoffe und pharmakologisch kompatible Exzipienten. Pastillenformen können die Aktivsubstanz in einem Geschmackstoff umfassen, üblicherweise Saccharose und Acacia oder Tragant, sowie Pastillen, welche die Aktivsubstanz in einer inerten Grundlage umfassen, z. B. Gelatine und Glycerin oder Saccharose und Acacia, Emulsionen, Gele und dergleichen, welche neben der Aktivsubstanz solche Exzipienten enthalten, wie sie auf dem Fachgebiet bekannt sind.

[0098] Ein Vektor oder Transfervektor gemäß vorliegender Erfindung kann – für sich allein oder in Kombination mit anderen geeigneten Komponenten – zu Aerosol-Formulierungen verarbeitet werden, welche durch Inhalation zu verabreichen sind. Diese Aerosol-Formulierungen können in zulässige Drucktreibmittel eingebracht werden, z. B. Dichlordifluormethan, Propan, Stickstoff und dergleichen. Sie können ferner als Arzneimittel für drucklose Zubereitungen, z. B. in Nebulisatoren oder Zerstäubern, formuliert werden.

[0099] Zur parenteralen Verabreichung geeignete Formulierungen umfassen wässrige und nichtwässrige isotonische, sterile Injektionslösungen, welche Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und gelöste Substanzen, welche die Formulierung auf Isotonie mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers einstellen, enthalten können, sowie wässrige und nichtwässrige sterile Suspensionen, welche Suspensionsmittel, Lösungsvermittler, Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Konservierungsmittel umfassen können. Die Formulierungen können in versiegelten Einzeldosis- oder Mehrdosenbehältnissen, z. B. Ampullen und Vials, dargeboten werden und können in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, wobei nur die Zugabe des sterilen flüssigen Exzipienten wie Wasser für Injektionen unmittelbar vor Gebrauch erforderlich ist. Extemporane Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulen und Tabletten der früher beschriebenen Art hergestellt werden.

[0100] Ferner kann ein Vektor oder Transfervektor gemäß vorliegender Erfindung zu Suppositorien verarbeitet werden durch Mischen mit einer Vielfalt von Grundlagen, z. B. mit emulgierenden Grundlagen oder wasserlöslichen Grundlagen.

[0101] Zur vaginalen Verabreichung geeignete Formulierungen können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schaumpräparate oder Sprayformulierungen dargeboten werden, welche neben der Aktivsubstanz solche Träger enthalten, wie sie auf dem Fachgebiet als geeignet bekannt sind.

[0102] Die einem Tier, insbesondere einem Menschen verabreichte Dosis im Kontext der vorliegenden Erfindung variiert je nach dem interessierenden Gen, der verwendeten Zusammensetzung, der Verabreichungsmethode und dem jeweils behandelten Ort und Organismus. Die Dosis sollte jedoch ausreichend sein, um eine therapeutische Antwort zu bewirken.

[0103] Wie bereits angegeben, kann ein Vektor oder ein Transfervektor gemäß vorliegender Erfindung auch *in vitro* Verwendung finden. Ein derartiger Vektor kann als Forschungswerkzeug beim Studium der adenoviralen Anheftung und Infektion von Zellen und in einem Verfahren zum Assay der Bindungsstelle-Ligand-Interaktion verwendet werden. Ähnlich kann das chimäre Fiberprotein, welches eine eingeschränkte nicht-native Aminosäuresequenz zusätzlich zu oder an Stelle einer nativen Aminosäuresequenz umfasst, z. B. in Rezeptor-Ligand-Assays und als Adhäsionsprotein *in vitro* oder *in vivo* verwendet werden.

Beispiele

[0104] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der vorliegenden Erfindung und sind selbstverständlich nicht so auszulegen, dass sie den Bereich der Erfindung in irgendeiner Weise begrenzen.

Beispiel 1

[0105] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von Transfervektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in exponierten Schleifen der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0106] Die Fiberproteine von Ad2 und Ad5 erkennen beide denselben Rezeptor. Eine parallele Evaluierung der Proteinstruktur des Fiber-Knob und seiner DNA-Restriktionskarte zeigt, dass der Ad2-Fiber-Knob eine singuläre Spe I-Restriktionsstelle in einer Region enthält, welche eine exponierte Schleife in dem Protein codiert. Die Aminosäuren in dieser Schleife sind in keine Interaktionen involviert, welche für Proteinfaltung relevant sind. Demgemäß ist es unwahrscheinlich, dass Hinzufügungen zu dieser Schleife die Fähigkeit des Fiberproteins, sich zu falten, beeinflussen. Chimäre adenovirale Fiberproteine, welche Modifikationen von einer exponierten Schleife umfassen (insbesondere der HI-Schleife), wurden konstruiert wie hierin beschrieben.

[0107] Zur Vektorkonstruktion und -charakterisierung wurden molekulare und genetische Standardtechniken durchgeführt, z. B. die Generierung von Stämmen, Plasmiden und Viren, Gelelektrophorese, DNA-Manipulationen, einschließlich Plasmidisolierung, DNA-Klonierung und -Sequenzierung, Western-Blot-Assays und der gleichen, wie sie dem Fachmann bekannt sind und im Detail in Standard-Laborhandbüchern beschrieben sind (z. B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1992); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, (1987)). Restriktionsenzyme und andere Enzyme, welche für molekulare Manipulationen eingesetzt wurden, wurden von kommerziellen Quellen bezogen (z. B. Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis, Indiana; New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Maryland) und gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Für Experimente verwendete Zellen (z. B. Zellen der transformierten humanen embryonalen Nierenzelllinie 293 (d. h. CRL 1573-Zellen) und andere, von American Type Culture Collection gelieferte Zellen) wurden kultiviert und aufrechterhalten mittels steriler Standard-Kulturreagenzien, -medien und -techniken, wie früher beschrieben (Erzerum et al., Nucleic Acids Research, 21, 1607–1612 (1993)).

[0108] Zur Herstellung von rekombinanten Adenovirus-Vektoren, welche Targeting-Sequenzen enthalten, durch Ligation von Restriktionsverdaufragmenten war es zunächst notwendig, die in einem Transfervektor präsente Knob-Region des Ad5 gegen die Knob-Codierungsregion von Ad2 auszutauschen, weil die HI-Schleife von Ad2 eine singuläre Spe I-Restriktionsstelle umfasst, welche Klonierung von bestimmten Targeting-Sequenzen in diese Stelle erlaubt. Das Nettoergebnis dieser Vektormanipulation war die Erzeugung einer Fiber-Chimäre, in welcher die den Schwanz und den Schaft der Fiber codierende DNA von Ad5 stammt, die das Knob codierende DNA von Ad2 stammt und das Knob ferner eine nicht-native Aminosäuresequenz in der HI-Schleife aufweist, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Alternativ wurde eine Standard-Oligonucleotid-vermittelte ortsgerechte Mutagenese nach den Angaben des Herstellers (Stratagene, La Jolla, CA) verwendet. Für ortsgerechte Mutagenese besteht keine Notwendigkeit, die Fiber-Knobs auszutauschen, weil keine singulären Restriktionsstellen erforderlich sind. Bei einem weiteren alternativen Verfahren der Erfindung, welches in späteren Beispielen beschrieben ist, wird die Targeting-Sequenz an den Terminus des Fiber-Knob-Proteins platziert, wie in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0109] In dem ersten Schritt des Verfahrens zur Herstellung von Fiber-Knob-Insertionen in einer Schleife wurde der in [Fig. 3](#) gezeigte Transfervektor p193(F5*) konstruiert. Dieses Plasmid enthält eine 8-Nucleotid-Insertion zwischen dem letzten Aminosäure-Codon der Fiber-Codierungssequenz und dem Stop-Codon. Die 8-Nucleotid-Insertion enthält eine singuläre Bam HI-Restriktionsstelle, welche einen "Straightforward"-Austausch von Ad5-Fiber-Domänen mit anderen Fiber-Domänen von anderen Adenovirus-Serotypen erlaubt. Namentlich ist die Sequenz des Wildtyp-Ad5-Fiber-Gens:

TCA TAC ATT GCC CAA GAA TAA A

[SEQ ID NO:6]

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu *

[SEQ ID NO:7]

worin * einen Terminations-Codon bezeichnet. Im Vergleich ist der C-Terminus des mutierten Fiber-Gens, welches in p193(F5*) präsent ist:

TCA TAC ATT GCC CAA GAA GGA TCC AAT AAA

[SEQ ID NO:8]

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Asn Lys

[SEQ ID NO:9]

worin die unterstrichene Sequenz die in das Fiberprotein eingeführte Bam HI-Stelle bezeichnet. Diese Bam HI-Stelle dient ferner dazu, für die Aminosäuren Glycin und Serin zu codieren.

[0110] Das Transferplasmid p193(F5*) wurde aus p193NS(ΔF) konstruiert. Das mutierte Fiber-Gen (d. h. das Fiber-Gen, welches die Bam HI-Stelle vor dem Stop-Codon umfasst) wurde in das Fiber-minus-Plasmid p193NS(ΔF) inkorporiert mittels synthetischer Sense- und Antisense-Oligonucleotid-Primer, um das Fiber-Gen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren und dabei gleichzeitig eine modifizierte Bam HI-Stelle auf den letzten Codon des Fiber-Gens folgend zu inkorporieren, um das mutante Fiber-Gen zu erzeu-

gen. Die Primer, welche zum Amplifizieren von der Nde I-Stelle zu den C-terminalen Codierungsregionen des Fiber-Gens aus Ad5-Genom-DNA verwendet wurden, waren: Antisense-Primer T CCC CCC GGG TCT AGA TTA GGA TCC TTC TTG GGC AAT GTA TGA (Bam HI-Stelle unterstrichen) [SEQ ID NO:10]; Sense-Primer CGT GTA TCC ATA TGA CAC AGA (Nde I-Stelle unterstrichen) [SEQ ID NO:11]. Das PCR-Produkt wurde dann mit Nde I und Bam HI geschnitten und in die Nde I/Bam HI-Stellen von p193NS(ΔF) kloniert.

[0111] Das Plasmid p193NS(ΔF) selbst wurde konstruiert mittels einer intermediären Reihe von Vektoren. Namentlich wurde zunächst das Transferplasmid p193NS83-100 konstruiert durch Klonieren des Ad5-Nde I-Sal I-Fragments, welches die Karteneinheiten-Region 83-100 des Ad5-Genoms überspannt, welche das Fiber-Gen enthält, in das Plasmid pNEB193 (New England Biolabs, Beverly, MA). Das Nde I-Mun I-Fragment wurde ersetzt durch ein synthetisches Oligonucleotid, umfassend eine Bam HI-Stelle, die von einer 5'-Nde I-Stelle und einer 3'-Mun I-Stelle flankiert war, um Klonierung zu erleichtern. Das doppelsträngige synthetische Oligonucleotid-Fragment wurde aus den überlappenden synthetischen einzelsträngigen Oligonucleotiden Sense (d. h. umfassend die Sequenz TAT GGA GGA TCC AAT AAA GAA TCG TTT GTG TTA TGT TTC AAC GTG TTT ATT TTT C [SEQ ID NO:12]) und Antisense (d. h. umfassend die Sequenz AAT TGA AAA ATA AAC ACG TTG AAA CAT AAC ACA AAC GAT TCT TTA TTG GAT CCT CCA [SEQ ID NO:13]) erzeugt. Die Enden der überlappenden Oligomere wurden so erzeugt, dass Überhänge entstehen, die kompatibel sind für eine direkte Klonierung in die Nde I- und Mun I-Stellen. Dem resultierenden Vektor p193NS(ΔF) fehlt die komplette Codierungssequenz für das Fiber-Gen, er enthält aber die gesamte adenovirale E4-Codierungssequenz. Das Plasmid behält das AATAAA-Polyadenylierungssignal bei, welches in dem synthetischen Nde I/Mun I-Oligonucleotid enthalten ist, und inkorporiert ferner die neue Bam HI-Restriktionsstelle.

[0112] Nach seiner Konstruktion in einer Reihe von sequentiellen Klonierungsschritten wurde also der Transfervektor P193(F5*) in nachfolgenden Vektorkonstruktionen verwendet. Namentlich wurden das Sense-Oligonucleotid F5F2K(s)N (d. h. umfassend die Sequenz GGC CAT GGC CTA GAA TTT GAT TCA AAC GGT GCC ATG ATT ACT AAA CTT GGA GCG [SEQ ID NO:14], enthaltend eine Nco I-Restriktionsstelle) und der Antisense-Oligonucleotid-Primer F5F2K(a)B (d. h. umfassend die Sequenz GC GGA TCC TTA TTC CTG GGC AAT GTA GGA [SEQ ID NO:15], enthaltend eine Bam HI-Restriktionsstelle) verwendet, um die Knob-Codierungsregion aus gereinigter Ad2-DNA mittels PCR zu amplifizieren. Die Inkorporation dieser Stellen an beiden Enden des PCR-Produktes erlaubte, es mit Nco I und Bam HI zu schneiden und in das Basisplasmid p193(F5*) zu klonieren, um den in [Fig. 4](#) gezeigten Transfervektor p193 F5F2K zu erzeugen. Anders als p193(F5*) enthält p193 F5F2K eine singuläre Spe I-Restriktionsstelle innerhalb des Ad2-Fiber-Gens, welche eine exponierte Schleife in dem Protein codiert. Namentlich umfasst das in p193 F5F2K präsente Fiber-Gen die mutierte Fiber-Sequenz

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGT GAA TCC ACA

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Ser Glu Ser Thr

GAA ACT

[SEQ ID NO:16]

Glu Thr

[SEQ ID NO:17]

worin die unterstrichene Sequenz die neue, in das Fiber-Gen eingeführte Spe I-Stelle bezeichnet.

[0113] Dieser Vektor wurde dann zum Klonieren von Targeting-Sequenzen in die Spe I-Stelle verwendet. Insbesondere wurden eine Nucleinsäuresequenz, welche das FLAG-Peptidmotiv DYKDDDDK (d. h. Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys [SEQ ID NO:2]) codiert, und eine Nucleinsäuresequenz, welche die Strecke von 8 basischen Aminosäuren RKKKRK (Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys [SEQ ID NO:1]), umfassend die Heparin-Bindungsdomäne, codiert, in die Spe I-Stelle von p193 F5F2K mittels überlappender Sense- und Antisense-Oligonucleotide kloniert.

[0114] Namentlich umfasst die PolyGS(RKKK)₂-Sequenz:

ACT AGA AAA AAA AAA CGC AAG AAG AAG

Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys

ACT AGT

[SEQ ID NO:18]

Thr Ser

[SEQ ID NO:19].

[0115] Das 27-mere Sense-Oligonucleotid PolyGS(RKKK)₂(s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA AAG AAG AAA CGC AAA AAG AAG A [SEQ ID NO:20]) und das 27-mere Antisense-Oligonucleotid PolyGS(RKKK)₂(a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT CTT CTT TTT GCG TTT CTT CTT T [SEQ ID NO:21]) wurden verwendet zum Klonieren der PolyGS(RKKK)₂-Sequenz, umfassend das Peptidmotiv RKKKRKKK [SEQ ID NO:17]. Dieses Plasmid wurde konstruiert durch Klonieren der die Bindungsdomäne codierenden DNA-Sequenz in die Spe I-Stelle von p193 F5FK2. Die überlappenden Sense- und Antisense-Oligonucleotide, welche die Bindungsdomäne codieren, wurden zunächst "annealt" und dann direkt in die Spe I-Restriktionsstelle ligiert, um in dem in [Fig. 5](#) gezeigten Plasmid p193 F5F2K(RKKK2) zu resultieren.

[0116] Ähnlich umfasst die FLAG-Sequenz:

ACT AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG

Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

ACT AGT

[SEQ ID NO:22]

Thr Ser

[SEQ ID NO:23].

[0117] Das 30-mere Sense-Oligonucleotid FLAG(s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG A [SEQ ID NO:24]) und das 30-mere Antisense-Oligonucleotid FLAG(a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT CTT ATC ATC GTC GTC CTT GTA GTC T [SEQ ID NO:25]) wurden verwendet zum Klonieren der FLAG-Peptidsequenz auf eine ähnliche Weise wie für p193 F5F2K(RKKK2) beschrieben, um in dem in [Fig. 6](#) gezeigten Plasmid p193 F5F2K(FLAG) zu resultieren.

