



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 25 567 T2 2006.05.04

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 020 529 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 25 567.8

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 203 878.6

(96) Europäischer Anmeldetag: 19.11.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.07.2000

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 01.06.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.05.2006

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

98203921 20.11.1998 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Crucell Holland B.V., Leiden, NL

(72) Erfinder:

Havenga, Menzo Jans Emco, 2401 KG Alphen aan
de Rijn, NL; Vogels, Ronald, 3461 HW Linschoten,
NL; Bout, Abraham, 2751 XL Moerkapelle, NL

(74) Vertreter:

Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

(54) Bezeichnung: Genverabreichende Vektoren mit Gewebetropismus für glatte Muskelzellen und/oder Endothelzellen

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 eingelebt, 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**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Molekulargenetik und Medizin. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf das Gebiet der Gentherapie, insbesondere auf die Gentherapie unter Verwendung von Adenoviren.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Bei der Gentherapie wird gewöhnlich genetische Information an eine Wirtszelle geliefert, um entweder einen genetischen Mangel in der Zelle zu korrigieren (zu ergänzen) oder um eine unerwünschte Funktion in der Zelle zu hemmen oder um die Wirtszelle zu eliminieren. Natürlich kann die genetische Information auch dazu vorgesehen sein, die Wirtszelle mit einer gewünschten Funktion zu versorgen, z.B. ein sezerniertes Protein zuzuführen, um andere Zellen des Wirtes zu behandeln, usw.

[0003] Viele verschiedene Verfahren wurden entwickelt, um neue genetische Information in Zellen einzuführen. Obwohl bei *in vitro* kultivierten Zelllinien möglicherweise viele verschiedene Systeme funktionieren, scheint nur die Gruppe der von viralen Vektoren vermittelten Genabgabeverfahren in der Lage zu sein, die erforderliche Effizienz der Genübertragung *in vivo* zu erfüllen. Für Gentherapiezwecke richtet sich also die meiste Aufmerksamkeit auf die Entwicklung von geeigneten viralen Vektoren. Heute richtet sich bei der Entwicklung von geeigneten viralen Vektoren die meiste Aufmerksamkeit auf solche Vektoren, die auf Adenoviren beruhen. Diese Adenovirusvektoren können fremde genetische Information *in vivo* sehr effizient an Zielzellen abgeben. Außerdem ist es bei den meisten Arten von Adenovirusvektoren kein Problem, große Mengen von Adenovirusvektoren zu erhalten. Adenovirusvektoren sind relativ leicht zu konzentrieren und zu reinigen. Außerdem haben Studien bei klinischen Versuchen wertvolle Informationen über die Verwendung dieser Vektoren bei Patienten ergeben.

[0004] Es gibt viele Gründe für die Verwendung von Adenovirusvektoren zur Abgabe von Nucleinsäure an Zielzellen in Gentherapievorschriften. Einige Merkmale der derzeitigen Vektoren beschränken jedoch ihre Verwendung in speziellen Anwendungen. Zum Beispiel lassen sich Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur durch die derzeitige Generation von Adenovirusvektoren nicht leicht transduzieren. Für viele Gentherapieanwendungen, wie Anwendungen im cardiovasculären Bereich, sollten diese Arten von Zellen vorzugsweise genetisch modifiziert werden. Andererseits ist bei einigen Anwendungen selbst die sehr gute *in-vivo*-Abgabekapazität von Adenovirusvektoren nicht ausreichend, und höhere Übertragungseffizienzen sind erforderlich. Dies ist zum Beispiel dann der Fall, wenn die meisten Zellen eines Zielgewebes transduziert werden müssen.

[0005] Die vorliegende Erfindung wurde im Verlauf der Manipulation von Adenovirusvektoren gemacht. Im folgenden Abschnitt wird daher eine kurze Einführung zu Adenoviren gegeben.

Adenoviren

[0006] Adenoviren enthalten ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül aus ungefähr 36000 Basenpaaren. Es enthält identische invertierte terminale Wiederholungssequenzen (inverted terminal repeats; ITR) von ungefähr 90–140 Basenpaaren, wobei die genaue Länge vom Serotyp abhängt. Die viralen Replikationsstartpunkte liegen innerhalb der ITRs genau an den Enden des Genoms. Die Transcriptionseinheiten sind in frühe und späte Bereiche eingeteilt. Kurz nach der Infektion werden das E1A- und das E1B-Protein exprimiert und bewirken eine Transaktivierung von zellulären und adenoviralen Genen. Die frühen Bereiche E2A und E2B codieren Proteine (DNA-bindendes Protein, preterminales Protein und Polymerase), die für die Replikation des adenoviralen Genoms erforderlich sind (Übersicht bei van der Vliet, 1995). Der frühe Bereich E4 codiert mehrere Proteine mit pleiotropen Funktionen, z.B. die Transaktivierung des frühen E2-Promotors, was den Transport und die Anhäufung von viralen mRNAs in der späten Infektionsphase erleichtert und die Zellkernstabilität von starken späten Pre-mRNAs (Übersicht bei Leppard, 1997). Der frühe Bereich 3 codiert Proteine, die an der Modulation der Immunantwort des Wirtes beteiligt sind (Wold et al., 1995). Der späte Bereich wird von einem einzigen Promotor (starker später Promotor) aus transkribiert und wird beim Einsetzen der DNA-Replikation aktiviert. Komplexe Spleiß- und Polyadenylierungsmechanismen führen zu mehr als 12 RNA-Spezies, die für Kernproteine, Kapsidproteine (Penton, Hexon, Faser und assoziierte Proteine), virale Protease und Proteine, die für den Zusammenbau des Kapsids und das Herunterfahren der Translation der Wirtsproteine notwendig sind, codieren (Imperiale, M. J., Akusjnarvi, G. und Leppard, K. N. (1995), Posttranscriptional control of adenovirus gene expression. In: The molecular repertoire of adenoviruses I. P139–171. W. Doerfler und P. Bohm

(Hrsg.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszellen

[0007] Die Wechselwirkung des Virus mit der Wirtszelle wurde hauptsächlich mit den Serotyp-C-Viren Ad2 und Ad5 untersucht. Die Bindung erfolgt über eine Wechselwirkung des Knob-Bereichs der hervorstehenden Faser mit einem zellulären Rezeptor. Der Rezeptor für Ad2 und Ad5 und wahrscheinlich noch weitere Adenoviren ist als "Coxsackievirus-und-Adenovirus-Rezeptor" oder CAR-Protein bekannt (Bergelson et al., 1997). Die Internalisierung wird über die Wechselwirkung der in der Pentonbasis vorhandenen RGD-Sequenz mit zellulären Integrinen vermittelt (Wickham et al., 1993). Dies gilt möglicherweise nicht für alle Serotypen, zum Beispiel enthalten die Serotypen 40 und 41 keine RGD-Sequenz in ihrer Pentonbasissequenz (Kidd et al., 1993).

Das Faserprotein

[0008] Der einleitende Schritt für eine erfolgreiche Infektion ist die Bindung des Adenovirus an seine Zielzelle, ein Vorgang, der über das Faserprotein vermittelt wird. Das Faserprotein hat eine trimere Struktur (Stouten et al., 1992) mit unterschiedlicher Länge, die vom Serotyp des Virus abhängt (Signas et al., 1985; Kidd et al., 1993). Verschiedene Serotypen weisen Polypeptide mit strukturell ähnlichen N- und C-Termini, aber unterschiedlichen Mittelstammbereichen auf. Die ersten 30 Aminosäuren am N-Terminus sind an der Verankerung der Faser an der Pentonbasis beteiligt (Chroboczek et al., 1995), insbesondere der konservierte FNPVYP-Bereich im Schwanz (Arnberg et al., 1997). Der C-Terminus oder Knob ist für die einleitende Wechselwirkung mit dem zellulären Adenovirusrezeptor verantwortlich. Nach dieser einleitenden Bindung führt eine sekundäre Bindung zwischen der Pentonbasis des Kapsids und Integrinen der Zelloberfläche zu einer Internalisierung von viralen Partikeln in Stachelsaumgrübchen (coated pits) und zur Endozytose (Morgan et al., 1969; Svensson und Persson, 1984; Varga et al., 1991; Greber et al., 1993; Wickham et al., 1993). Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, von denen wenigstens 14 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert wurden (Hynes, 1992). Die Anordnung von Integrinen, die in Zellen exprimiert werden, ist komplex und variiert zwischen den Zelltypen und je nach der zellulären Umgebung. Obwohl der Knob einige konservierte Bereiche enthält, zeigen die Knob-Proteine zwischen den Serotypen einen hohen Grad der Variabilität, was darauf hinweist, dass es unterschiedliche Adenovirusrezeptoren gibt.

Adenovirale Serotypen

[0009] Zur Zeit wurden sechs verschiedene Untergruppen von humanen Adenoviren vorgeschlagen, die insgesamt ungefähr 50 verschiedene Adenovirus-Serotypen umfassen. Neben diesen humanen Adenoviren wurden auch viele Tier-Adenoviren identifiziert (siehe z.B. Ishibashi und Yasue, 1984). Ein Serotyp wird auf der Basis seiner immunologischen Eigenart definiert, die durch quantitative Neutralisierung mit tierischem Antiserum (Pferd, Kaninchen) bestimmt wird. Wenn die Neutralisierung einen gewissen Grad der Kreuzreaktion zwischen zwei Viren zeigt, wird die Eigenart des Serotyps angenommen, wenn A) die Hämaggglutinine nicht miteinander verwandt sind, was sich durch ein Fehlen einer Kreuzreaktion auf die Hämaggglutinierungsimmunität zeigt, oder B) es erhebliche biophysikalische/biochemische Unterschiede in der DNA gibt (Francki et al., 1991). Die zuletzt identifizierten Serotypen (42–49) wurden zuerst aus HIV-infizierten Patienten isoliert (Hierholzer et al., 1988; Schnurr et al., 1993). Aus nicht gut verstandenen Gründen verbreiten die meisten dieser immunschwächten Patienten Adenoviren, die aus immunkompetenten Individuen nie isoliert wurden (Hierholzer et al., 1988, 1992; Khoo et al., 1995).

[0010] Neben den Unterschieden bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber neutralisierenden Antikörpern verschiedener Adenovirus-Serotypen binden Adenoviren der Untergruppe C, wie Ad2 und Ad5, auch an andere Rezeptoren als Adenoviren aus der Untergruppe B, wie Ad3 und Ad7 (Defer et al., 1990; Gall et al., 1996). Ähnlich wurde nachgewiesen, dass die Rezeptorspezifität geändert werden konnte, indem man das Ad3-Knob-Protein durch das Ad5-Knob-Protein ersetzte und umgekehrt (Krasnykh et al., 1996; Stevenson et al., 1995, 1997). Die Serotypen 2, 4, 5 und 7 haben alle eine natürliche Affinität zu Lungenepithel und anderen Geweben der Atemwege. Dagegen haben die Serotypen 40 und 41 eine natürliche Affinität zum Magen-Darm-Trakt. Diese Serotypen unterscheiden sich wenigstens in den Kapsidproteinen (Pentonbasis, Hexon), den Proteinen, die für die Zellbindung verantwortlich sind (Faserprotein) und den Proteinen, die bei der Replikation des Adenovirus beteiligt sind. Es ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß die Kapsidproteine die Unterschiede im Tropismus bestimmen, die man zwischen den Serotypen findet. Es kann sehr wohl sein, dass postinfektiöse Mechanismen die Zelltypspezifität von Adenoviren bestimmen. Es wurde gezeigt, dass Adenoviren der Serotypen A (Ad12 und Ad31), C (Ad2 und Ad5), D (Ad9 und Ad15), E (Ad4) und F (Ad41) alle in der Lage sind, markiertes lösliches CAR-Protein (sCAR) zu binden, wenn sie auf Nitrocellulose immobilisiert sind.

Weiterhin konnte die Bindung von Adenoviren dieser Serotypen an Ramos-Zellen, die große Mengen CAR exprimieren, aber keine Integrine aufweisen (Roelvink et al., 1996), durch die Zugabe von sCAR zu den Viren vor der Infektion effizient blockiert werden (Roelvink et al., 1998). Die Tatsache, dass (wenigstens einige) Vertreter dieser Untergruppen in der Lage sind, CAR zu binden, schließt jedoch nicht aus, dass diese Viren in verschiedenen Zelltypen eine unterschiedliche Infektionseffizienz haben. Zum Beispiel haben Serotypen der Untergruppe D relativ kurze Faserschäfte im Vergleich zu Viren der Untergruppen A und C. Es wurde postuliert, dass der Tropismus von Viren der Untergruppe D zu einem großen Teil durch die Bindung der Pentonbasis an Integrine bestimmt wird (Roelvink et al., 1996; Roelvink et al., 1998). Ein weiteres Beispiel lieferten Zabner et al., 1998, die 14 verschiedene Serotypen in Bezug auf die Infektion von humanem Flimmerepithel (CAE) getestet haben und herausfanden, dass der Serotyp 17 (Untergruppe D) effizienter gebunden und internalisiert wurde als alle anderen Viren einschließlich anderer Vertreter der Untergruppe D. Ähnliche Experimente unter Verwendung von Serotypen aus Untergruppe A–F in primären fetalnen Rattenzellen zeigten, dass Adenoviren aus Untergruppe A und B ineffizient waren, während Viren aus Untergruppe D am effizientesten waren (Law et al., 1998). Außerdem zeigten Viren innerhalb einer Untergruppe in diesem Fall eine unterschiedliche Effizienz. Die Bedeutung der Faserbindung für die verbesserte Infektion von Ad17 in CAE wurde von Armentano et al. gezeigt (WO 98/22609), die ein rekombinantes LacZ-Ad2-Virus mit einem Faser-Gen von Ad17 herstellten und zeigten, dass das chimärische Virus CAE effizienter infizierte als LacZ-Ad2-Viren mit Ad2-Fasern.

[0011] Trotz ihrer gemeinsamen Fähigkeit, CAR zu binden, bestimmen also möglicherweise Unterschiede zwischen den verschiedenen Serotypen in der Länge der Faser, der Knob-Sequenz und in anderen Kapsidproteinen, z.B. der Pentonbasis, die Effizienz, mit der ein Adenovirus eine bestimmte Zielzelle infiziert. Von Interesse in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit von Ad5- und Ad2-Fasern, aber nicht von Ad3-Fasern, an Fibronektin III und von MHC Klasse 1 α 2 abgeleitete Peptide zu binden. Dies lässt vermuten, dass Adenoviren in der Lage sind, auch andere zelluläre Rezeptoren als CAR zu nutzen (Hong et al., 1997). Es ist bekannt, dass die Serotypen 40 und 41 (Untergruppe F) zwei Faserproteine tragen, die sich in der Länge des Schaftes unterscheiden. Es zeigt sich, dass die 41L-Faser, die einen langen Schaft hat, CAR bindet, während die 41S, die einen kurzen Schaft hat, kein CAR binden kann (Roelvink et al., 1998). Der Rezeptor für die kurze Faser ist nicht bekannt.

Adenovirale Vektoren

[0012] Die meisten adenoviralen Vektoren, die zur Zeit in der Gentherapie verwendet werden, sind von den Serotyp-C-Adenoviren Ad2 oder Ad5 abgeleitet. Die Vektoren weisen eine Deletion im E1-Bereich auf, und dort kann neue genetische Information eingeführt werden. Durch die E1-Deletion hat das rekombinante Virus einen Replikationsdefekt. Es wurde ausführlich gezeigt, dass rekombinantes Adenovirus, insbesondere Serotyp 5, für eine effiziente Übertragung von Genen in vivo an die Leber, das Atemwegsepithel und feste Tumoren in Tiermodellen und humanen Xenotransplantaten bei immunschwachen Mäusen geeignet ist (Bout 1996, 1997; Blaese et al., 1995).

[0013] Von Adenoviren abgeleitete Vektoren (adenovirale Vektoren) haben mehrere Merkmale, aufgrund derer sie für die Genübertragung besonders gut geeignet sind:

- 1) Die Biologie der Adenoviren ist wohlcharakterisiert;
- 2) das Adenovirus ist nicht mit schweren humanen Krankheiten assoziiert;
- 3) das Virus führt seine DNA äußerst effizient in die Wirtszelle ein;
- 4) das Virus kann eine Vielzahl von Zellen infizieren und hat einen breiten Wirtsbereich;
- 5) das Virus kann in hohen Titern und in großen Mengen hergestellt werden;
- 6) und das Virus kann durch Deletion des frühen Bereichs 1 (E1) des viralen Genoms mit einem Replikationsdefekt versehen werden (Brody und Crystal, 1994).

[0014] Mit der Verwendung von adenoviralen Vektoren sind jedoch noch mehrere Nachteile verbunden:

- 1) Adenoviren, insbesondere die gut untersuchten Serotypen Ad2 und Ad5, rufen gewöhnlich eine Immunantwort durch den Wirt hervor, in den sie eingeführt werden;
- 2) es ist zur Zeit nicht möglich, das Virus gezielt zu bestimmten Zellen und Geweben zu steuern;
- 3) die Replikation und andere Funktionen des Adenovirus sind nicht immer sehr gut für die Zellen geeignet, die mit dem zusätzlichen genetischen Material versehen werden sollen;
- 4) die Serotypen Ad2 oder Ad5 sind für die Abgabe von zusätzlichem genetischem Material an andere Organe als die Leber nicht ideal. Die Leber kann mit von Ad2 oder Ad5 abgeleiteten Vektoren besonders gut transduziert werden. Die Abgabe solcher Vektoren über den Blutstrom führt zu einer erheblichen Abgabe der Vektoren an die Zellen der Leber. In Therapien, bei denen andere Zelltypen als Leberzellen transduziert werden müssen, müssen Methoden zum Ausschluss der Leber angewendet werden, um die Aufnahme des

Vektors durch diese Zellen zu verhindern. Die derzeitigen Verfahren beruhen auf der physikalischen Trennung des Vektors von den Leberzellen, und die meisten dieser Verfahren beruhen auf der Lokalisierung des Vektors und/oder des Zielorgans durch Chirurgie, Ballon-Angioplastie oder direkte Injektion in ein Organ, zum Beispiel mit Nadeln. Der Ausschluss der Leber wird auch durch die Abgabe des Vektors an Kompartimente des Körpers praktiziert, die im Wesentlichen gegenüber dem Blutstrom isoliert sind, wodurch der Transport des Vektors zur Leber verhindert wird. Obwohl es bei diesen Verfahren meisten gelingt, eine Abgabe des Vektors an die Leber weitgehend zu vermeiden, sind die meisten der Verfahren noch unausgereift und weisen noch beträchtliche Undichtigkeiten auf und/oder haben schlechte Zielgewebe-Penetrationsmerkmale. In einigen Fällen kann eine ungewollte Abgabe des Vektors an Leberzellen für den Patienten toxicisch sein. Zum Beispiel ist die Abgabe eines Thymidin-Kinase(TK)-Gens des Herpes-simplex-Virus (HSV) zum anschließenden Abtöten von sich teilenden Krebszellen durch Verabreichung von Gancyclovir sehr gefährlich, wenn auch eine erhebliche Menge von Leberzellen durch den Vektor transduziert wird. Die erhebliche Abgabe und anschließende Expression des HSV-TK-Gens an Leberzellen ist mit schwerer Toxizität verbunden. Es besteht also ein spezielles Bedürfnis nach einem inhärent sicheren Vektor mit der Eigenschaft einer reduzierten Transduktionseffizienz von Leberzellen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0015] Tabelle I: Oligonucleotide und degenerierte Oligonucleotide, die für die Amplifikation von DNA verwendet werden, welche von alternativen Adenovirus-Subtypen abgeleitete Faserproteine codiert. (Fett gedruckte Buchstaben stellen die NdeI-Restriktionsstelle (A–E), die NsiI-Restriktionsstelle (1–6, 8) oder die PstI-Restriktionsstelle (7) dar.)

[0016] Tabelle II: Bioverteilung von chimärischem Adenovirus nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene. Die Werte stellen die Luciferase-Aktivität pro µg Gesamtprotein dar. Alle Werte unterhalb von 200 relativen Lichteinheiten pro µg Protein werden als Hintergrund angesehen. ND = nicht bestimmt.

[0017] Tabelle III: Expression von CAR und Integrinen auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur. 70%: Zellen bei einer Zelldichte von 70% Konfluenz für die FACS-Analyse geerntet. 100%: Zellen bei einer Zelldichte von 100% Konfluenz für die FACS-Analyse geerntet. PER.C6-Zellen wurden als Kontrolle für die Antikörperfärbung genommen. Die Werte stellen den Prozentsatz der Zellen dar, die CAR oder eines der Integrine auf Niveaus oberhalb des Hintergrunds exprimieren. Als Hintergrundskontrolle wurden HUVECs oder HUVsmc nur mit dem sekundären, mit Ratten-Anti-Maus-IgG1-PE markierten Antikörper inkubiert.

[0018] Tabelle IV: Bestimmung der Transgen-Expression (Luciferase-Aktivität) pro µg Gesamtzellprotein nach der Infektion von A549-Zellen.

[0019] [Fig. 1](#): Schematische Zeichnung des pBr/Ad.Bam-rITR-Konstrukts.

[0020] [Fig. 2](#): Schematische Zeichnung der Strategie, die zur Deletion des Faser-Gens aus dem pBr/Ad.Bam-rITR-Konstrukt verwendet wird.

[0021] [Fig. 3](#): Schematische Zeichnung des Konstrukts pBr/Ad.BamRΔfib.

[0022] [Fig. 4](#): Sequenzen der chimärischen Fasern Ad5/12, Ad5/16, Ad5/28 und Ad5/40-L.

[0023] [Fig. 5](#): Schematische Zeichnung des Konstrukts pClipsal-Luc.

[0024] [Fig. 6](#): Schematische Zeichnung des Verfahrens zur Erzeugung von chimärischen Adenoviren unter Verwendung von drei überlappenden Fragmenten. Der frühe (E) und der späte Bereich (L) sind angezeigt. L5 ist die fasercodierende Sequenz.

[0025] [Fig. 7](#): A) Infektion von HUVEC-Zellen mit Hilfe von unterschiedlichen Mengen an Viruspartikeln pro Zelle und verschiedenen faserchimärischen Adenoviren. Viruskonzentration: 10000 VP/Zelle (= weißer Balken), 5000 VP/Zelle (= grauer Balken), 2500 VP/Zelle (= schwarzer Balken), 1000 VP/Zelle (hellgrauer Balken), 250 und 50 VP/Zelle: keine nachweisbare Luciferase-Aktivität oberhalb des Hintergrunds. Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Mikrogramm zelluläres Protein ausgedrückt. B) Infektion von HUVEC-Zellen unter Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen von Zellen (22500, 45000, 90000 oder 135000 Zellen pro Napf ausgesät) und entweder Adenovirus Serotyp 5 (schwarzer Balken) oder des Fa-

ser-16-chimärischen Adenovirus (weißer Balken). Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Mikrogramm zelluläres Protein ausgedrückt. C) Durchflusscytometrische Analyse an Endothelzellen aus humaner Aorta, die mit 500 (schwarzer Balken) oder 5000 (grauer Balken) Viruspartikeln von Ad5 oder des Faser-16-chimärischen Virus (Fib16) pro Zelle transduziert wurden. Nichtinfizierte Zellen wurden verwendet, um den Hintergrund auf 1% und eine mediane Fluoreszenz von 5,4 zu setzen. Die maximale Verschiebung in der medianen Fluoreszenz, die mit einem Durchflusscytometer beobachtet werden kann, beträgt 9999. Letzteres deutet darauf hin, dass bei 5000 VP/Zelle sowohl Ad5 als auch Fib16 außerhalb des Empfindlichkeitsbereichs des Durchflusscytometers liegen.

