



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 33 035 T2** 2005.11.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 956 052 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 33 035.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/21169**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 948 396.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/022143**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.11.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **13.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.11.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 48/00**
C12N 15/86

(30) Unionspriorität:

31323 P **19.11.1996** **US**

37081 P **04.02.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

**University of Alabama, Birmingham Research
Foundation, Birmingham, Ala., US**

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

CURIEL, T., David, Birmingham, US

(54) Bezeichnung: **CHIMÄRES RETROVIRUS/ADENOVIRUS SYSTEM**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Querverweis auf verwandte Anmeldung

[0001] Diese Anmeldung beansprucht den Vorteil der provisorischen Anmeldungen 60/031,323, eingereicht am 19. November 1996 und 60/037,081, eingereicht am 4. Februar 1997.

Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf die Bereiche der Molekularbiologie von Vektoren und der Gentherapie. Genauer gesagt, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein chimäres Adenovirus-Vektorsystem und Verfahren für seine Verwendung.

Beschreibung des Standes der Technik

[0003] Viele Gentherapiestrategien für Herz-, Lungen- und Blutkrankheiten basieren auf der stabilen genetischen Modifikation relevanter Parenchymzellen. In vielen Zusammenhängen kann diese nur durch direkte in vivo Genapplikation erreicht werden, wodurch eine stabile Transduktion in situ erreicht wird. Zu diesem Zweck sind verschiedene Virusvektoren entwickelt worden, um deren Integrativfähigkeit als ein Mittel für den Erhalt einer stabilen genetischen Transduktion auszunutzen. Vektoren dieser Art umfassen rekombinante Retroviren und adenoassoziierte Viren (AAV) und sind in ex vivo Gentransferschemen entwickelt worden, um die stabile genetische Modifikation von Targetzellen zu erreichen.

[0004] Trotz der Nützlichkeit von retroviralen und AAV-Vektoren in diesen ex vivo-Umgebungen, ist die Entwicklung dieser Vektoren für die direkte in vivo Genapplikation problematisch gewesen. In dieser Umgebung haben Probleme eines wirksamen Titers und in vivo-Stabilität die Nützlichkeit solcher Vektoren für die vielen Schemen, bei denen eine direkte in situ-Transduktion eines Parenchyms erforderlich ist, eingeschränkt. Auf der anderen Seite können rekombinante Adenovirus-Vektoren mit hohem Titer, die in vivo-Stabilität besitzen, hergestellt werden, wobei dies zwei Faktoren sind, die ihre Entwicklung für eine direkte in vivo Genapplikation auf differenzierte Targetzellen ermöglicht hat. Die Einschränkung von Adenovirus-Vektoren liegt jedoch darin, daß die gewünschte heterologe Genexpression nur vorübergehend ist. Dies basiert zum Teil auf der Tatsache, daß Adenovirus-Vektor-transduzierte Zellen immunologisch durch den Wirt vernichtet werden. Außerdem besitzt das Elternadenovirus nicht die Fähigkeit, sein Genom in das Wirtschromosom zu integrieren.

[0005] Dem Stand der Technik mangelt es an einem effektiven Vektorsystem, das die stabile genetische Modifikation von Zellen nach direkter in vivo Vektorverabreichung ermöglicht. Die vorliegende Erfindung erfüllt den seit langem in der Technik bestehenden Bedarf und Wunsch.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Retrovirale integrative Funktionen können im Zusammenhang mit Adenovirus-Vektoren dazu genutzt werden, ein System herzuleiten, das eine effiziente, stabile Transduktion von Targetzellen in vivo erreichen kann. Die vorliegende Erfindung zeigt, daß retrovirales Vektorverpacken und retrovirale Vektorfunktionen im Zusammenhang mit Adenovirus-Vektorkonstrukten arbeiten können, wobei integrative retrovirale Nachkommenvektoren erfolgreich abgeleitet werden können. In diesem Schema werden Targetzellen induziert, die durch eine Kombination von Adenovirus-Vektor-hervorgerufener Applikation von Retrovirus-Vektor-Sequenzen zusammen mit Adenovirus-Vektorexpression der retroviralen Verpackungsfunktion als vorübergehende retrovirale „Erzeugerzellen“ fungieren. In der in vivo-Umgebung konnte die hoch effiziente Applikation der retroviralen Verpackungs- und Vektorfunktionen an Parenchymstellen über Adenovirus-Vektoren erreicht werden, um dies in situ zu erreichen. Daher könnten lokal synthetisierte Retrovirusvektoren sekundär Nachbarzellen infizieren, um eine stabile genetische Transduktion zu erreichen. Daher ist ein „chimäres“ Vektorsystem entwickelt worden, daß die vorteilhaften Merkmale jedes Komponentenvektors ausnutzt.

[0007] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung Adenovirus-Vektoren zu entwickeln, die retrovirale integrative Funktionen enthalten, und deren in vitro-Entwicklung zur Erreichung einer stabilen Transduktion von Targetzellen zu optimieren.

[0008] Es ist ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung diese chimären Vektoren zu entwickeln, um eine

stabile genetische in vivo-Modifikation von Parenchymzellen, die für Herz-, Lungen- und Blutkrankheiten relevant sind, zu erreichen.