[0118] Die FLAG-Sequenz wird von dem anti-FLAG M2-Antikörper (Kodak, New Haven, CT) erkannt und wird zum Targeting von Adenovirus mittels bispezifischer Antikörper verwendet (Wickham et al., "Targeted Adenovirus Gene Transfer to Endothelial and Smooth Muscle Cells Using Bispecific Antibodies", J. Virol., 70(10), 6831-6838 (1996)). Die Peptid-Sequenz RKKKRKKK [SEQ ID NO:17] erkennt zelluläres Heparinsulfat und wird zum Targeting des Adenovirus auf Heparinsulfat enthaltende Rezeptoren auf Zellen verwendet. Weil Heparinsulfatreste auf nahezu allen Säugetierzellen exprimiert werden, erlaubt das Heparin-Bindungsmotiv AdF2K(RKKK2) ein breites Spektrum von Zellen zu binden und zu transduzieren im Vergleich zu unmodifizierten (d. h. Wildtyp-)Adenovirus-Vektoren.

[0119] Es wurde bestätigt, dass die Plasmide p193 F5F2K(RKKK2) und p193 F5F2K(FLAG) die korrekten Inserte enthielten, durch die Verwendung von PCR-Analyse und Mobility-Shift-Assays, durchgeführt an durch Restriktionsverdauungen der Plasmide generierten DNA-Fragmenten. Namentlich ist der relevante Bereich der modifizierten Schleife des Fiber-Knob, welcher in p193 F5F2K(RKKK2) präsent ist:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGA AAG AAG AAA CGC AAA AAG AAG

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys

ACT AGT GAA TCC ACA GAA ACT

[SEQ ID NO:26]

Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

[SEQ ID NO:27].

[0120] Der relevante Bereich der modifizierten Schleife des Fiber-Knob, welcher in p193 F5F2K(FLAG) präsent ist, ist:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

AAG ACT AGT GAA TCC ACA GAA ACT

[SEQ ID NO:28]

Lys Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

[SEQ ID NO:29].

[0121] Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung wurde ein zusätzliches mutantes Fiberprotein durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugt. Es wurden Primer synthetisiert, um die DNA Sequenz, welche Aminosäuren der CD-, FG- und IJ-Schleifen des Ad5-Fiber-Knob codiert, zu ersetzen. Insbesondere wurde die Sequenz, welche die Aminosäuresequenz SGTVQ [SEQ ID NO:81] (Aminosäuren 449 bis 453 der CD-Schleife des na-

tiven Ad5-Fiber-Knob) codiert, durch DNA ersetzt, welche die Aminosäuresequenz Gly Ser Gly Ser Gly [SEQ ID NO:82] codiert, durch Durchführung ortsgerichteter Mutagenese des Plasmids pAcSG2 F5KN (Roelvink et al.) mittels der Primer

GGC AGT TTG GCT CCA ATA GGA TCC GGG TCT GGA AGT GCT CAT CTT ATT
[SEQ ID NO:83]

und

AAT AAG ATG AGC ACT TCC AGA CCC GGA TCC TAT TGG AGC CAA ACT GCC
[SEQ ID NO:85].

[0122] Ähnlich wurden mittels geeigneter Primer für ortsgerichtete Mutagenese die Aminosäuresequenzen Ser His Gly Lys Thr Ala [SEQ ID NO:86] (Aminosäuren 507–512) der FG-Schleife und Ser Gly His Asn [SEQ ID NO:87] (Aminosäuren 559–562) der IJ-Schleife durch Gly Ser Gly Ser Gly Ser [SEQ ID NO:88] bzw. Gly Ser Gly Ser [SEQ ID NO:89] ersetzt. Die resultierenden Baculovirus-Transfervektoren, welche die mutierten Fiber-Knob-Gene enthielten, wurden zur Herstellung von rekombinantem Baculovirus verwendet. Die rekombinanten Baculoviren wurden verwendet, um rekombinante Fiber-Knob-Proteine, welche die Mutationen enthalten, herzustellen. Es wurde gefunden, dass die resultierenden Proteine voll löslich waren, was anzeigt, dass sie sich korrekt zu Trimeren gefaltet hatten. Ferner wurden die löslichen Proteine verwendet, um Adenovirus-Bindung an Zellen zu blockieren, was anzeigt, dass die Substitutionen in dem Fiber-Gen die Bindung an den Fiber-Rezeptor nicht unterbrachen.

[0123] Diese Resultate bestätigen somit, dass die hierin beschriebenen Verfahren verwendet werden können, um Transfervektoren zu konstruieren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in einer exponierten Schleife der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

Beispiel 2

[0124] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von adenoviralen Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in einer Schleife der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0125] Die Transferplasmide p193 F5F2K(RKKK2) und p193 F5F2K(FLAG) wurden verwendet, um die korrespondierenden adenoviralen Vektoren zu erhalten, welche die FLAG- und RKKK2-Peptidmotive umfassen. Erreicht wurde dies durch Verdau dieser Plasmide (welche die essentielle E4-Region von Adenovirus enthalten) mit Sal I und Transfektion derselben in 293-Zellen, welche bereits 1 Stunde zuvor mit dem Adenovirus-Vektor AdZ.E4Gus infiziert worden waren. Diesem Adenovirus-Vektor fehlt die E4-Region, und er kann in 293-Zellen ohne die E4-Gene nicht replizieren. Erst wenn AdZ.E4Gus-DNA mit Plasmid-DNA, z. B. p193 F5F2K, p193 F5F2K(FLAG) und p193 F5F2K(RKKK2), rekombiniert, um die E4-Gene zu erhalten, ist der Vektor fähig, in 293-Zellen zu replizieren. Während dieser Rekombination zur Rettung des adenoviralen Vektors nimmt der neu gebildete Vektor ferner die durch die Plasmide codierte mutierte Fiber-Sequenz auf.

[0126] Lebensfähiges rekombinantes E4⁺-Adenovirus, enthaltend die F2K(RKKK2)- und F2K(FLAG)-DNA-Sequenzen (d. h. AdZ.FLAG und AdZ.RKKK2), wurde durch Plaquebildung der transfizierten Zelllysate 5 Tage nach Transfektion isoliert. Die rekombinanten Adenoviren wurden dann zweimal auf 293-Zellen Plaque-gereinigt. Die gereinigten Plaques wurden auf 293-Zellen amplifiziert. Alle Viren wurden aus infizierten Zellen 2 Tage post Infektion in 3 Gefrier-Tau-Zyklen gereinigt, gefolgt von zwei sukzessiven Bandenbildungen auf CsCl-Gradienten. Das gereinigte Virus wurde gegen 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8, enthaltend 10 mM MgCl₂, 3% Saccharose, dialysiert und bei -80°C eingefroren, bis es gebraucht wird. Durch PCR wurde verifiziert, dass die gereinigten Viren entweder das RKKK2-Insert oder das FLAG-Insert enthielten.

[0127] Diese adenoviralen Vektoren und die Sequenzen, die sie spezifisch gezielt ansteuern infolge ihres Besitzes von modifizierten Fiber-Knobs, sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Tabelle 1 Adenovirale Vektoren umfassend eingeschränkte Peptidmotive

Vektorname	Zielrezeptor	Zielsequenz
AdZ.FLAG	Beliebiger Rezeptor (unter Verwendung eines bispezifischen Antiköpers)	TRDYKDDDDKTS Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Ser [SEQ ID NO:23]
AdZ.RKKK2	Heparinsulfat enthaltende Rezeptoren	TRKKKRKKKTS Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Thr Ser [SEQ ID NO:19]

[0128] Diese Resultate bestätigen somit, dass die hierin beschriebenen Verfahren verwendet werden können, um adenovirale Vektoren zu konstruieren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in einer exponierten Schleife der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

Beispiel 3

[0129] Dieses Beispiel beschreibt die Charakterisierung von adenoviralen Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in einer Schleife der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0130] Es wurde gezeigt, dass das in dem AdZ.FLAG-Vektor präsente FLAG-Insert funktional zugänglich und zur Bindung des anti-FLAG-M2-mAB befähigt war, wie abgeschätzt mittels Immunofluoreszenz, wie früher beschrieben (Wickham et al., 1993). Kurz gefasst wurden 293-Zellen bei einer niedrigen Multiplizität der Infektion (d. h. bei einem MOI-Wert von ca. 0,02) mit den AdZ.RKKK2- oder AdZ.FLAG-Isolaten infiziert. Die Zellen wurden zwei Tage post Infektion fixiert und entweder mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Pentonbasis-Antikörper oder einem Maus-anti-FLAG-mAB inkubiert, gefolgt von Inkubation mit anti-Kaninchen- oder anti-Maus-FITC-Antikörper. Der anti-Pentonbasis-Antikörper erkannte mit jedem der beiden Viren infizierte Zellen. Im Vergleich dazu erkannte der FLAG-mAB nur die mit dem AdZ.FLAG-Virus infizierten Zellen, nicht aber die mit dem AdZ.RKKK2-Virus infizierten Zellen.

[0131] Diese Resultate bestätigen, dass gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren produzierte Adenoviren lebensfähig sind und dass das Insert (z. B. das FLAG-Epitop), welches in einer exponierten Schleife von Fiberprotein präsent ist, zugänglich ist für seine korrespondierende Bindungsentität (z. B. eine Zelloberflächen-Bindungsstelle oder einen Antikörper, z. B. den anti-FLAG-Antikörper) und dieselbe zu binden vermag. Diese Resultate bestätigen, dass das erfindungsgemäße Verfahren für adenoviral vermitteltes Zell-Targeting verwendet werden kann.

Beispiel 4

[0132] Dieses Beispiel beschreibt Gen-Delivery, vermittelt durch adenovirale Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotiven in einer exponierten Schleife der Knob-Region des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0133] Zum Testen der Fähigkeit des RKKK2-Motivs, Zell-Targeting zu bewirken, wurden 293-Zellen (welche relativ hohe Levels des Rezeptors, über den Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein Zelleintritt bewirkt, zu exprimieren scheinen) für 30 Minuten in der Anwesenheit und in der Abwesenheit von kompetierendem Wildtyp-Fiberprotein vorinkubiert. Gereinigte AdZ- oder AdZ.RKKK2-Vektoren wurden sodann mit den Zellen für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht in Kulturmedium

inkubiert. Sodann wurde aus lysierten Zellen die β -Galactosidase-Aktivität mittels eines fluorometrischen β -Galactosidase-Assay-Kit (Tropix, Redford, MA) bestimmt. Die Aktivität wurde in einem Luminometer in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen.

[0134] Die in [Fig. 7](#) illustrierten Daten demonstrieren Gen-Delivery in 293-Zellen, bewirkt durch den AdZ.RKKK2-Vektor. Wie aus dieser Figur ersichtlich, blockierte das rekombinante Wildtyp-Fiberprotein Gen-Delivery durch AdZ, nicht aber Gen-Delivery durch AdZ.RKKK2. Der AdZ.RKKK2-Vektor war in der Lage, den Fiber-vermittelten Block von adenoviralem Gen-Delivery zu überwinden.

[0135] Diese Resultate bestätigen, dass dieses eingeschränkte Peptidmotiv, welches in der Fiber-Schleife präsent ist, in der Lage ist, Zellbindung/-eintritt effizient zu vermitteln. Ferner bestätigen die Resultate weiter, dass adenovirale Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen Peptidmotive in einer exponierten Schleife des Knob des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen, zum Delivery (z. B. von DNA und/oder Protein) in Zellen verwendet werden können.

Beispiel 5

[0136] Dieses Beispiel beschreibt andere Oligonucleotide, welche zum Inserieren einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein, vorzugsweise in eine exponierte Schleife des Adenovirus-Fiber-Knob, aber auch am C-Terminus des Proteins, verwendet werden können.

[0137] Die in dem vorausgehenden Beispiel beschriebenen Klonierungstechniken können verwendet werden, um in eine exponierte Schleife des Fiber-Knob Inserte zu inkorporieren, welche Peptidmotive umfassen, die z. B. α_v -Integrine, $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, FLAG-mAb oder andere Zelloberflächen-Bindungsstelle gezielt ansteuern.

[0138] Insbesondere kann eine HA α_v -Sequenz inseriert werden.

[0139] Diese Sequenz umfasst:

ACT AGA GCC TGC GAC TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT
Thr Arg Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly

ACT AGT [SEQ ID NO:30]
Thr Ser [SEQ ID NO:31].

[0140] Die Sequenz kann inseriert werden unter Verwendung des 39-meren Sense-Oligonucleotids HAav(s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA GCC TGC GAC TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT A [SEQ ID NO:32]) und des 30-meren Antisense-Oligonucleotids HAav(a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT ACC GCA AAA ACA ATC GCC GCG ACA GTC GCA GGC T [SEQ ID NO:33]). Diese Oligonucleotide wurden zur Herstellung von p193(F5*)pGS(RGD) verwendet, welches zur Herstellung von AdZ.RGD verwendet wurde.

[0141] Ähnlich kann eine HA $\alpha_5\beta_1$ -Sequenz inseriert werden, welche Targeting auf $\alpha_5\beta_1$ -Integrin erlaubt. Diese repräsentative Sequenz umfasst:

ACT AGA TGC CGC CGC GAA ACC GCT TGG GCC TGT
Thr Arg Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys

ACT AGT [SEQ ID NO:34]
Thr Ser [SEQ ID NO:35].

[0142] Die Sequenz kann inseriert werden unter Verwendung des 39-meren Sense-Oligonucleotids HA $\alpha_5\beta_1$ (s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA TGC CGC CGC GAA ACC GCT TGG GCC TGT A [SEQ ID NO:36]) und des 39-meren Antisense-Oligonucleotids HA $\alpha_5\beta_1$ (a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT ACA GGC CCA AGC GGT TTC GCG GCG GCA T [SEQ ID NO:37]).

[0143] Diese Sequenzen (und andere hierin beschriebene Sequenzen), welche Targeting auf die α_v -Integrine erlauben, können Verwendung finden, weil dieser Zielrezeptor eine breite Verteilung demonstriert, einschließlich Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Der Adhäsionsrezeptor scheint wichtig zu sein bei Wunden (d. h.

betreffend sowohl Heilung als auch Exazerbation derselben), sowie in der Angiogenese, Restenose und Metastasierung. Allgemein ist der Rezeptor in proliferierenden Endothelzellen und glatten Muskelzellen aufreguliert und zeigt hohe Expression in Melanom und Gliom. Normale Liganden für die α_v -Integrin-Rezeptoren umfassen Vitronectin, Collagen, Fibronectin, Laminin und Osteopontin.

[0144] Ferner kann eine E-Selectin-Targeting-Sequenz inseriert werden. Eine repräsentative Sequenz umfasst:

ACT AGA GAC ATT ACC TGG GAC CAG CTT TGG GAC CTT ATG AAG

Thr Arg Asp Ile Thr Trp Asp Gln Leu Trp Asp Leu Met Lys

ACT AGT

[SEQ ID NO:38]

Thr Ser

[SEQ ID NO:39].

[0145] Weitere Liganden, welche Elastin binden, sind im Stand der Technik beschrieben und können ähnlich als nicht-native Aminosäuresequenzen für die Generierung von Peptidmotiven wie hierin beschrieben verwendet werden (siehe z. B. Martens et al., J. Biolog. Chem., 270, 21129–21136 (1995)). Die E-Selectin-Sequenz kann inseriert werden unter Verwendung des 42-meren Sense-Oligonucleotids E-Selectin(s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA GAC ATT ACC TGG GAC CAG CTT TGG GAC CTT ATG AAG A [SEQ ID NO:40]) und des 42-meren Antisense-Oligonucleotids E-Selectin(a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT CTT CAT AAG GTC CCA AAG CTG GTC CCA GGT AAT GTC T [SEQ ID NO:41]).