[0026] **Fig. 8:** A) Infektion von HUVsmc-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Mengen von Viruspartikeln pro Zelle und verschiedener, auf der Fasermutante Ad5 basierender Adenoviren. Viruskonzentration: 5000 VP/Zelle (= weißer Balken), 2500 VP/Zelle (= grauer Balken), 1250 VP/Zelle (= dunkelgrauer Balken), 250 VP/Zelle (= schwarzer Balken) oder 50 VP/Zelle (= hellgrauer Balken). Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Mikrogramm zelluläres Protein ausgedrückt. B) Infektion von HUVsmc-Zellen unter Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen von Zellen (10000, 20000, 40000, 60000 oder 80000 Zellen pro Napf) und entweder Adenovirus Serotyp 5 (weiße Balken) oder des Faser-16-chimärischen Adenovirus (schwarze Balken). Nach der Infektion mit chimärischem Faser-16-Adenovirus wird ein Plateau beobachtet, da die Transgen-Expression höher ist als der Empfindlichkeitsbereich des verwendeten Bioluminometers. C) SMC (Zellen aus glatter Muskulatur) aus der menschlichen Nabelschnurvene, transduziert mit 500 VP/Zelle (schwarzer Balken) oder 5000 VP/Zelle (grauer Balken) unter Verwendung von entweder Ad5 oder der Faser-16-Mutante (Fib 16). Nichttransduzierte Zellen wurden verwendet, um den Hintergrund der medianen Fluoreszenz auf ungefähr 1 zu setzen. Gezeigt ist die mit Durchflusscytometrie gemessene mediane Fluoreszenz der GFP-Expression. D) HUVsmc wurden mit 312 (hellgrauer Balken), 625 (grauer Balken), 1250 (schwarzer Balken), 2500 (dunkelgrauer Balken), 5000 (hellgrauer Balken) oder 10000 (weißer Balken) Viruspartikeln pro Zelle von entweder dem Faser-11-, -16-, -35- oder -51-chimärischen Virus infiziert. Die in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Mikrogramm Protein ausgedrückte Luciferase-Transgen-Expression wurde 48 Stunden nach der Virusbehandlung gemessen. E) Makroskopische Photos der LacZ-Färbung von Saphenaproben. In den Zellkern gelenktes LacZ (ntLacZ) ergibt eine tiefblaue Farbe, die in nichtfarbigen Abzügen schwarz oder dunkelgrau erscheint. F) Makroskopische Photos der LacZ-Färbung von Perikardproben. In den Zellkern gelenktes LacZ (ntLacZ) ergibt eine tiefblaue Farbe, die in nichtfarbigen Abzügen schwarz erscheint. G) Makroskopische Photos der LacZ-Färbung von Proben der rechten Koronararterie. In den Zellkern gelenktes LacZ (ntLacZ) ergibt eine tiefblaue Farbe, die in nichtfarbigen Abzügen schwarz erscheint. H) LacZ-Färbung von Proben der linken absteigenden Koronararterie (LAD). In den Zellkern gelenktes LacZ (ntLacZ) ergibt eine tiefblaue Farbe, die in nichtfarbigen Abzügen schwarz erscheint.

[0027] **Fig. 9:** Sequenzen, die das Gen, welches Adenovirus-16-Faserprotein codiert, wie es in Genbank veröffentlicht ist, einschließen, und Sequenzen, die ein Gen einschließen, das eine Faser von einer Adenovirus-16-Variante, wie sie in der vorliegenden Erfindung isoliert wurde, codiert, wobei die Sequenzen des Faserproteins von der NdeI-Stelle aus angegeben sind. [Fig. 9A](#): Nucleotidsequenzvergleich. [Fig. 9B](#): Aminosäurevergleich.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt Gentherapieverfahren, Verbindungen und Medikamente bereit. Die vorliegende Erfindung ist insbesondere für Gentherapieanwendungen geeignet, bei denen Endothelzellen und/oder Zellen der glatten Muskulatur den Zielzelltyp bilden. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Genüberträger (Vektoren), die mit einem Gewebetropismus für wenigstens Endothelzellen und/oder Zellen der glatten Muskulatur versehen sind. Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf Genüberträger, die von einem Gewebetropismus für Leberzellen befreit sind.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0029] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Materialien und Verfahren bereitzustellen, um die oben genannten Beschränkungen von adenoviralen Vektoren zu überwinden. In einem weiteren Sinn stellt die Erfindung neue Adenoviren bereit, die ganz oder zum Teil von Serotypen abgeleitet sind, welche von Ad5 verschiedenen sind. Spezielle Gene von Serotypen mit bevorzugten Merkmalen können in einem chimärischen Vektor miteinander kombiniert werden, was einen Vektor ergibt, der für spezielle Anwendungen besser geeignet ist. Zu den bevorzugten Merkmalen gehören unter anderem eine verbesserte Infektion einer speziellen Zielzelle, eine reduzierte Infektion von Nicht-Zielzellen, eine verbesserte Stabilität des Virus, eine reduzierte Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen (APC) oder eine erhöhte Aufnahme in APC, eine reduzierte Toxizität gegenü-

ber Zielzellen, eine reduzierte Neutralisation in Menschen oder Tieren, eine reduzierte oder erhöhte CTL-Antwort in Menschen oder Tieren, eine bessere und/oder verlängerte Transgen-Expression, eine erhöhte Penetrationskapazität in Geweben, verbesserte Ausbeuten in Verpackungszelllinien usw.

[0030] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung erleichtert die Kombination der geringen Immunogenität einiger Adenoviren mit den Merkmalen anderer Adenoviren, die eine effiziente Gentherapie ermöglichen. Solche Merkmale können eine hohe Spezifität für bestimmte Wirtszellen, eine gute Replikationsmaschinerie für bestimmte Zellen, eine hohe Infektionsrate in bestimmten Wirtszellen, eine geringe Infektionseffizienz in Nicht-Zielzellen, eine hohe oder niedrige Effizienz der APC-Infektion usw. sein. Die Erfindung kann also chimärische Adenoviren bereitstellen, die die nützlichen Eigenschaften von wenigstens zwei Adenoviren verschiedener Serotypen aufweisen.

[0031] Typischerweise sind zwei oder mehr Anforderungen aus der obigen nichtumfassenden Liste notwendig, um ein Adenovirus zu erhalten, das in der Lage ist, genetisches Material effizient auf eine Wirtszelle zu übertragen. Daher stellt die vorliegende Erfindung von Adenoviren abgeleitete Vektoren bereit, die als Cassetten verwendet werden können, um verschiedene adenovirale Gene von verschiedenen adenoviralen Serotypen an den erforderlichen Stellen einzusetzen. Auf diese Weise kann man einen Vektor erhalten, der ein chimärisches Adenovirus erzeugen kann, wodurch natürlich auch ein interessierendes Gen eingesetzt werden kann (zum Beispiel an der Stelle des E1 des ursprünglichen Adenovirus). Auf diese Weise kann das zu erzeugende chimärische Adenovirus an die Anforderungen und Bedürfnisse bestimmter Wirte, die eine Gentherapie für bestimmte Störungen benötigen, angepasst werden. Um diese Viruserzeugung zu ermöglichen, wird im Allgemeinen eine Verpackungszelle benötigt, um eine ausreichende Menge sicherer chimärischer Adenoviren zu erzeugen.

[0032] In einem ihrer Aspekte stellt die vorliegende Erfindung adenovirale Vektoren bereit, die wenigstens ein Fragment eines Faserproteins eines Adenovirus aus Untergruppe B umfasst. Das Faserprotein kann das native Faserprotein des adenoviralen Vektors sein oder kann von einem Serotyp abgeleitet sein, der von dem Serotyp, auf dem der adenovirale Vektor beruht, verschieden sein. Im letzteren Fall ist der adenovirale Vektor gemäß der Erfindung ein chimärisches Adenovirus, das wenigstens ein Fragment des Faserproteins aufweist, das von Adenoviren der Untergruppe B abgeleitet ist, wobei dieses Fragment wenigstens die Rezeptorbindungssequenz umfasst. Typischerweise wird ein solches Virus unter Verwendung eines Vektors (typischerweise eines Plasmids, eines Cosmids oder eines Baculovirus-Vektors) erzeugt. Solche Vektoren sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter Vektor ist ein Vektor, der verwendet werden kann, um ein chimärisches rekombinantes Virus herzustellen, das an den zu behandelnden Wirt und an die zu behandelnde Störung angepasst ist.

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein chimärisches Adenovirus bereit, das auf Adenovirus Typ 5 beruht, aber wenigstens ein Fragment der Fasersequenz von Adenovirus Typ 16 aufweist, wobei das Fragment der Faser von Ad16 das Fragment des Faserproteins umfasst, das an der Bindung einer Wirtszelle beteiligt ist.

[0034] Die vorliegende Erfindung stellt auch chimärische adenovirale Vektoren bereit, die in speziellen Wirtszellen, unter anderem zum Beispiel Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur menschlichen oder tierischen Ursprungs, im Vergleich zu Adenoviren aus anderen Untergruppen eine verbesserte Infektion zeigen. Ein wichtiges Merkmal der vorliegenden Erfindung ist das Mittel zur Herstellung des chimärischen Virus. Typischerweise möchte man keine Adenoviruscharge, die replikationskompetentes Adenovirus enthält, an die Wirtszelle verabreichen. Im Allgemeinen ist es daher erwünscht, mehrere Gene (aber wenigstens eines) aus dem adenoviralen Genom auf dem Vektor, der das chimärische Virus codiert, wegzulassen und diese Gene im Genom der Zelle zuzuführen, in die der Vektor gebracht wird, um chimärisches Adenovirus zu erzeugen. Eine solche Zelle wird gewöhnlich "Verpackungszelle" genannt. Die Erfindung stellt also auch eine Verpackungszelle zur Herstellung eines chimärischen Adenovirus gemäß der Erfindung bereit, die in trans alle Elemente umfasst, die für die Adenoviruserzeugung notwendig sind, aber auf dem adenoviralen Vektor gemäß der Erfindung nicht vorhanden sind. Typischerweise müssen der Vektor und die Verpackungszelle aneinander angepasst werden, so dass sie alle notwendigen Elemente aufweisen, aber keine überlappenden Elemente aufweisen, die durch Rekombination zu einem replikationskompetenten Virus führen. Die Erfindung stellt also auch einen Kit mit Bestandteilen bereit, der eine Verpackungszelle gemäß der Erfindung und einen rekombinanten Vektor gemäß der Erfindung umfasst, wobei es im Wesentlichen keine Sequenzüberlappung gibt, die zu einer Rekombination, welche die Erzeugung von replikationskompetentem Adenovirus zur Folge hat, zwischen der Zelle und dem Vektor führt. Für bestimmte Anwendungen, zum Beispiel wenn die Therapie auf eine Ausrottung von Tumorzellen abzielt, kann der adenovirale Vektor gemäß der Erfindung replikationskompetent sein oder

unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel in speziellen Zelltypen, wie Tumorzellen oder Tumorendothelzellen, zur Replikation befähigt sein.

[0035] Es liegt im Umfang der Erfindung, mehrere Gene oder einen funktionellen Teil dieser Gene aus demselben oder anderen Serotypen in den adenoviralen Vektor einzusetzen und die entsprechenden nativen Sequenzen zu ersetzen. So kann zum Beispiel der Ersatz von (oder eines funktionellen Teils der) Fasersequenzen durch entsprechende Sequenzen von anderen Serotypen zum Beispiel mit dem Ersatz von (oder eines funktionellen Teils von) anderen Kapsidgenen, wie Pentonbasis oder Hexon, durch entsprechende Sequenzen des Serotyps oder von anderen, unterschiedlichen Serotypen kombiniert werden. Der Fachmann versteht, dass andere Kombinationen, die nicht auf diese Gene beschränkt sind, möglich sind und im Umfang der Erfindung liegen. Der chimärische adenovirale Vektor gemäß der Erfindung kann aus wenigstens zwei verschiedenen Serotypen stammen. Dadurch kann der Vektor mit bevorzugten Merkmalen ausgestattet werden, wie einer verbesserten Infektion von Zielzellen und/oder geringeren Infektion von Nicht-Zielzellen, einer verbesserten Stabilität des Virus, einer reduzierten Immunogenität bei Menschen oder Tieren (z.B. reduzierte Aufnahme in APC, reduzierte Neutralisation im Wirt und/oder reduzierte cytotoxische T-Lymphocyten(CTL)-Antwort), einer erhöhten Penetration von Gewebe, einer besseren Langlebigkeit der Transgen-Expression usw. In diesem Aspekt werden vorzugsweise Kapsidgene, z.B. Penton- und/oder Hexongene von weniger immunogenen Serotypen verwendet, die durch das Fehlen oder die Anwesenheit nur geringer Mengen von neutralisierenden Antikörpern in der großen Mehrheit der Wirte definiert sind. Vorzugsweise werden auch Faser- und/oder Pentonsequenzen von Serotypen verwendet, die eine verbesserte Bindung und Internalisierung in die Zielzellen zeigen. Weiterhin werden aus dem viralen Vektor vorzugsweise diejenigen Gene entfernt, die zur Expression von adenoviralen Genen in den Zielzellen führen. In diesem Aspekt wird auch ein Vektor bevorzugt, aus dem alle adenoviralen Gene entfernt wurden. Weiterhin ist der Promotor, der das interessierende Gen, das in den Zielzellen exprimiert werden soll, steuert, vorzugsweise ein zelltypspezifischer Promotor.

[0036] Um den viralen Vektor genau anpassen und das chimärische Virus nach Wunsch mit den gewünschten Eigenschaften versehen zu können, wird vorzugsweise eine Bibliothek von adenoviralen Genen bereitgestellt, wobei sich die auszutauschenden Gene auf adenoviralen Konstrukten auf Plasmid- oder Cosmidbasis befinden, wobei die auszutauschenden Gene oder Sequenzen von Restriktionsstellen flankiert sind. Die bevorzugten Gene oder Sequenzen können aus der Bibliothek ausgewählt und in die adenoviralen Konstrukte, die man zur Erzeugung der Viren verwendet, eingesetzt werden. Typischerweise umfasst ein solches Verfahren mehrere Spaltungs- und Ligierungsschritte und die Transfektion einer Verpackungszelle. Der adenovirale Vektor kann in einem Stück oder in Form von zwei oder mehr überlappenden Fragmenten zur Transfektion verwendet werden, wobei durch homologe Rekombination Viren erzeugt werden. Zum Beispiel kann der adenovirale Vektor aus zwei oder mehr überlappenden Sequenzen zum Einsetzen eines interessierenden Gens oder Ersetzen durch ein interessierendes Gen zum Beispiel im E1-Bereich, zum Einsetzen oder Ersetzen in Penton- und/oder Hexonsequenzen und zum Einsetzen oder Ersetzen in Fasersequenzen aufgebaut werden. Die Erfindung stellt also ein Verfahren zur Herstellung von chimärischen Adenoviren bereit, die eine oder mehrere gewünschte Eigenschaften, wie einen gewünschten Wirtsbereich und eine verminderte Antigenität, aufweisen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: Bereitstellen von einem oder mehreren Vektoren gemäß der Erfindung, die die gewünschten Insertionsstellen aufweisen, Einsetzen wenigstens eines funktionellen Teils eines Faserproteins, das von einem Adenovirus-Serotyp abgeleitet ist, der den gewünschten Wirtsbereich hat, in die Vektoren und/oder Einsetzen eines funktionellen Teils eines Kapsidproteins, das von einem Adenovirus-Serotyp abgeleitet ist, der eine relativ geringe Antigenität hat, und Transfizieren einer Verpackungszelle gemäß der Erfindung mit den Vektoren und Erzeugenlassen von chimärischen viralen Partikeln. Selbstverständlich können auch andere Kombinationen von anderen viralen Genen, die von verschiedenen Serotypen stammen, eingesetzt werden, wie weiter oben offenbart ist. Chimärische Viren, die außer einer Insertion eines interessierenden Gens oder einem Ersatz durch ein interessierendes Gen im E1-Bereich nur eine einzige nichtnative Sequenz aufweisen, fallen ebenfalls in den Umfang der Erfindung. Eine immunogene Reaktion auf Adenovirus, die typischerweise auftritt, ist die Erzeugung von neutralisierenden Antikörpern durch den Wirt. Dies ist typischerweise ein Grund, um ein Kapsidprotein, wie Penton, Hexon und/oder Faser, eines weniger immunogenen Serotyps auszuwählen.

[0037] Selbstverständlich kann es auch sein, dass es nicht notwendig ist, chimärische Adenoviren herzustellen, die vollständige Proteine von verschiedenen Serotypen aufweisen. Es liegt innerhalb des fachmännischen Könnens, chimärische Proteine herzustellen, zum Beispiel ist es im Falle von Faserproteinen sehr gut möglich, die Basis von einem Serotyp und den Schaft und den Knob von einem anderen Serotyp zu verwenden. Auf diese Weise wird es möglich, dass diejenigen Teile des Proteins, die für den Zusammenbau von viralen Partikeln verantwortlich sind, von einem einzigen Serotyp stammen, so dass die Produktion von intakten viralen Partikeln verstärkt wird. Die Erfindung stellt also auch ein chimärisches Adenovirus gemäß der Erfindung be-

reit, bei dem das Hexon-, Penton-, Faser- und/oder andere Kapsidproteine chimärische Proteine sind, die von verschiedenen Adenovirus-Serotypen stammen. Neben der Erzeugung von chimärischen Adenoviren durch Austauschen von ganzen Wildtyp-Kapsid-(Protein)-Genen usw. oder Teilen davon fällt es auch in den Umfang der vorliegenden Erfindung, Kapsid-(Protein)-Gene usw. einzusetzen, die nichtadenovirale Sequenzen oder Mutationen, wie Punktmutationen, Deletionen, Insertionen usw., tragen und die leicht auf bevorzugte Merkmale, wie Temperaturstabilität, Zusammenbau, Verankerung, umorientierte Infektion, geänderte Immunantwort usw., durchmustert werden können. Wiederum können auch andere chimärische Kombinationen erzeugt werden und fallen in den Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0038] Bei Mäusen und Ratten wurde nachgewiesen, dass nach systemischer in-vivo-Abgabe von rekombinantem Adenovirus von üblicherweise verwendeten Serotypen für Gentherapiezwecke mehr als 90% des Virus in der Leber eingefangen werden (Herz et al., 1993; Kass-Eisler et al., 1994; Huard et al., 1995). Es ist auch bekannt, dass humane Hepatocyten von Adenovirus-Serotyp-5-Vektoren effizient transduziert werden (Castell, J. V., Hernandez, D., Gomez-Foix, A. M., Guillen, I., Donato, T. und Gomez-Lechon, M. J. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer into human hepatocytes: analysis of the biochemical functionality of transduced cells. Gene Ther. 4(5), S. 455–464). Die in-vivo-Gentherapie durch systemische Abgabe von Vektoren auf der Basis von Ad2 oder Ad5 wird also durch die effiziente Aufnahme der Viren in die Leber, was zu einer unerwünschten Toxizität und geringeren Verfügbarkeit von Virus für die Transduktion der Zielzellen führt, ernsthaft behindert. Daher ist die Änderung des Wirtszellbereichs von Adenovirus Serotyp 5, um in vivo andere Organe ansteuern zu können, ein wichtiges Interesse der Erfindung.

[0039] Um eine umorientierte Infektion von rekombinantem Adenovirus Serotyp 5 zu erhalten, wurden oder werden immer noch mehrere Ansätze untersucht. Wickham et al. haben das RGD-Motiv (Arg, Gly, Asp) in der Pentonbasis verändert, das vermutlich für die Bindung von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin an die Pentonbasis verantwortlich ist. Sie haben dieses RGD-Motiv durch ein anderes Peptidmotiv ersetzt, das für den $\alpha_4\beta_1$ -Rezeptor spezifisch ist. Auf diese Weise können eine Zielsteuerung des Adenovirus zu einer speziellen Zielzelle bewerkstelligt werden (Wickham et al., 1995). Krasnykh et al. (1998) haben sich die im Knob verfügbare HI-Schleife zunutze gemacht. Diese Schleife befindet sich laut Röntgenkristallographie auf der Außenseite der trimeren Struktur des Knob und trägt daher vermutlich nicht zu den intramolekularen Wechselwirkungen im Knob bei. Die Insertion einer FLAG-codierenden Sequenz in die HI-Schleife führte zu Faserproteinen, die in der Lage waren, zu trimerisieren, und es wurde weiter gezeigt, dass Viren, die die FLAG-Sequenz im Knob-Bereich enthalten, hergestellt werden konnten. Obwohl die Wechselwirkungen des FLAG enthaltenden Knob mit CAR nicht geändert werden, kann die Insertion von Liganden in die HI-Schleife zu einer neuen Zielrichtung der Infektion führen. Zwar wurde die erfolgreiche Einführung von Änderungen in die Faser und Pentonbasis von Adenovirus Serotyp 5 beschrieben, doch sind solche Zielsteuerungsansätze aufgrund der komplexen Struktur des Knob und der begrenzten Kenntnisse über die genauen Aminosäuren, die mit CAR wechselwirken, mühsam und schwierig. Die Verwendung von Antikörpern, die an CAR und an einen spezifischen zellulären Rezeptor binden, wurde ebenfalls beschrieben (Wickham et al., 1996; Rogers et al., 1997). Dieser Ansatz ist jedoch durch die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers und durch die Komplexität des Gentherapieprodukts beschränkt.

[0040] Um die oben beschriebenen Beschränkungen zu überwinden, verwendeten wir bereits vorhandene Adenovirusfasern, Pentonbasisproteine, Hexonproteine oder andere Kapsidproteine, die von anderen Adenovirus-Serotypen abgeleitet sind. Indem wir Bibliotheken von chimärischem Adenovirus Serotyp 5 erzeugten, die Strukturproteine von alternativen Adenovirus-Subtypen enthielten, haben wir eine Technik entwickelt, die eine schnelle Suche nach einem rekombinanten adenoviralen Vektor mit bevorzugten Merkmalen ermöglicht.

[0041] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verfahren für die Erzeugung von chimärischen Kapsiden bereitzustellen, die in vitro sowie in vivo gezielt zu speziellen Zelltypen gesteuert werden können und damit einen geänderten Tropismus für bestimmte Zelltypen aufweisen. Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Mittel bereitzustellen, mit denen ein Adenovirus oder ein Adenoviruskapsid als Überträger für die Abgabe von Protein oder Nucleinsäure an einen speziellen Zelltyp oder ein spezielles Gewebe verwendet werden kann.

[0042] Die Erzeugung von chimärischen Adenoviren auf der Basis von Adenovirus Serotyp 5 mit modifizierten späten Genen wird beschrieben. Zu diesem Zweck wurden drei Plasmide aufgebaut, die zusammen das vollständige Adenovirus-Serotyp-5-Genom enthalten. Aus einem dieser Plasmide wurde ein Teil der DNA, die das Faserprotein des Adenovirus Serotyp 5 codiert, entfernt und durch Linker-DNA-Sequenzen ersetzt, die die Klonierung erleichtern. Dieses Plasmid diente anschließend als Matrize für die Insertion von DNA, die Faserprotein codiert, das von verschiedenen Adenovirus-Serotypen stammt. Die von den verschiedenen Serotypen ab-

geleiteten DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion in Kombination mit (degenerierten) Oligonucleotiden erhalten. An der früheren E1-Stelle im Genom von Adenovirus Serotyp 5 kann jedes interessierende Gen kloniert werden. Ein einziger Transfektionsvorgang mit den drei Plasmiden zusammen führt zur Bildung eines rekombinanten chimärischen Adenovirus. Alternativ dazu kann die Klonierung der Sequenzen, die aus der Bibliothek von Genen erhalten wurden, so erfolgen, dass der chimärische adenovirale Vektor aus einem oder zwei Fragmenten aufgebaut wird. Zum Beispiel enthält ein Konstrukt wenigstens die linken ITR sowie Sequenzen, die für die Verpackung des Virus benötigt werden, eine Expressionscassette für das interessierende Gen und Sequenzen, die mit dem zweiten Konstrukt überlappen, das alle Sequenzen, die für die Replikation und Virusbildung notwendig sind und in der Verpackungszelle nicht vorhanden sind, sowie die nichtnativen Sequenzen, die für die bevorzugten Merkmale sorgen, umfasst. Diese neue Technik von Bibliotheken, die aus chimärischen Adenoviren bestehen, ermöglicht also eine schnelle Suche nach verbesserten rekombinanten adenoviralen Vektoren für in-vitro- und in-vivo-Gentherapiezwecke.