[0009] Die Entwicklung von Adenovirus-Vektoren mit integrativer Fähigkeit würde es ermöglichen, daß diese Vektoren eine stabile Integration von Transgenen in vivo erreichen. Diese Strategie würde daher die vorteilhaften Merkmale jedes Komponentenvektorsystems nutzen, um die stabile Genexpression an Parenchymtargetstellen, die die Möglichkeiten zur Erreichung einer effektiven Genkorrektur im Zusammenhang mit Gentherapieanwendungen für Herz-, Lungen- und Blutkrankheiten verbessern, zu ermöglichen.

[0010] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird ein chimärer Adenovirus/Retrovirus-Vektor bereitgestellt, umfassend: zumindest einen Adenovirus-Vektor, der Retrovirussequenzen enthält.

[0011] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird ein Verfahren zur stabilen Transduktion von Targetzellen bereitgestellt, umfassend den Schritt der Verabreichung des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors der vorliegenden Erfindung an ein Individuum, das einer solchen Behandlung bedarf.

[0012] Andere und weitere Aspekte, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der derzeit bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die zum Zweck der Offenbarung angegeben wird, ersichtlich.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] So wie die Art und Weise wie die oben zitierten Merkmale, Vorteile und Ziele der Erfindung sowie anderes, das deutlich wird, erreicht und genauer verständlich werden, können genauere Beschreibungen der Erfindung, die oben kurz zusammengefaßt wurden, durch Verweis auf bestimmte Ausführungsformen davon, die in den anhängenden Zeichnungen veranschaulicht werden, erhalten werden. Diese Zeichnungen bilden einen Teil der Beschreibung. Es ist anzumerken, daß die anhängenden Zeichnungen jedoch bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung veranschaulichen und daher nicht als deren Umfang einschränkend betrachtet werden sollten.

[0014] [Fig. 1](#) zeigt das Schema der lokalen Erzeugung von Retrovirusvektor an einer Stelle eines Zielorgans. Adenovirus-Vektoren, die retrovirale Vektor- und Verpackungsfunktionen kodieren, vollenden den in vivo-Gen-transfer zu Targetparenchymzellen mit einer hohen Effizienz, was sie zu vorübergehenden Retroviruserzeugern macht. Die lokal synthetisierten Retrovirusteilchen können daher direkt Nachbarzellen infizieren.

[0015] [Fig. 2](#) zeigt (**Fig. 2A**) Chromosomenkarten von Adenovirus-Shuttle-Plasmiden, die retrovirale Verpackungsfunktionen enthalten, und (**Fig. 2B**) Chromosomenkarten von Adenovirus-Shuttle-Plasmiden, die retrovirale Vektorfunktionen enthalten.

[0016] [Fig. 3](#) zeigt die strukturelle Bewertung von Adenovirus-Vektor mittels Molekularanalyse.

[0017] [Fig. 4](#) zeigt Chromosomenkarten von konstruierten Adenovirus-Vektoren, die HGF und KGF für die Induktion der Targetzellproliferation in vivo codieren.

[0018] [Fig. 5](#) zeigt die dauerhafte Genexpression, die mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektorsystems erreicht wurde. Die Targetzellen wurden mit AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg oder AdLNCMVGFp allein infiziert und dann hinsichtlich der stabilen genetischen Transduktion analysiert. Die GFP-Expression in W162-Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bei den angezeigten Zeitpunkten nach der Adenovirus-Vektorinfektion analysiert.

[0019] [Fig. 6](#) zeigt die dauerhafte Genexpression. Die Targetzellen wurden mit AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg oder AdLNCMVGFp allein infiziert und hinsichtlich der stabilen genetischen Transduktion analysiert. **Fig. 6A** zeigt die FACS-Analyse der GFP-Expression in W162-Zellen bei den angezeigten Zeiten nach der Infektion. **Fig. 6B** zeigt eine Analyse der genomischen DNA, die aus W162-Zellen, geerntet an Tag 30 nach der Infektion, extrahiert wurde. Die HMW-DNA der Zellen wurde mit MunI digestiert und mit einem retroviralen Vektorprovirus-Segment untersucht. Die DNA in Bahn 1 wurde aus Zellen extrahiert, die mit AdLNCMVGFp und AdCMVAmpg infiziert wurden; die Bahn 2-DNA wurde aus Zellen extrahiert, die mit AdLNCMVGFp allein infiziert wurde; und Bahn 3 ist eine Kontrolle, die AdLNCMVGFp genomische DNA enthält, die mit MunI digestiert wurde.

[0020] **Fig. 7** zeigt die Derivation von transduzierenden Retrovirusteilchen mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors. Die angezeigten Zellen wurden nur mit AdLNCMVGFp oder AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg behandelt und die Überstände auf Retrovirusvektorteilchen durch das Titrieren an NIH-3T3-Zellen analysiert. Die überständigen behandelten Zellen wurden an Tag 20 durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

[0021] **Fig. 8** zeigt den in vivo-Gentransfer mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors. SKOV3_{ip1}-Zellen wurden intraperitoneal implantiert. **Fig. 6A** zeigt ein Hämatoxylin-gefärbtes intraperitoneales Tumorknötchen. Tiere, die entweder mit **Fig. 6B** AdLNCMVGFp allein oder (**Fig. 6C**) AdLNCMVGFp und AdCMVAmpg angeregt wurden, wurden durch Fluoreszenzmikroskopie auf die Expression von GFP an Tag 16 analysiert.