[0146] Ferner können eine PolyGS(RKKK)₃-Sequenz oder andere Variationen dieser Sequenz inseriert werden. Diese Sequenz umfasst:

ACT AGA AAG AAG AAG CGC AAA AAA AAA AGA AAG AAG AAG

Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys

ACT AGT

[SEQ ID NO:42]

Thr Ser

[SEQ ID NO:43].

[0147] Die Sequenz kann inseriert werden unter Verwendung des 39-meren Sense-Oligonucleotids PolyGS(RKKK)₃(s) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA AAG AAG AAG CGC AAA AAA AAA AGA AAG AAG AAG A [SEQ ID NO:44]) und des 39-meren Antisense-Oligonucleotids PolyGS(RKKK)₃(a) (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT CTT CTT CTT TCT TTT TTT GCG CTT CTT CTT T [SEQ ID NO:45]).

[0148] Dieses Beispiel bestätigt somit, dass andere Oligonucleotide verwendet werden können zum Inserieren einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in ein Fiberprotein. Derartige Insertionen können entweder in einer exponierten Schleife des Adenovirus-Fiber-Knob oder, wie im Folgenden beschrieben, am C-Terminus des Fiberproteins durchgeführt werden. Ferner kann die nicht-native Aminosäuresequenz in das chimäre Fiberprotein nicht nur als eine Insertion in die Sequenz inkorporiert werden, sondern auch als ein Austausch von adenoviralen Sequenzen. Durchgeführt werden kann dies durch Modifikation der hierin beschriebenen Klonierungsprozeduren, wie sie dem Fachmann bekannt sind.

Beispiel 6

[0149] In einer ähnlichen Weise wie die durch Platzierung eines Peptidmotivs innerhalb einer exponierten Schleife des Adenovirus-Fiberproteins erzielte Einschränkung kann eine Einschränkung durch geeignete Modifikation eines Peptidmotivs am C-Terminus des Fiberproteins erhalten werden, um im Wesentlichen eine nicht-präexistierende Schleife an dieser Stelle zu erzeugen. Dieses Beispiel beschreibt also die Konstruktion von Transfervektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen eingeschränkten Peptidmotiven am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen. Dieses Verfahren ist in [Fig. 2](#) dargestellt.

[0150] Der in Beispiel 1 beschriebene Transfervektor p193(F5*) wurde als ein Basisplasmid verwendet, um chimäre Adenovirus-Partikel zu erzeugen, welche C-terminale Hinzufügungen zu dem Fiber-Gen enthalten. Insbesondere wurden DNA-Sequenzen, welche eine Linker-Sequenz gefolgt von einer Targeting-Sequenz und einem Stop-Codon codieren, in die Bam HI-Stelle kloniert, um weitere Transfervektoren zu erzeugen, die ih-

rerseits (d. h. über die Konstruktion der weiteren Transfervektoren p193(F5)pGS(RGD) und p193(F5)pGS) zur Herstellung von chimären Adenovirus-Partikeln verwendet wurden.

[0151] Die mutanten Transferplasmide, welche Sequenzen enthalten, die einen Glycin/Serin-Aminosäure-Repeat-Linker, eine Targeting-Sequenz und einen Stop-Codon codieren, wurden hergestellt durch Klonierungen von synthetischen Oligonucleotiden in die Bam HI-Stelle von p193(F5*). Die Klonierungsreaktionen wurden im Wesentlichen durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben. Insbesondere waren die überlappenden synthetischen Oligonucleotide, welche zur Herstellung des in [Fig. 8](#) gezeigten Transferplasmids p193(F5)pGS(RGD) verwendet wurden, folgende: Sense, GA TCA GGA TCA GGT TCA GGG AGT GGC TCT GCC TGC GAC TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT TAA G [SEQ ID NO:46]; Antisense, GA TCC TTA ACC GCA AAA ACA ATC GCC GCG ACA GTC GCA GGC AGA GCC ACT CCC TGA ACC TGA TCC T [SEQ ID NO:47]. Dieses Plasmid umfasst die Nucleinsequenz GCC CAA GAA GGA TCA GGA TCA GGT TCA GGG AGT GGC TCT GCC TGC GAC TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT TAA GGA TCC AAT AA [SEQ ID NO:48], welche die Aminosäuresequenz Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly *** [SEQ ID NO:49] codiert, worin *** sich auf den Stop-Codon bezieht. Das RGD-Peptid ist innerhalb dieser größeren Sequenz präsent. Das Plasmid p193(F5)pGS(RGD) umfasst also die Targeting-Sequenz CDCRGDCFC (d. h. Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys [SEQ ID NO:3]), welche in der größeren Sequenz Ser Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly [SEQ ID NO:79] präsent ist. Diese Sequenz, wie andere, früher beschriebene Sequenzen, welche das Tripeptidmotiv RGD enthalten, fungieren als ein Ligand für die Zielrezeptor- α_5 -Integrine. Jedoch binden hoch eingeschränkte Formen von RGD mit höheren Affinitäten an Integrine als lineare Formen (siehe z. B. Aumailley et al., FEBS, 291, 50–54 (1991); Cardarelli et al., J. Biolog. Chem., 269., 18668–18673 (1994); Koivunen et al., Bio/Technology, 13, 265–270 (1995)). Nach diesen Grundsätzen bindet das eingeschränkte RGD-Targeting-Motiv, welches in p193(F5)pGS(RGD) präsent ist, mit ca. 100fach höherer Affinität an α_5 -Integrine als ähnliche, lineare RGD-Motive. Jedes Paar von Cysteinen beiderseits des RGD bildet Disulfidbindungen mit dem gegenüberliegenden Paar von Cysteinen, um eine hoch eingeschränkte RGD-Schleife zu bilden.

[0152] Ferner können Variationen der Targeting-Sequenz CRCRGDCFC [SEQ ID NO:3] im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispielsweise kann an Stelle von zwei Cysteinresten beiderseits der RGD-Tripeptid-Sequenz nur ein Rest verwendet werden. Es kann eine beliebige Sequenz verwendet werden, solange eine schleifenähnliche Struktur erzeugt wird, welche die RGD-Sequenz umfasst, und solange die Sequenz ein oder mehrere Cysteinpaare umfasst. Ferner kann die RGD-Sequenz mit einer anderen Sequenz substituiert werden, z. B. LDV.

[0153] Mit Bezug auf die Konstruktion des verwandten Transferplasmids p193(F5)pGS waren die überlappenden synthetischen Oligonucleotide, welche zur Herstellung des Transferplasmids verwendet wurden, folgende: Sense, PolyGS(s), GA TCC GGT TCA GGA TCT GGC AGT GGC TCG ACT AGT TAA A [SEQ ID NO:50]; Antisense, PolyGS(a), GA TCT TTA ACT AGT CGA GCC ACT GCC AGA TCC TGA ACC G [SEQ ID NO:51]. Die Sense- und Antisense-Oligonucleotide wurden in äquimolaren Verhältnissen gemischt und in die Bam HI-Stelle von p193(F5*) kloniert, um p193(F5)pGS zu erzeugen. Der Transfervektor p193(F5)pGS wurde sodann verwendet, um weitere Transfervektoren zu konstruieren, wie in den folgenden Beispielen beschrieben.

[0154] Dieses Beispiel bestätigt somit, dass Transfervektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen eingeschränkten Peptidmotiven am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen, gemäß der Erfindung konstruiert werden können. Ferner können auch andere Transfervektoren (d. h. mit verschiedenen Targeting-Sequenzen) mittels dieses Ansatzes konstruiert werden.

Beispiel 7

[0155] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von Adenovirus-Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen eingeschränkten Peptidmotiven am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0156] Das für diese Experimente verwendete E1- und E3-deletierte Adenovirus AdZ enthält das β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus(CMV)-Promotors und im adenoviralen Genom integriert. AdZ wurde in humanen embryonalen Nieren-293-Zellen propagiert, welche die komplementäre E1-Region für Viruswachstum enthalten. AdZ.RGD (sowie andere Vektoren, welche auf andere Adhäsionsrezeptoren zielgesteuert sind, wie hierin beschrieben), wurde direkt von AdZ abgeleitet. Diese Viren sind ebenfalls E1- und E3-deletiert und sind identisch zu AdZ bis auf die Gegenwart zusätzlicher Aminosäuren am C-Terminus der Fiberproteine.

[0157] Die Transferplasmide p193(F5)pGS und p193(F5)pGS(RGD), welche die essentielle E4-Region von Adenovirus enthalten, wurden für adenovirale Vektorkonstruktion verwendet. Diese Transferplasmide wurden mit Sal I geschnitten und in 293-Zellen transfiziert, welche bereits 1 Stunde zuvor mit dem Adenovirus-Vektor AdZ.E4Gus infiziert worden waren. Dem Adenovirus-Vektor AdZ.E4Gus fehlt die E4-Region, und er kann in 293-Zellen ohne die E4-Gene nicht replizieren. Erst wenn AdZ.E4Gus-DNA mit der p193(F5)pGS- oder p193(F5)pGS(RGD)-Plasmid-DNA rekombiniert, um die E4-Gene zu erhalten, ist der Vektor in der Lage, in 293-Zellen zu replizieren. Während dieser Rekombination nimmt der neu gebildete Vektor ferner die in den Plasmiden codierten Fiber-Mutationen auf. Lebensfähige rekombinante E4⁺-Adenoviren, welche die pGS- und pGS(RGD)-Mutationen enthalten, wurden sodann durch Plaquebildung der transfizierten Zelllysate 5 Tage nach Transfektion isoliert. Ihre resultierenden Vektoren AdZ.pGS und AdZ.RGD wurden durch zwei aufeinanderfolgende Plaquebildungsrunden auf 293-Zellen isoliert und gereinigt. Es wurde verifiziert, dass jeder Vektor das korrekte Insert enthielt, durch Sequenzierung von PCR-Produkten aus Virus-DNA, welche die Region der Insert-DNA überspannt.

[0158] Dieses Beispiel bestätigt, dass Adenovirus-Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die Insertionen von verschiedenen eingeschränkten Peptidmotiven am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen, gemäß der Erfindung konstruiert werden können.

Beispiel 8

[0159] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von Transfervektoren und adenoviralen Vektoren unter Verwendung anderer Oligonucleotide, welche zum Inserieren einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein, vorzugsweise in eine exponierte Schleife des Adenovirus-Fiber-Knob, aber auch am C-Terminus des Proteins, verwendet werden können.

[0160] Die in Beispiel 6 beschriebenen Klonierungstechniken wurden verwendet, um Hinzufügungen an dem C-Terminus zu erzeugen. Im Wesentlichen wurden die in diesem Beispiel beschriebenen Transfervektoren (insbesondere der Transfervektor p193(F5)pGS) an der in den Vektoren präsenten singulären Klonierungsstelle Spe I linearisiert, und neue Sequenzen wurden an dieser Stelle inseriert. Andere Mittel (z. B. PCR-Reaktionen) können ebenfalls verwendet werden, um Insertionen in diese singuläre Stelle durchzuführen. Ähnlich können die in Beispiel 5 beschriebenen Klonierungstechniken verwendet werden, um in eine exponierte Schleife des Fiber-Knob Inserte zu inkorporieren, welche Peptidmotive umfassen, die andere Zelloberflächen-Bindungsstellen oder Epitope für einen Antikörper gezielt ansteuern.

[0161] Insbesondere wurden multiple Kopien der RGD-Sequenz (d. h. polyRGD- oder pRGD-Sequenz) inseriert. Diese Sequenz umfasst:

ACT AGT GGA AGA GGA GAT ACT TTT GGC CGC GGC GAC ACG TTC

Thr Ser Gly Arg Gly Asp Thr Phe Gly Arg Gly Asp Thr Phe

GGA AGG GGG GAT ACA TTT TCT AGT

[SEQ ID NO:52]

Gly Arg Gly Asp Thr Phe Ser Ser

[SEQ ID NO:53].

[0162] Die Sequenz wurde inseriert unter Verwendung des Sense-Oligonucleotids pRGDs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT GGA AGA GGA GAT ACT TTT GGC CGC GGC GAC ACG TTC GGA AGG GGG GAT ACA TTT T [SEQ ID NO:54]) und des Antisense-Oligonucleotids pRGDs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA AAA TGT ATC CCC CCT TCC GAA CGT GTC GCC GCG GCC AAA AGT ATC TCC TCT TCC A [SEQ ID NO:55]).

[0163] Das resultierende Plasmid p193(F5*)RGD wurde verwendet, um das Adenovirus AdZ.pRGD zu erzeugen. Ein Vergleich der in AdZ.RGD und AdZ.pRGD präsenten Inserte (wobei das RGD-Peptid fett hervorgehoben ist) ist in Tabelle 2 vorgestellt.

Tabelle 2 Vergleich der adenoviralen Vektoren AdZ.RGD und AdZ.pRGD

Vektorname	Zielrezeptor	Zielsequenz
AdZ.RGD	α_v - Integrine	SACDC RGDCFCGTS [SEQ ID NO:68]
AdZ.pRGD	α_v - Integrine	TS(RGDTF) ₃ SS
	β_1 -Integrine	[SEQ ID NO:53]

[0164] Ähnlich können eine oder mehrere Kopien einer LDV-Targeting-Sequenz inseriert werden. Der LDV-Zielrezeptor ist in hämatopoetischen Zellen, Lymphocyten und Monocyten/Makrophagen verteilt. Der Adhäsionsrezeptor ist hoch exprimiert auf ruhenden Lymphocyten, welche in Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen involviert sind (z. B. während hämatopoetischer Extravasation sowie Inflammation und Lymphozyten- "Trafficking"). Liganden für den α_4 -Integrin-Zielrezeptor umfassen, sind aber nicht begrenzt auf Fibronectin (ein Extrazellulärmatrixprotein), VCAM-1 (welches Wechselwirkung mit Endothelgewebe vermittelt) und MAdCAM ($\alpha_4\beta_7$) (welches darmspezifisch ist). Insbesondere umfassen die α_4 -Integrin-Targeting-Sequenzen die Sequenz EILDVPST (d. h. Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr [SEQ ID NO:56], welche von der obigen Sequenz umfasst ist, und die Sequenz (EILDVPS)₃ (oder drei Kopien des Peptidmotivs EILDVPS [SEQ ID NO:80] in Tandem, oder Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser) [SEQ ID NO:57].

[0165] Insbesondere können multiple Kopien der LDV-Sequenz (d. h. eine polyLDV- oder pLDV-Sequenz) inseriert werden, um die Sequenz:

ACT AGT GAA ATT CTT GAC GTC GGA GAG ATC CTC GAC GTC GGG

Thr Ser Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val Gly

GAA ATA CTG GAC GTC TCT AGT [SEQ ID NO:58]

Glu Ile Leu Asp Val Ser Ser [SEQ ID NO:59]

zu umfassen.

[0166] Diese Sequenz wurde inseriert unter Verwendung des Sense-Oligonucleotids pLDVs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT GAA ATT CTT GAC GTC GGA GAG ATC CTC GAC GTC GGG GAA ATA CTG GAC GTC T [SEQ ID NO:60]) und des Antisense-Oligonucleotids pLDVs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA GAC GTC CAG TAT TTC CCC GAC GTC GAG GAT CTC TCC GAC GTC AAG AAT TTC A [SEQ ID NO:61]).

[0167] Diese Insertion resultierte in der Generierung des in [Fig. 9](#) gezeigten Vektors p193(F5)pLDV. Das in diesem Vektor präsente LDV-Targeting-Motiv (d. h. umfassend die Sequenz SEQ ID NO:59) bindet mit submiliomolarer Affinität an α_4 -Integrine. Das LDV-Motiv ist dreimal wiederholt in jedem Fiber-Monomer, so dass sich insgesamt 9 Motive pro Fiber-Molekül ergeben. Dieser Vektor wurde ferner für die Generierung eines korrespondierenden adenoviralen Vektors verwendet.

[0168] Ferner wurde eine pYIGSR-Targeting-Sequenz am C-Terminus des Fiberproteins inseriert, um das in [Fig. 10](#) gezeigte Plasmid p193(F5)pYIGSR abzuleiten. Das Fiberprotein in diesem Plasmid umfasst die Aminosäuresequenz:

ACT AGT GGA TAC ATC GGC AGT CGC GGT TAC ATT GGG TCC

Thr Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser

CGA GGA TAT ATA GGC TCA AGA TCT AGT [SEQ ID NO:62]

Arg Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Ser Ser [SEQ ID NO:63].