[0043] Die Verwendung von Adenovirus Typ 5 für die in-vivo-Gentherapie ist beschränkt durch die offensichtliche Unfähigkeit zur Infektion von bestimmten Zelltypen, z.B. humanen Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, und die Präferenz der Infektion bestimmter Organe, z.B. Leber und Milz. Insbesondere hat dies Folgen für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie Restenose und pulmonaler Hochdruck. Die Adenovirus-vermittelte Abgabe von humanem ceNO5 (konstitutive endotheliale NO-Synthase) wurde als Behandlung für Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) vorgeschlagen. Restenose ist durch progressive Arterienremodellierung, Bildung von extrazellulärer Matrix und intimer Hyperplasie an der Stelle der Angioplastie gekennzeichnet (Schwartz et al., 1993; Carter et al., 1994; Shi et al., 1996). NO ist einer der vasoaktiven Faktoren, von denen gezeigt wurde, dass sie nach einer PTCA-induzierten Verletzung der endothelialen Barriere verloren gehen (Lloyd Jones und Bloch, 1996). Die Wiederherstellung der NO-Konzentrationen nach einer balloninduzierten Verletzung mittels adenoviraler Abgabe von ceNOS kann also eine Restenose verhindern (Varenne et al., 1998). Weitere Anwendungen der Gentherapie, bei denen die Viren oder chimärischen Viren gemäß der Erfindung den Viren auf Ad2- oder Ad5-Basis überlegen sind und die als nichteinschränkende Beispiele angegeben werden, sind die Erzeugung von Proteinen, die ins Blut sezerniert werden, durch Endothelzellen, die Behandlung von Bluthochdruck, die präventive Behandlung von Stenose während einer Venentransplantation, Angiogenese, Herzversagen, renaler Bluthochdruck und andere.

[0044] In einer Ausführungsform beschreibt diese Erfindung adenovirale Vektoren, die neben anderen besonders für die Genabgabe an Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, welche für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Störungen wichtig sind, geeignet sind. Die adenoviralen Vektoren sind vorzugsweise von Adenoviren der Untergruppe B abgeleitet oder enthalten wenigstens einen funktionellen Teil des Faserproteins von einem Adenovirus von Untergruppe B, der wenigstens die zellbindende Struktureinheit des Faserproteins umfasst. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die adenoviralen Vektoren chimärische Vektoren, die auf Adenovirus Typ 5 beruhen und wenigstens einen funktionellen Teil des Faserproteins von Adenovirus Typ 16 enthalten.

[0045] In einer anderen Ausführungsform stellt diese Erfindung adenovirale Vektoren oder chimärische adenovirale Vektoren bereit, die nach systemischer Verabreichung der Leber entkommen. Vorzugsweise sind diese adenoviralen Vektoren von Untergruppe A, B, D oder F abgeleitet, insbesondere Serotypen 12, 16, 28 und 40, oder enthalten wenigstens die zellbindende Struktureinheit des von diesen Adenoviren abgeleiteten Faserproteins.

[0046] Man sollte sich darüber im Klaren sein, dass die adenoviralen Vektoren in allen Ausführungsformen von dem Serotyp mit den gewünschten Eigenschaften abgeleitet sein kann oder dass der adenovirale Vektor auf einer Adenovirusform von einem Serotyp beruht und die Sequenzen enthält, die die gewünschten Funktionen eines anderen Serotyps umfassen, wobei diese Sequenzen die nativen Sequenzen in diesem Serotyp ersetzen.

[0047] In einem anderen Aspekt beschreibt diese Erfindung chimärische Adenoviren und Verfahren zur Erzeugung dieser Viren, die einen veränderten Tropismus aufweisen, der von dem des Adenovirus Serotyp 5 verschieden ist, zum Beispiel Viren auf der Basis von Adenovirus Serotyp 5, die jedoch irgendeine in der Natur existierende Adenovirusfaser aufweisen. Dieses chimärische Adenovirus Serotyp 5 ist in der Lage, bestimmte Zelltypen in vitro und in vivo effizienter oder weniger effizient zu infizieren als das Adenovirus Serotyp 5. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, dendritische Zellen, neuronale Zellen, Gliazellen, Synovalzellen, Lungenepithelzellen, hämatopoetische Stammzellen, Monocyten/Makrophagen, Tumorzellen, Skelettmuskelzellen, Mesothelzellen, Synoviocyten usw.

[0048] In einem anderen Aspekt beschreibt die Erfindung den Aufbau und die Verwendung von Bibliotheken, die aus getrennten Teilen von Adenovirus Serotyp 5 bestehen, bei denen ein oder mehrere Gene oder Sequenzen durch DNA ersetzt sind, die von alternativen humanen oder tierischen Serotypen abgeleitet ist. Diese Menge von Konstrukten, die insgesamt das gesamte Adenovirusgenom umfasst, ermöglicht den Aufbau von einzigartigen chimärischen Adenoviren, die für eine bestimmte Krankheit, Patientengruppe oder sogar ein einzelnes Individuum maßgeschneidert sind.

[0049] In allen Aspekten der Erfindung können die chimärischen Adenoviren Deletionen im E1-Bereich und Insertionen von heterologen Genen, die mit einem Promotor verknüpft sind oder auch nicht, enthalten oder auch nicht. Weiterhin können chimärische Adenoviren Deletionen im E3-Bereich und Insertionen von heterologen Genen, die mit einem Promotor verknüpft sind, enthalten oder auch nicht.

[0050] Weiterhin können chimärische Adenoviren Deletionen im E2- und/oder E4-Bereich und Insertionen von heterologen Genen, die mit einem Promotor verknüpft sind, enthalten oder auch nicht. Im letzteren Fall sind E2- und/oder E4-komplementierende Zelllinien erforderlich, um rekombinante Adenoviren zu erzeugen. Tatsächlich kann jedes Gen im Genom des viralen Vektors herausgenommen und in trans zugeführt werden. Im Extremfall enthalten chimärische Viren also keine adenoviralen Gene in ihrem Genom und sind per Definition minimale adenovirale Vektoren. In diesem Fall werden alle adenoviralen Funktionen in trans zugeführt, wobei man stabile Zelllinien und/oder eine transiente Expression dieser Gene verwendet. Ein Verfahren zur Herstellung von minimalen adenoviralen Vektoren ist in WO 97/00326 beschrieben und wird hier als Referenz verwendet. In einem anderen Fall werden chimärische Ad/AAV-Moleküle in die Adenoviruskapside der Erfindung verpackt. Ein Verfahren zur Herstellung von chimärischen Ad/AAV-Vektoren ist in EP 97204085.1 beschrieben und wird hier als Referenz verwendet. Im Prinzip kann jede Nucleinsäure mit den Adenoviruskapsiden der Erfindung versehen werden.

[0051] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung einen Genüberträger bereit, der mit wenigstens einem Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen versehen ist. In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen Genüberträger bereit, der von einem Gewebetropismus für wenigstens Leberzellen befreit ist. Vorzugsweise ist der Genüberträger mit einem Gewebetropismus für wenigstens Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen versehen und von einem Gewebetropismus für wenigstens Leberzellen befreit. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Genüberträger mit einem Gewebetropismus für wenigstens Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen versehen und von einem Gewebetropismus für wenigstens Leberzellen befreit, wobei ein Faserprotein verwendet wird, das von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist. In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung umfasst der Genüberträger ein Viruskapsid. Vorzugsweise umfasst das Viruskapsid ein Viruskapsid, das ganz oder zum Teil von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist, oder es umfasst Proteine oder Teile davon von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Viruskapsid Proteine oder Fragmente davon von wenigstens zwei verschiedenen Viren, vorzugsweise Adenoviren. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung ist wenigstens eines der Viren ein Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16.

[0052] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Genüberträger ein Adenovirus-Faserprotein oder Fragmente davon. Das Faserprotein ist vorzugsweise von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet. Der Genüberträger kann weiterhin andere Faserproteine oder Fragmente davon von anderen Adenoviren umfassen. Der Genüberträger kann auch andere Adenovirusproteine umfassen oder auch nicht. Nucleinsäure kann direkt mit Faserproteinen oder Fragmenten davon verknüpft sein, aber sie kann auch indirekt damit verknüpft sein. Beispiele für indirekte Verknüpfungen umfassen unter anderem die Verpackung von Nucleinsäure in Adenoviruskapsiden oder die Verpackung von Nucleinsäure in Liposomen, wobei ein Faserprotein oder ein Fragment davon in ein Adenoviruskapsid eingebaut oder mit einem Liposom verknüpft ist. Die direkte Verknüpfung von Nucleinsäure mit einem Faserprotein oder einem Fragment davon kann durchgeführt werden, wenn das Faserprotein oder ein Fragment davon kein Bestandteil eines Komplexes ist oder wenn das Faserprotein oder ein Fragment davon Bestandteil eines Komplexes, wie eines Adenoviruskapsids, ist.

[0053] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Genüberträger bereitgestellt, der ein Adenovirus-Faserprotein umfasst, wobei das Faserprotein ein gewebebestimmendes Fragment eines Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, umfasst. Adenovirus-Faserprotein umfasst drei funktionelle Domänen. Eine Domäne, die Basis, ist für die Verankerung der Faser an einer Pentonbasis des Adenoviruskapsids verantwortlich. Eine andere Domäne, der Knob, ist für die Rezeptorerkennung verantwortlich, während die Schaft-

domäne als Spacer fungiert, der die Basis vom Knob trennt. Die verschiedenen Domänen können auch eine andere Funktion haben. Zum Beispiel ist der Schaft vermutlich auch an der Zielzell-Spezifität beteiligt. Jede der oben genannten Domänen kann verwendet werden, um ein Fragment einer Faser zu definieren. Fragmente können jedoch auch auf andere Weise identifiziert werden. Zum Beispiel besteht die Knob-Domäne aus einem rezeptorbindenden Fragment und einem schaftbindenden Fragment. Die Basisdomäne umfasst ein Pentonbasis-bindendes Fragment und ein schaftbindendes Fragment. Außerdem umfasst der Schaft wiederholte Abschnitte von Aminosäuren. Jeder dieser wiederholten Abschnitte kann ein Fragment sein.

[0054] Ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins kann ein einzelnes Fragment eines Faserproteins oder eine Kombination von Fragmenten wenigstens eines Faserproteins sein, wobei das gewebetropismusbestimmende Fragment, entweder allein oder in Kombination mit einem Viruskapsid, die Effizienz bestimmt, mit der ein Genüberträger eine gegebene Zelle oder einen gegebenen Zelltyp transduzieren kann, vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise in einer positiven Weise. "Gewebetropismus für Leberzellen" bedeutet ein Gewebetropismus für Zellen, die in der Leber vorkommen, vorzugsweise Leberparenchymzellen.

[0055] Ein Gewebetropismus für ein bestimmtes Gewebe kann erhalten werden, indem man die Effizienz erhöht, mit der Zellen dieses Gewebes transduziert werden, und alternativ dazu kann ein Gewebetropismus für ein bestimmtes Gewebe auch erhalten werden, indem man die Effizienz senkt, mit der andere Zellen als die Zellen dieses Gewebes transduziert werden.

[0056] Faserproteine besitzen gewebetropismusbestimmende Eigenschaften. Das am besten beschriebene Fragment des Faserproteins, das am Gewebetropismus beteiligt ist, ist die Knob-Domäne. Die Schaftdomäne des Faserproteins besitzt jedoch ebenfalls gewebetropismusbestimmende Eigenschaften. Es werden jedoch nicht alle gewebetropismusbestimmenden Eigenschaften eines Adenoviruskapsids in ein Faserprotein eingebaut.

[0057] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Faserprotein, das von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist, mit den Nichtfaser-Kapsidproteinen von einem Adenovirus der Untergruppe C, vorzugsweise Adenovirus 5, kombiniert.

[0058] In einem Aspekt der Erfindung wird ein Genüberträger bereitgestellt, der eine von einem Adenovirus abgeleitete Nucleinsäure umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst die Adenovirus-Nucleinsäure wenigstens eine Nucleinsäuresequenz, die ein Faserprotein codiert, das wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins eines Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, umfasst. In einem bevorzugten Aspekt umfasst das Adenovirus Nucleinsäure von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren. In einem bevorzugten Aspekt umfasst das Adenovirus Nucleinsäure von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren, wobei wenigstens eine Nucleinsäuresequenz, die ein Faserprotein codiert, wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins eines Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, umfasst.

[0059] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Adenovirus-Nucleinsäure so modifiziert, dass die Fähigkeit der Adenovirus-Nucleinsäure zur Replikation in einer Zielzelle reduziert oder lahmgelegt ist. Dies kann durch eine Inaktivierung oder Deletion von Genen, die Proteine des frühen Bereichs 1 codieren, erreicht werden.

[0060] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Adenovirus-Nucleinsäure so modifiziert, dass die Fähigkeit eines Wirtssystems zur Ausbildung einer Immunantwort gegen Adenovirusproteine, die von der Adenovirus-Nucleinsäure codiert werden, reduziert oder lahmgelegt ist. Dies kann durch eine Deletion von Genen, die Proteine des frühen Bereichs 2 und/oder des frühen Bereichs 4 codieren, erreicht werden. Alternativ dazu können Gene, die Proteine des frühen Bereichs 3 codieren, deletiert sein, oder in Anbetracht der Anti-Immunsystem-Funktion einiger der Proteine, die von den Genen im frühen Bereich 3 codiert werden, kann die Expression von Proteinen des frühen Bereichs 3 für einige Zwecke im Gegenteil auch verstärkt sein. Außerdem kann die Adenovirus-Nucleinsäure auch durch eine Kombination von zwei oder mehr der oben genannten spezifischen Veränderungen der Adenovirus-Nucleinsäure verändert sein. Wenn essentielle Gene aus der Adenovirus-Nucleinsäure deletiert werden, ist klar, dass die Gene in der Zelle, die die Adenovirus-Nucleinsäure, den Adenovirus-Vektor, den Überträger oder das chimärische Kapsid erzeugen soll, ergänzt werden müssen. Die Adenovirus-Nucleinsäure kann auch so modifiziert sein, dass die Fähigkeit eines Wirtssystems zur Ausbildung einer Immunantwort gegen Adenovirusproteine, die von der Adenovirus-Nucleinsäure codiert werden, auf andere Weise, als es oben erwähnt ist, reduziert oder lahmgelegt ist, zum Beispiel

durch Austauschen von Kapsidproteinen oder Fragmenten davon durch Kapsidproteine oder Fragmente davon von anderen Serotypen, für die Menschen keine oder nur geringe Mengen von neutralisierenden Antikörpern haben. Ein weiteres Beispiel dafür ist der Austausch von Genen, die Kapsidproteine codieren, durch die gene, die Kapsidproteine von anderen Serotypen codieren. Außerdem können auch Kapsidproteine oder Fragmente davon gegen andere Kapsidproteine oder Fragmente davon ausgetauscht werden, gegen die Individuen keine Immunantwort ausbilden können oder nur in geringem Maße dazu befähigt sind.

[0061] Eine Adenovirus-Nucleinsäure kann weiterhin oder anstelle von einer oder mehreren der oben genannten Veränderungen verändert werden, indem man Gene, die späte Proteine des Adenovirus, wie unter anderem Hexon, Penton, Faser und/oder Protein IX, codieren, inaktiviert oder deletiert.

[0062] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind alle Gene, die Adenovirus-Proteine codieren, von der Adenovirus-Nucleinsäure deletiert, was diese Nucleinsäure zu einem minimalen Adenovirusvektor macht.

[0063] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Adenovirus-Nucleinsäure ein chimaïrischer Ad/AAV-Vektor, wobei wenigstens die Integrationsmittel eines adenoassoziierten Virus (AAV) in die Adenovirus-Nucleinsäure eingebaut sind.

[0064] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst ein erfindungsgemäßer Vektor oder eine erfindungsgemäße Nucleinsäure, die ein und dasselbe sein können oder auch nicht, weiterhin wenigstens ein Nicht-Adenovirus-Gen. Vorzugsweise ist wenigstens eines der Nicht-Adenovirus-Gene aus der Gruppe von Genen ausgewählt, die Folgendes codieren: ein Apolipoprotein, ein ceNOS, eine Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase, ein Interleukin-3, ein Interleukin-1 α , ein (Anti)-Angiogenese-Protein, wie Angiostatin, ein Antiproliferationsprotein, einen Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VGAF), einen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), einen Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF-1 α), ein PAI-1 oder ein Antimigrationsprotein für Zellen der glatten Muskulatur.

[0065] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Zelle für die Erzeugung eines Genüberträgers bereit, der wenigstens mit einem Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen versehen ist. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Zelle für die Erzeugung eines Genüberträgers bereit, der wenigstens von einem Gewebetropismus für Leberzellen befreit ist. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Zelle für die Erzeugung eines Genüberträgers bereit, der wenigstens mit einem Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen versehen ist und wenigstens von einem Gewebetropismus für Leberzellen befreit ist. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Zelle eine Adenovirus-Verpackungszelle, wobei eine Adenovirus-Nucleinsäure in einem Adenoviruskapsid verpackt ist. In einem Aspekt einer Adenovirus-Verpackungszelle der Erfindung werden alle Proteine, die für die Replikation und Verpackung einer Adenovirus-Nucleinsäure erforderlich sind, außer den Proteinen, die vom frühen Bereich 1 codiert werden, von Genen bereitgestellt, die in die Adenovirus-Nucleinsäure eingebaut sind. Die im frühen Bereich 1 codierten Proteine in diesem Aspekt der Erfindung können von Genen codiert werden, die in die genomische DNA der Zellen eingebaut sind. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der Zelle um PER.C6 (ECACC-Hinterlegungs-Nr. 96022940). Wenn Genprodukte, die für die Replikation und Verpackung einer Adenovirus-Nucleinsäure in ein Adenoviruskapsid erforderlich sind, nicht von einer Adenovirus-Nucleinsäure bereitgestellt werden, werden sie im Allgemeinen von der Verpackungszelle bereitgestellt, entweder durch transiente Transfektion oder durch stabile Transformation der Verpackungszelle. Ein Genprodukt, das von der Verpackungszelle bereitgestellt wird, kann jedoch auch von einem Gen bereitgestellt werden, das auf der Adenovirus-Nucleinsäure vorhanden ist. Zum Beispiel kann ein Faserprotein von der Verpackungszelle, zum Beispiel durch transiente Transfektion, bereitgestellt und von der Adenovirus-Nucleinsäure codiert werden. Dieses Merkmal kann unter anderem verwendet werden, um Adenoviruskapside zu erzeugen, die Faserproteine von zwei verschiedenen Viren umfassen.

[0066] Die Genüberträger der Erfindung sind für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Erkrankungen, die durch die Abgabe von Nucleinsäure an Endothelzellen oder Zellen der glatten Muskulatur behandelt werden können, geeignet. Ein nichteinschränkendes Beispiel für letztere ist zum Beispiel Krebs, wobei die übertragene Nucleinsäure ein Gen umfasst, das ein Anti-Angiogenese-Protein codiert.

[0067] Die Genüberträger der Erfindung können als Pharmakon für die Behandlung dieser Krankheiten verwendet werden. Alternativ dazu können die Genüberträger der Erfindung auch für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung dieser Krankheiten verwendet werden.

[0068] In einem Aspekt stellt die Erfindung ein Adenoviruskapsid bereit, das einen Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen aufweist oder damit versehen ist, wobei das Kapsid vorzugsweise Proteine von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren umfasst und wobei wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Adenoviruskapsid bereit, das von einem Gewebetropismus für Leberzellen befreit ist, wobei das Kapsid vorzugsweise Proteine von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren umfasst und wobei wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins von einem Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist.

[0069] In einer Ausführungsform umfasst die Erfindung die Verwendung eines Adenoviruskapsids zur Abgabe von Nucleinsäure an Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Erfindung die Verwendung eines Adenoviruskapsids zur Verhinderung der Abgabe von Nucleinsäure an Leberzellen.

[0070] Die Adenoviruskapside der Erfindung können für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Erkrankungen, die durch die Abgabe von Nucleinsäure an Endothelzellen oder Zellen der glatten Muskulatur behandelt werden können, verwendet werden. Ein Beispiel für letztere ist zum Beispiel Krebs, wobei die übertragene Nucleinsäure ein Gen umfasst, das ein Anti-Angiogenese-Protein codiert.

[0071] Die Adenoviruskapside der Erfindung können als Pharmakon für die Behandlung dieser Krankheiten verwendet werden. Alternativ dazu können die Adenoviruskapside der Erfindung auch für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung dieser Krankheiten verwendet werden.

[0072] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Konstrukt pBr/Ad.BamRΔFib bereitgestellt, das die Adenovirus-S-Sequenzen 21562–31094 und 32794–35938 umfasst.

[0073] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Konstrukt pBr/AdBamRfib16 bereitgestellt, das die Adenovirus-S-Sequenzen 21562–31094 und 32794–35938 umfasst und weiterhin ein Faserprotein codierendes Adenovirus-16-Gen umfasst.

[0074] In noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Konstrukt pBr/AdBamR.pac/fib16 bereitgestellt, das die Adenovirus-5-Sequenzen 21562–31094 und 32794–35938 umfasst und weiterhin ein Faserprotein codierendes Adenovirus-16-Gen umfasst und weiterhin eine einzige PacI-Stelle in der Nähe der rechten terminalen Wiederholungssequenz im Nicht-Adenovirus-Sequenzgerüst des Konstrukts umfasst.

[0075] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Konstrukt pWE/Ad.AfIIIrlTRfib16 bereitgestellt, das die Ad5-Sequenzen 3534–31094 und 32794–35938 umfasst und weiterhin ein Faserprotein codierendes Adenovirus-16-Gen umfasst.

[0076] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Konstrukt pWE/Ad.AfIIIrlTRDE2Afib16 bereitgestellt, das die Ad5-Sequenzen 3534–22443 und 24033–31094 und 32794–35938 umfasst und weiterhin ein Faserprotein codierendes Adenovirus-16-Gen umfasst.

[0077] Bei der Nummerierung der oben genannten Sequenzen ist die Zahl "until" und nicht "until plus" angegeben.

[0078] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Konstrukte für die Erzeugung eines Genüberträgers oder eines Adenoviruskapsids mit einem Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen verwendet.

[0079] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Bibliothek von Adenovirus-Vektoren oder Genüberträgern bereit, welche ein und dasselbe sein können oder auch nicht und die eine große Auswahl an Nicht-Adenovirus-Nucleinsäuren umfassen. In einem anderen Aspekt der Erfindung werden Adenovirus-Gene, die Kap-sidproteine codieren, verwendet, um eine Bibliothek von Adenoviruskapsiden zu erzeugen, die aus Proteinen besteht, die von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren abgeleitet sind, wobei die Adenoviren vorzugsweise von zwei verschiedenen Serotypen abgeleitet sind, wobei vorzugsweise einer der Serotypen ein Adenovirus der Untergruppe B ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Bibliothek von Adenoviruskapsiden erzeugt, die aus Proteinen von wenigstens zwei verschiedenen Adenoviren besteht, wobei wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Faserproteinfragment von einem Adenovirus der

Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus 16, abgeleitet ist.

[0080] Ein Faserprotein von Adenovirus 16 umfasst vorzugsweise die in **Fig. 9** angegebene Sequenz. Innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung können jedoch durch Ausnutzung der Degeneriertheit des Codes auch analoge Sequenzen erhalten werden. Alternativ dazu können auch Aminosäuresubstitutionen oder -insertionen oder -deletionen durchgeführt werden, solange die gewebetropismusbestimmende Eigenschaft nicht erheblich geändert ist. Solche Aminosäuresubstitutionen können innerhalb derselben Polaritätsgruppe oder außerhalb erfolgen.

[0081] Im Folgenden wird die Erfindung durch mehrere nichteinschränkende Beispiele veranschaulicht.

Beispiele

Beispiel 1: Erzeugung von Viren auf der Basis von Adenovirus Serotyp 5 mit chimärischen Faserproteinen

Erzeugung von Adenovirus-Matrizenklonen denen für Faser codierende DNA fehlt

[0082] Die fasercodierende Sequenz von Adenovirus Serotyp 5 befindet sich zwischen den Nucleotiden 31042 und 32787. Um die fasercodierende Adenovirus-Serotyp-5-DNA zu entfernen, begannen wir mit dem Konstrukt pBr/Ad.Bam-rlTR (**Fig. 1**; ECACC-Hinterlegung P97082122). Aus diesem Konstrukt wurde zuerst eine Ndel-Stelle entfernt. Zu diesem Zweck wurde pBr322-Plasmid-DNA mit Ndel aufgespalten, und danach wurden die klebrigen Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Dieses pBr322-Plasmid wurde dann religiert, mit Ndel aufgespalten und in E.-coli-DH5 α transformiert. Das erhaltene pBr/ Δ Ndel-Plasmid wurde mit Scal und Sall aufgespalten, und das resultierende 3198-bp-Vektorfragment wurde mit dem von pBr/Ad.BamrlTR abgeleiteten 15349-bp-Scal-Sall-Fragment ligiert, was ein Plasmid pBr/Ad.Bam-rlTR Δ Ndel ergab, das somit eine einzigartige Ndel-Stelle enthielt. Dann wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden "NY-up" und "NY-down" (**Fig. 2**) durchgeführt. Während der Amplifikation wurden sowohl eine Ndel- als auch eine Nsil-Restriktionsstelle eingeführt, um die Klonierung der amplifizierten Faser-DNAs zu erleichtern. Die Amplifikation bestand aus 25 Cycles von jeweils 45 s bei 94°C, 1 min bei 60°C und 45 s bei 72°C. Die PCR-Reaktion enthielt 25 pmol der Oligonukleotide NY-up oder NY-down, 2 mM dNTP, PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 1 Einheit der hitzestabilen Polymerase Elongase (Gibco, Niederlande). Ein Zehntel des PCR-Produkts wurde auf einem Agarose-Gel laufen gelassen, was bewies, dass das erwartete DNA-Fragment von \pm 2200 bp amplifiziert worden war. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend unter Verwendung des Geneclean-Kit-Systems (Bio101 Inc.) gereinigt. Dann wurden sowohl das Konstrukt pBr/Ad.Bam-rlTR Δ Ndel als auch das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen Ndel und Sbfl aufgespalten. Das PCR-Fragment wurde anschließend mit Hilfe des T4-Ligase-Enzyms in die Ndel- und Sbfl-Stelle einkloniert, so dass pBr/Ad.BamR Δ Fib entstand (**Fig. 3**).