[0022] **Fig. 9** zeigt den in vivo-Gentransfer mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors. SKOV3_{ip1}-Zellen wurden entweder mit AdLNCMVGFp (**Fig. 9B**) oder AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg (**Fig. 9C**), gemischt mit reinen Tumorzellen und subkutan in athymische nackte Mäuse implantiert, infiziert. An Tag 20 wurden die Tumore geerntet und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

[0023] (**Fig. 9A**) Hämatoxylin-gefärbte Sektion, die aus einem subkutanen Zweivirus Knötchen genommen wurde. SKOV3_{ip1}-Zellen wurden intraperitoneal implantiert und Tiere wurden entweder mit AdLNCMVGFp allein (**Fig. 9E**) oder AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg (**Fig. 9F**) angeregt. Die Analyse fand durch Fluoreszenzmikroskopie für die Expression des GFP, das an Tag 16 aufgezeichnet wurde, statt. (**Fig. 9D**) Ein Hämatoxylin-gefärbtes intraperitoneales Tumorknötchen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0024] Die vorliegende Erfindung ist auf ein Vektorsystem gerichtet, das sowohl hohe Effizienz bei der in vivo-Genapplikation an Zellen nach der vaskulären Verabreichung als auch eine integrative Fähigkeit von heterologen Gensequenzen eine stabile genetische Modifikation von Zellen nach der Transduktion zu erreichen, aufweist. In dem chimären Vektor der vorliegenden Erfindung wird ein Adenovirus-Vektor eingesetzt, um der Zelle für die lokale in situ-Produktion von Retrovirusteilchen in der Zelle retrovirale Funktionen zu verleihen. Dies wird durch die Konstruktion der replikationsarmen Adenovirus-Vektoren, die entweder retrovirale „Verpackungs“-funktionen (Retrovirusgene gag, pol env) oder retrovirale „Vektor“-funktionen (Retrovirus-LTR-Sequenzen, die das „therapeutische“ Gen begleiten) enthalten. Diese Adenovirus-Vektoren können ebenfalls Genprodukte mit hoher Effizienz an Zellen co-applizieren, die auf der anerkannten Adenovirus-Vektoren-Fähigkeit, eine effiziente in vivo-Transduktion nach der vaskulären Vektorverabreichung zu erreichen, basieren.

[0025] Zellen wie Hepatozyten, die mit diesen Adenovirus-Vektoren transduziert wurden, werden dann zu vorübergehenden Retrovirus-Vektor-„Erzeugerzellen“ gemacht. Diese Zellen zeigen vorübergehend Retrovirusvektorfunktionen. Die Zellen können daher Retrovirusteilchen, die das therapeutische Gen enthalten, synthetisieren. Aufgrund der „lokalen“ in situ-Herstellung von Retrovirusteilchen, wird die effiziente Transduktion von Nachbarzellen mit den synthetisierten Retrovirusteilchen erreicht. Dieses Verfahren überwindet daher den obligatorischen Verlust von Retrovirusvektoren, der bei der „fernen“ vaskulären Verabreichung auftritt. Außerdem werden transduzierte „Nachbar“-Zellen aufgrund der Tatsache, daß Retrovirus-Vektoren das Transduktionsereignis erreichen, stabil modifiziert. Dieses Ereignis überwindet daher die prinzipielle Einschränkung von Adenovirus-Vektoren, in dem ein integratives Transduktionsereignis ermöglicht wird.

[0026] Ein einzigartiges Merkmal für dieses chimäre virale Vektorsystem ist daher die Ausnutzung der Adenovirus-Vektor-Applikationselemente, um eine effektive in situ-Retrovirustransduktion zu erreichen. Dieses Konzept kann auf die Applikation anderer Gene erweitert werden, die Zellen ferner für Retrovirus-Vektoren, die „lokal“ erzeugt wurden, empfänglich machen. Im Hinblick darauf wird die Retrovirusinfektion durch die Proliferation von Targetzellen gesteigert.

[0027] Die vorliegende Erfindung ist auf einen chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektor gerichtet, umfassend: zumindest einen Adenovirus-Vektor, der Retrovirussequenzen enthält. Vorzugsweise umfaßt der chimäre Adenovirus/Retrovirus-Vektor: (a) einen replikationsarmen Adenovirus-Vektor, der retrovirale Vektorfunktionen enthält; und (b) zumindest einen replikationsarmen Adenovirus-Vektor, der retrovirale Verpackungsfunktionen enthält. Vorzugsweise umfassen die retroviralen Vektorfunktionen ein heterologes Gen, und ein solches Gen wird von retroviralen langen terminalen Wiederholungen begleitet. Im allgemeinen werden retrovirale Verpackungsfunktionen aus der Gruppe, bestehend aus gag, pol und env, oder Kombinationen hiervon ausgewählt. Ein Fachmann wird erkennen, daß man alternierende env-Gene austauschen kann, um eine Zelle genauer zu targetieren. Beispielsweise ist das env-Gen ein Bläschenstomatitisvirus-G-Glycoprotein wie nachstehend aus-

fürlich beschrieben. Bevorzugt wird das heterologe Gen aus der Gruppe, bestehend aus einem Gen, das ein therapeutisches Protein codiert, einem selektierbaren Marker und einem Reportergen ausgewählt. Ein Fachmann wird erkennen, daß man eine breite Vielzahl an Genen, die Proteine, z. B. therapeutische Proteine, codieren, dazu verwenden kann, um entweder solch ein Protein zu ersetzen, oder um eine spezielle biochemische Aktivität zu verstärken oder zu inhibieren.