[0169] Die Sequenz wurde inseriert unter Verwendung des Sense-Oligonucleotids pYIGSRs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGT GGA TAC ATC GGC AGT CGC GGT TAC ATT GGG TCC CGA GGA TAT ATA GGC TCA AGA T [SEQ ID NO:64]) und des Antisense-Oligonucleotids pYIGSRs (d. h. umfassend die Sequenz CT AGA TCT TGA GCC TAT ATA TCC TCG GGA CCC AAT GTA ACC GCG ACT GCC GAT GTA TCC A [SEQ ID NO:65]).

[0170] Das resultierende Plasmid enthält das Targeting-Motiv YIGSR [SEQ ID NO:66] (d. h. umfassend die Sequenz Tyr Ile Gly Ser Arg [SEQ ID NO:66]), welches mit submillimolarer Affinität an den Hochaffinitätsrezeptor Laminin bindet. Das Motiv YIGSR [SEQ ID NO:66], welches als YIGSRG präsent ist (d. h. umfassend die Sequenz Tyr Ile Gly Ser Arg Gly [SEQ ID NO:67]), ist dreimal wiederholt in jedem Fiber-Monomer, so dass sich insgesamt 9 Motive pro Fiber-Molekül ergeben. Insbesondere stellt das Motiv YIGSR [SEQ ID NO:66] Targeting auf den 67 kDa-Laminin/Elastin-Rezeptor bereit. Dieser Rezeptor ist präsent in Monocyten/Neutrophilen, glatten Gefäßmuskeln, Fibroblasten und Chondrocyten und ist in vielen Tumoren aufreguliert. Ferner scheint der Rezeptor involviert in Tumormetastasierung und Angiogenese. Typische Liganden für den Laminin/Elastin-Rezeptor umfassen Laminin, Elastin und Galactose. Das hierin abgeleitete Plasmid p193(F5)pYIGSR wurde ferner für die Generierung des Adenovirus-Vektors AdZ.pYIGSR verwendet.

[0171] Dieses Beispiel bestätigt somit, dass andere Oligonucleotide verwendet werden können zum Inserieren einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in ein Fiberprotein. Derartige Insertionen können entweder in einer exponierten Schleife des Adenovirus-Fiber-Knob oder, wie im Folgenden beschrieben, am C-Terminus des Fiberproteins durchgeführt werden. Ferner kann die nicht-native Aminosäuresequenz in das chimäre Fiberprotein nicht nur als eine Insertion in die Sequenz inkorporiert werden, sondern auch als ein Austausch von adenoviralen Sequenzen. Dies kann durchgeführt werden durch einfache Modifikation der hierin beschriebenen Klonierungsprozeduren, wie sie dem Fachmann bekannt sind.

Beispiel 9

[0172] Dieses Beispiel beschreibt die Charakterisierung von adenoviralen Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die eine Insertion eines eingeschränkten RGD-Peptidmotivs am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen. Insbesondere wurden diese Vektoren auf ihre Fähigkeit, aktive Viruspartikel in verschiedenen Zellen zu produzieren, untersucht.

[0173] Für die Western-Analyse von Viruspartikeln wurden gereinigte Viruspartikel (2×10^{10}) in einem Volumen von 10 µl 1:1 in Laemmli-Laufpuffer verdünnt und auf ein Gel mit 9% Acrylamid, enthaltend 0,1% SDS, geladen. Das Gel wurde bei 150 mV laufen gelassen und dann auf Nitrocellulose transferiert. Die Nitrocellulose wurde mit 5% Trockenmilch blockiert und mit einer Kombination von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern sondiert, die gegen denaturierte Ad5-Virionen (1:1000) und gegen Fiberprotein (1:5000) gerichtet sind. Die Proteine wurden mittels anti-Kaninchen-Peroxidase (1:5000) und eines kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Detektionskit detektiert.

[0174] Die Fiberproteine der rekombinanten Adenoviren AdZ.pGS und AdZ.RGD waren auf dem Western relativ zu dem in dem AdZ-Vektor enthaltenen Fiberprotein nach oben verschoben. Ein parallel laufen gelassenes Gel, welches auf Nitrocellulose transferiert und nur mit dem gegen das Fiberprotein gerichteten polyklonalen Antikörper sondiert wurde, demonstrierte, dass die verschobenen Banden in der Western-Analyse in der Tat Fiberprotein waren. Diese Resultate bestätigen, dass die AdZ.pGS- und AdZ.RGD-Fiberproteine die geeigneten Aminosäure-Inserte enthalten.

[0175] Die Kinetik der Virusproduktion wurde bestimmt, um zu bestätigen, dass lebensfähiges Adenovirus in 293-Zellen produziert wurde, welche mit verschiedenen adenoviralen Vektoren gemäß der Erfindung infiziert waren. Zur Durchführung dieser Studien wurde radiomarkiertes Adenovirus hergestellt durch Zugabe von 50 µCi/ml [³H]-Thymidin (Amersham, Arlington Heights, IL) zu dem Medium von infizierten Zellen 20 Stunden nach ihrer Infektion bei einem MOI-Wert von 5. Die infizierten Zellen wurden dann 60 Stunden post Infektion geerntet und das Virus wurde gereinigt, wie früher beschrieben. Die Aktivität der markierten Viren betrug ca. 10^4 Viruspartikel/cpm. Infektiöse Partikel wurden in Fluoreszenz-Fokuseinheiten (ffu) mittels eines Fluoreszenz-Fokus-Assay auf 293-Zellen titriert.

[0176] Die Kinetik der Produktion aktiver Viruspartikel aus infizierten 293-Zellen wurde bestimmt durch Infizieren von 10^6 293-Zellen mit 0,2 ml AdZ oder AdZ.RGD für 1 Stunde in 6 cm-Platten bei einem MOI-Wert von 10 am Tag 0. Die Zellen wurden am Tag 1, 2 und 3 post Infektion geerntet. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert und resuspendiert in 1 ml PBS für AdZ und AdZ.RGD. Die Zellen wurden dreimal eingefroren und auf-

getaut, um die Viruspartikel freizusetzen. Die Lysate wurden dann auf die Anzahl der pro Zelle produzierten aktiven Partikel mittels Standard-Techniken getestet. Die Resultate dieser Experimente (in [Fig. 11](#) dargestellt) bestätigen, dass die Modifikationen des Fiberproteins in AdZ.RGD die Produktion von aktiven Viruspartikeln nicht signifikant beeinflussen, verglichen mit dem unmodifizierten Vektor AdZ.

[0177] Ähnlich wurde die Partikeldosis-Antwort der Vektoren AdZ und AdZ.RGD auf A549-Epithel-, CPAE-Endothel- und humanen intestinalen glatten Muskel(HISM)-Zellen untersucht. HISM-, CPAE- oder A549-Zellen (5×10^5 Zellen/Well) wurden 1 bis 2 Tage vor den Experimenten auf 6 cm-Platten ausgesät. In Assays zum Evaluieren der Vektordosis-Antwort in Fiber-Rezeptor exprimierenden Zellen wurden ansteigende Konzentrationen von AdZ- oder AdZ.RGD-Partikeln mit den Zellen für 60 Minuten bei 37°C in 0,2 ml DMEM + 20 mM HEPES inkubiert. Die Platten wurden alle 10 Minuten während dieser Inkubation geschüttelt. Die Zellen wurden dann zweimal mit DMEM gewaschen und in DMEM + 5% Kälberserum für 2 bis 3 Tage bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde dann abgesaugt, und die Zellen wurden in 1 ml 1X-Reporter-Lyse-Puffer + 10 mM EDTA (Promega, Madison, WI) lysiert. Die β -Galactosidase-Aktivität in den Zelllysaten wurde sodann bestimmt, wie früher beschrieben. Die Resultate sind Mittelwerte von Duplikatmessungen.

[0178] Die Resultate dieser Experimente sind in den [Fig. 12](#)–[Fig. 14](#) präsentiert. Diese Experimente bestätigen, dass die AdZ- und AdZ.RGD-Vektoren äquivalent sind mit Bezug auf ihre Fähigkeit zum Eintritt und zur Produktion von lebensfähigen Viruspartikeln in Zellen (A549), die bekanntermaßen hohe Levels von Adenovirus-Fiber-Rezeptor exprimieren (d. h. A549-Zellen, wie in [Fig. 12](#) präsentiert). Für die (in [Fig. 13](#) bzw. [Fig. 14](#) präsentierten) CPAE- und HISM-Zellen jedoch, denen signifikante Levels von Adenovirus-Fiber-Rezeptor fehlen, die aber α_v -Integrine exprimieren, ist der AdZ.RGD-Vektor viel effizienter in der Transduktion als der unmodifizierte AdZ-Vektor. Die Transduktion der CPAE- und HISM-Zellen durch AdZ.RGD ist etwa 100fach bzw. 30fach höher als bei AdZ über einen weiten Bereich von Vektor-Konzentrationen.

[0179] Dieses Resultat validiert, dass Aminosäure-Inserte, welche in adenoviralen Vektoren gemäß der Erfindung präsent sind, geeignet translatiert werden im Kontext des chimären Adenovirus-Fiberproteins und dass das resultierende Fiberprotein funktional ist, wie abgeschätzt durch die Generierung von lebensfähigen Adenoviren, welche dieses Protein enthalten. Ferner bestätigen die Resultate, dass das in dem chimären Fiberprotein präsente Peptidmotiv in der Lage ist, Adenovirus-Bindung umzudirigieren und adenovirale Zellbindung/-eintritt mit einer hohen Effizienz selektiv zu bewirken.

Beispiel 10

[0180] Dieses Beispiel beschreibt das Bindungsverhalten von adenoviralen Vektoren, welche Fiber-Sequenzen codieren, die eine Insertion eines eingeschränkten Peptidmotivs am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins aufweisen.

[0181] Die Spezifität der Vektoren AdZ und AdZ.RGD bei der Bindung an Nieren(835)-, Glattmuskel-(A10)- und Endothel-(CPAE)-Zellen wurde untersucht. Für diese Experimente wurden Monolayer von 835-, A10- oder CPAE-Zellen in 24-Well-Gewebekulturplatten für 45 Minuten mit 0,3 ml Medium, welches lösliche rekombinante Fiber (F5; 3 μ g/ml), Pentonbasis (PB; 50 μ g/ml), Fiber plus Pentonbasis oder keines der Coat-Proteine, enthielt, vorinkubiert. Radiomarkierter AdZ oder AdZ.RGD wurde sodann zu den Wells hinzugegeben und für 90 Minuten unter Hin- und Herbewegen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit PBS gewaschen, und die verbliebene zellassoziierte Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Resultate dieser Experimente sind graphisch in den [Fig. 15](#)–[Fig. 17](#) und quantitativ in Tabelle 3 präsentiert.

Tabelle 3 Vergleich der AdZ- und AdZ.RGD-Bindung an drei Zelllinien*

	835-HEK**		CPAE**		A10**	
	AdZ	AdZ.RGD	AdZ	AdZ.RGD	AdZ	AdZ.RGD
Kontrolle	7,6	12,7	0,19	0,84	0,72	1,68
Fiber	1,7	12,3	0,22	1,06	0,23	1,40
PB	9,0	9,7	0,20	0,37	0,80	0,62
Fiber/PB	1,0	3,7	0,21	0,46	0,20	0,41

Werte repräsentieren den Prozentsatz an Input-Vektor im Bindungsassay.

**Fehler für alle Werte unter 10%.

[0182] Diese Resultate bestätigen, dass sowohl für die 835-Zellen ([Fig. 15](#)) als auch für die A10-Zellen ([Fig. 16](#)) Fiberprotein die AdZ-Transduktion signifikant blockiert, nicht aber die AdZ.RGD-Transduktion. Nur Fiber plus Pentonbasis, welches – in Kombination – sowohl Fiber-Rezeptor als auch α_v -Integrine blockiert, ist in der Lage, die Bindung von AdZ.RGD an diese Zellen signifikant zu blockieren. Für die CPAE-Zellen, denen detektierbare Levels an Fiber-Rezeptor fehlen ([Fig. 17](#)), ist Pentonbasis allein in der Lage, die Bindung von AdZ.RGD signifikant zu blockieren.

[0183] Diese Resultate demonstrieren, dass AdZ.RGD mit α_v -Integrinen auf Zellen interagiert. Ferner validieren die Resultate, dass das Peptidmotiv, wie es in dem Fiberprotein von AdZ.RGD präsent ist, effektiv verwendet werden kann, um Adenovirus auf bestimmte Zellen zielzusteuern.

Beispiel 11

[0184] Dieses Beispiel beschreibt Gen-Delivery, welches durch adenovirale Vektoren vermittelt wird, die Insertionen von verschiedenen Sequenzen am C-Terminus des Adenovirus-Fiberproteins codieren.

[0185] Zum Testen der Fähigkeit des Peptidmotivs YIGSR [SEQ ID NO:66], Zell-Targeting zu bewirken, wurden A549-Zellen für 30 Minuten in der Anwesenheit und in der Abwesenheit von kompetierendem Wildtyp-Fiberprotein vorinkubiert. Gereinigte AdZ- oder AdZ.pYIGSR-Vektoren wurden sodann mit den Zellen für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht in Kulturmedium inkubiert. Aus den lysierten Zellen wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt.

[0186] [Fig. 18](#) zeigt, dass das rekombinante Wildtyp-Fiberprotein das Gen-Delivery durch beide Vektoren komplett blockierte. Erhöhtes Gen-Delivery durch den AdZ.pYIGSR-Vektor wird in der Anwesenheit von Fiberprotein nicht beobachtet. Dies zeigt, dass das pYIGSR-Targeting-Motiv nicht von ausreichend hoher Affinität ist, um den Block der Adenovirus-Bindung zu überwinden, der mit der Zugabe löslichen Fiberproteins erzielt wird.

[0187] Zum Testen der Fähigkeit des pLDV-Motivs, Zell-Targeting zu bewirken, wurden Ramos-Zellen (welche hohe Levels des α_4 -Integrin-Zielrezeptors exprimieren) für 30 Minuten in der Anwesenheit und in der Abwesenheit von kompetierendem Wildtyp-Fiberprotein vorinkubiert. Die gereinigten AdZ- oder AdZ.pLDV-Vektoren wurden sodann mit den Zellen für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht in Kulturmedium inkubiert. Sodann wurde aus den lysierten Zellen die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt.

[0188] [Fig. 19](#) illustriert durch den AdZ.pLDV-Vektor bewirktes Gen-Delivery in Ramos-Zellen. Wie aus dieser Figur ersichtlich, blockierte das rekombinante Wildtyp-Fiberprotein sowohl das Gen-Delivery durch AdZ als auch das Gen-Delivery durch AdZ.pLDV. Wie bei AdZ.pYIGSR kann kein gesteigertes Gen-Delivery, bewirkt durch den AdZ.pLDV-Vektor, in der Gegenwart von Fiberprotein, nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass das pLDV-Targeting-Motiv – wie das Targeting-Motiv YIGSR [SEQ ID NO:66] – nicht von ausreichend hoher Affinität ist, um den Fiber-vermittelten Block der Proteinbindung zu überwinden. Die verbliebene Gen-Delivery-Kapazität von AdZ.pLDV, die nicht durch die Zugabe von löslichem Fiberprotein blockiert wird, wird auch durch weitere Inkubation mit EDTA nicht blockiert. Im Vergleich dazu wird die Interaktion der α_4 -Integrine mit dem LDV-Motiv, welches normalerweise in Fibronectin präsent ist, durch EDTA blockiert. Dieses Resultat bestätigt ferner, dass das pLDV-Targeting-Motiv nicht mit ausreichend hoher Affinität mit α_4 -Integrinen interagiert, um Vektorbindung und Gen-Delivery in die Ramos-Zellen zu erhöhen. Jedoch ist es sowohl mit dem YIGSR-Motiv (d. h. umfassend die Sequenz [SEQ ID NO:66]) als auch mit dem LDV-Motiv möglich, dass Hochaffinitäts-Peptidmotive abgeleitet werden könnten durch die konformationelle Beschränkung dieser Peptide in einer exponierten Schleife der Fiberproteine.