Amplifikation von Fasersequenzen von Adenovirus-Serotypen

[0083] Um eine Amplifikation der DNAs zu ermöglichen, die Faserprotein codieren, das von alternativen Serotypen abgeleitet ist, wurden degenerierte Oligonukleotide synthetisiert. Zu diesem Zweck wurden zuerst bekannte DNA-Sequenzen, die für ein Faserprotein von alternativen Serotypen codierten, aneinander ausgerichtet, um konservierte Bereiche sowohl im Schwanzbereich als auch im Knob-Bereich des Faserproteins zu identifizieren. Aus der Ausrichtung, die die Nucleotidsequenz von 19 verschiedenen Serotypen enthielt, die alle 16 Untergruppen darstellten, wurden (degenerierte) Oligonukleotide synthetisiert (siehe Tabelle I). Ebenso in Tabelle 3 gezeigt ist die Kombination von Oligonukleotiden, die verwendet wird, um die DNA, welche Faserprotein eines speziellen Serotyps codiert, zu amplifizieren. Die Amplifikationsreaktion (50 μ l) enthielt 2 mM dNTPs, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, Standard-1x-PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂ und 1 Einheit der hitzestabilen Polymerase Pwo (Boehringer Mannheim) pro Reaktion. Das Cyclerprogramm enthielt 20 Cycles, die jeweils aus 30 s bei 94°C, 60 s bei 60–64°C und 120 s bei 72°C bestanden. Ein Zehntel des PCR-Produkts wurde auf einem Agarose-Gel laufen gelassen, um nachzuweisen, dass ein DNA-Fragment amplifiziert worden war. Von den verschiedenen Matrizen wurden jeweils zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt.

Erzeugung von chimärischen adenoviralen DNA-Konstrukten

[0084] Alle amplifizierten Faser-DNAs sowie der Vektor (pBr/Ad.BamR Δ Fib) wurden mit Ndel und Nsil aufgespalten. Die aufgespaltenen DNAs wurden anschließend auf einem Agarose-Gel laufen gelassen, und danach wurden die Fragmente aus dem Gel isoliert und mit Hilfe des Geneclean-Kits (Bio101 Inc.) gereinigt. Die PCR-Fragmente wurden dann in die Ndel- und Nsil-Stelle von pBr/AdBamR Δ Fib einkloniert, so dass pBr/Ad.BamRFibXX entstand (wobei XX die Nummer des Serotyps ist, von dem die Faser-DNA isoliert wurde). Die

durch PCR erzeugten Einschübe wurden sequenziert, um eine korrekte Amplifikation zu bestätigen. Die erhaltenen Sequenzen der verschiedenen Faser-Gene sind in **Fig. 4** gezeigt.

Erzeugung von rekombinantem Adenovirus das chimärisch in Bezug auf das Faserprotein ist

[0085] Um eine effiziente Erzeugung von chimärischen Viren zu ermöglichen, wurde ein AvrII-Fragment von den Konstrukten pBr/AdBamRFib16, pBr/AdBamRFib28 und pBr/AdBamRFib40-L in den Vektor pBr/Ad.Bam-rITR.pac#8 (ECACC-Hinterlegungs-Nr. P97082121) subkloniert, wobei die entsprechenden Sequenzen in diesem Vektor ersetzt wurden. pBr/Ad.Bam-rITR.pac#8 hat denselben adenoviralen Einschub wie pBr/Ad.Bam-rITR, weist jedoch eine Pacl-Stelle in der Nähe des rITR auf, so dass die ITR von den Vektorsequenzen getrennt werden können. Das Konstrukt pWE/Ad.AfIII-Eco wurde wie folgt erzeugt. PWE.pac wurde mit Clal aufgespalten, und die klebrigen 5'-Enden wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Die DNA wurde dann mit Pacl aufgespalten und aus Agarose-Gel isoliert. pWE/AfIIIrITR wurde mit EcoRI aufgespalten und nach der Behandlung mit Klenow-Enzym mit Pacl aufgespalten. Das große Fragment von 24 kb, das die adenoviralen Sequenzen enthielt, wurde aus Agarose-Gel isoliert und an den mit Clal aufgespaltenen und mit einem glatten Ende versehenen pWE.Pac-Vektor ligiert. Dabei wurde der Ligation ExpressTM von Clontech verwendet. Nach der Transformation von XL10-Gold-Zellen von Stratagene wurden Klone identifiziert, die das erwartete Konstrukt enthielten. PWE/Ad.AfIII-Eco enthält Ad5-Sequenzen ab den Basenpaaren 3534–27336. Drei Konstrukte, mit Sall aufgespaltenes pClipsal-Luc (**Fig. 5**), mit Pacl und EcoRI aufgespaltenes pWE/Ad.AfIII-Eco und mit BamHI und Pacl aufgespaltenes pBr/AdBamR.pac/fibXX wurden in Adenovirus erzeugende Zellen (PER.C6, Fallaux et al., 1998) transfiziert. **Fig. 6** zeigt schematisch das Verfahren und die Fragmente, die zur Erzeugung der chimärischen Viren verwendet wurden. Nur pBr/Ad.BamRfib12 wurde ohne Subklonierung in den Pacl enthaltenden Vektor verwendet, und wurde daher bei Verwendung von Pacl nicht aus den Vektorsequenzen freigesetzt, sondern mit Clal aufgespalten, das ungefähr 160 bp Vektorsequenzen zurücklässt, die an die rechten ITR gebunden sind. Weiterhin enthalten pBr/Ad.BamRfib12 und pBr/Ad.BamRfib28 eine interne BamHI-Stelle in den Fasersequenzen und wurden daher mit Sall aufgespalten, das in die Vektorsequenzen schneidet, die die BamHI-Stelle flankieren. Für eine Transfektion wurden 2 µg pCLIPsal-Luc und 4 µg von sowohl pWE/Ad.AfIII-Eco als auch pBr/AdBamR.pac/fibXX in serumfreiem DMEM auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Zu dieser DNA-Suspension wurden 100 µl 2,5 × verdünntes Lipofectamin (Gibco) in serumfreiem Medium gegeben. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA-Lipofectamin-Komplexlösung zu 2,5 ml serumfreiem DMEM gegeben, das anschließend in einen T25-cm²-Gewebekulturkolben gegeben wurde. Dieser Kolben enthielt PER.C6-Zellen, die 24 Stunden vor der Transfektion in einer Dichte von 1 × 10⁶ Zellen/Kolben ausgesät wurden. Zwei Stunden später wurde das DNA-Lipofectamin-Komplex enthaltende Medium einmal durch die Zugabe von 2,5 ml DMEM verdünnt, das mit 20% fetalem Kälberserum ergänzt war. Wieder 24 Stunden später wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt, das mit 10% fetalem Kälberserum ergänzt war. Die Zellen wurden 6–8 Tage lang kultiviert, anschließend geerntet und dreimal eingefroren/aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden durch 5 Minuten Zentrifugation mit 3000 U/min bei Raumtemperatur entfernt. Vom Überstand (12,5 ml) wurden 3–5 ml verwendet, um erneut PER.C6-Zellen zu infizieren (T80-cm²-Gewebekulturkolben). Diese Reinfektion führt nach 5–6 Tagen zum vollen cytopathogenen Effekt (CPE), und danach wird das Adenovirus geerntet, wie es oben beschrieben ist.

Herstellung von faserchimärischem Adenovirus

[0086] 10 ml des oben beschriebenen rohen Lysats wurden verwendet, um einen 1-Liter-Fermenter zu beimpfen, der 1 bis 1,5 × 10⁶ PER.C6-Zellen/ml enthielt, die in Suspension wuchsen. Drei Tage nach der Beimpfung wurden die Zellen geerntet und durch 10 min Zentrifugieren mit 1750 U/min bei Raumtemperatur sedimentiert. Das in den sedimentierten chimärischen Zellen vorhandene chimärische Adenovirus wurde anschließend extrahiert und unter Verwendung der folgenden Vorschrift zur nachgeschalteten Verarbeitung gereinigt. Das Sediment wurde in 50 ml 10 mM NaPO₄⁻ gelöst und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei 37°C wurden 5,6 ml Desoxycholat (5% w/v) hinzugefügt, und danach wurde die Lösung homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert, um die Zellen vollständig aufzuschließen. Nach dem Homogenisieren der Lösung wurden 1875 µl 1 M MgCl₂⁻ und 5 ml 100% Glycerin hinzugefügt. Nach der Zugabe von 375 µl DNase (10 mg/ml) wurde die Lösung 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Zelltrümmer wurden durch 30 Minuten Zentrifugation mit 1880 × g bei Raumtemperatur mit abgeschalteter Bremse entfernt. Der Überstand wurde anschließend durch Aufgeben auf 10 ml Freon von Proteinen gereinigt. Nach 15 Minuten Zentrifugation mit 2000 U/min ohne Bremse bei Raumtemperatur sind drei Banden sichtbar, von denen die obere Bande das Adenovirus darstellt. Diese Bande wurde durch Pipettieren isoliert, und danach wurde sie auf einen mit Tris/HCl (1 M) gepufferten Cäsiumchlorid-Blockgradienten (Bereich: 1,2 bis 1,4 g/ml) aufgegeben. Nach 2,5 Stunden Zentrifugation mit 21000 U/min bei 10°C wurde das Virus von restlichem Protein und Zelltrümmern gereinigt, da das Virus im Gegensatz zu den anderen Komponenten nicht in die 1,4 g/ml Cäsiumchloridlösung

wandert. Die Virusbande wird isoliert, und danach wird eine zweite Reinigung durchgeführt, wobei man einen mit Tris/HCl (1 M) gepufferten kontinuierlichen Gradienten von 1,33 g/ml Cäsiumchlorid verwendet. Nach dem Aufgeben des Virus auf diesen Gradienten wird das Virus 17 Stunden lang mit 55000 U/min bei 10°C zentrifugiert. Anschließend wird die Virusbande isoliert, und nach der Zugabe von 30 µl Saccharose (50% w/v) wird überschüssiges Cäsiumchlorid durch drei Dialyserunden entfernt, wobei jede Runde 1 Stunde dauert. Für die Dialyse wird das Virus auf Dialysecassetten (Slide-a-lyzer, Schwelle 10000 kDa, Pierce, USA) übertragen. Die für die Dialyse verwendeten Puffer sind PBS-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung), die mit einer zunehmenden Konzentration von Saccharose ergänzt sind (Runde 1 bis 3: 30 ml, 60 ml und 150 ml Saccharose (50% w/v)/1,5 Liter PBS, alle ergänzt mit 7,5 ml 2% (w/v) CaMgCl₂). Nach der Dialyse wird das Virus aus dem Slide-a-lyzer entnommen, und danach wird es in Portionen von 25 und 100 µl aliquotiert, woraufhin das Virus bei -85°C gelagert wird. Um die Zahl der Viruspartikel pro ml zu bestimmen, werden 50 µl der Viruscharge auf einem Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen (HPLC) laufen gelassen, wie es von Shamram et al. (1997) beschrieben wird. Es zeigte sich, dass die Virustiter in demselben Bereich lagen wie bei der Ad5.Luc-Viruscharge (Ad5.Luc: $2,2 \times 10^{11}$ VP/ml; Ad5.LucFib12: $1,3 \times 10^{11}$ VP/ml; Ad5.LucFib16: $3,1 \times 10^{12}$ VP/ml; Ad5.LucFib28: $5,4 \times 10^{10}$ VP/ml; Ad5.LucFib40-L: $1,6 \times 10^{12}$ VP/ml).

Beispiel 2: Biologische Verteilung von chimärischen Viren nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene von Ratten

[0087] Um die biologische Verteilung der chimärischen Adenoviren zu untersuchen, die Faser 12, 16, 28 oder 40-2 trugen, wurden jeweils 1×10^{10} Partikel der erzeugten Viruschargen in 1 ml PBS verdünnt, und danach wurde das Virus in die Schwanzvene von erwachsenen männlichen Wag/Rij-Ratten injiziert (3 Ratten/Virus). Als Kontrolle wurde Ad5 verwendet, das das Luciferase-Transgen trug. 48 Stunden nach der Verabreichung des Virus wurden die Ratten getötet, und danach wurden die Leber, Milz, Lunge, Niere, das Herz und Gehirn herausgeschnitten. Diese Organe wurden anschließend mit 1 ml Lysepuffer (1% Triton X-100/PBS) gemischt und 30 Sekunden lang püriert, um ein Proteinlysat zu erhalten. Das Proteinlysat wurde anschließend auf die Anwesenheit von Transgen-Expression (Luciferase-Aktivität) getestet, und die Proteinkonzentration wurde bestimmt, um die Luciferase-Aktivität pro µg Protein zu exprimieren. Die in Tabelle II gezeigten Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zur Adenovirus-Serotyp-S-Kontrolle keine der Faserchimären spezifisch zur Leber oder zur Milz gesteuert wird. Dieses Experiment zeigt, dass es möglich ist, die Aufnahme von Adenoviren durch die Leber zu umgehen, indem man Fasern anderer Serotypen verwendet. Es zeigt auch, dass die Aufnahme durch die Leber nicht mit der Länge des Faserschaftes korreliert bzw. ausschließlich durch die Fähigkeit des Faser-Knob zur Bindung an CAR bestimmt wird. Die verwendeten Fasern haben unterschiedliche Schaftlängen, und mit Ausnahme von Faser 16 sind sie von Untergruppen abgeleitet, die bekanntermaßen eine Faser haben, die CAR binden kann (Roelvink et al., 1998).

Beispiel 3: Chimärische Viren weisen Unterschiede in der Transduktion von Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur auf

A) Infektion von humanen Endothelzellen

[0088] Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden isoliert, kultiviert und charakterisiert, wie es schon früher beschrieben wurde (Jaffe et al. 1973; Wijnberg et al., 1997). Kurz gesagt, die Zellen wurden bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 Vol.-% CO₂/95 Vol.-% Luft auf gelatinebeschichteten Schalen in M199 kultiviert, das mit 20 mM HEPES, pH 7,3 (Flow Labs., Irvine, Schottland), 10 Vol.-% Humanserum (nächstgelegene Blutbank), 10 Vol.-% hitzeinaktiviertes Serum neugeborener Kälber (NBCS) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 150 µg/ml roher Endothelzellen-Wachstumsfaktor, 5 E/ml Heparin (Leo Pharmaceuticals Products, Weesp, Niederlande), Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) ergänzt war. Die für die Experimente verwendeten Zellen befanden sich zwischen Passage 1–3. In einer ersten Gruppe von Experimenten wurden in jeden Napf von 24-Napf-Platten 40000 HUVEC-Zellen (ein Pool von 4 verschiedenen Individuen) in einem Gesamtvolume von 200 µl ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und danach wurden 200 µl DMEM, das mit 2% FCS ergänzt war, zu den Zellen gegeben. Dieses Medium enthielt verschiedene Mengen an Virus (multiplicity of infection MOI = 50, 250, 1000, 2500, 5000 und 10000). Die verwendeten Viren waren neben der Kontrolle Ad5 die Faserchimären 12, 16, 28 und 40-L (jede Infektion in dreifacher Ausführung). Zwei Stunden nach der Zugabe des Virus wurde das Medium durch normales Medium ersetzt. Wieder 48 Stunden später wurden die Zellen gewaschen und durch die Zugabe von 100 µl Lysepuffer lysiert. In [Fig. 7a](#) sind Ergebnisse für die Transgen-Expression pro Mikrogramm Gesamtprotein nach der Infektion von HUVEC-Zellen gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Faserchimären 12 und 28 nicht in der Lage sind, HUVEC-Zellen zu infizieren, dass 40-L HUVECs mit ähnlicher Effizienz infiziert wie die Kontrolle Ad5-Virus und dass die Faserchimäre 16 HUVECs erheblich besser infiziert.

In einer nächsten Gruppe von Experimenten ($n = 8$) wurde die Faser-16-Chimäre an HUVEC mit dem Ad5.Luc-Vektor in Bezug auf die Luciferase-Aktivität nach der Transduktion mit 2500 Viruspartikeln von jedem Virus pro Zelle verglichen. Diese Experimente zeigten, dass Faser 16 im Vergleich zu Ad5 im Durchschnitt eine 8,1fach erhöhte Luciferase-Aktivität ergab ($SD \pm 4,6$). In einem nächsten Experiment wurde eine gleiche Zahl von Viruspartikeln zu Näpfen von 24-Napf-Platten gegeben, die verschiedene HUVEC-Zellkonzentrationen enthielten. Dieses Experiment wurde durchgeführt, weil bekannt ist, dass HUVECs weniger effizient mit Adenovirus Serotyp 5 infiziert werden, wenn diese Zellen die Konfluenz erreichen. Zu diesem Zweck wurden HUVECs mit 22 500, 45000, 90000 und 135000 Zellen pro Napf von 24-Napf-Platten (in dreifachen Parallelansätzen) ausgesät. 24 Stunden später wurden diese Zellen gemäß der obigen Beschreibung mit Medium infiziert, das $4,5 \times 10^8$ Viruspartikel enthielt. Die verwendeten Viren waren neben der Kontrolle Adenovirus Serotyp 5 die Faser-16-Chimäre. Das 48 Stunden nach der Infektion bestimmte Ergebnis der Transgen-Expression (RLU) pro Mikrogramm Protein (siehe [Fig. 7b](#)) zeigt, dass das chimärische Faser-16-Adenovirus ebenfalls besser geeignet ist, HUVEC-Zellen zu infizieren, selbst wenn diese Zellen zu 100% konfluent sind, was eine bessere Nachbildung einer in-vivo-Situation ist. Da das Luciferase-Marken keine Informationen bezüglich der Anzahl der infizierten Zellen liefert, wurde ein anderes Experiment mit Adenovirus Serotyp 5 und der Faser-16-Chimäre durchgeführt, die beide ein Grünes Fluoreszent Protein (GFP) als Marken trugen. Diese Proteinexpression kann mit Hilfe eines Durchflusscytometers nachgewiesen werden, das Informationen über den Prozentsatz der transduzierten Zellen sowie die Fluoreszenz pro Zelle liefert. In diesem Experiment wurden Zellen in einer Konzentration von 40000 Zellen pro Napf ausgesät und 2 Stunden lang dem Virus ausgesetzt. Das verwendete Virus war Ad5.GFP ($8,4 \times 10^{11}$ VP/ml) und Ad5.Fib16.GFP ($5,1 \times 10^{11}$ VP/ml). Die Zellen wurden einer Viruskonzentration von 500 Viruspartikeln pro Zelle ausgesetzt. Eine durchflusscytometrische Analyse 48 Stunden nach der Virusbehandlung zeigte, dass das Faser-16-Virus höhere Transgen-Expressionsniveaus pro Zelle ergibt, da die mediane Fluoreszenz, ein Parameter, der die Menge der GFP-Expression pro Zelle identifiziert, bei Faser 16 höher ist als bei Ad5 ([Fig. 7c](#)). Diese Ergebnisse sind also konsistent und zeigen, dass das chimärische Faser-16-Virus besser als Ad5 geeignet ist, humane primäre Endothelzellen zu infizieren.

B) Infektion von humanen Zellen der glatten Muskulatur

[0089] Zellen der glatten Muskulatur wurden nach der Isolation von Endothelzellen isoliert (Weinberg et al., 1997). Die Venen wurden mit Medium (DMEM, ergänzt mit Penicillin/Streptomycin) inkubiert, das 0,075% (w/v) Collagenase (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA) enthielt. Nach 45 Minuten wurde das Inkubationsmedium, das abgelöste Zellen enthielt, aus den Venen gespült. Die Zellen wurden gewaschen und bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 Vol.-% CO_2 /95 Vol.-% Luft auf gelatinebeschichteten Schalen in Kulturmedium kultiviert, das mit 10% fetalem Kälberserum und 10% Humanserum ergänzt war. Die für die Experimente verwendeten Zellen befanden sich zwischen Passage 3–6. Zuerst testeten wir die Gruppe der faserchimären Viren gegenüber der Kontrolle Adenovirus Serotyp 5 in Bezug auf die Infektion von humanen Zellen der glatten Muskulatur. Zu diesem Zweck wurden 40000 humane Zellen der glatten Muskulatur aus Nabelschnurvenen (HUVsmc) in Näpfen von 24-Napf-Platten in einem Gesamtvolumen von 200 μl ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und danach wurden 200 μl DMEM, das mit 2% FCS ergänzt war, zu den Zellen gegeben. Dieses Medium enthielt verschiedene Mengen an Virus (MOI = 50, 250, 1250, 2500 und 5000). Die verwendeten Viren waren neben der Kontrolle Ad5 die Faserchimären 12, 16, 28 und 40-L (jede Infektion in dreifacher Ausführung). Zwei Stunden nach der Zugabe des Virus wurde das Medium durch normales Medium ersetzt. Wieder 48 Stunden später wurden die Zellen gewaschen und durch die Zugabe von 100 μl Lysepuffer lysiert. In [Fig. 8a](#) sind Ergebnisse für die Transgen-Expression pro Mikrogramm Gesamtprotein nach der Infektion von HUVsmc-Zellen gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Faserchimären 12 und 28 nicht in der Lage sind, HUVsmc-Zellen zu infizieren, dass 40-L HUVsmc mit ähnlicher Effizienz infiziert wie die Kontrolle Ad5-Virus und dass die Faserchimäre 16 HUVsmc erheblich besser infiziert. In einer nächsten Gruppe von Experimenten wurden von der Rosenvene (Vena saphena), der Darmbeinarterie, der linken Arteria mammaria interna (LIMA) und der Aorta abgeleitete Zellen der glatten Muskulatur auf Infektion mit der Faser-16-Chimäre und Ad5 (die beide Luciferase als Marken tragen) getestet. Diese Experimente ($n = 11$) zeigten, dass die Faser-16-Chimäre im Durchschnitt 61,4fach erhöhte Werte der Luciferase-Aktivität ($SD \pm 54,8$) im Vergleich zu Ad5 ergab. Die hohe Standardabweichung (SD) wird aufgrund des Ergebnisses erhalten, dass die verwendeten Adenoviren in Bezug auf ihre Effizienz bei der Infektion von SMC, die von verschiedenen humanen Gefäßen abgeleitet sind, variieren. Im nächsten Experiment wurde eine gleiche Zahl von Viruspartikeln zu Näpfen von 24-Napf-Platten gegeben, die verschiedene HUVsmc-Zellkonzentrationen in Konfluenz enthielten. Zu diesem Zweck wurden HUVsmc in Mengen von 10000, 20000, 40000, 60000 und 80000 Zellen pro Napf von 24-Napf-Platten (in dreifachen Parallelansätzen) ausgesät. 24 Stunden später wurden diese Zellen gemäß der obigen Beschreibung mit Medium infiziert, das 2×10^8 Viruspartikel enthielt. Die verwendeten Viren waren neben der Kontrolle Adenovirus Serotyp 5 die Faser-16-Chimäre. Das 48 Stun-

den nach der Infektion bestimmte Ergebnis der Transgen-Expression (RLU) pro Mikrogramm Protein (siehe [Fig. 8b](#)) zeigt, dass das chimärische Faser-16-Adenovirus besser geeignet ist, Zellen der glatten Muskulatur zu infizieren, selbst wenn diese Zellen zu 100% konfluent sind, was eine bessere Nachbildung einer in-vivo-Situation ist. Um die Zahl der mit der Faser-16-Chimäre und Ad5 transduzierten SMCs zu identifizieren, führten wir Transduktionsexperimente mit Ad5.GFP und Ad5Fib16.GFP durch (identische Chargen, wie sie auch für die EC-Infektionen verwendet wurden). Humane SMC aus der Nabelschnurvene wurden in einer Konzentration von 60000 Zellen pro Napf in 24-Napf-Platten ausgesät und 2 Stunden lang 500 oder 5000 Viruspartikeln der Art Ad5.GFP oder Ad5Fib16.GFP pro Zelle ausgesetzt. 48 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und unter Verwendung eines Durchflusscytometers analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Faser-16-Mutante eine ungefähr 10fach höhere Transduktion von SMC ergibt, da die nach der Transduktion mit 5000 Viruspartikeln von Ad5.GFP gemessene GFP-Expression gleich der GFP-Expression nach der Transduktion mit 500 Viruspartikeln der Faser-16-Chimäre pro Zelle ist ([Fig. 8c](#)).