[0028] Die vorliegende Erfindung ist ebenso auf ein Verfahren zur stabilen Transduktion von Targetzellen gerichtet, umfassend den Schritt der Verabreichung des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors der vorliegenden Erfindung an ein Individuum, das einer solchen Behandlung bedarf. Vorzugsweise umfaßt der chimäre Adenovirus/Retrovirus-Vektor: (a) einen replikationsarmen Adenovirus-Vektor, der retrovirale Vektorfunktionen enthält; und (b) zumindest einen replikationsarmen Adenovirus-Vektor, der retrovirale Verpackungsfunktionen enthält. Vorzugsweise umfassen die retroviralen Vektorfunktionen ein heterologes Gen, und ein solches Gen wird von retroviralen langen terminalen Wiederholungen begleitet. Im allgemeinen werden retrovirale Verpackungsfunktionen aus der Gruppe, bestehend aus gag, pol und env, oder Kombinationen hiervon ausgewählt. Ein Fachmann wird erkennen, daß man alternierende env-Gene austauschen kann, um eine Zelle genauer zu targetieren. Beispielsweise ist das env-Gen ein Bläschenstomatitisvirus-G-Glycoprotein wie nachstehend ausführlich beschrieben. Bevorzugt wird das heterologe Gen aus der Gruppe, bestehend aus einem Gen, das ein therapeutisches Protein codiert, einem selektierbaren Marker und einem Reportergen ausgewählt. Ein Fachmann wird erkennen, daß man eine breite Vielzahl an Genen, die Proteine, z. B. therapeutische Proteine, codieren, dazu verwenden kann, um entweder solch ein Protein zu ersetzen, oder um eine spezielle biochemische Aktivität zu verstärken oder zu inhibieren. Unter Verwendung der nachstehend beschriebenen Verfahren kann man einen replikationsarmen Adenovirus-Vektor, der retrovirale Vektorfunktionen enthält verabreichen; und der replikationsarme Adenovirus-Vektor, der retrovirale Verpackungsfunktionen enthält, wird in eine Wirtszelle co-transduziert, wobei die Expression der Gene, die durch den Adenovirus-Shuttle-Vektor codiert wurden, zu der Erzeugung von Retrovirusteilchen, die das therapeutische Gen enthalten, führt, wobei die Retrovirusteilchen Nachbarzellen infizieren, wobei die Retrovirusteilchen das therapeutische Gen stabil in die genomische DNA der Wirtszellen integrieren.

[0029] Ein Fachmann wird erkennen, daß man den chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektor der vorliegenden Erfindung durch verschiedene Manipulationen speziell targetieren kann. Beispielsweise kann man die Faser- oder die Knobkomponente des Adenovirus-Vektors, zum Beispiel durch die Einführung eines Liganden, der einen Zelloberflächenrezeptor speziell erkennt, genetisch modifizieren. Alternativ kann man den Adenovirus immunologisch unter Verwendung von einkettigen Antikörpern von Fab-Fragmenten wie sie in der Technik bekannt sind, targetieren.

[0030] Die folgenden Beispiele werden zum Zweck der Veranschaulichung verschiedener Ausführungsformen der Erfindung angegeben und sollen die vorliegende Erfindung in keinstenweise Weise einschränken.

Beispiel 1

Entwicklung von Adenovirus-Vektoren die retrovirale integrative Funktionen für eine stabile Transduktion von Targetzellen enthalten

[0031] Um eine dauerhafte heterologe Genexpression nach einer effizienten in vivo-Genapplikation zu erreichen, können retrovirale integrative Merkmale mit Adenovirus-Vektorsystemen gekoppelt werden. Dies wird durch den Einsatz replikationsarmer Adenovirus-Vektoren herbeigeführt, um sowohl retrovirale Verpackungsfunktionen als auch Retrovirusvektorsequenzen an Targetzellen in situ zu applizieren. Die co-transduzierten Zellen fungieren dann als Retrovirusproduziererzellen. In diesem Schema transduzieren die lokal synthetisierten Retrovirusteilchen stabil „Nachbarzellen“ in das umgebende Parenchym, wodurch eine effiziente Integration von Transgensequenzen der relevanten Zielorgane für Gentherapie zwecke erreicht wird. Die Fähigkeit der Adenovirus-Vektoren, relevante Retrovirusfunktionen für die effiziente Induktion von Targetzellen, die als Retrovirusproduziererzellen fungieren, zu applizieren, wird gezeigt.

Beispiel 2

Plasmidvektoren und -zellen

[0032] Um die Adenovirus/Retrovirus-Chimere zu erzeugen wurden zuerst einzelne Elemente der Retrovirusgenomkomponenten in zwei unterschiedliche Adenovirus-Shuttle-Vektoren eingeführt, die mit pCAmpg und pΔE1LNCX bezeichnet werden. Es wurden ebenso Shuttle-Vektoren erzeugt, die Reportergene enthalten, was

zu pΔE1LNCMVGFp, das die grüne fluoreszierende Protein (GFP)-cDNA codiert, und pΔE1LNCMVLacZ, das das Escherichia coli β-Galactosidase (LacZ) Gen codiert, führt.