[0189] Die Fähigkeit des RGD-Motivs, Zell-Targeting zu bewirken, wurde ähnlich bei α_v -Integrine exprimierenden 293-Zellen studiert. Diese Studien wurden wie für die anderen Peptidmotive/Zelllinien durchgeführt. Jedoch wurden zu Vergleichszwecken ferner die Vektoren AdZ und AdZ.pRGD (d. h. der Vektor, welcher multiple Kopien des RGD-Motivs enthält, das keine Cystein-Reste aufweist) einbezogen. Die Ergebnisse dieser Studien sind in [Fig. 20](#) präsentiert. Wie aus dieser Figur ersichtlich, war AdZ.RGD, nicht aber AdZ.pRGD, klar in der Lage, den Fiber-vermittelten Block des adenoviralen vermittelten Gen-Delivery zu überwinden.

[0190] Diese Resultate bestätigen somit, dass das RGD-Peptidmotiv (d. h. präsent als eine Schleife am C-Terminus des Fiberproteins) – wie das in einer Schleife des Adenovirus-Fiberproteins präsente RKKK2-Motiv (in Beispiel 4 beschrieben) – von ausreichend hoher Affinität ist, so dass es in der Lage war, den Fiber-ver-

mittelten Block des adenovirale vermittelten Gen-Delivery zu überwinden und effektiv die typische Interaktion von Wildtyp-Fiberprotein mit seinem zellulären Rezeptor zu "verdrängen", um das Adenovirus auf einen neuen Rezeptor zielzusteuern.

[0191] Die Resultate bestätigen weiter, dass die Einschränkung einer nicht-nativen Aminosäuresequenz (d. h. entweder durch Insertion in eine Fiber-Schleife oder durch Erzeugung einer schleifenähnlichen Struktur am Fiber-Terminus) in der Erzeugung eines Hochaffinitäts-Peptidmotivs resultieren kann. Ein derartiges Hochaffinitäts-Peptidmotiv kann für adenovirales Zell-Targeting Anwendung finden.

[0192] Die Erfindung wurde mit Betonung auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben; für den Durchschnittsfachmann wird jedoch erkennbar sein, dass Variationen der bevorzugten Ausführungsformen hergestellt und verwendet werden können und dass die Erfindung auch anders als spezifisch hierin beschrieben umgesetzt werden kann. Es ist beabsichtigt, dass die vorliegende Erfindung derartige Variationen und alternative Umsetzungen mit umfasst.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) ANMELDERIN: GENVEC, INC.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: ADENOVIRUS-TARGETING MITTELS EINGESCHRÄNKTER PEPTIDMOTIVE
- (iii) ANZAHL SEQUENZEN: 89
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Leydig, Voit & Mayer, Ltd.
 - (B) STRASSE: 2, Prudential Plaza, Suite 4900
 - (C) STADT: Chicago
 - (D) STAAT: Illinois
 - (E) LAND: USA
 - (F) PLZ: 60601
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC Kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, VERSION #1.30
- (vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:
 - (A) ANMELDUNG NR.: WO
 - (B) ANMELDEDATUM:
- (vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:
 - (A) ANMELDUNG NR.: US 08/701 124
 - (B) ANMELDEDATUM: 21. AUGUST 1996

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

Cys Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Xaa Cys

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..18

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

TCA TAC ATT GCC CAA GAA TAAA 22

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

TCA TAC ATT GCC CAA GAA GGA TCC AAT AAA 30

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Asn Lys

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

Ser Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Asn Lys

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

TCCCCCCCAGGG TCTAGATTAG GATCCTTCTT GGGCAATGTA TGA 43

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

CGTGTATCCA TATGACACAG A 21

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

TATGGAGGAT CCAATAAAGA ATCGTTGTG TTATGTTCA ACGTGTAT TTTTC

55

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

AATTGAAAAAA TAAACACGTT GAAACATAAC ACAAACGATT CTTTATTGGA TCCTCCA

57

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

GGCCATGGCC TAGAATTGAGT TCAAACGGT GCCATGATTA CTAAACTTGG AGCG

54

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GCGGATCCTT ATT CCTGGGC AAT GTAGGA

29

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGT GAA TCC ACA GAA ACT

36

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

15 20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

ACT AGA AAA AAA AAA CGC AAG AAG AAG ACT AGT

Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Thr Ser

15 20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:19:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Thr Ser

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

CTAGAAAGAA GAAACGCAAA AAGAAGA

33

27

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

CTAGTCTTCT TTTTGCCTTT CTTCTTT

27

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:22:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

ACT AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ACT AGT

36

Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Thr Ser

15

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Thr Ser

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

CTAGAGACTA CAAGGACGAC GATGATAAGA

30

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

CTAGTCTTAT CATCGTCGTC CTTGTAGTCT

30

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:26

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYPE: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..63

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGA AAG AAG AAA CGC AAA AAG AAG ACT AGT 48

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Thr Ser

GAA-TGG-AGA-GAA-AGT 63

SAK YEE KEE CHAN
CHAN Sze Tin CHAN Tin

Old Old MM Old MM
26

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Thr

1 5 10 15

Glu Ser Thr Glu Thr

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 66 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..66

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ACT 48

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr

1 5 10 15

AGT GAA TCC ACA GAA ACT 66

Ser Glu Ser Thr Glu Thr

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 22 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:29:

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr

1 5 10 15

Ser Glu Ser Thr Glu Thr

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 45 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:30:

ACT AGA GCC TGC GAC TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT ACT AG 45
Thr Arg Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Thr Ser
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:31:

Thr Arg Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Thr Ser
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:32:

CTAGAGCCTG CGACTGTCGC GGCGATTGTT TTTGCGGTA

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:33:

CTAGTACCGC AAAAACAAATC GCCGCGACAG TCGCAGGCT

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:34:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..39

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:34:
 ACT AGA TGC CGC CGC GAA ACC GCT TGG GCC TGT ACT AGT
 Thr Arg Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Thr Ser
 1 5 10

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:35:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:35:
 Thr Arg Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys Thr Ser
 1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:36:
 CTAGATGCCG CCGCGAAACC GCTTGGGCCT GTA

33

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare

- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:37:

CTAGTACAGG CCCAAGCGGT TTCGCGGCGG CAT

33

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:38:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LOKALISATION: 1..48

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:38:

ACT AGA GAC ATT ACC TGG GAC CAG CTT TGG GAC CTT ATG AAG ACT AGT

48

Thr Arg Asp Ile Thr Trp Asp Gln Leu Trp Asp Leu Met Lys Thr Ser

1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:39:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:39:

Thr Arg Asp Ile Thr Trp Asp Gln Leu Trp Asp Leu Met Lys Thr Ser

1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:40:

CTAGAGACAT TACCTGGGAC CAGCTTGGA ACCTTATGAA GA

42

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:41:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:41:

CTAGTCTTCA TAAGGTCCCA AAGCTGGTCC CAGGTAATGT CT

42

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:42:

ACT AGA AAG AAG AAG CGC AAA AAA AAA AGA AAG AAG ACT AGT 45
Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Thr Ser
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:43:

Thr Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Arg Lys Lys Thr Ser
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:44:

CTAGAAAGAA GAAGCGCAAA AAAAAAAGAA AGAAGAAGA

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:45:

CTAGTCTTCT TCTTTCTTTT TTTTTTGCGC TTCTTCTTT

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 66 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:46:

GATCAGGATC AGGTTCAGGG AGTGGCTCTG CCTGCGACTG TCGCGGCGAT TGTTTTGCG

60

GTTAAG

66

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 66 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:47:

GATCCTTAAC CGCAAAAACA ATCGCCGCGA CAGTCGCAGG CAGAGCCACT CCCTGAACCT	60
GATCCT	66

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:48

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 86 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..72

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:48:

GCC CAA GAA GGA TCA GGA TCA GGT TCA GGG AGT GGC TCT GCC TGC GAC	48
---	----

Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala Cys Asp	
1 5 10 15	

TGT CGC GGC GAT TGT TTT TGC GGT TAAGGATCCA ATAA	86
---	----

Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly	
---------------------------------	--

20	
----	--

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:49:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:49:

Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala Cys Asp

1 5 10 15

Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:50:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:50:

GATCCGGTTC AGGATCTGGC AGTGGCTCGA CTAGTTAAA

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:51:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:51:

GATCTTAAC TAGTCGAGCC ACTGCCAGAT CCTGAACCG

39

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:52

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

 - (A) LÄNGE: 66 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LOKALISATION: 1..66

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID N

ACT AGT GGA AGA GGA GAT ACT TTT GGC CGC GGC GAC ACG TTC GGA AGG	48
Thr Ser Gly Arg Gly Asp Thr Phe Gly Arg Gly Asp Thr Phe Gly Arg	
1 5 10 15	
GGG GAT ACA TTT TCT AGT	66
Gly Asp Thr Phe Ser Ser	
20	

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:53:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

 - (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:53:
Thr Ser Gly Arg Gly Asp Thr Phe Gly Arg Gly Asp Thr Phe Gly Arg
1 5 10 15
Gly Asp Thr Phe Ser Ser
20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:54:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:54:

CTAGTGGAAG AGGAGATACT TTTGGCCGCG GCGACACGTT CGGAAGGGGG GATACATTTT 60

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:55:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:55:

CTAGAAAATG TATCCCCCT TCCGAACGTG TCGCCGCGGC CAAAAGTATC TCCTCTTCCA 60

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:56:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Nicht relevant
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:56:

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:57:

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Glu Ile

1 5 10 15

Leu Asp Val Pro Ser

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..63

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:58:

ACT AGT GAA ATT CTT GAC GTC GGA GAG ATC CTC GAC GTC GGG GAA ATA	48
Thr Ser Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile	
1 5 10 15	
CTG GAC GTC TCT AGT	63
Leu Asp Val Ser Ser	
20	

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:59:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:59:

Thr Ser Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile	
1 5 10 15	
Leu Asp Val Ser Ser	
20	

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:60:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:60:

CTAGTGAAAT TCTTGACGTC GGAGAGATCC TCGACGTCGG GGAAATACTG GACGTCT 57

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:61:

CTAGAGACGT CCAGTATTTC CCCGACGTCG AGGATCTCTC CGACGTCAAG AATTCA 57

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:62

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 66 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISATION: 1..66

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:62:

ACT AGT GGA TAC ATC GGC AGT CGC GGT TAC ATT GGG TCC CGA GGA TAT 48

Thr Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr

ATA CGG TCA AGA TCT ACT

Home | About | Contact | Privacy | Terms | Help | Log In | Sign Up

1888 Aug 26. 26.

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 22 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:63:

Thr Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr

1 5 10 15

Ile Gly Ser Arg Ser Ser

20

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:64:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 60 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:64:

CTAGTGGATA CATCGGCAGT CGCGGTTACA TTGGGTCCCG AGGATATATA GGCTCAAGAT

60

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:65:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:65:

CTAGATCTTG AGCCTATATA TCCTCGGGAC CCAATGTAAC CGCGACTGCC GATGTATCCA

60

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:66:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:66:

Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:67:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:67:

Tyr Ile Gly Ser Arg Gly

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:68:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:68:

Ser Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Cys Thr Ser

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:69:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:69:

Ile Thr Leu Asn Gly

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:70:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:70:

Glu Ser Thr Glu Thr

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:71:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:71:

Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:72:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:72:

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:73:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..36

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:73:

ATT ACA CTT AAT GGC ACT AGT GAA TCC ACA GAA ACT

36

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:74:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:74:

Ile Thr Leu Asn Gly Thr Ser Glu Ser Thr Glu Thr

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:75:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 105 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..102

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:75:

GCC CAA GAA GGA TCC GGT TCA GGA TCT GGC AGT GGC TCG ACT AGT GAA	48
Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Glu	
1 5 10 15	
ATT CTT GAC GTC GGA GAG ATC CTC GAC GTC GGG GAA ATA CTG GAC GTC	96
Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val	
20 25 30	
TCT AGT TAA	105
Ser Ser	

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 34 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:76:

Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val Gly Glu Ile Leu Asp Val

20 25 30

Ser Ser

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 108 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Doppelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1..105

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:77:

GCC CAA GAA GGA TCC GGT TCA GGA TCT GGC AGT GGC TCG ACT AGT GGA 48

Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Gly

1 5 10 15

TAC ATC GGC AGT CGC GGT TAC ATT GGG TCC CGA GGA TAT ATA GGC TCA 96

Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser

20 25 30

AGA TCT AGT TAA 108

Arg Ser Ser

35

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:78:

Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Gly

1 5 10 15

Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Gly Tyr Ile Gly Ser

20 25 30

Arg Ser Ser

35

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:79:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:79:

Ser Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly

1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:80:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:80:

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:81:

Ser Gly Thr Val Gln

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:82:

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:83:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:83:

GGC AGT TTG GCT CCA ATA GGA TCC GGG TCT GGA AGT GCT CAT CTT ATT 48
Gly Ser Leu Ala Pro Ile Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala His Leu Ile
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:84:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:84:

Gly Ser Leu Ala Pro Ile Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala His Leu Ile
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:85:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:85:

AATAAGATGA GCACCTCCAG ACCCGGATCC TATTGGAGCC AAACTGCC

48

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:86:

Ser His Gly Lys Thr Ala

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:87:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:87:

Ser Gly His Asn

1

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:88:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:88:

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID NO:89:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:89:

Gly Ser Gly Ser

1

Patentansprüche

1. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein, umfassend eine nicht-native Aminosäuresequenz, welche durch die Anwesenheit einer RGD-Sequenz und eines oder mehrerer Cystein-Paare eingeschränkt ist, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz zur Bildung einer nicht-präexistierenden Schleife infolge Interaktion zwischen den Cysteinen befähigt ist oder in die oder an Stelle der nativen Aminosäuresequenz einer präexistierenden Schleife eines Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins inseriert ist.

2. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach Anspruch 1, wobei das chimäre Adenovirus-Fiberprotein den Zelleintritt eines Vektors, welcher das chimäre Adenovirus-Fiberprotein umfasst, effizienter erleichtert verglichen mit einem adenoviralen Vektor, der bis auf die Tatsache, dass er ein Wildtyp-Adenovirus-Fiberprotein an Stelle des chimären Adenovirus-Fiberproteins umfasst, identisch ist.

3. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz ein Epitop für einen Antikörper oder einen Liganden für eine Zelloberflächenbindungsstelle umfasst.

4. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz bis zu 200 Aminosäuren umfasst.

5. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz bis zu 30 Aminosäuren umfasst.

6. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, welche besteht aus SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:68 und SEQ ID NO:79.

7. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, welche besteht aus SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5.

8. Chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz an dem C-Terminus eines Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins inseriert ist.

9. Isolierte oder gereinigte Nucleinsäure, welche ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein nach einem der An-

sprüche 1 bis 8 codiert.