C) Von Faser 16 verschiedene Fasermutanten aus der Untergruppe B

[0090] Der Schaft und Knob von Faser 16 sind von Adenovirus Serotyp 16 abgeleitet, der zur Untergruppe B gehört, wie oben beschrieben wurde. Auf der Grundlage von Hämaggglutinierungsassays, DNA-Restriktionsmustern und Neutralisationsassays wurden die Viren der Untergruppe B weiter in Untergruppe B1 und B2 unterteilt (Wadell et al., 1984). Vertreter der Untergruppe B1 umfassen die Serotypen 3, 7, 16, 21 und 51. Vertreter der Untergruppe B2 umfassen die Serotypen 11, 14, 34 und 35. Um zu testen, ob die erhöhte Infektion von Zellen der glatten Muskulatur für alle Fasern gilt, die aus der Untergruppe B stammen, oder spezifisch für ein oder mehrere Fasermoleküle aus der Untergruppe B ist, verglichen wir Faser 16 und Faser 51 (beide Untergruppe B1) mit Faser 11 und Faser 35 (beide Untergruppe B2). Zu diesem Zweck wurden HUVsmc mit steigenden Mengen von Viruspartikeln pro Zelle (156, 312, 625, 1250, 2500, 5000) infiziert. Die Fasermutanten tragen alle das Luciferase-Markergen (Ad5Fib11.Luc: $1,1 \times 10^{12}$ VP/ml; Ad5Fib35Luc: $1,4 \times 10^{12}$ VP/ml; Ad5Fib51Luc: $1,0 \times 10^{12}$ VP/ml). Auf der Grundlage der gemessenen und in [Fig. 8d](#) gezeigten Luciferase-Aktivität gilt die effiziente Infektion von SMC nicht allgemein für alle Fasermoleküle der Untergruppe B. Faser 16 und Faser 11 sind eindeutig besser für die Infektion von SMC geeignet als Faser 35 und Faser 51. Dennoch zeigen alle getesteten Fasermutanten aus Untergruppe B eine bessere SMC-Infektion als Ad5.

D) Organkulturexperimente

[0091] Als nächstes identifizierten wir, ob der beobachtete Unterschied in der Transduktion von EC und SMC unter Verwendung der Faser-16-Chimäre oder des Ad5 auch in Organkulturexperimenten nachgewiesen werden kann. Bisher haben wir uns auf die folgenden Gewebe beschränkt: 1) Humane Rosenvene: die Vene, die bei ungefähr 80% aller klinischen Venentransplantationsverfahren verwendet wird.

- 2) humanes Perikard/Epikard: für die Abgabe von rekombinanten Adenoviren in die Perikardflüssigkeit, die nach der Infektion der Perikard- oder Epikardzellen aus dem Transgen, das das Adenovirus trägt, das interessierende Protein produzieren.
- 3) humane Koronararterien: für die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) zur Verhinderung einer Restenose. Von den Koronararterien konzentrierten wir uns auf die linke absteigende Koronararterie (LAD) und die rechte Koronararterie (RCA).

[0092] Teile einer humanen Rosenvene, die nach einer Venentransplantationsoperation zurückblieben, wurden in Stücke von ungefähr 0,5 cm geschnitten. Diese Stücke ($n = 3$) wurden anschließend 2 Stunden lang in 200 ml mit 5×10^{10} Viruspartikeln pro ml kultiviert. Nach zwei Stunden Virusbehandlung wurden die Stücke mit PBS gewaschen und weitere 48 Stunden bei 37°C in einem Inkubator mit 10% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Stücke gewaschen, fixiert und für die LacZ-Transgen-Expression angefärbt. Die Viren waren Ad5.LacZ ($2,2 \times 10^{12}$ VP/ml), die Faser-16-Chimäre Ad5Fib16.LacZ ($5,2 \times 10^{11}$ VP/ml) und eine Faser-51-Chimäre: Ad5Fib51.LacZ ($2,1 \times 10^{12}$ VP/ml). Die Rosenvenenstücke wurden mit Hilfe einer Digitalkamera makroskopisch photographiert. Auf der Grundlage einer LacZ-Transgen-Expression, die nach 2 Stunden Viruseinwirkung auf Rosenvene-Schnittstücke erhalten wurde, ergeben sowohl das chimärische Faser-16- als auch Faser-51-Virus eine höhere Infektion, da bei Verwendung dieser Viren viel mehr blaue Färbung beobachtet wird als bei Ad5.LacZ ([Fig. 8e](#)). Identische Experimente, wie sie auch für die Rosenvene beschrieben wurden, wurden mit humanem Perikard und den humanen Koronararterien RCA und LAD durchgeführt. Ergebnisse dieser Experimente ([Fig. 8f](#), [Fig. 8g](#) bzw. [Fig. 8h](#)) zusammen mit den Experimenten, die an primären Zellen durchgeführt wurden, bestätigten die Überlegenheit der Faser-16- und -51-Mutanten gegenüber Ad5 bei der Infektion von humanen cardiovasculären Geweben.

E) CAR- und Integrinexpression bei humanen EC und SMC

[0093] Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird klar, dass das chimärische Adenovirus mit dem Schaf und Knob aus Faser 16 gut geeignet ist, um Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur zu infizieren. Durch Änderung des Faserproteins an Ad5-Viren waren wir also in der Lage, die Infektion von Zellen, die von Ad5 schlecht infiziert werden, zu erhöhen. Der Unterschied zwischen Ad5 und Ad5Fib16 ist zwar bei beiden Zelltypen signifikant, aber bei Endothelzellen weniger verblüffend als bei Zellen der glatten Muskulatur. Dies spiegelt möglicherweise Unterschiede in der Rezeptorexpression wider. Zum Beispiel exprimieren HUVsmc erheblich mehr $\alpha_v\beta_3$ -Integrine als HUVEC (siehe unten). Alternativ dazu kann dieser Unterschied auch auf Unterschiede in der Expression des Rezeptors von Faser 16 zurückzuführen sein. Ad5.LucFib16 infiziert Zellen der glatten Muskulatur aus der Nabelschnurvene ungefähr achtmal so gut wie Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, während im Falle von Ad5.Luc-Viren Endothelzellen besser infiziert werden als Zellen der glatten Muskulatur. Um zu testen, ob eine Ad5-Infektion mit der Rezeptorexpression dieser Zellen korreliert, wurde die Anwesenheit von CAR und α_v -Integrinen mit einem Durchfluscytometer bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 1×10^5 HUVEC-Zellen oder HUVsmc einmal mit PBS/0,5% BSA gewaschen, und danach wurden die Zellen durch 5 Minuten Zentrifugation mit 1750 U/min bei Raumtemperatur sedimentiert. Anschließend wurden 10 μ l eines 100fach verdünnten $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers (Mab 1961, Brunswick Chemie, Amsterdam, Niederlande), eines 100fach verdünnten $\alpha_v\beta_5$ -Antikörpers (Mab 1976, Brunswick Chemie, Amsterdam, Niederlande) oder eines 2000fach verdünnten CAR-Antikörpers, der großzügigerweise von Dr. Bergelson, Harvard Medical School, Boston, USA, gespendet wurde (Hsu et al.), zu dem Zellsediment gegeben, und danach wurden die Zellen in einer dunklen Umgebung 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS/0,5% BSA gewaschen und wiederum durch 5 Minuten Zentrifugation mit 1750 U/min bei Raumtemperatur sedimentiert. Um die Zellen zu markieren, wurden 10 ml Ratten-Anti-Maus-IgG1, die mit Phycoerythrin (PE) markiert waren, zu dem Zellsediment gegeben, und daraufhin wurden die Zellen wiederum 30 Minuten lang bei 4°C in einer dunklen Umgebung inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit PBS/0,5% BSA gewaschen und mit einem Durchfluscytometer analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle III gezeigt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass HUVsmc keine nachweisbaren Mengen an CAR exprimieren, was bestätigt, dass diese Zellen schwierig mit einem Adenovirus, das über den CAR-Rezeptor in die Zellen eintritt, zu transduzieren sind.

F) Infektion von humanen A549-Zellen

[0094] Als Kontrolle für die Experimente, die mit Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur durchgeführt wurden, wurden A549-Zellen infiziert, um festzustellen, ob eine gleiche Menge Viruspartikel der verschiedenen chimärischen Adenoviren signifikante Unterschiede in der Transgen-Expression bei Zelllinien zeigt, die von Adenovirus leicht infiziert werden. Dies dient dazu, zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede in der Infektionseffizienz bei Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur zelltypspezifisch sind. Zu diesem Zweck wurden 105 A549-Zellen in 24-Napf-Platten in einem Volumen von 200 μ l ausgesät. Zwei Stunden nach der Aussaat wurde das Medium durch Medium ersetzt, das unterschiedliche Mengen von Partikeln der Faserchimären 5, 12, 16 oder 40-L enthält (MOI = 0, 5, 10, 25, 100, 500). 24 Stunden nach der Zugabe des Virus wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, und danach wurden die Zellen durch die Zugabe von 100 μ l Lysepuffer (1% Triton X-100 in PBS) zu jedem Napf lysiert, und danach wurden die Transgen-Expression (Luciferase-Aktivität) und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität pro μ g Protein berechnet. Die in Tabelle IV gezeigten Daten zeigen, dass Ad5.Luc-Viren A549-Zellen am effizientesten infizieren, während die Infektionseffizienz von Ad5LucFib16 oder Ad5LucFib40-L ein paarmal geringer ist. Dies bedeutet, dass die effiziente Infektion von Endothelzellen und insbesondere Zellen der glatten Muskulatur auf Unterschiede in der Bindung des Virus an diese Zellen und nicht auf die Menge an Virus oder die Qualität der verwendeten Viren zurückzuführen ist.

Tabelle I

Serotyp	Schwanz-Oligonucleotid	Knob-Oligonucleotid
4	A	1
8	B	2
9	B	2
12	E	3
16	C	4
19p	B	2
28	B	2
32	B	2
36	B	2
37	B	2
40-1	D	5
40-2	D	6
41-s	D	5
41-1	D	7
49	B	2
50	B	2
51	C	8

A: 5' - CCC GTG TAT CCA TAT GAT GCA GAC AAC GAC CGA CC- 3'
 B: 5' - CCC GTC TAC CCA TAT GGC TAC GCG CGG- 3'
 C: 5' - CCK GTS TAC CCA TAT GAA GAT GAA AGC- 3'
 D: 5' - CCC GTC TAC CCA TAT GAC ACC TYC TCA ACT C- 3'
 E: 5' - CCC GTT TAC CCA TAT GAC CCA TTT GAC ACA TCA GAC- 3'
 1: 5' - CCG ATG CAT TTA TTG TTG GGC TAT ATA GGA - 3'.
 2: 5' - CCG ATG CAT TYA TTC TTG GGC RAT ATA GGA - 3'.
 3: 5' - CCG ATG CAT TTA TTC TTG GGR AAT GTA WGA AAA GGA - 3'.
 4: 5' - CCG ATG CAT TCA GTC ATC TTC TCT GAT ATA - 3'.
 5: 5' - CCG ATG CAT TTA TTG TTC AGT TAT GTA GCA - 3'.
 6: 5' - GCC ATG CAT TTA TTG TTC TGT TAC ATA AGA - 3'.
 7: 5' - CCG TTA ATT AAG CCC TTA TTG TTC TGT TAC ATA AGA A - 3'.
 8: 5' - CCG ATG CAT TCA GTC ATC YTC TWT AAT ATA - 3'.

Tabelle II

Organ	Kontrolle Ad5	Fib 12	Fib 16	Fib 28	Fib 40-L
Leber	740045	458	8844	419	2033
Milz	105432	931	3442	592	16107
Lunge	428	315	334	316	424
Niere	254	142	190	209	224
Herz	474	473	276	304	302
Hirn	291	318	294	323	257

Tabelle III

Zelllinie	$\alpha_v\beta 3$	$\alpha_v\beta 5$	CAR
HUVEC 70%	98.3%	18.9%	18.1%
HUVEC 100%	97.2%	10.5%	7.2%
HUVsmc 70%	95.5%	76.6%	0.3%
HUVsmc 100%	92.2%	66.5%	0.3%
PER.C6	7.8%	16.8%	99.6%

Tabelle IV

MOI (VP/Zelle)	Kontrolle Ad5	Faser 12	Faser 16	Faser 40-L
0	0	0	0	0
5	1025	46	661	443
10	1982	183	1704	843
25	4840	200	3274	2614
100	21875	1216	13432	11907
500	203834	3296	93163	71433

Literatur

- Arnberg N., Mei Y. and Wadell G., 1997. Fiber genes of adenoviruses with tropism for the eye and the genital tract. *Virology* 227: 239–244.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. and Finberg, R. W. (1997) Isolation of a common receptor for coxsackie B virus and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320–1323.
- Bout A. (1997) Gene therapy, p. 167–182. In: D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar (ed.), *Pharmaceutical Biotechnology*, Harwood Academic Publishers.
- Bout, A. (1996) Prospects for human gene therapy. *Eur. J. Drug Met. and Pharma.* 2, 175–179.
- Blaese, M., Blankenstein, T., Brenner, M., Cohen-Hagenauer, O., Gansbacher, B., Russel, S., Sorrentino, B. and Velu, T. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2: 291–297.
- Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Adenovirus mediated *in vivo* gene transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716: 90–101.
- Carter, A. J., Laird, J. R., Farb, A., Kufs, W., Wortham, D. C. and Virmani, R. (1994) Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24: 1398–1405.
- Chroboczek J., Ruigrok R. W. H., and Cusack S., 1995. Adenovirus fiber, p. 163–200. In: W. Doerfler and P. Bohm (ed.), *The molecular repertoire of adenoviruses*, I. Springer-Verlag, Berlin.
- Defer C., Belin M., Caillet-Boudin M. and Boulanger P., 1990. Human adenovirus-host cell interactions; comparative study with members of subgroup B and C. *Journal of virology* 64 (8): 3661–3673.
- Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I et al. New helper cells and matched E1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. *Human Gene Therapy*, 9 (1998), p1909–1917.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. and Brown, F. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 140–144.
- Gall J., Kass-Eisler A., Leinwand L. and Falck-Pedersen E. (1996) Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *Journal of Virology* 70 (4): 2116–2123.
- Greber, U. F., Willets, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993). Stepwise dismanteling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477–486.
- Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25.
- Herz, J. and Gerard, R. D. (1993) Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2812–2816.
- Hierholzer, J. C. (1992) Adenovirus in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol Rev.* 5, 262–274.
- Hierholzer, J. C., Wigand, R., Anderson, L. J., Adrian, T., and Gold, J. W. M. (1988) Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43–47). *J. Infect. Dis.* 158, 804–813.
- Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T. and Boulanger, P. A. (1997) Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I α 2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16: 2294–2306.
- Hsu, K. H., Lonberg-Holm, K., Alstein, B. and Crowell, R. L. (1988) A monoclonal antibody specific for the cellular receptor for the group B coxsackieviruses. *J. Virol* 62(5): 1647–1652.
- Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B. and Karpati, G. (1995) The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther.* 2: 107–115.

- Ishibashi, M. and Yasue, H. (1984) The adenoviruses, H. S. Ginsberg, ed., Plenum Press, London, New York. Chapter 12, 497–561.
- Jaffe, F. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R. (1973) Culture of endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52, 2745–2756.
- Kass-Eisler, A., Falck-Pederson, E., Elfenbein, D. H., Alvira, M., Buttrick, P. M. and Leinwand, L. A. (1994) The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 1: 395–402.
- Khoo, S. H., Bailey, A. S., De Jong, J. C., and Mandal, B. K. (1995). Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: Clinical features and molecular epidemiology. *J. Infect. Dis* 172, 629–637
- Kidd, A. H., Chroboczek, J., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. (1993) Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers. *Virology* 192, 73–84.
- Krasnykh V. N., Mikheeva G. V., Douglas J. T. and Curiel D. T. (1996) Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70(10): 6839–6846.
- Krasnykh V. N., Dmitriev I., Mikheeva G., Miller C. R., Belousova N. and Curiel D. T. (1998) Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72(3): 1844–1852.
- Law, L., Chillon, M., Bosch, A., Armentano, D., Welsh, M. J. and Davidson, B. L. (1998) Infection of primary CNS cells by different adenoviral serotypes: Searching for a more efficient vector. Abstract 1st Annual Meeting American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington.
- Leppard, K. N. (1997) E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J. Gen. Virol.* 78: 2131–2138.
- Lloyd Jones, D. M. and Bloch, K. D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu. Rev. Med.* 47: 365–375.
- Morgan, C., Rozenkrantz, H. S., and Mednis, B. (1969) Structure and development of viruses as observed in the electron microscope.X. Entry and uncoating of adenovirus. *J. Virol.* 4, 777–796.
- Roelvink, P. W., Kovesdi, I. and Wickham, T. J. (1996) Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: Adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J. Virol.* 70: 7614–7621.
- Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. and Wickham, T. J. (1998) The coxsackie-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72: 7909–7915.
- Rogers, B. E., Douglas J. T., Ahlem, C., Buchshaum, D. J., Frincke, J. and Curiel, D. T. (1997) Use of a novel crosslinking method to modify adenovirus tropism. *Gene Ther.* 4: 1387–1392.
- Schulick, A. H., Vassalli, G., Dunn, P. F., Dong, G., Rade, J. J., Zamarron, C. and Dichek, D. A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries.
- Schnurr, D and Dondero, M. E. (1993) Two new candidate adenovirus serotypes. *Intervirol.* 36, 79–83.
- Schwartz, R. S., Edwards, W. D., Huber, K. C., Antoniades, L. C. Bailey, K. R., Camrud, A. R., Jorgenson, M. A. and Holmes, D. R. Jr. (1993) Coronary restenosis: Prospects for solution and new perspectives from a porcine model. *Mayo Clin. Proc.* 68: 54–62.
- Shi, Y., Pieniek, M., Fard, A., O'Brien, J., Mannion, J. D. and Zalewski, A. (1996) Adventitial remodelling after coronary arterial injury. *Circulation* 93: 340–348.
- Shabram, P. W., Giroux, D. D., Goudreau, A. M., Gregory, R. J., Horn, M. T., Huyghe, B. G., Liu, X., Nunnally, M. H., Sugarman, B. J. and Sutjipto, S. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8(4): 453–465.
- Signas, G., Akusjarvi, G., and Pettersson, U. (1985). Adenovirus 3 fiberpolypeptide gene: Complications for the structure of the fiber protein. *J. Virol.* 53, 672–678.
- Stevenson S. C., Rollence M., White B., Weaver L. and McClelland A., (1995) Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J. Virol* 69(5): 2850–2857.
- Stevenson S. C., Rollence M., Marshall-Neff J. and McClelland A. (1997) Selective targeting of human cells by a chimaeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J. Virology* 71(6): 4782–4790.
- Stouten, P. W. F., Sander, C., Ruigrok, R. W. H., and Cusack, S. (1992) New triple helical model for the shaft of the adenovirus fiber. *J. Mol. Biol.* 226, 1073–1084.
- Svensson, V. and Persson, R. (1984). Entry of adenovirus 2 into HeLa cells. *J. Virol.* 51, 687–694.
- Van der Vliet, P. C. (1995) Adenovirus DNA replication In: W. Doerfler and P. Böhm (eds.), The molecular repertoire of adenoviruses II. Springer-Verlag, Berlin.
- Varga, M. J., Weibull, C., and Everitt, E. (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.* 65, 6061–6070.
- Varenne, O., Pislaru, S., Gillijns, H., Van Pelt, N., Gerard, R. D., Zoldhelyi, P., van de Werf, F., Collen, D. and Janssens, S. P. (1998) Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthetase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 98: 919–926.

- Wadell G (1984) Molecular Epidemiology of human adenoviruses Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110, 191–220.
- Wickham T. J., Carrion M. E. and Kovesdi I., 1995. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. Gene Therapy 2: 750–756.
- Wickham T. J., Segal, D. M., Roelvink, P. W., Carrion M. E., Lizonova, A., Lee, G-M., and Kovesdi, I. (1996) Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. J. Virol. 70 (10), 6831–6838.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cherish, D. A., and Nemerow, G. R. (1993) Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell 73, 309–319.
- Wijnberg, M. J., Quax, P. H. A., Nieuwenbroek, M. M. E., Verheijen, J. H. (1997). The migration of human smooth muscle cells in vitro is mediated by plasminogen activation and can be inhibited by al-pha(2)-macro globulin receptor associated protein. Thromb. and Haemostas. 78, 880–886.
- Wold, W. S., Tollefson, A. E. and Hermiston, T. W. (1995) E3 transcription unit of adenovirus. In: W. Doerfler and P. Böhm (eds.), The molecular repertoire of adenoviruses I. Springerverlag, Berlin.
- Zabner, J., Armentano, D., Chillon, M., Wadsworth, S. C. and Welsh, M. J. (1998) Type 17 fiber enhances gene transfer Abstract 1st Annual Meeting American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington.