[0033] Für pCAAmpg wurden die DNA-Fragmente, die das Retrovirus gag/pol und amphotrope env-Gene codieren, aus pPAM3 (bereitgestellt von Dr. Dusty A. Miller, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) in einem Zweischritt-PCR/Restriktionsdigestionsverfahren wie folgt isoliert: ein 133 bp PCR-Fragment, das die gag/pol-Transkriptionsinitiationsstelle umfaßt, wurde aus pPAM3 unter Verwendung eines Upstream-Primers, 5'-gggaagcctatgggccagactgttaccac (SEQ ID Nr. 1), der eine HindIII-Stelle enthält, und eines Downstream-Primers, 5'-caaggctcccaggtcacgatgttagg (SEQ ID Nr. 2), der eine interne PstI-Stelle enthält, verstärkt. Dieses Fragment wurde mit HindIII und PstI vor dem Klonen digeriert. Das verbleibende 7,0 kb gag/pol/env-Segment wurde aus pPAM3 mit PstI-HpaI-Digestion erhalten. Die beiden Retrovirusfragmente wurden in den Adenovirus-Shuttle-Vektor pCA13 (Microbix Biosystems Inc., Ontario, Canada) bei HindIII-EcoRV-Stellen dreifach ligiert, um den pCAAmpg-Vektor (13,9 kb) zu erhalten.

[0034] Um einen Adenovirus-Shuttle-Vektor zu konstruieren, der retrovirale Integrationssequenzen, Neomycin-beständige cDNA, einen CMV-Promoter und mehrere Klonstellen enthält, wurde der Retrovirus-Vektor pLNCX (Dr. A. Dusty Miller) teilweise mit EcoRI und HindIII digeriert, um ein 3,6 kb Fragment zu erhalten. Dieses Fragment wurde anschließend in eine modifizierte Version von pZero-1TM (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) subkloniert, worin eine ClaI-Stelle durch eine stille Mutation zwischen den EcoRV- und NotI-Stellen eingeführt wurde. Das resultierende Konstrukt wurde als pEH3,6 gekennzeichnet. Die verbleibende Retrovirus-Vektorsequenz wurde durch ApaI- und HindIII-Digestion erhalten und das verbleibende Fragment wurde in pZero-1TM an HindIII- und EcoRV-Stellen subkloniert, damit es pHA0,9 ergab. Das 3,6 kb ClaI-HindIII-Fragment aus pEH3,6 und das 1,0 kb HindIII-XhoI-Fragment aus pHA0,9 wurden in pΔE1SP1A (Microbix, Biosystems Inc.) an ClaI- und XhoI-Stellen dreifach ligiert, um pΔE1LNCX zu erzeugen. Das 0,9 kb GFP cDNA-Segment wurde aus pEGFP-N1 (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) durch HindIII-HpaI-Digestion exzidiert und in pΔE1LNCX an HindIII- und HpaI-Stellen subkloniert. Ein ähnliches Schema wurde verwendet, um pΔE1LNCMVLacZ aus pΔE1LNCX zu konstruieren. Die Shuttle-Vektoren pCAAmpg, pΔE1LNCX, pΔE1LNCMVGFp, pΔE1LNCMVLacZ wurden durch Restriktionsenzymanalyse bestätigt und unter Verwendung des USB 70770-Sequenzierungskits (Amersham, Cleveland, Ohio, USA) teilweise sequenziert.

[0035] NIH-3T3-Fibroblasten, 293 Zellen, EJ-Blasenkarzinomzellen (ATCC, Rockville, Maryland), W162 (Gary Ketner, Princeton University) und SKOV3_{ip1}-Zellen (Dr. Janet Price, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) wurden in Vollmedium, das aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F12, Mediatech, Inc.; Washington, D. C.), angereichert mit 10% fetalem Rinderserum (FBS, Hyclone; Logan, UT), 2 mM Glutamin (Mediatech) und Penizillin/Streptomycin (Cellgro Mediatech), besteht, gehalten. Alle Zellen wurden bei 37°C in 5% CO₂ gehalten.

Beispiel 3

Erzeugung von rekombinanten Adenovirus-Vektoren

[0036] E1A/B- und E3-deletierte replikationsarme rekombinante Adenovirus-Vektoren wurden durch ein homologes in vitro-Rekombinationsverfahren erzeugt. In diesen Studien wurden die pCAAmpg-, pΔE1LNCMVLacZ- oder pΔE1LNCMVGFp-Shuttle-Plasmide mit pBGH11 (Microbix Biosystems Inc.) in 293 Zellen co-transfiziert, um AdCMVampg, AdLNCMVLacZ bzw. AdLNCMVGFp zu erzeugen. Jeder Adenovirus wurde durch drei Runden Plaquereinigung geführt, und anschließend durch PCR-Analyse und Restriktionsenzymkartierung bestätigt. Rekombinante Adenoviren wurden auf der permissiven 293 Zelllinie vermehrt, zweimal durch CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt und unter Verwendung von Standardverfahren der Plaque-Titer bestimmt.