10. Transfervektor, umfassend die isolierte oder gereinigte Nucleinsäure nach Anspruch 9.
11. Transfervektor nach Anspruch 10, wobei der Transfervektor p193(F5)pGS(RGD) ist, wie in [Fig. 8](#) gezeigt.
12. Vektor, umfassend das chimäre Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
13. Vektor nach Anspruch 12, wobei der Vektor ein nicht behülltes Virus ist.
14. Vektor nach Anspruch 12 oder 13, wobei der Vektor ein adenoviraler Vektor ist.
15. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei der Vektor ferner ein Passagier-Gen umfasst, welches entweder in das virale Genom inseriert ist oder an ein Coat-Protein des Adenovirus mittels einer Protein/DNA-Interaktion angeheftet ist.
16. In-vitro-Verfahren zur Erhöhung der Effizienz des Zelleintritts eines Vektors, welcher ein Fiberprotein umfasst, wobei das Verfahren umfasst: Ersetzen des Fiberproteins des Vektors durch das chimäre Adenovirus-Fiberprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
17. In-vitro-Verfahren zum genetischen Modifizieren einer Zelle, umfassend das Inkontaktbringen der Zelle mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 11 bis 15.
18. Wirtszelle, umfassend einen Vektor nach einem der Ansprüche 11 bis 15.
19. Verfahren zur Erhöhung der Affinität eines Peptids für eine Zelloberflächen-Bindungsstelle, umfassend:
 - (a) Erhalten eines Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins, und
 - (b) Inserieren einer nicht-nativen Aminosäuresequenz in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz in einer präexistierenden Schleife eines Knob des Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins, wobei die nicht-native Aminosäuresequenz durch ihren Besitz einer RGD-Sequenz und eines oder mehrerer Cystein-Paare eingeschränkt ist, so dass ein chimäres Adenovirus-Fiberprotein resultiert.
20. Verfahren zum Erhöhen der Affinität einer RGD-Sequenz für eine Zelloberflächen-Bindungsstelle, umfassend:
 - (a) Erhalten eines Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins, und
 - (b) Inserieren einer RGD-Sequenz in eine oder an Stelle einer Proteinsequenz des Wildtyp-Adenovirus-Fiberproteins, derart, dass sie von einem oder mehreren Cystein-Paaren flankiert ist und zur Bildung einer Schleife infolge Interaktion zwischen den Cysteinen befähigt ist.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

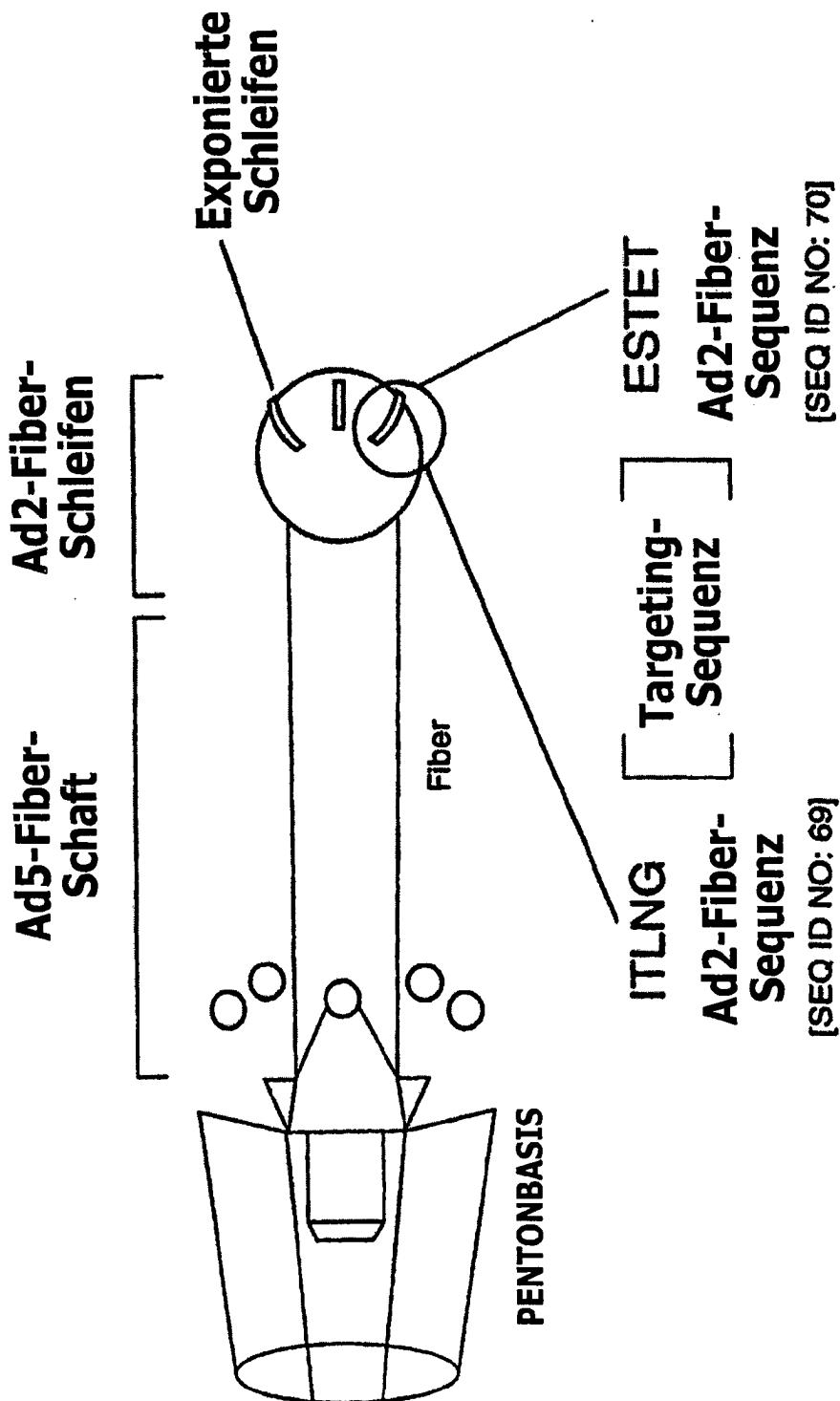


FIG.1

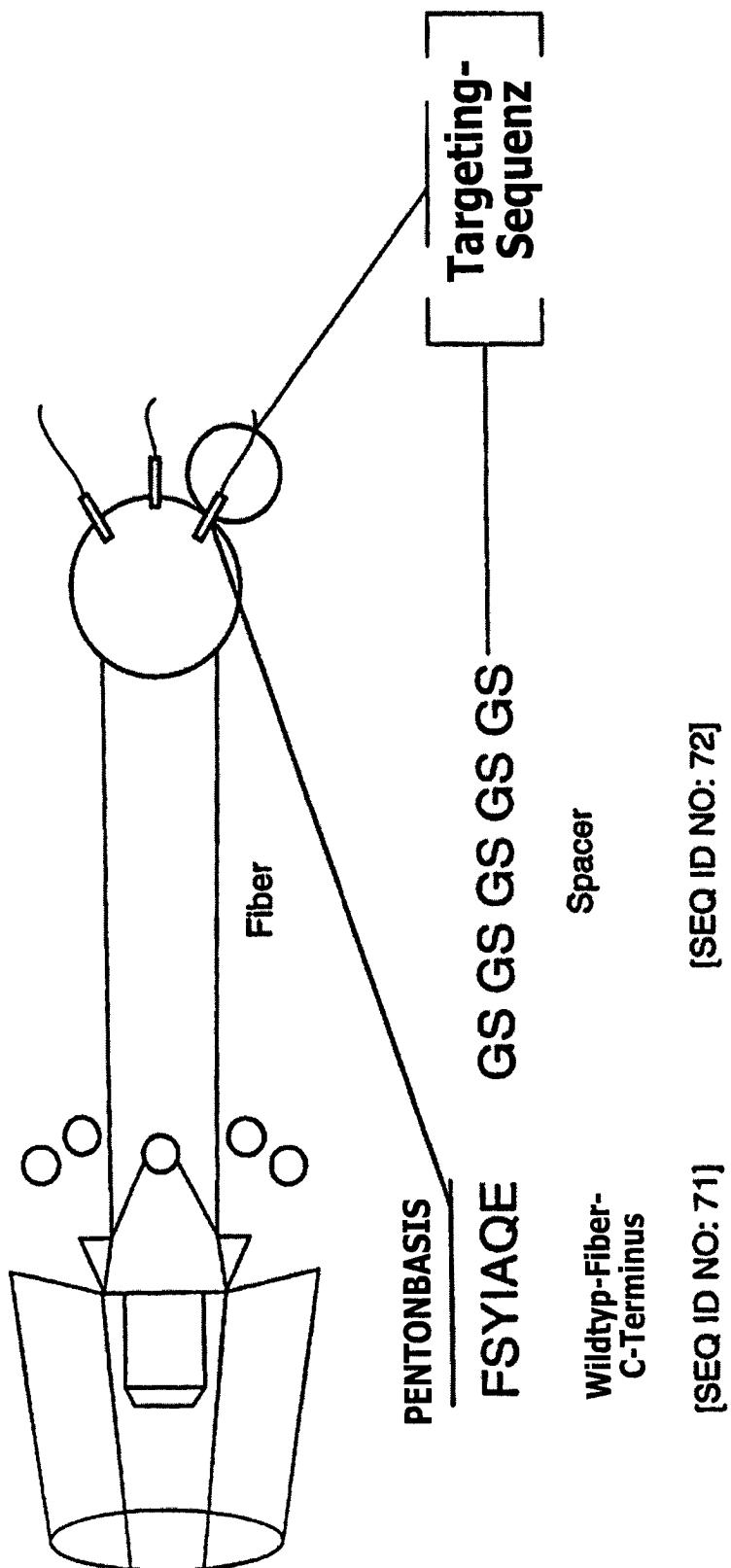


FIG. 2

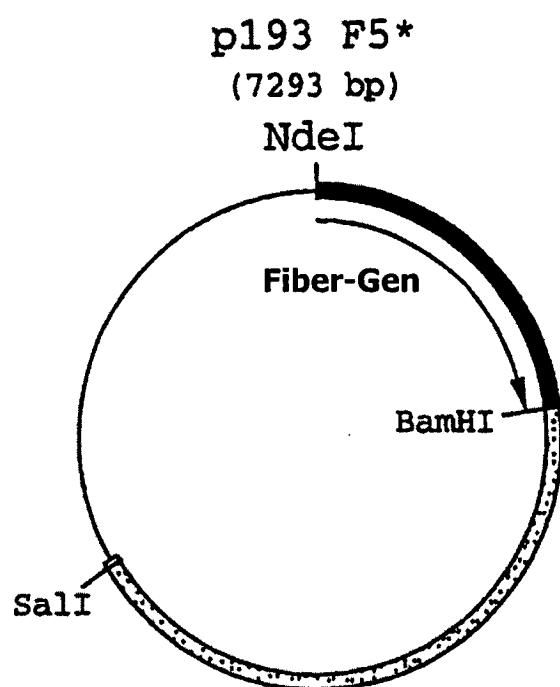


FIG.3

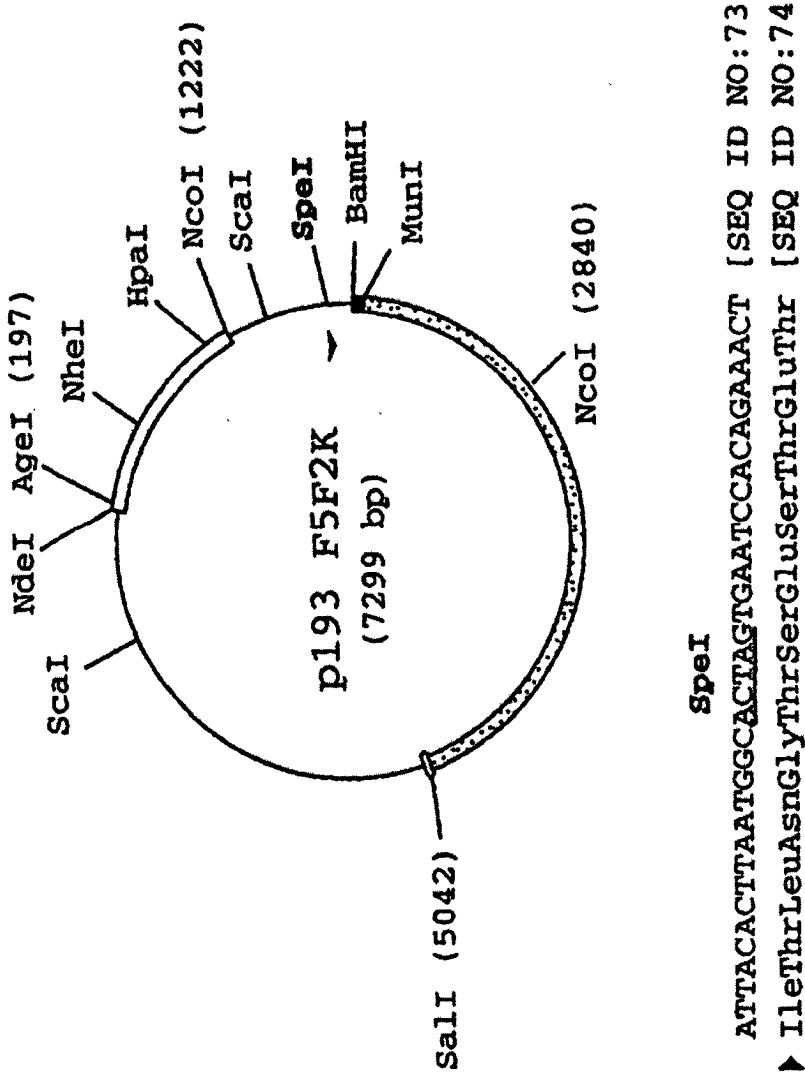
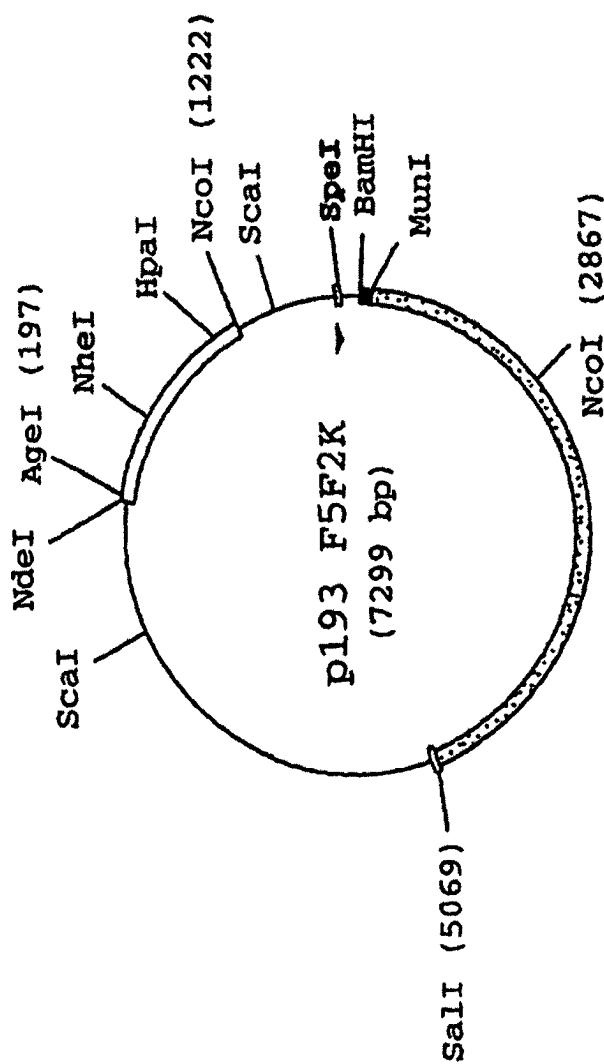
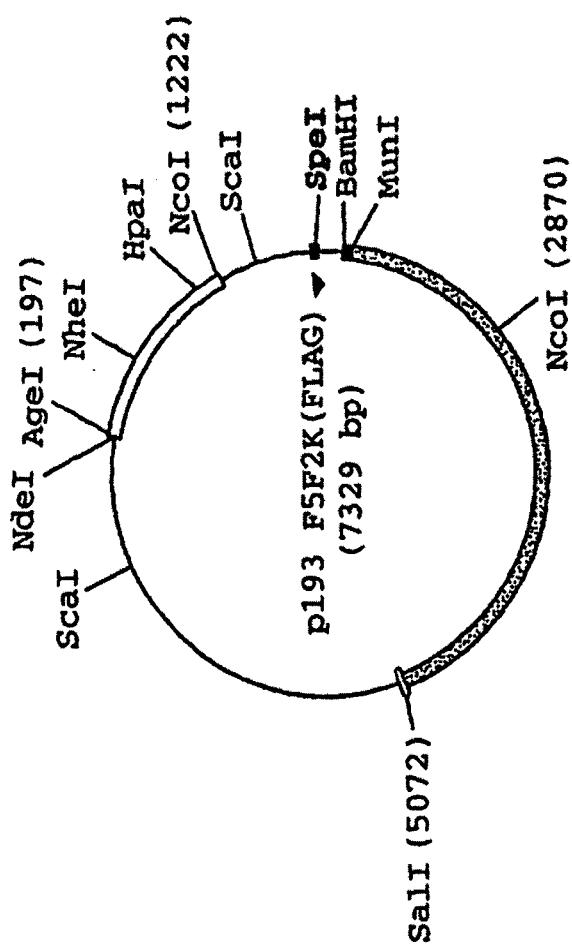