Patentansprüche

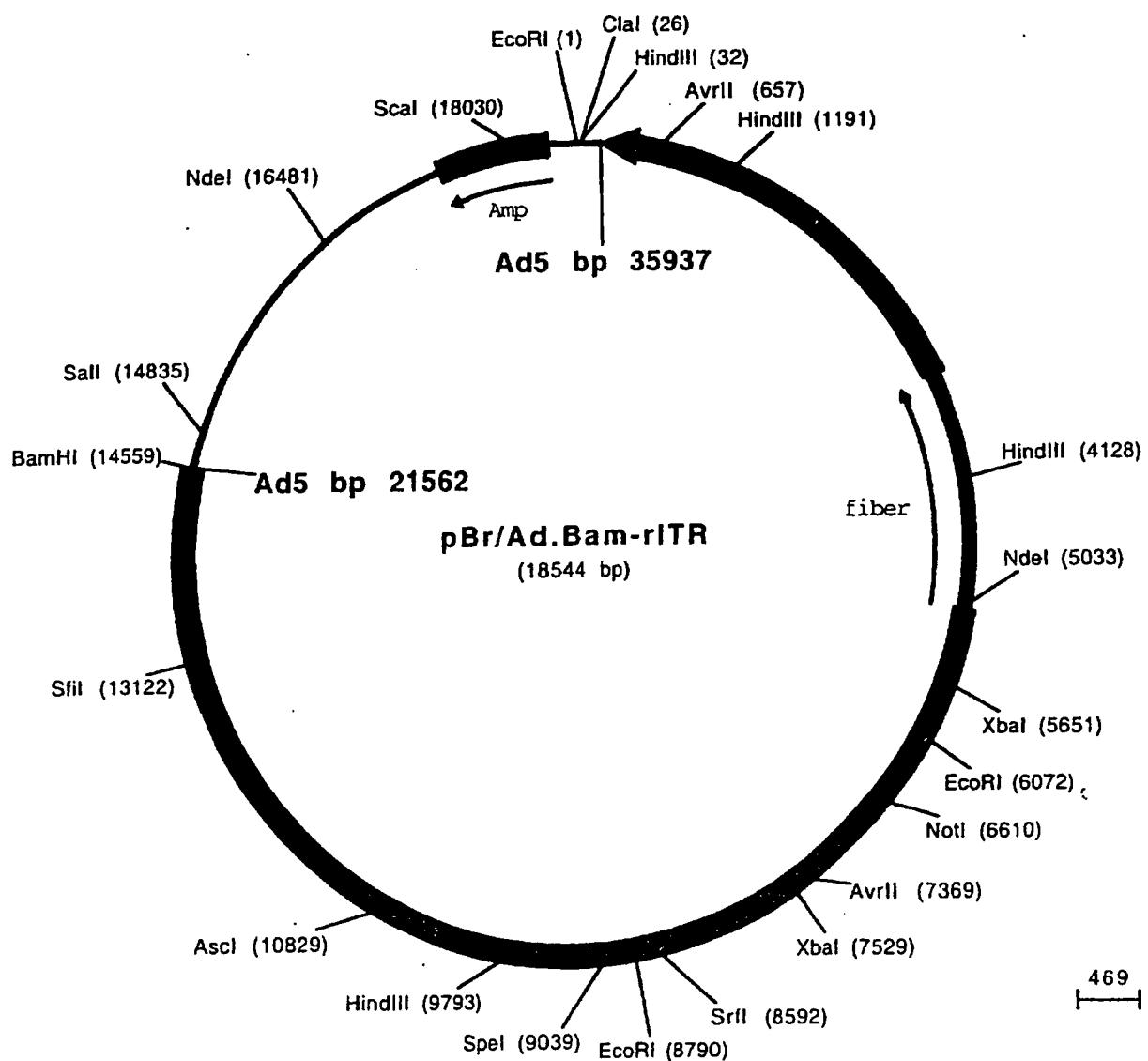
1. Rekombinanter adenoviraler Vektor eines Serotyps aus der Untergruppe C, der mit wenigstens einem Gewebetropismus für Zellen der glatten Muskulatur und/oder Endothelzellen ausgestattet ist und wenigstens von einem Gewebetropismus für Leberzellen befreit ist, wobei der adenovirale Vektor ein Kapsid umfasst, das ein tropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins eines Adenovirus eines Serotyps aus der Untergruppe B umfasst, und wobei der Adenovirus-Serotyp aus der Untergruppe B aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Adenovirus 11, Adenovirus 16, Adenovirus 35 und Adenovirus 51 besteht.
2. Rekombinanter adenoviraler Vektor gemäß Anspruch 1, der weiterhin eine adenovirale Nucleinsäure von einem Adenovirus der Untergruppe C umfasst, wobei die Nucleinsäure eine Sequenz umfasst, die ein Faserprotein codiert, wobei das Faserprotein wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment eines Faserproteins eines Adenovirus eines Serotyps aus der Untergruppe B umfasst und wobei der Adenovirus-Serotyp aus der Untergruppe B aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Adenovirus 11, Adenovirus 16, Adenovirus 35 und Adenovirus 51 besteht.
3. Rekombinanter adenoviraler Vektor gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei dem Serotyp aus der Untergruppe C um Adenovirus 5 handelt.
4. Rekombinanter adenoviraler Vektor gemäß Anspruch 3, wobei die adenovirale Nucleinsäure so modifiziert ist, dass die Kapazität der adenoviralen Nucleinsäure zur Replikation in einer Zielzelle reduziert oder beseitigt ist.
5. Rekombinanter adenoviraler Vektor gemäß Anspruch 3 oder 4, der weiterhin wenigstens eine Nicht-Adenovirus-Nucleinsäure umfasst.
6. Rekombinanter adenoviraler Vektor gemäß Anspruch 5, wobei wenigstens eine der Nicht-Adenovirus-Nucleinsäuren ein Gen ist, das aus der Gruppe von Genen ausgewählt ist, die Folgendes codieren: ein Apolipoprotein, eine NO-Synthase, eine Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase, ein Interleukin-3, ein Interleukin-1α, ein (Anti)angiogeneseprotein, wie Angiostatin, ein Antiproliferationsprotein, ein Antimigrationsprotein von Zellen der glatten Muskulatur, einen Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VGEF), einen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor, einen Hypoxie-induzierbaren Faktor 1α (HIF-1α) oder ein PAI-1.
7. Verwendung eines rekombinanten adenoviralen Vektors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 als Pharmakon.
8. Konstrukt pBr/Ad.BamRΔFib, das die Adenovirus-5-Sequenzen 21562–31094 und 32794–35938 umfasst, wobei dem Konstrukt die Adenovirus-5-Nucleotide 31095–32793 fehlen, die die Nucleinsäure umfassen, welche wenigstens den gewebetropismusbestimmenden Teil des Faserproteins codiert, und das weiterhin eine Nucleinsäure umfasst, die sich zwischen Position 31094 und 32794 des Adenovirus 5 befindet, wobei die Nucleinsäure wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment des Faserproteins von Adenovirus 16, 11, 35 oder 51 codiert.
9. Konstrukt pBr/Ad.BamR.pac/fib16, das die Adenovirus-S-Sequenzen 21562–31094 und 32794–35938

umfasst und das eine Nucleinsäure umfasst, die sich zwischen Position 31094 und 32794 des Adenovirus 5 befindet, wobei die Nucleinsäure wenigstens ein gewebetropismusbestimmendes Fragment des Faserproteins von Adenovirus 16 codiert, und das weiterhin eine einzigartige PacI-Restriktionsstelle in der Nähe des rechten Inverted Terminal Repeat von Adenovirus 5 in dem nichtadenoviralen Sequenzgerüst des Konstrukts umfasst.

10. Verwendung eines Konstrukts gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9 für die Herstellung eines rekombinanten adenoviralen Vektors gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6.

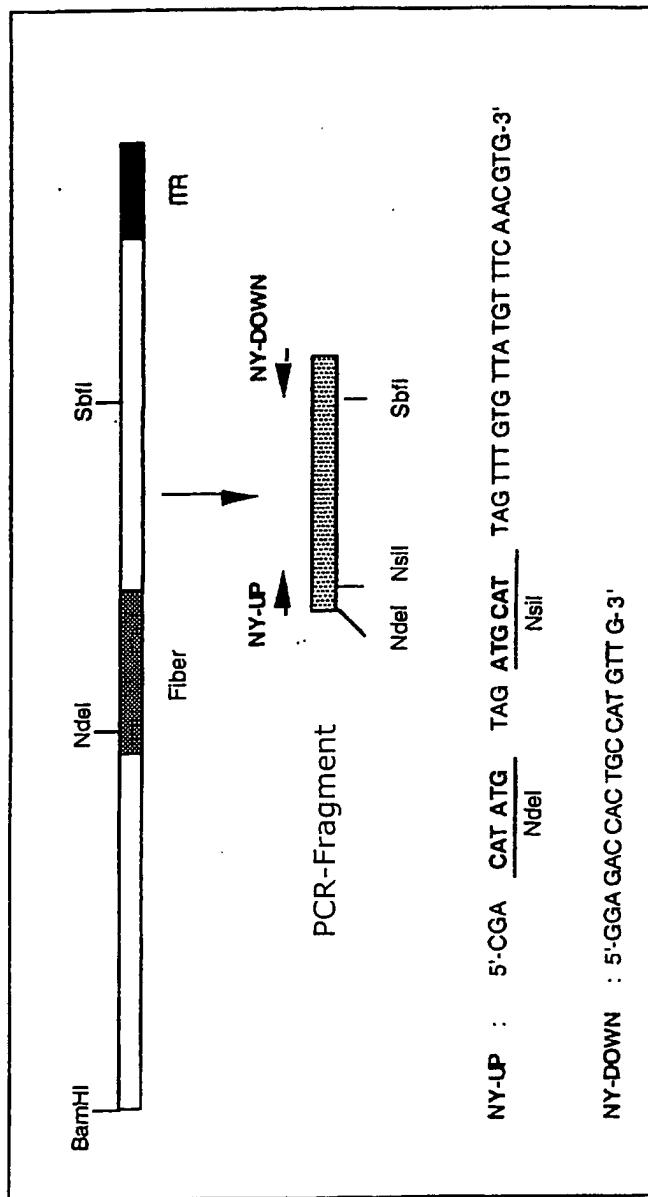
Es folgen 24 Blatt Zeichnungen

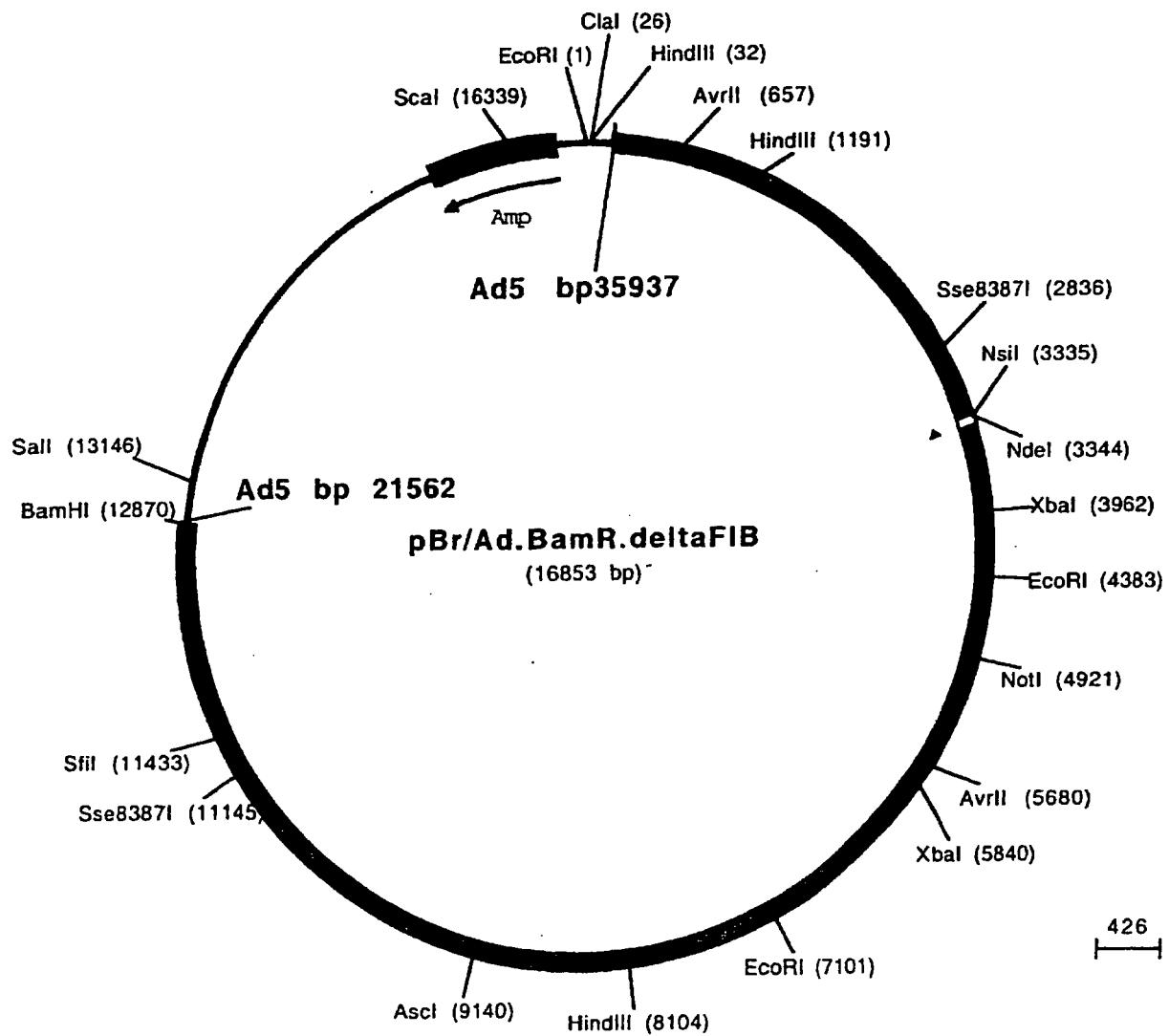
Anhängende Zeichnungen



Figur 1

Figur 2





Figur 3

Figur 4a: Sequenz der Ad5-Faser

ATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATACCTCAACCCCGTGTATCCATA**TGACACGGAAACCGGTC**
CTCCAACTGTGCC~~TTT~~CTACTCCTCC~~TTT~~GATCCCCAATGGGTTCAAGAGAGTCCCCCTGG
GGTACTCTCTTGCGCCTATCGAACCTCTAGTTACCTCCAATGGCATGCTTGC~~G~~C~~T~~CAAATGGC
AACGGCCTCTCTGGACGAGGCCGGAACCTAACCTCCAAAATGTAACC~~ACT~~GTGAGCCCACCTC
TC~~AAAAAAACCAAGTCAAAACATAAAAC~~CTGGAAATATCTGCACCCCTCACAGT~~TAC~~TCAGAAGCCCT
AACTGTGGCTGCCGCCGACCTCTAATGGTCGCCGGCAACACACTCACC~~AT~~GC~~A~~ATCACAGGCCCG
CTAACCGTGACGACTCCAAACTTAGCATTGCCACCC~~A~~GGGCC~~C~~CC~~T~~ACAGTGT~~C~~AGAAGGAAAGC
TAGCCCTGCAAACATCAGGCC~~CC~~CTACCACCACCGATAGCAGTACCC~~T~~ACTATC~~A~~TGCCTCACC
CCCTCTAACTACTGCCACTGGTAGCTGGCATTGACTTGAAGAGCCCATTATA~~C~~ACAAAATGGA
AAACTAGGACTAAAGTACGGGCTCCTTG~~C~~ATGTAACAGACGACCTAAACACTT~~G~~ACC~~G~~TAGCAA
CTGGTCCAGGTGT~~G~~ACTATTAAATAACTTCCTTG~~C~~AAACTAAAGTTACTGGAGCCTGGGTTTG~~A~~
TTCACAAGGCAATATGCAACTTAATGTAGCAGGAGGACTAAGGATTGATTCTAAAACAGACGCC~~T~~
ATACTTGATGTTAGTTATCCGTTGATGCT~~C~~AAAACCAACTAAATCTAAGACTAGGACAGGGCC~~T~~C
TTTTTATAAAACTCAGCCCACA~~A~~CTGGATATTAACTACAACAAAGGC~~T~~TTACTTGTTACAGCTTC
AAACAATTCCAAAAGCTTGAGGTTAACCTAAGC~~A~~CTGCCAAGGGGTTGATTTGACGCTACAGCC
ATAGCCATTAA~~T~~GCAGGAGATGGGCTGAATTGGT~~C~~ACCTAATGCACCAACACAAAATCCCTCA
AAACAAAAATTGGCCATGCC~~T~~AGAATTGATTC~~A~~ACAAAGGCTATGGT~~C~~CTAAACTAGGA~~A~~CTGG
CCTTAGTTTGACAGCACAGGTGCCATTACAGTAGGAAACAAAATAATGATAAGCTAACTTTGTGG
ACCACACCAGCTCCATCTCTAACTGTAGACTAAATGCAGAGAAAGATGCTAAACTC~~A~~CTTTGGT~~C~~
TAACAAAATGTGGCAGTCAAATACTTGCTACAGTT~~C~~AGTTGGCTGTTAAAGGCAGTTGGCTCC
AATATCTGGAACAGTTCAAAGT~~G~~C~~T~~C~~A~~TCTTATTATAAGATTGACGAAAATGGAGT~~G~~C~~T~~ACTAAAC
AATTCC~~T~~CTGGACCCAGAAATTGGA~~A~~CTT~~G~~AGATCTTACTGAAGGCACAGCCTATA
CAAACGCTGTTGGATTATGCC~~T~~AACTATCAGCTTATC~~A~~AAATCTCACGGTAAA~~A~~CTGCC~~A~~AG
TAACATTGTCAGTCAA~~G~~T~~T~~ACTTAAACGGAGACAAA~~A~~CTAAACCTGTAACACTAACCA~~T~~ACTA
AACGGTACACAGGAAACAGGAGACACA~~A~~CTCCAAAGTGC~~A~~ACTCTATGTC~~A~~TTTCATGGACTGGT
CTGGCCACA~~A~~CTACATTAATGAAATTTGCCACATCCTTACACTTTTCATACATTGCCAAGA
ATAA :

Figur 4b: Sequenz der chimärischen Ad5/fib12-Faser

ATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATACCTCAACCCGTGTATCCATATGACCCATTGACACAT
 CAGACGTACCCCTTGTTACACCCCCCTTACTTCTCCAATGGTCTTCAGAAGAAAAACCACCAAGGTGT
 ATTAGCACCTTAATTACAAGACCCCATTGTAACTGAAAATGGAACCCCTACACTCAAGCTAGGGGAC
 GGAATAAAACTTAATGCCAAGGTCAACTACAGCTAGTAATAATCAATGTTGGAGCCCTTA
 CCAACACCTCACAAGGTCTAAACTTCTGGAGCGCCCCCTAGCAGTAAAGGCTAGTGCCTCAC
 ACTTAACACAAGAGCGCCCTAACCAACACGGATGAAAGCTTAGCCTTAATAACCGCCCTCCATT
 ACAGTAGAGTCTCGCGTTGGGCTGGCCACCATAGCCCTCTAAGCTTAGATGGAGGTGGAAC
 TAGGTTAAATCTTCTGCTCCCTGGACGTTAGTAACAACAATTGCATCTCACCACGTAAACTCC
 CTTAGTTGAAATTCTAGCGGTGCCCTATCTGTTGCTACTGCAGACCCATAAGTGTGCAACAAAC
 GCTCTACCCCTACCTACGGCAGATCCGTTAATGGTGAGCTCGATGGGTTGGAATAAGTGTCACTA
 GTCCCATTACAGTAATAAACGGTTCTTAGCCTGTCTACAACACTGCTCCCTCAACAGCACAGGATC
 CACTTAAGTCTGTCTGGCCAATCCTCTGACTATTTACAAGACACATTGACTGTTCCACTGGT
 AACGGCTTCAAGTGTGGGGTCTCAATTAGTAACAAGAAATAGGGGATGGTTAACATTGATAATG
 GGGTCATGAAAGTAAACGTTGCCGGGGAATGAGAACTCTGGCGGTAGAATAATTAGATGTTAA
 TTATCCCTTGATGCGAGCAATAACCTGTCCTTAAGACGGGATTGGGACTAATTATAACCAATCT
 ACAAACTGGAACCTAACAACTGATATTAGTACCGAAAAAGGTTAATGTTAGTGGCAATCAAATAG
 CTCTTAATGCAAGGTCAAGGGCTTACATTAATAATGGCCAACCTAGGGTTAAGTGGAGCTGGACT
 TATTTTGATTCAAACAATAACATTGCTTAGGCAGCAGCAGAACACTCCATACGACCCCTGACA
 CTGTGGACAACCTCTGACCCACCACCAACTGCAGCCTCATACAAGAGCTAGATGCAAAACTCACCC
 TGTGCTTAACAAAAACGGATCTATTGTTAATGGCATTGTAAGTTAGTGGGTGTTAAGGGTAATCT
 CCTAAATATCCAAAGTACTACTACCACTGTAGGAGTGCATTAGTGTGTTGATGAAACAGGGAAAGATTA
 ATCACATCAACCCCTACTGCCCTGGTCCCCAAGCTTCTGGGGATATAGACAAGGCAATCAGTGT
 CTACCAAACTGTTACCAATGGTCTAGGTTTATGCTTAATGTGAGTGCTTACCCCTAGACCAAATGC
 CAGTGAGGCTAAAGCCAATGGTAAGTCTCACGTACTTACAGGGAGATACTAAACCTATAACA
 ATGAAAGTTGCAATTAAATGGCATTACGTGCTAAATGGACTACTTTAACATTGTCAGGTC
 TATCAAACATATAAAATCAGCTTCTACACCATCCTGCTCCTNTCTACATTGCCAAGAATA
AATGCATTAG

Figur 4c: Sequenz der chimärischen Ad5/fib16-Faser

ATGAAGCGCGAAGACCGTCTGAAGATACCTCAACCCGTGTATCCATATGAAGATGAAAGCAGCT
CACAACACCCTTTATAAACCTGGTTCATTCCTCAAATGGTTGCACAAAGCCCAGATGGAGT
TCTAACTCTTAAATGTGTTAATCCACTCACTACCGCCAGCGGACCCCTCCA**ACTTAAAGTTGGAAGC**
AGTCTTACAGTAGATACTATCGATGGGTCTTGAGGAAAATATACTGCCGAAGCGCCACTCACTA
AAACTAACCACTCCATAGGTTTATTAAAGGATCTGGCTTGCAAACAAAGGATGATAAA**ACTTTGTT**
ATCGCTGGGAGATGGGTTGGTAACAAAGGATGATAAA**ACTATGTTATCGCTGGGAGATGGGTTAATA**
ACAAAAAAATGATGTA**CTATGTGCCAAACTAGGACATGGCCTGTGTTGACTCTTCCAATGCTATCA**
CCATAGAAAACAACACCTGTGGACAGGCGAAA**ACCAAGCGCCA**ACTGTGTAATTAAAGAGGGAGA
AGATTCCCAGACTGTAAGCTCACTTAGTTCTAGTGAAAGAATGGAGGACTGATAAA**TGGATACATA**
ACATTAATGGGAGCCTCAGAATATA**ACTAACACCTGTTAAAACAATCAAGTTACAATCGATGTAAC**
ACCTCGCATTGATAATA**CTGGCCAAATTATTACTTACCTATCCCTAAAGTAACCTGAAC**TT
TAAAGACAACAAA**ACATGGCTACTGGAACCCATAACCAGTGCCAAAGGCTTCATGCCAGCAC**CC
GCCTATCCATTATAACATACGCCACTGAGACCTAA**ATGAAGATACATTATGGAGAGTGT**ACT
ACAAATCTACCAATGGAA**CTCTTCCACTAAAGTTACTGTCACACTAAACAGACGTATGTTAGC**
TTCTGGAATGGCCTATGCTATGAATTTCATGGTCTCTAA**ATGCAAGAGGAAGCCCCGGAAACTACC**
GAAGTCACTCTCATTACCTCCCCCTCTTTTTCTTATATCAGAGAAGATGACT**GAATGCATTAG**