Beispiel 4

Retrovirusteilchenerzeugung und -detektion

[0037] Zellen wurden in 100-mm-Gewebekulturplatten (10⁶ Zellen/Platte) in Vollmedium, das 10% FKS enthält, plattiert und über Nacht bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Für den Ausgangstest der Plasmidkonstrukte wurden 293 Zellen durch Calcuimphosphatausfällung mit entweder pΔE1LNCMVLacZ plus pCAAmpg oder mit pLNCX und pPAM3 transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Vollmedium gespeist. 48 h nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet und zur Bestimmung des Retrovirustiters auf NIH-3T3-Zellen verwendet. Für die Adenovirusinfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch

DMEM/F12 plus 2% FKS, das entweder AdCMVAmpg plus AdLNCMVGFp, oder AdLNCMVGFp allein enthält, bei einem Verhältnis von 50 plaquebildenden Einheiten (pfu)/Zelle für jede Gruppe ersetzt. Nach 3 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mehrere Male mit PBS gespült und mit Vollmedium gespeist. Die Retrovirusproduktion wurde entweder direkt durch das Titern des Überstandes 48 h nach der Infektion, oder indirekt durch Überwachung der Nachbarzellen in bezug auf Retrovirusinfektion bestimmt. Langzeitkulturen für eine stabile Integration wurden bei Intervallen von 8 Tagen durchgeführt. Der Retrovirustiter wurde auf NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Für diese Analyse wurde der Kulturüberstand aus Retrovirusproduktionszellen geerntet, filtriert (0,45 µm) und bei einem 1 : 1-Verhältnis zu Vollmedium plus 10 mg/ml Polybrene zu Rezipientenzellen zugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen, die LacZ exprimieren, durch X-gal-Histochemie visualisiert, und der Titer wurde durch die Quantifizierung der gesamten blauen Zellen/Schale bestimmt. Der Titer wurde als infektiöse Virionen/ml ausgedrückt.

Beispiel 5

Assay für LacZ, GFP und replikationsfähiges Retrovirus (RCR)

[0038] Die zelluläre Expression von LacZ wurde quantitativ durch die Färbung mit X-gal(5-Brom-4-chlor-3-indyl-β-D-galactosid) analysiert. Die Zellen wurden mit 0,25% Glutaraldehyd/0,1 M Natriumphosphat für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, gefolgt vom Waschen mit PBS und der Inkubation über Nacht mit X-gal-Färbungslösung (0,2% X-gal/2 mM MgCl₂/4 mM K₄Fe(CN)₆/4 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O in PBS) bei Raumtemperatur. X-gal positive (blaue) Zellen wurden unter Lichtmikroskopie gezählt. Die zelluläre GFP-Expression wurde quantitativ durch FACS-Analyse und durch Visualisierung unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie gemäß dem Protokoll des Herstellers analysiert (Clontech, CA, USA).

[0039] Katzen-S⁺L⁻(PG-4)-Zellen wurden in McCoy's 5A Medium (Bio Whittaker, Walkersville, MD) plus 15% FKS in 60 mm Kulturschalen ungefähr 24 h vor der Inokulation ausgesät. Fünf Wiederholungsschalen wurden mit 0,2 ml Probeverdünnungen inokuliert; 1 und 10 Herde-bildende Einheiten aus amphotropen Rattenretroviren 4070A als eine positive Kontrolle; und Kulturmedium, das als eine negative Kontrolle dient. Nach einer 2stündigen Adsorptionszeit bei 36 ± 2°C und mit frischem Medium gespeist, wenn notwendig, wurden für einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen die Herde der transformierten Zellen in den positiven Kontrollschalen vollständig entwickelt. Die Schalen wurden mikroskopisch überprüft, und die Herde wurden gezählt. Der Assay lieferte das gewünschte Ergebnis, wenn in den negativen Kontrollen keine Herde beobachtet wurden, und die positiven Kontrollverdünnungen einen mittleren Titer in einem log des bestätigten mittleren Titers der positiven Kontrollviruscharge zeigten.

Beispiel 6

In vivo-Experimente und Provirusintegration

[0040] Weiblichen nackten Mäusen (4 bis 6 Wochen alt) wurden i. p. 1 × 10⁷ SKOV3_{ip1}-Zellen injiziert. Fünf Tage danach wurde den Tieren i. p. entweder AdCMVAmpg plus AdLNCMVGFp, oder AdLNCMVGFp allein (1 × 10⁹ pfu pro Maus für jeden Virus) injiziert. Die Tiere wurden 16 Tage nach der Adenovirusreizung getötet. Die Tumorknötchen wurden geerntet, in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert, geteilt und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für subkutane Mischstudien wurden SKOV3_{ip1}-Zellen ex vivo bei 50 pfu/pro Zelle infiziert. Sechzehn Stunden nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, geerntet, gezählt und bei einem Verhältnis von 1 : 4 mit nicht infizierten SKOV3_{ip1}-Zellen gemischt. Insgesamt 5 × 10⁶ gemischte Zellen wurden subkutan in die Flanken nackter Mäuse injiziert. Die Tiere wurden an Tag 20 nach der Injektion getötet. Tumorknötchen wurden für die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie geerntet.

[0041] Um die Provirusintegration aufzuzeichnen wurde die DNA-Fraktion mit hohem Molekulargewicht aus Adenovirus-behandelten Zellen extrahiert. Die DNA wurde MnlI-digert, auf einem 0,8% Agarosegel gelöst und mit einem 32P-markierten 1,4 kb Fragment, das eine Retrovirus-Vektorsequenz enthält, geprüft, das durch PCR-Amplifizierung von AdLNCMVGFp von 4,8 kb bis 6,2 kb erhalten wurde. Die DNA-Markierung, der Membrantransfer, die Hybridisierung und das Waschverfahren wurden gemäß dem Protokoll der Hersteller (Amersham) durchgeführt.