FIG.4



SpeI
ATTACACTTAATGGCACTAGAAAGAACGCAAAAGAAAGACTAGTGAATCCACAGAACT [SEQ ID NO: 26]
► IleThrLeuAsnGlyThrArgLysLysLysArgLysLysLysSerThrSerGluSerThrGluthr [SEQ ID NO: 27]

FIG.5



SPEI
ATTACACTTAATGGCACTAGAGACACTACAGGACGATGATAAGACTAGTGAATCCACAGAACT [SEQ ID NO:28]
► IlethrLeuAsnGlythrArgAspTyrlsAspAspAspAspLysSerGluSerThrGluThr [SEQ ID NO:29]

FIG.6

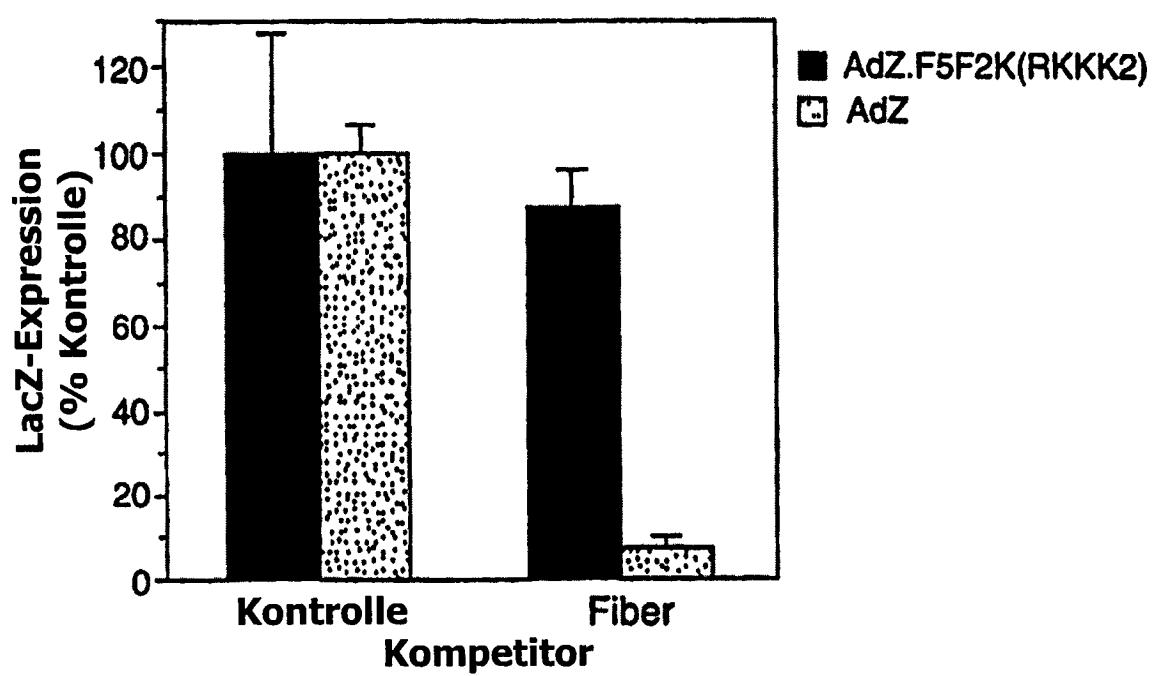
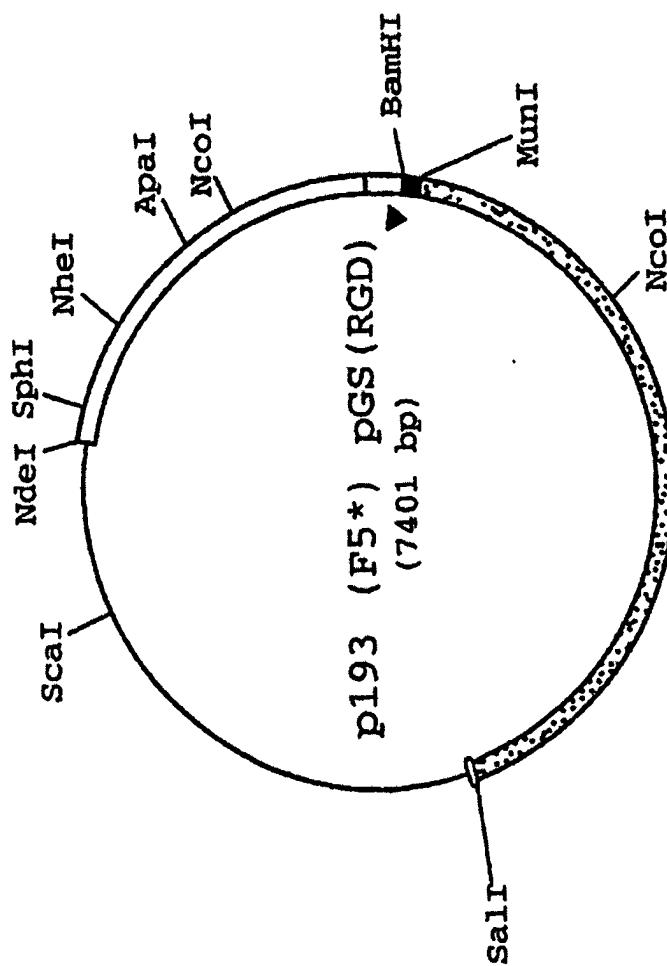
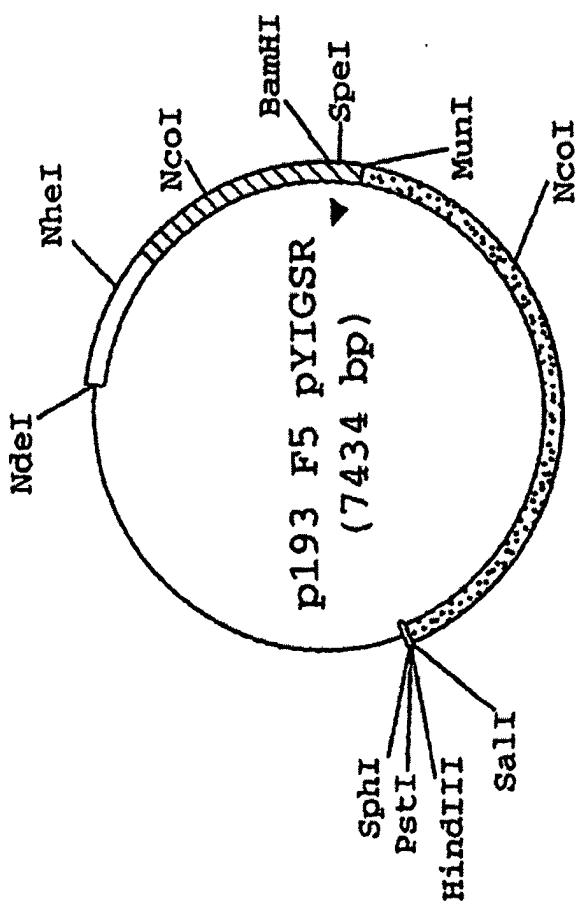


FIG.7



BamHI [SEQ ID NO:48]
GCCCAAGGATCAGGTTCAAGGAGTGGCTCTGCCTGGACTGCGGGGATTGTTTCCGGTTAAGGATCCAAATAA [SEQ ID NO:48]
► AlaGlnGluGlySerGlySerGlySerGlyAspCysArgGlyAspCysPheCysGly... [SEQ ID NO:49]

FIG.8



BamHI CCCAGGATCCGGTCAAGGATCTGGCACTGGCTGACTACTGGATACTGGCACATGGTCCGGAGGATATAAGGCTCAAGATCTAG
▶ AlaglnGluGlySerGlySerGlySerThrSerGlyTyrIleGlySerArgGlyTyrIleGlySerArgSerArgSerSer

[S80 ID NO:771] [S80 ID NO:781]