Figur 4d: Sequenz der chimärischen Ad5/fib28-Faser

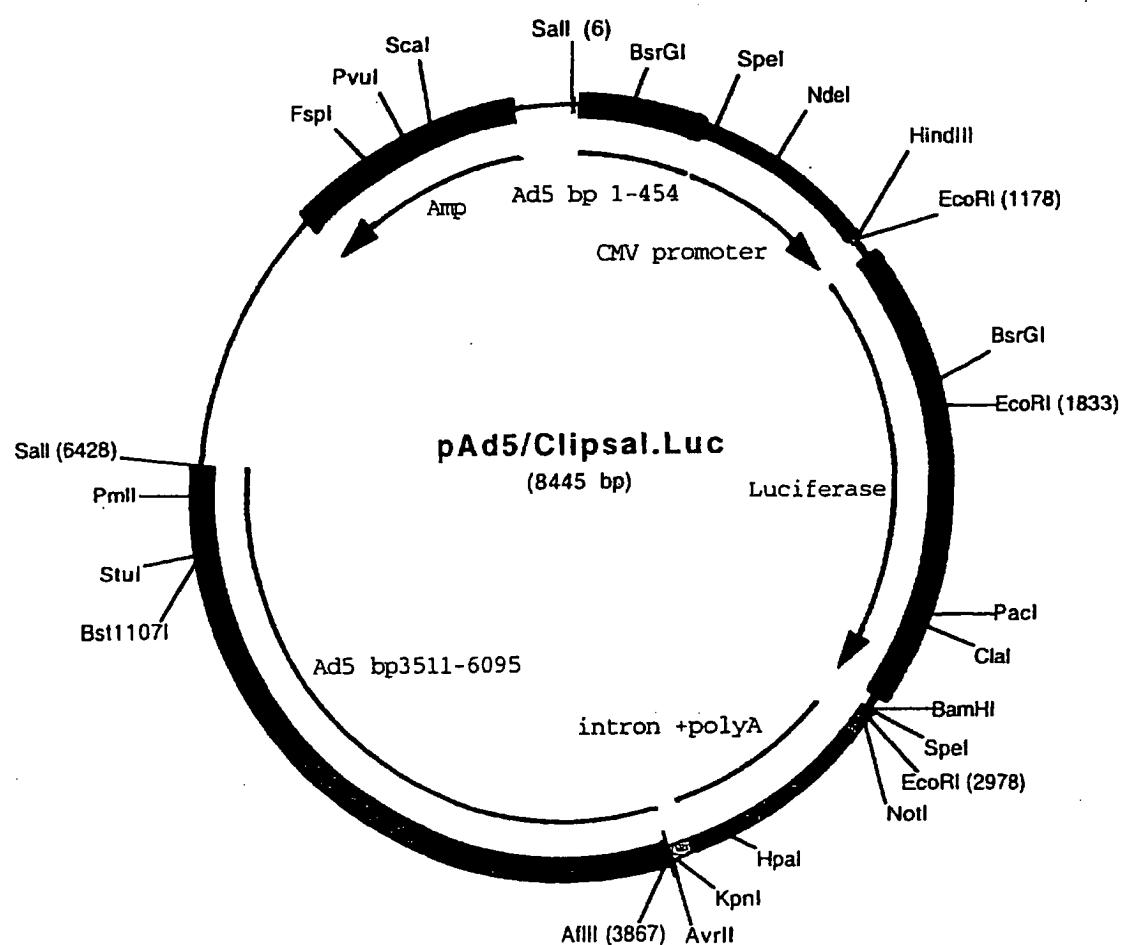
```
ATGTTGTTGCAGATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATACCTCAACCCGTATCCATATGGCT
ACGC CGGAAATCAGAATATCCCCTTCCTCACTCCCCCTTGTTCCTCGATGGATTCCAAAACCTT
CCCACCTGGGGTCTGTCACTCAAACGGCTGACCCAAATCACCATCGCTAATGGGGATGTCTCACTC
AAGTTGGGAGGCGGACTGACGGTGGAAAAAGAGTCTGGAAACTTAACGTGAACCTAAGGCTCCCT
TGCAAGTTGCAAGTGGACAATTGGAATTAGCATATGATTCTCCATTGATGTTAAAACAATATGCT
TACTCTAAAGCAGGTACGGCTTAGCAGTTGTAACGAAAGACAATACTGATTTACAACCACTAATG
GGCACACTTGTGTTAACTGGCAAAGGCATTGGCACTGGCACAAGTGTACGGTGGAACCATAG
ATGTGAGAATAGGAAAAACGGAAGTCTGGCATTGACAAAAATGGAGATTGGTGGCCTGGATAA
AGAAAATGACAGGCGCACTCTATGGACAACCTCCAGACACATCTCAAATTGCAAATGAGTGAAGTC
AAAGACTCAAAGCTTACTCTTATTCTACAAATGCCAAGTCAAATTCTAGGAAGTGTATCTTGC
TTGCTGTTAAAGGAGAATATCAAATATGACTGCCAGTACTAATAAGAATGAAAAATAACACTGCT
ATTTGATGCTAATGGAGTCTTGTAGAAGGATCCAGTCTGATAAAAGAGTACTGGAACCTTAGAAC
AATGATTCTACTGTGCTGGAAAATATGAAAATGCTGTTCCGTTCATGCTAACATAACAGCTTATA
AACCCGTCAATTCTAAAAGCTATGCCAGAAGTCACATATTGGAATGTATATATTGCTGCTAACGCC
ATATAATCCAGTGGTTATTAATAGCTTCAATCAAGAGACACAAAACAATTGTGTCTATTCTATA
TCATTTGACTACACTTGCTCTAAAGAGTATACAGGTATGCAATTGATGTTACATCTTCACCTCT
CCTATATGCCAAGAATGAATGCATTAG
```

Figur 4e: Sequenz der chimärischen Ad5/fib40-L-Faser

```

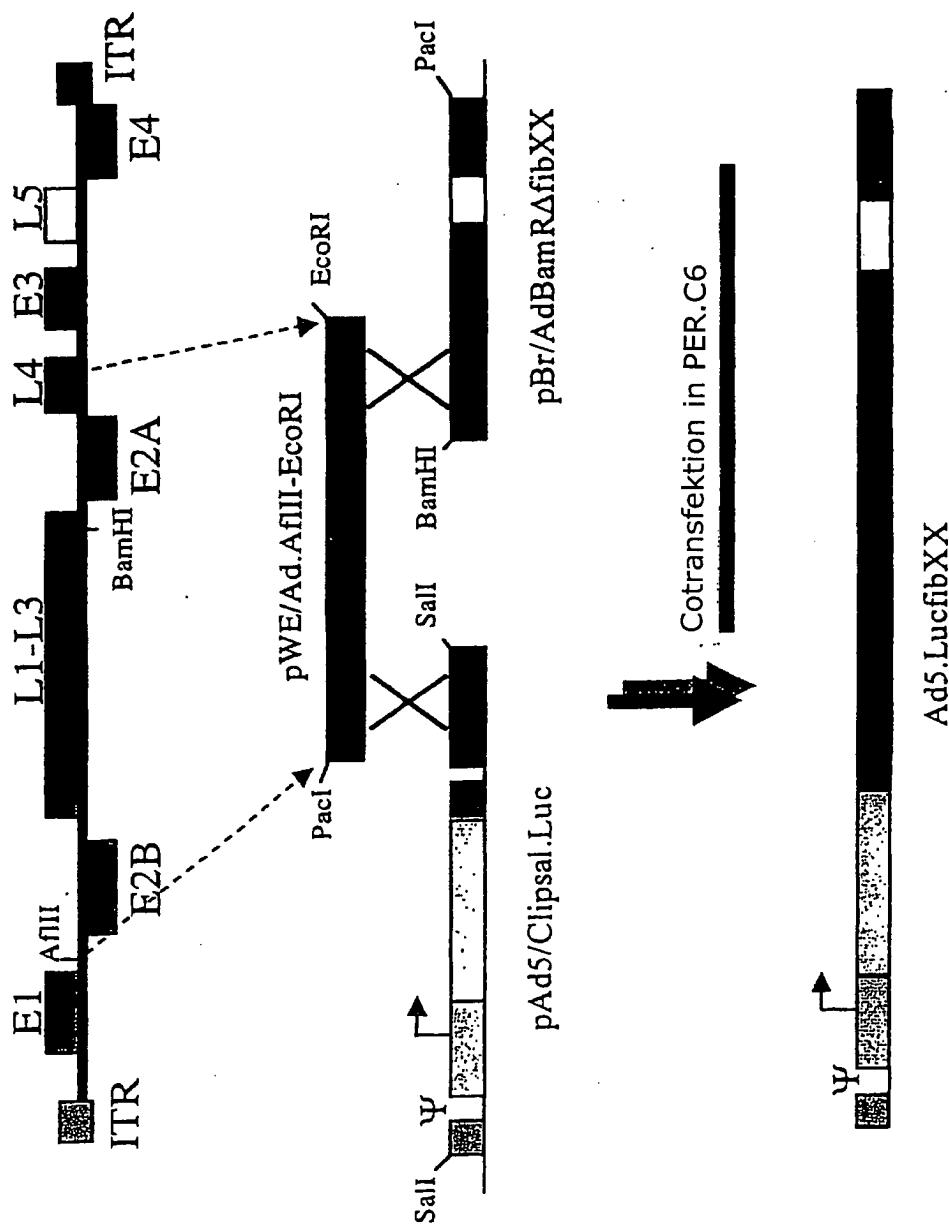
ATGTTGTCAGATGAAGCGCGAAGACCGTCTGAAGATACCTCAACCCGTGTATCCATATGAAC
ACTACAATCCCCCTGACATTCCATTACACCCCCGTTGCTTCCTCAACGGCTTGCAAGAAAA
ACCTCCGGGAGTCCTCAGCCTGAAATACACTGATCCACTACAACCAAAAACGGGGCTTAACCTTA
AAATTGGGACGGGACTAAACATTGATAAAAATGGAGATCTTCTTCAGATGCTAGCGTGGAAAGTTA
GCGCCCTATCACTAAAACCAACAAATCGTAGGTTAAATTACACTAAGCCTCTCGCTTGCAAAA
TAACGCGCTTACTCTTCTAACAGGCCCTTAACGTAGTAAATAATTAGCTCTAAATATG
TCACAGCCTGTTACTATTAAATGCAAACAAACGAACTTCTCTTAATAGACGCCCTTAATGCTG
ACACGGGCACTCTCGCCTCGAAGTGATGCACCTTGGACTAGTAGACAAAACACTAAAGGTTT
GTTTCTAGCCCCCTATCTAGATAATAACTTCTTACACTAGCCATTGAACGCCCTAGCTCTA
TCCAGTAACAGAGCAGTGGCCCTTAAGTATTCAACCACCTTAAAATAGAAAACGAAAACCTTAACCC
TAAGCACAGGGGACCTTTACTGTAAGCGGGGAAATTAAACCTGGCAACATCGGCACCCCTCTC
CGTGCAAAACAATTCTCTCCTTAAGGGTTAACCGCCTTCTCATCACTGACTCTGGATTAGCT
ATGGACTTAGGAGACGGCTTGCAATTAGGTGGCTCTAAGTTAAATCAATCTGGTCCAGGTTAC
AAATGTCTAATGGAGCTATTACTTTAGCACTAGATGCAGCGCTGCCTTGCAATATAAAAACAACCA
ACTTCAACTCAGAATTGGCTCCCGTCTGCTTAATTATGAGCGGAGTAACACAAACATTAAACGTC
AATGCCAATACCAAGCCTTGTCTATTGAAAATAACTCACTAGTTGTTAAGCTAGGAAACGGTC
TTCGCTTGTAGCTGGGAAGCATAGCTGTCTCACCTACTACCACTACCCCTACCACCCCTATGGAC
CACCAGGGACCCGTCCTAACGCCACTTTTATGAATCACTAGACGCCAAAGTGTGGCTAGTTTA
GTAAAATGCAACGGCATGGTTAACGGACCATATCCATTAAAGCTAAAAAGGCACCTTACTTAAAC
CCACAGCTAGTTATTCCCTTGTCATGTATTACAGCGACGGAACTGGAGGAAAAACTATCC
CGTGGTGCACAAACGAAGGGATACTAGCAAACAGTGCCACATGGGGTTATCGACAAGGACAGTCTGCC
AACACTAACGTTCCAATGCTGTAGAATTATGCCCTAGCTCTAAAGGTATCCAATGAAAAGGTT
CTGAAGTTCAGAACATGGCTTACCTACATTGGCAAGGTGACCTAACATGGCCATATCTTT
TCAGAGCATTATAATCATGCAATAGAAGGCTACTCATTAATTCNCCTGGCGCTTCGAAATAAT
GAACGTTTGACATCCCCTGTCATTTCTTATGTAACAGAACATAATGCATTAG

```



Figur 5

Figur 6: Erzeugung von (chimärischen) Adenoviren



Figur 7a

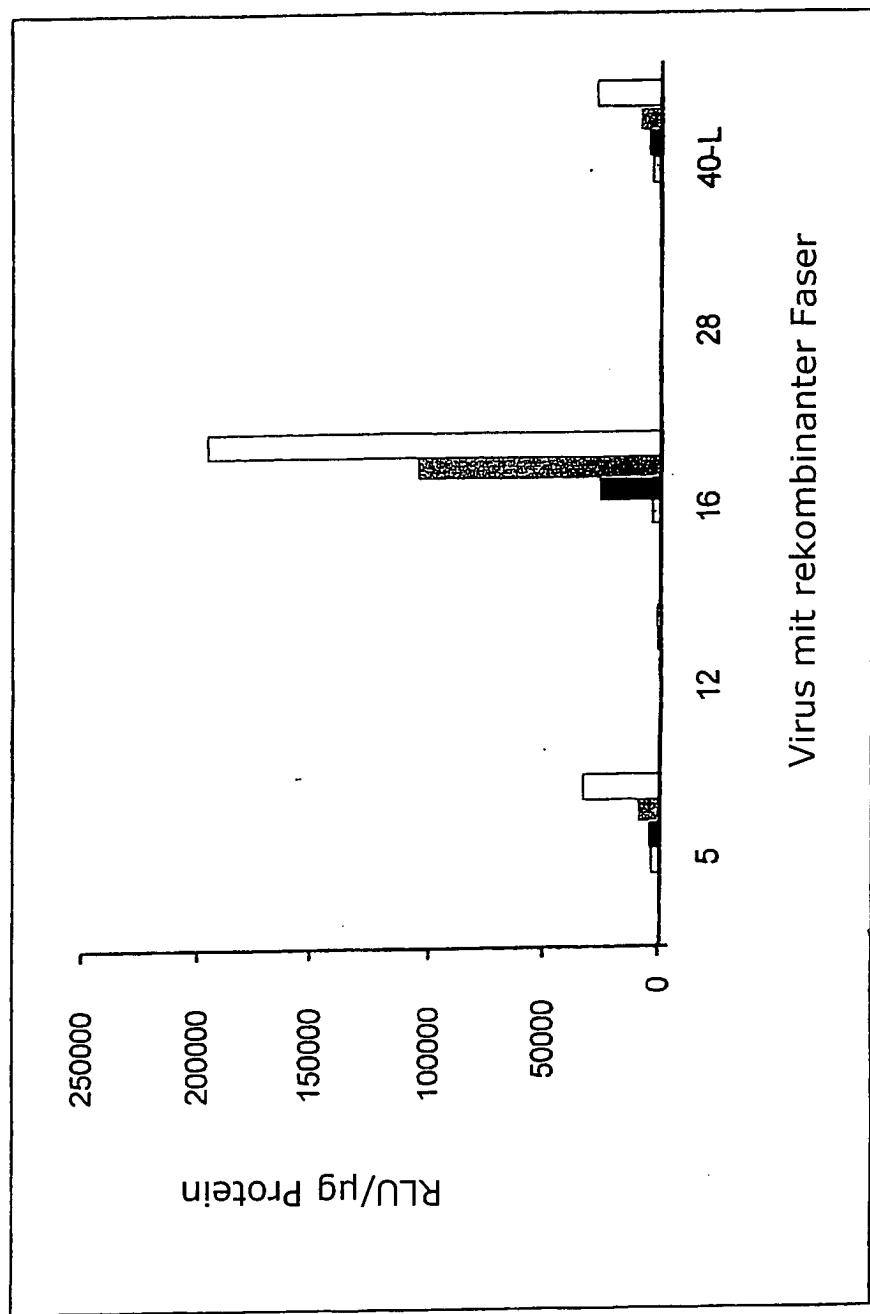
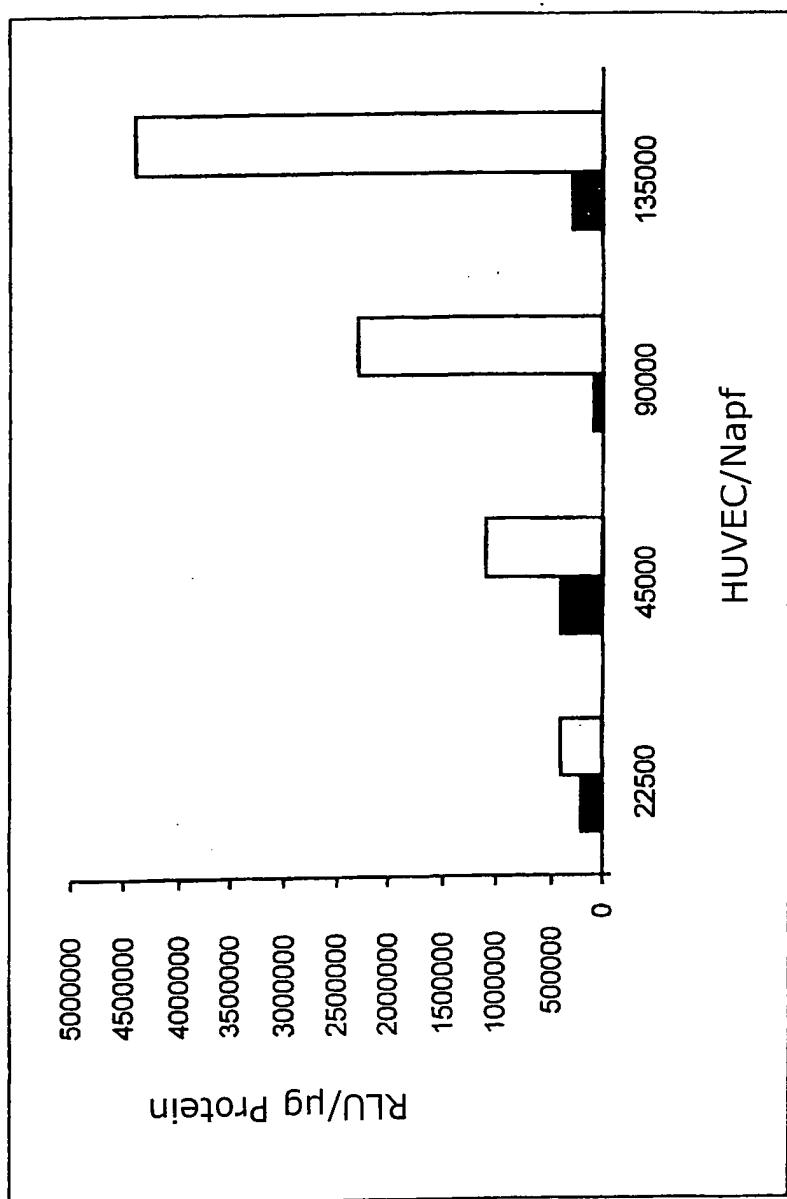
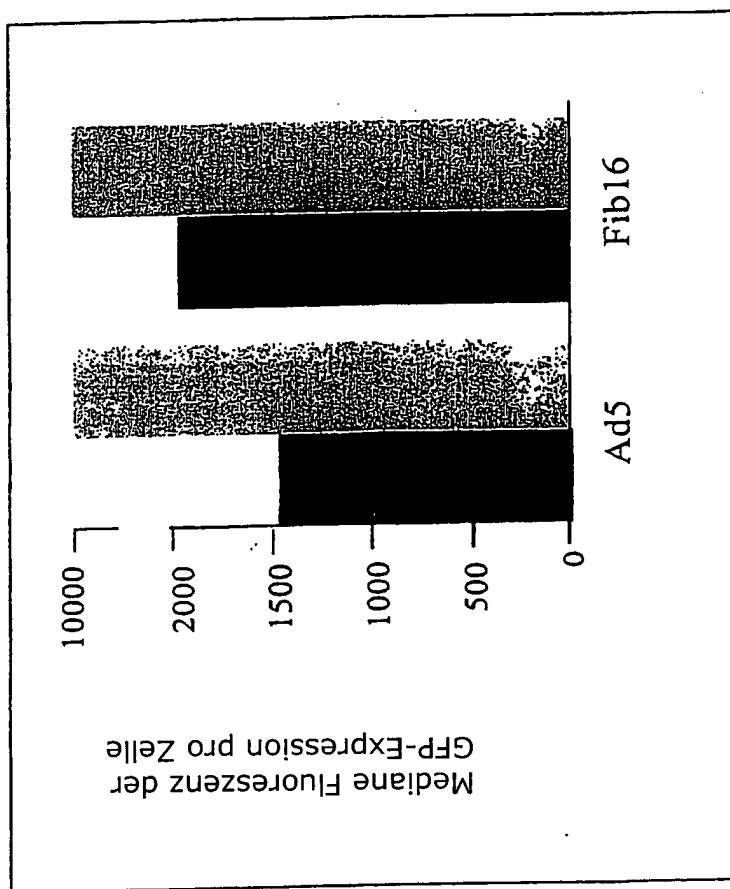