Synthetisierung von Retrovirusteilchen an Parenchymzielstellen zur Erreichung einer stabilen Transduktion von Nachbarzellen

[0042] Die vorliegende Erfindung entwickelte ein „Komposit“-Vektorsystem, das die hoch effiziente in vi-v-Genapplikationcharakteristiken rekombinanter Adenovirus-Vektoren mit den integrativen Fähigkeiten, die aus Retroviren stammen, vereinigt. Dies wird erreicht, indem Adenovirus-Vektor-infizierte Targetzellen mittels der Adenovirus-Vektor-hervorgerufenen Applikation von retroviralen Verpackungsfunktionen und Retrovirusvektorsequenzen zu vorübergehenden „Retroviruserzeugerzellen“ gemacht werden. Auf diese Weise können die lokal synthetisierten Retrovirus-Vektoren benachbarte Parenchymzellen mittels eines Integrativvektors infizieren. Die konzeptionelle Grundlage dieses Ansatzes wird in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0043] Als ein erster Schritt in Richtung der Implementierung dieser Strategie wurden Adenovirus-Vektoren, die Retrovirusvektorsequenzen und retrovirale Verpackungsfunktionen codieren, abgeleitet. Die Ableitung dieser Adenovirus-Vektoren basiert auf den Verfahren, in denen ein Adenovirus „Shuttle“-Vektor, der das Transgen enthält, mit dem Adenovirus-verpackenden Plasmid pJM17 cotransfiziert wird. Die Rekombination der homologen Bereiche in diesen Plasmiden führt zu einem replikationsarmen, E1A/8-deletierten Adenovirus-Vektor. Wenn die Adenovirus-Shuttle-Plasmide den intakten Expressionskassetten für die Adenovirus-Vektor-Einführung enthalten, liefern sie die Mittel für die Bestätigung der funktionellen Nützlichkeit der Transgensequenzen a priori. Basierend auf diesem Konzept, wurde eine Reihe an Adenovirus-Shuttle-Vektor-Plasmiden, die relevante retrovirale Transgensequenzen enthalten, abgeleitet.

[0044] Somit wurde eine Reihe von Plasmiden mit Retrovirusfunktionen, gag/pol/env, gag/pol oder env in den Polylinker des Adenovirus-Shuttle-Vektors pCA13 ([Fig. 2](#)) geklont.

[0045] Diese Vektoren würden somit die Expression der angezeigten retroviralen Verpackungsfunktionen über einen CMV-intermediären/frühen Enhancer-Promoter ermöglichen. Außerdem wurden Adenovirus-Shuttle-Plasmide, die Retrovirusvektorsequenzen codieren, abgeleitet. In diesem Fall, würde der vorhergesehene Adenovirus-Vektor als ein hoch effizientes Applikationsvehikel der codierten Transgensequenzen agieren. Diese Retrovirusvektorsequenzen würden dann zu Retrovirusteilchen verpackt werden, ein Verfahren, für das die Vektorexpression in Targetzellen nicht erforderlich ist. Daher wurden in diesen Fällen Retrovirusvektorsequenzen, die entweder ein E. coli β -Galactosidase (LacZ)-Gen, in Verbindung mit einem Neomycin-selektierbaren Marker, oder das Reportergen grün fluoreszierendes Protein (GFP) ebenso in Verbindung mit einem Neomycin-selektierbaren Marker codiert, zu einem Polylinker des „promoterlosen“ Adenovirus-Shuttle-Vektors ([Fig. 2](#)) geklont.

[0046] Diese retroviralen Vektorgenkonstrukte enthalten die angezeigten Marker/Reportersequenzen, die von intakten retroviralen langen terminalen Wiederholungen (LTRs) begleitet werden. Dies wurde erreicht, da diese Funktionen die minimalen Sequenzen sind, die in cis erforderlich sind, um die Retrovirusvektorintegration zu ermöglichen. Diese Plasmide wurden nach der Konstruktion alle durch indirekte Analyse mit Restriktionsendonukleasedigestion und direkte Analyse durch Dideoxykettenterminierungssequenzierung bestätigt.

[0047] Die funktionelle Analyse wurde dazu verwendet, um die Arbeitsweise von retroviralen Verpackungsfunktionen im Zusammenhang mit dem Adenovirus-Shuttle-Plasmid zu bestätigen. Für diese Studie wurde die Nützlichkeit des Adenovirus-Shuttle-Plasmids, das retrovirale Verpackungsfunktionen enthält (pCAAmpg) mit der Nützlichkeit eines Standardpackplasmids, pPAM3, das die ecotropen Retrovirusgene gag/pol/env enthält, unter der Kontrolle von Moloney Leukemia Virus (MLV) LTR verglichen. Diese Plasmide wurden auf ihre Fähigkeit zur Sicherung der Retrovirusvektorsequenzen aus dem Kontroll-Retrovirusvektor-Plasmid pLNCLZ analysiert, die die Retrovirusvektorkassette enthält, wobei das LacZ-Reportergen von Retrovirus-LTRs begleitet wird. Nach der Co-transfektion der Plasmide zu 293 Zellen wurden die Überstände geerntet und zur Infizierung der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 durch Standardverfahren verwendet. Die Zellen wurden dann 48 Stunden nach der Infektion nach dem Färben für das LacZ-Produkt mit X-gal-Immunohistochemie visualisiert.