FIG. 10

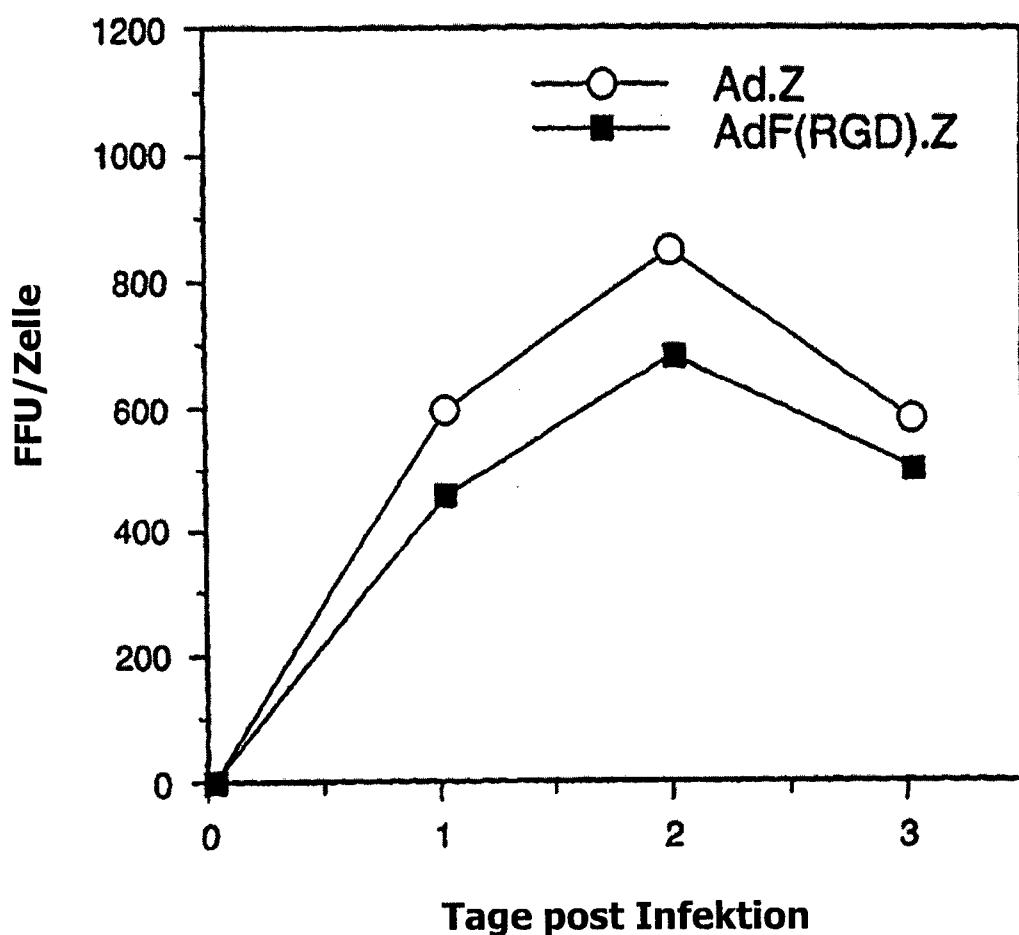


FIG.11

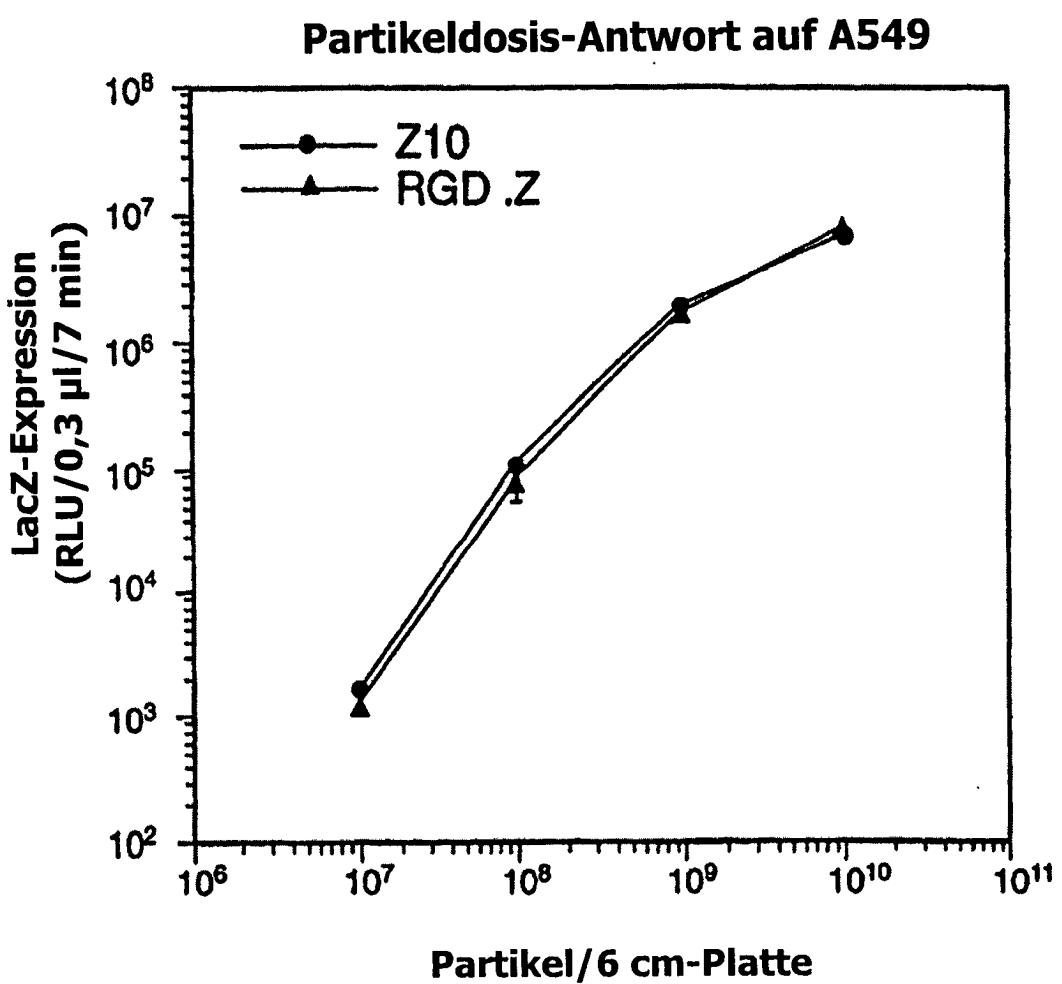


FIG.12

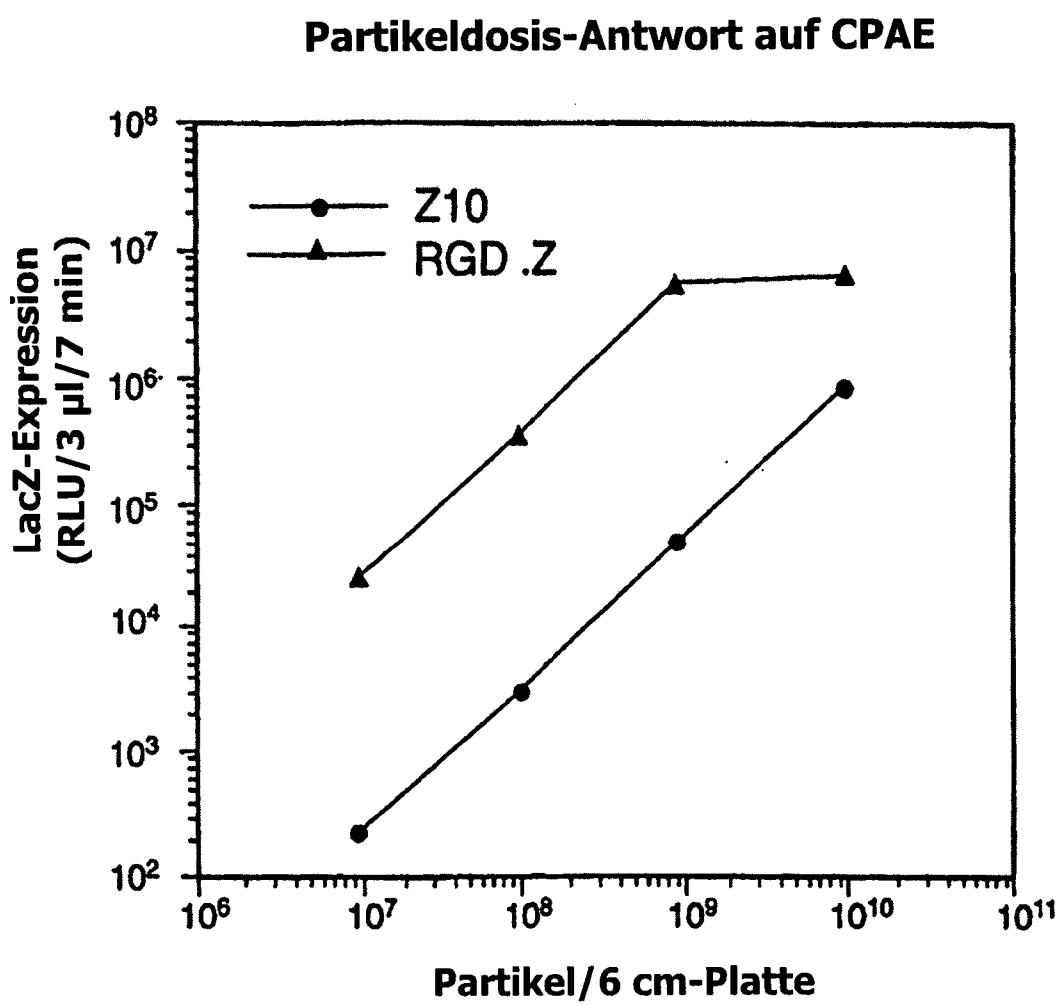


FIG.13

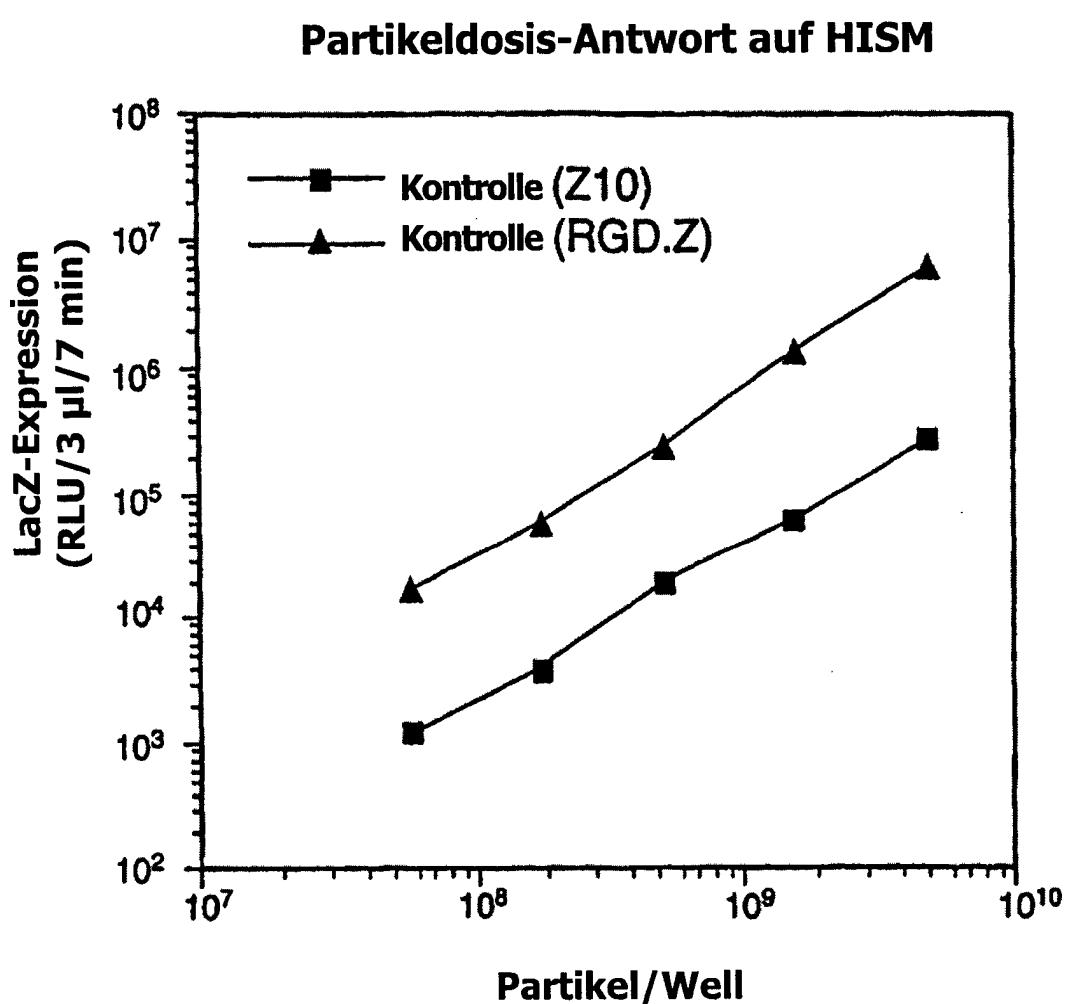


FIG.14

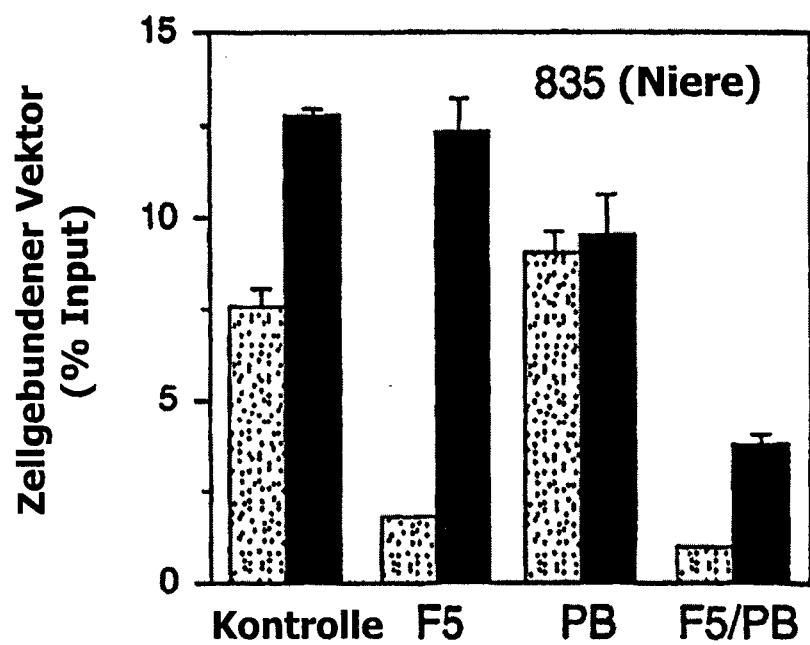


FIG.15

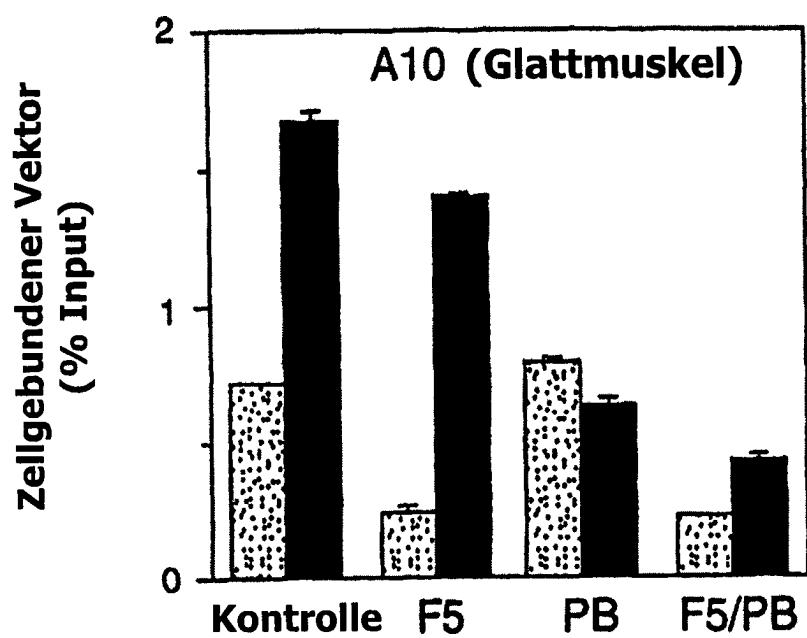


FIG.16

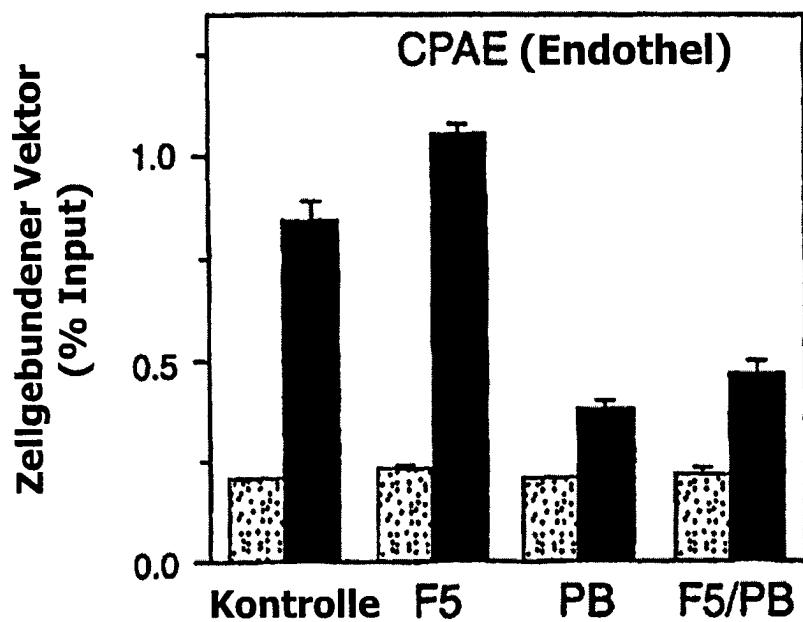


FIG.17

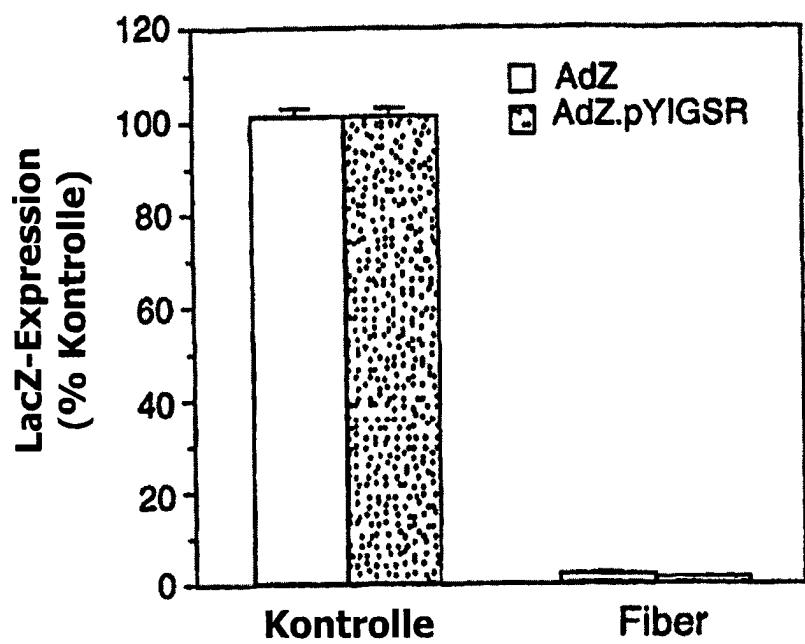


FIG.18

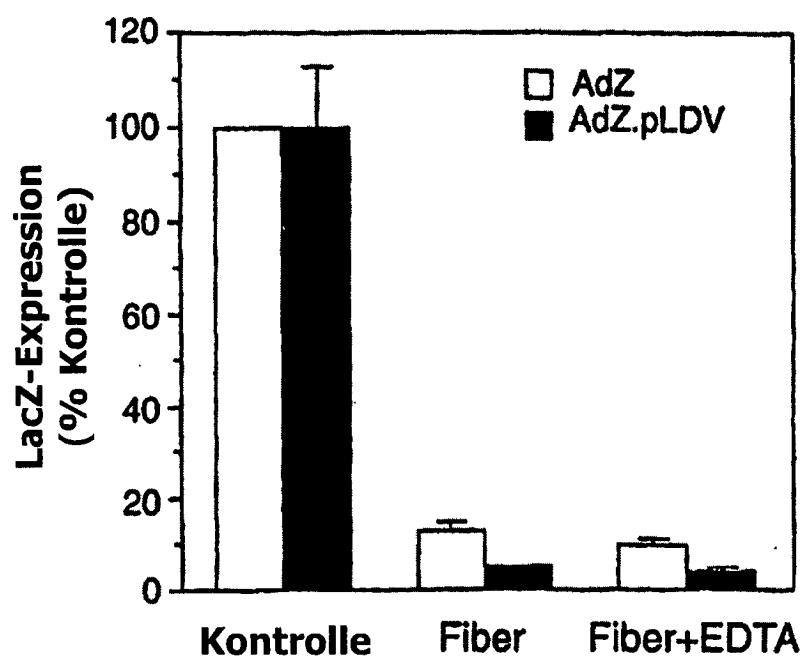


FIG.19

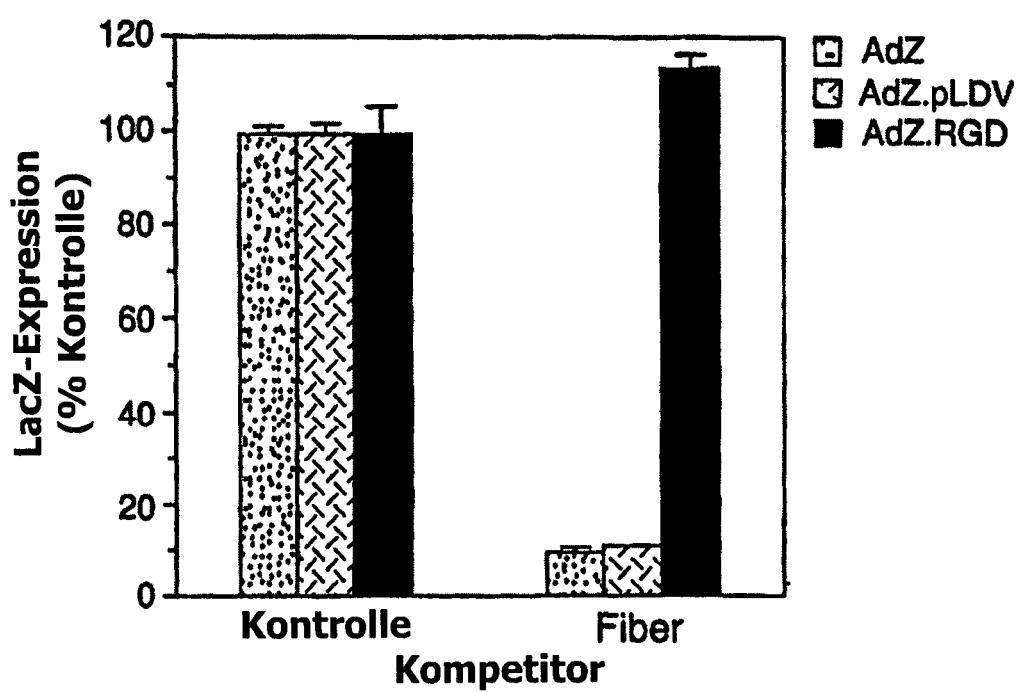


FIG.20