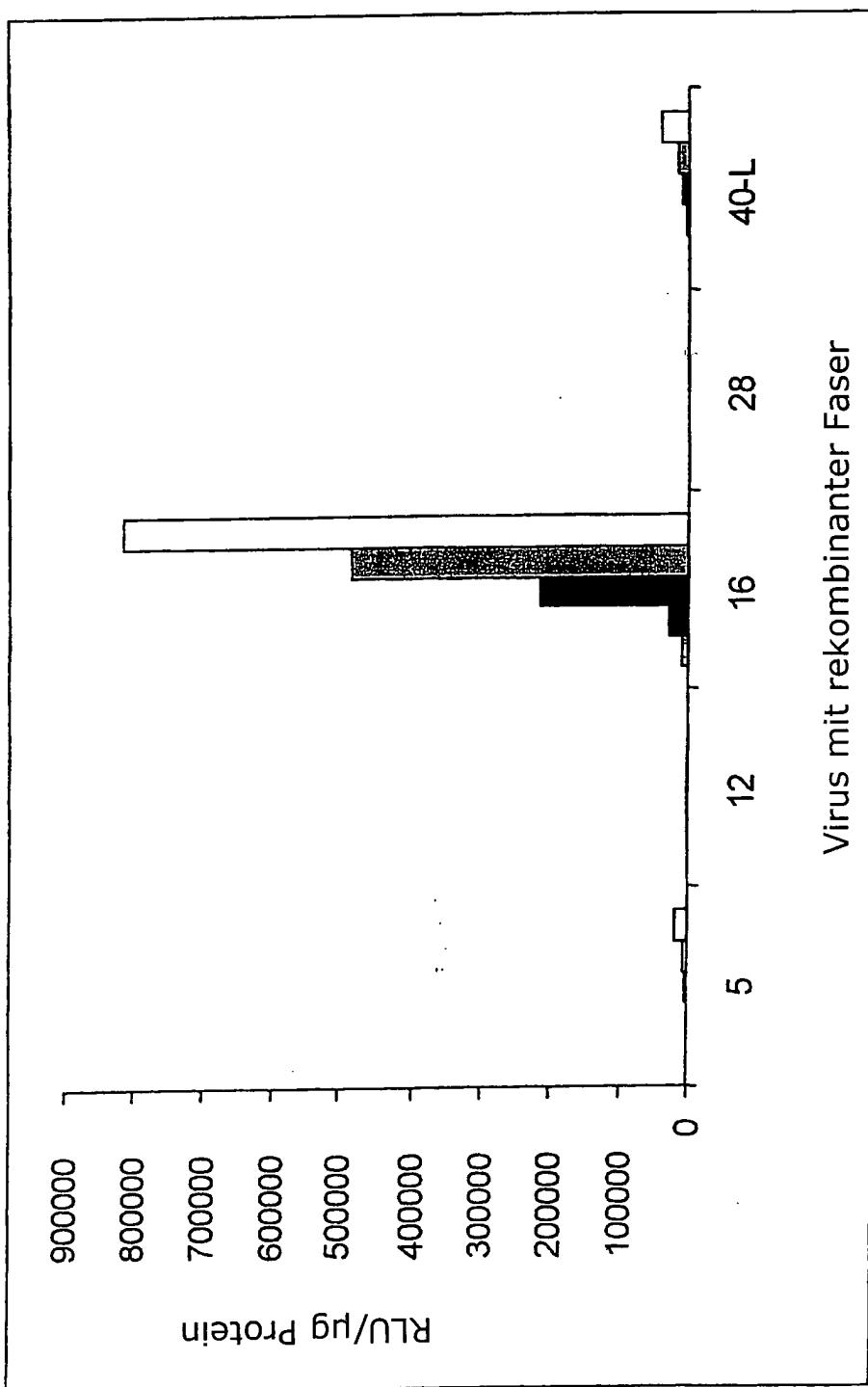
Figure 7b



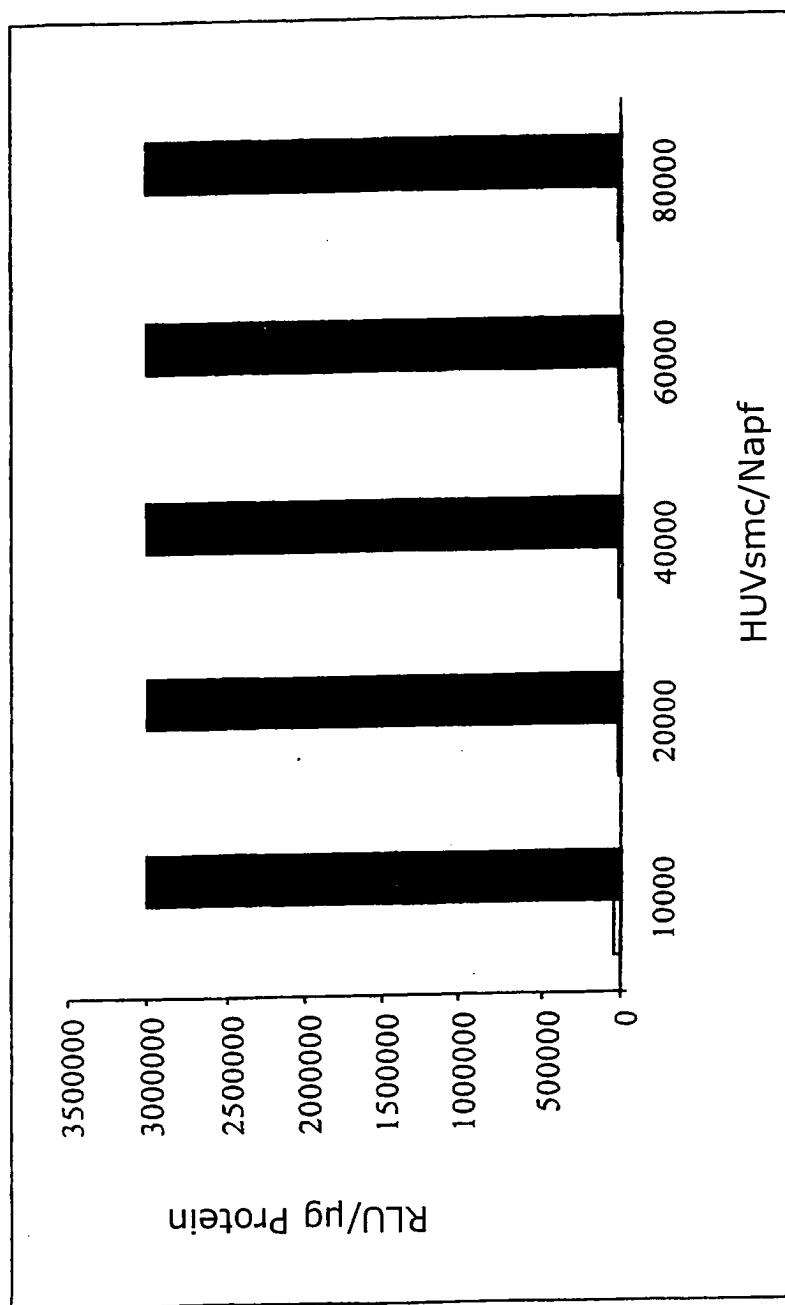
Figur 7c



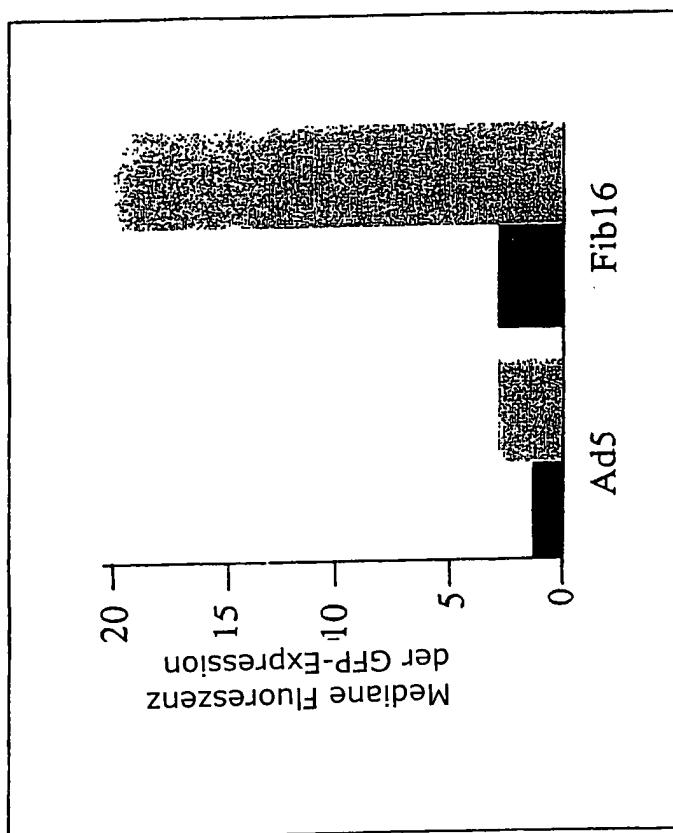
Figur 8a



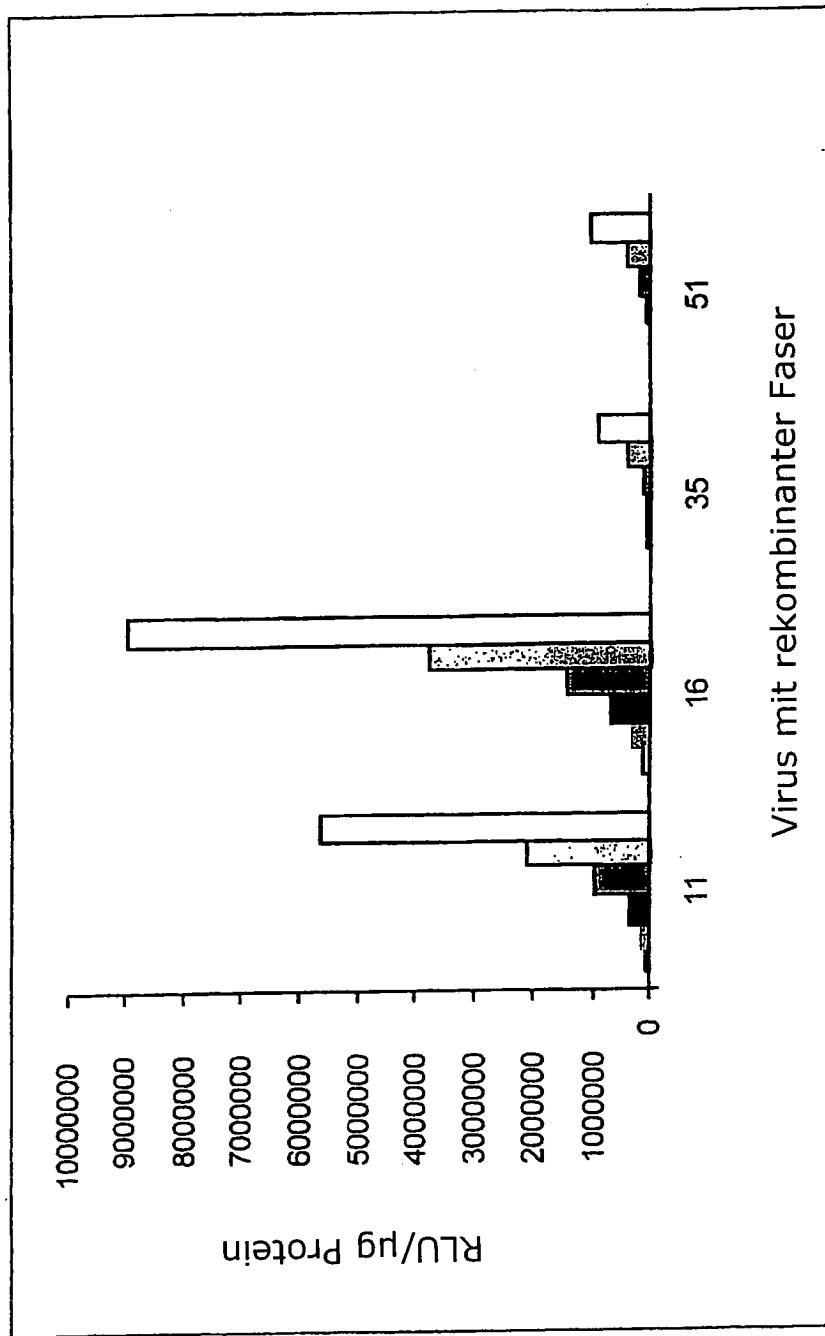
Figur 8b



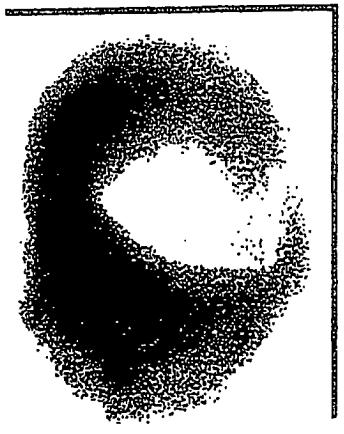
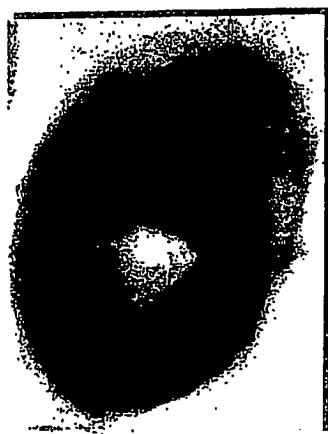
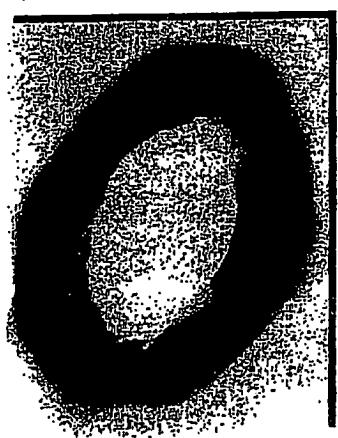
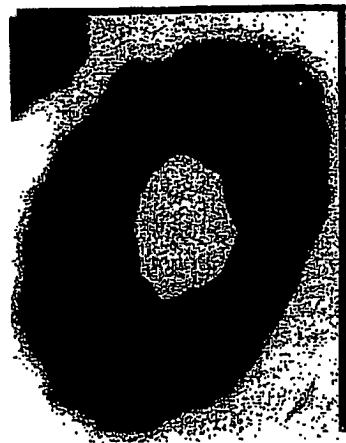
Figur 8c



Figur 8d



Figur 8e:



Figur 8f



Ad5Fiber 51.ntLacZ



Ad5Fiber 16.ntLacZ

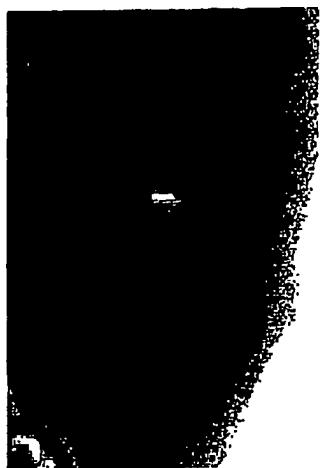


Ad5.ntLacZ

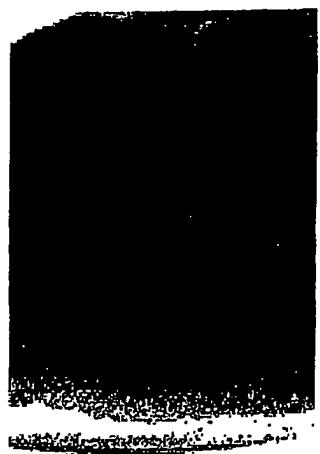


negative Kontrolle

Figur 8g



Ad5Fiber 16.ntLacZ

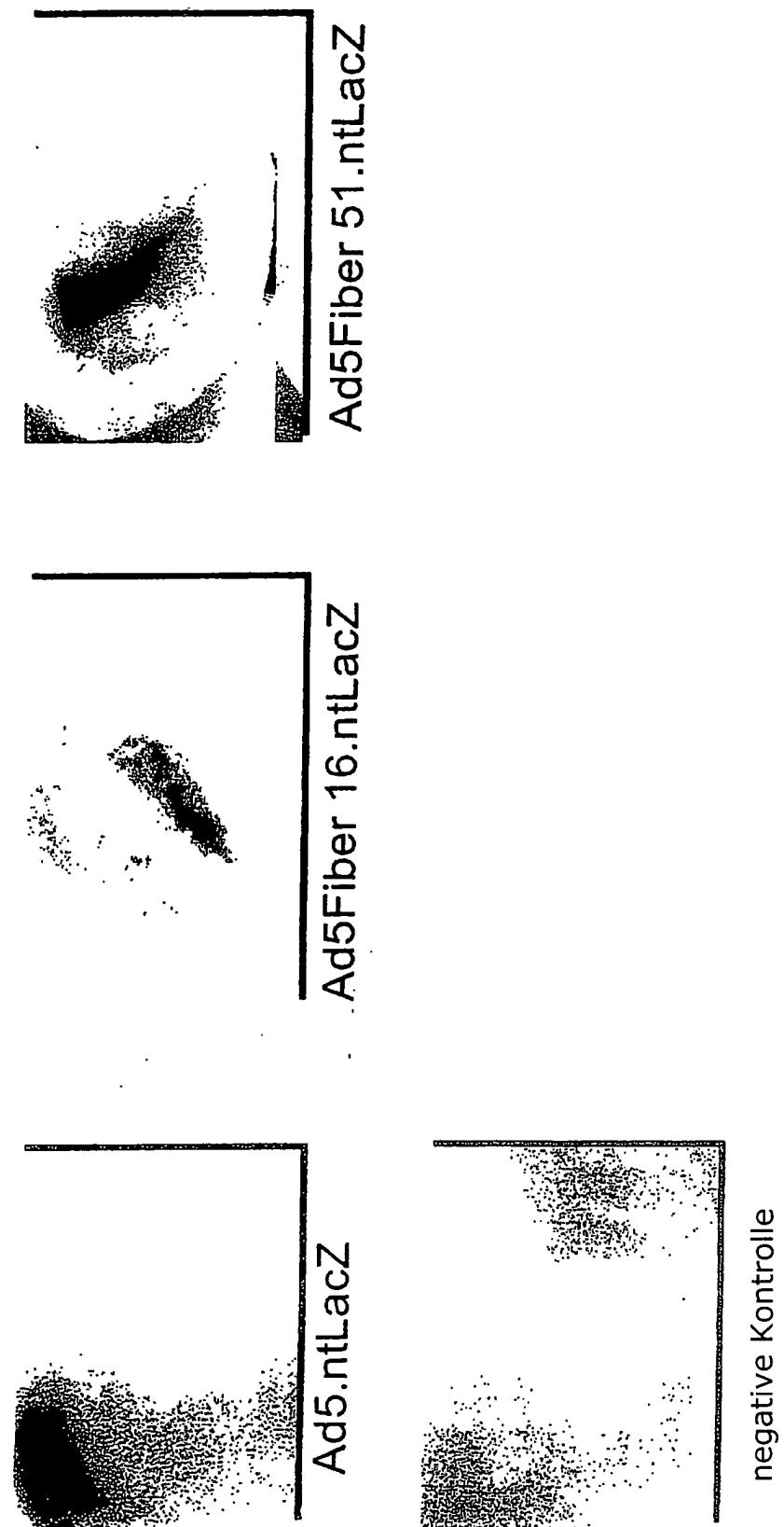


Ad5.ntLacZ



negative Kontrolle

Figur 8h



Figur 9A, Seite 1

Ausrichtungsbericht (ohne Titel) unter Verwendung von Clustal-Methode mit Tabelle der gewichteten Restgewichte.
Donnerstag, 19. November 1998, 18:25

1	A T G G C - - - C A A A C G A G G C T C G G C T A A G C A G C T - - - - -	Ad16 genbank.s
1	A T G T T G T T G C A G A T G A A G C G C G C A A G A C C G T C T G A A G A T A	Ad5/fib16.seq
29	C C T T C A A T C C G G T C T A C C C C T A T G A A G A T G A A A G C A G C T C	Ad16 genbank.s
41	C C T T C A A C C C C G T G T A T C C A T A T G A A G A T G A A A G C A G C T C	Ad5/fib16.seq
69	A C A A C A C C C C T T T A T A A A C C C T G G T T C A T T T C C T C A A A T	Ad16 genbank.s
81	A C A A C A C C C C T T T A T A A A C C C T G G T T C A T T T C C T C A A A T	Ad5/fib16.seq
109	G G T T T T G C A C A A A G C C C A G A T G G A G T T C T A A C T C T T A A A T	Ad16 genbank.s
121	G G T T T T G C A C A A A G C C C A G A T G G A G T T C T A A C T C T T A A A T	Ad5/fib16.seq
149	G T G T T A A T C C A C T C A C T A C C G G C A G C G G A C C C C T C C A A C T	Ad16 genbank.s
161	G T G T T A A T C C A C T C A C T A C C G G C A G C G G A C C C C T C C A A C T	Ad5/fib16.seq
189	T A A A G T T G G A A G C A G T C T T A C A G T A G A T A C T A T C G A T G G G	Ad16 genbank.s
201	T A A A G T T G G A A G C A G T C T T A C A G T A G A T A C T A T C G A T G G G	Ad5/fib16.seq
229	T C T T T G G A G G A A A A T A T A A C T G C C G C A G C G C C A C T C A C T A	Ad16 genbank.s
241	T C T T T G G A G G A A A A T A T A A C T G C C G A A G C G C C A C T C A C T A	Ad5/fib16.seq
269	A A A C T A A C C A C T C C A T A G G T T T A T T A A T A G G A T C T G G C T T	Ad16 genbank.s
281	A A A C T A A C C A C T C C A T A G G T T T A T T A A T A G G A T C T G G C T T	Ad5/fib16.seq
309	G C A A A C A A A G G A T G A T A A A C T T T G T T T A T C G C T G G G A G A T	Ad16 genbank.s
321	G C A A A C A A A G G A T G A T A A A C T T T G T T T A T C G C T G G G A G A T	Ad5/fib16.seq
349	G G G T T G G T A A C A A A G G A T G A T A A A C T A T G T T T A T C G C T G G G	Ad16 genbank.s
361	G G G T T G G T A A C A A A G G A T G A T A A A C T A T G T T T A T C G C T G G G	Ad5/fib16.seq
389	G A G A T G G G T T A A T A A C A A A A A A T G A T G T A C T A T G T G C C A A	Ad16 genbank.s
401	G A G A T G G G T T A A T A A C A A A A A A T G A T G T A C T A T G T G C C A A	Ad5/fib16.seq
429	A C T A G G A C A T G G C C T T G T G T T G A C T C T T C C A A T G C T A T C	Ad16 genbank.s
441	A C T A G G A C A T G G C C T T G T G T T G A C T C T T C C A A T G C T A T C	Ad5/fib16.seq
469	A C C A T A G A A A A C A A C A C C T T G T G G A C A G G C G C A A A A C C A A	Ad16 genbank.s
481	A C C A T A G A A A A C A A C A C C T T G T G G A C A G G C G C A A A A C C A A	Ad5/fib16.seq
509	G C G C C A A C T G T G T A A T T A A A G A G G G A G A A G A T T C C C C A G A	Ad16 genbank.s
521	G C G C C A A C T G T G T A A T T A A A G A G G G A G A A G A T T C C C C A G A	Ad5/fib16.seq
549	C T G T A A G C T C A C T T T A G T T C T A G T G A A G A A T G G A G G A C T G	Ad16 genbank.s
561	C T G T A A G C T C A C T T T A G T T C T A G T G A A G A A T G G A G G A C T G	Ad5/fib16.seq
589	A T A A A T G G A T A C A T A A C A T T A A T G G G A G C C T C A G A A T A T A	Ad16 genbank.s
601	A T A A A T G G A T A C A T A A C A T T A A T G G G A G C C T C A G A A T A T A	Ad5/fib16.seq
629	C T A A C A C C T T G T T T A A A A A C A A T C A A G T T A C A A T C G A T G T	Ad16 genbank.s
641	C T A A C A C C T T G T T T A A A A A C A A T C A A G T T A C A A T C G A T G T	Ad5/fib16.seq
669	A A A C C T C G C A T T T G A T A A T A C T G G C C A A A T T A T T A C T T A C	Ad16 genbank.s
681	A A A C C T C G C A T T T G A T A A T A C T G G C C A A A T T A T T A C T T A C	Ad5/fib16.seq
709	C T A T C A T C C C T T A A A A G T A A C C T G A A C T T T A A A G A C A A C C	Ad16 genbank.s
721	C T A T C A T C C C T T A A A A G T A A C C T G A A C T T T A A A G A C A A C C	Ad5/fib16.seq

Figur 9A, Seite 2

Ausrichtungsbericht (ohne Titel) unter Verwendung von Clustal-Methode mit Tabelle der gewichteten Restgewichte.
Donnerstag, 19. November 1998, 18:26

749	AAAACATGGCTACTGGAACCATAACCAAGTGCCAAAGGCTT	Ad16 genbank.seq
761	AAAACATGGCTACTGGAACCATAACCAAGTGCCAAAGGCTT	Ad5/fib16.seq
789	CATGCCAGCACCAACCGCCTATCCATTATAAACATACGCC	Ad16 genbank.seq
801	CATGCCAGCACCAACCGCCTATCCATTATAAACATACGCC	Ad5/fib16.seq
829	ACTGAGACCCCTAAATGAAGATACATTATGGAGAGTGT	Ad16 genbank.seq
841	ACTGAGACCCCTAAATGAAGATACATTATGGAGAGTGT	Ad5/fib16.seq
869	ACTACAAATCTACCAATGGAACCTCTCTTCCACTAAAAAGT	Ad16 genbank.seq
881	ACTACAAATCTACCAATGGAACCTCTCTTCCACTAAAAAGT	Ad5/fib16.seq
909	TACTGTCACACTAAACAGACGTATGTTAGCTCTGGAAATG	Ad16 genbank.seq
921	TACTGTCACACTAAACAGACGTATGTTAGCTCTGGAAATG	Ad5/fib16.seq
949	GCTATGCTATGAATTTCATGGTCTCTAAATGCAGAGG	Ad16 genbank.seq
961	GCTATGCTATGAATTTCATGGTCTCTAAATGCAGAGG	Ad5/fib16.seq
989	AAGCCCCGGAAACTACCGAACGTCACTCTCATTAACCTCCCC	Ad16 genbank.seq
1001	AAGCCCCGGAAACTACCGAACGTCACTCTCATTAACCTCCCC	Ad5/fib16.seq
1029	CTTCTTTTCTTATATCAGAGAAGATGACTGA	Ad16 genbank.seq
1041	CTTCTTTTCTTATATCAGAGAAGATGACTGA	Ad5/fib16.seq

Dekoration "Dekoration Nr. 1": eingerahmte Reste sind solche, die sich von Ad16 genbank.seq unterscheiden

Figur 9B

Ausrichtungsbericht (ohne Titel) unter Verwendung von Clustal-Methode mit Tabelle der PAM250-Restgewichte.
Donnerstag, 19. November 1998, 18:09

```

1  M A K R A R L S S [- S F N P V Y P Y E D E S S S Q H P F I N Ad16 fiber protein GenBank
1  M [- K R A R [P] S E D [T] F N P V Y P Y E D E S S S Q H P F I N Ad16A fib protein

30  P G F I S S N G F A Q S P D G V L T L K C V N P L T T A S G Ad16 fiber protein GenBank
30  P G F I S S N G F A Q S P D G V L T L K C V N P L T T A S G Ad16A fib protein

60  P L Q L K V G S S L T V D T I D G S L E E N I T A A A P L T Ad16 fiber protein GenBank
60  P L Q L K V G S S L T V D T I D G S L E E N I T A E A P L T Ad16A fib protein

90  K T N H S I G L L I G S G L Q T K D D K L C L S L G D G L V Ad16 fiber protein GenBank
90  K T N H S I G L L I G S G L Q T K D D K L C L S L G D G L V Ad16A fib protein

120 T K D D K L C L S L G D G L I T K N D V L C A K L G H G L V Ad16 fiber protein GenBank
120 T K D D K L C L S L G D G L I T K N D V L C A K L G H G L V Ad16A fib protein

150 F D S S N A I T I E N N T L W T G A K P S A N C V I K E G E Ad16 fiber protein GenBank
150 F D S S N A I T I E N N T L W T G A K P S A N C V I K E G E Ad16A fib protein

180 D S P D C K L T L V L V K N G G L I N G Y I T L M G A S E Y Ad16 fiber protein GenBank
180 D S P D C K L T L V L V K N G G L I N G Y I T L M G A S E Y Ad16A fib protein

210 T N T L F K N N Q V T I D V N L A F D N T G Q I I T Y L S S Ad16 fiber protein GenBank
210 T N T L F K N N Q V T I D V N L A F D N T G Q I I T Y L S S Ad16A fib protein

240 L K S N L N F K D N Q N M A T G T I T S A K G F M P S T T A Ad16 fiber protein GenBank
240 L K S N L N F K D N Q N M A T G T I T S A K G F M P S T T A Ad16A fib protein

270 Y P F I T Y A T E T L N E D Y I Y G E C Y Y K S T N G T L F Ad16 fiber protein GenBank
270 Y P F I T Y A T E T L N E D Y I Y G E C Y Y K S T N G T L F Ad16A fib protein

300 P L K V T V T L N R R M L A S G M A Y A M N F S W S L N A E Ad16 fiber protein GenBank
300 P L K V T V T L N R R M L A S G M A Y A M N F S W S L N A E Ad16A fib protein

330 E A P E T T E V T L I T S P F F F S Y I R E D D . Ad16 fiber protein GenBank
330 E A P E T T E V T L I T S P F F F S Y I R E D D . Ad16A fib protein

```

Dekoration "Dekoration Nr. 1": eingerahmte Reste sind solche, die sich vom Consensus genbank.seq unterscheiden