[0048] Die funktionelle Bewertung der Adenovirus-Shuttle-Plasmide, die retrovirale Verpackungsfunktionen enthalten, zeigten, daß 293 Zellen mit den angezeigten Plasmiden durch CaPO_4 transduziert wurden und die Überstände zur Infizierung von NIH-3T3-Zellen mit X-gal-Färbung bei 48 h für das Produkt des LacZ-Gens verwendet. Die Transfektionen waren mit: a) pPAM3 und pLNCLZ; b) pPAM3; c) pLNCLZ und d) pCAAmpg und pLNCLZ. Die Transfektion mit pPAM3 und pLNCLZ war positiv. Die Transfektion mit pPAM3 und pLNCLZ war negativ. Die Transfektion mit pCAAmpg und pLNCLZ war positiv.

[0049] Die Co-transfektion der Kontrollplasmide pPAM3 und pLNCRZ ergab Retrovirustransduzierungsteilchen, wie durch die Gegenwart von LacZ-positiven NIH-3T3 Zellen angezeigt. Im Gegensatz dazu ergab die Transfektion mit einem dieser beiden Plasmide allein keine transduzierenden Retrovirusteilchen. Als nächstes wurde dann die Co-transduktion des Adenovirus-Shuttle-Vektors, der retrovirale Verpackungsfunktionen (pCAAmpg) codiert, mit dem Retrovirusvektorplasmid pLNCLZ durchgeführt. Was die Co-transfektion mit beiden Kontrollplasmiden (pPAM3 und pLNCLZ) betrifft, wurden in dieser Analyse LacZ-transduzierende Retrovirusteilchen abgeleitet. Daher sind retrovirale Verpackungsfunktionen für die Retrovirusteilchenableitung im Zusammenhang mit einem Adenovirus-Shuttle-Plasmid nutzbar.

[0050] Studien waren auf die Bestimmung gerichtet, ob Retrovirusvektorsequenzen aus einem Adenovirus-Shuttle-Plasmid isoliert werden könnten. Für diese Analyse wurden Retrovirusteilchen abgeleitet und transduzierende Teilchen wurden wie oben beschrieben analysiert. Das Verpackungsplasmid, das für diese Analyse eingesetzt wurde, war pPAM3. Es wurde zur Isolierung von Retrovirusteilchen entweder aus einem herkömmlichen Retrovirusvektorplasmid, pLNCLZ, das ein LacZ-Gen enthält, das von Retrovirus-LTRs begleitet wird, oder aus einem Adenovirus-Shuttle-Plasmid, das dasselbe LTR-neo-CMV-LacZ-LTR-Segment (pΔE1LNCMVlacZ) enthält, verwendet. Wie vorstehend erzeugte die Co-transfektion von 293 mit pPAM3 und pLNCLZ LacZ-transduzierende Retrovirusteilchen, wie durch X-gal-Färbung von NIH-3T3-Indikatorzellen angezeigt. Außerdem besaß kein Plasmid allein diese Fähigkeit. Wichtig ist, daß ebenso gezeigt werden konnte, daß die Co-transfektion des Adenovirus-Shuttle-Plasmids, das die Retrovirus-Vektorsequenz, pΔE1LNCMVlacZ, enthält, mit dem retroviralen Kontroll-Verpackungsplasmid, pPAM3, LacZ-transduzierende Retrovirusteilchen erzeugte.

[0051] Die funktionelle Bewertung der Adenovirus-Shuttle-Plasmide, die retrovirale Vektorfunktionen enthalten, wurde durchgeführt. Für diese Analyse wurden 293 Zellen mit den angezeigten Plasmiden durch CaPO_4 transduziert und die Überstände zur Infizierung von Target-NIH-373-Zellen mit X-gal-Färbung bei 48 h für das Produkt des LacZ-Gens verwendet. Die Transfektionen waren mit: a) pPAM3 und pLNCLZ; b) pPAM3; c) pLNCLZ; und d) pPAM3 und pΔE1LNCMVlacZ. Die Transfektion mit pPAM3 und pLNCLZ war positiv; die Transfektion mit pPAM3 war negativ; die Transfektion mit pLNCLZ war negativ und die Transfektion mit pPAM3 und pΔE1LNCMVlacZ war positiv. Daher können Retrovirusvektoren aus Adenovirus-Shuttle-Plasmiden für die Ableitung von transduzierenden Teilchen isoliert werden.

[0052] Diese Studien haben daher unabhängig anerkannt, daß retrovirale Verpackungs- und Vektorfunktionen im Zusammenhang mit Adenovirus-Shuttle-Plasmiden arbeiten können, um die Erzeugung von in vivo-Retrovirusteilchen zu ermöglichen. Es war wichtig zu demonstrieren, daß diese Funktionen, wenn beide in einer Adenovirus-Shuttle-Plasmid-Umgebung vorkommen, auch dazu dienen, Retrovirusteilchen zu erhalten. Für diese Analyse wurde die Fähigkeit von retroviralen Verpackungsfunktionen in einem Adenovirus-Shuttle-Vektor, pCAAmpg, bewertet, retrovirale Vektorfunktionen in dem Adenovirus-Shuttle-Vektorplasmid, pΔE1LNCMVlacZ, zu isolieren. Kontrollexperimente mit pPAM3 und pLNCLZ bestätigen die Fähigkeit, daß in diesem Assay Teilchen abgeleitet werden können. Außerdem ergab die Kontrolltransfektion mit pCAAmpg oder pΔE1LNCMVlacZ unabhängig davon ebenso keine Teilchen. Die Co-transfektion dieser beiden Plasmide ergab jedoch LacZ-transduzierende Retrovirusteilchen, wie es in der positiven Kontrollstudie angemerkt wurde.

[0053] Die funktionelle Bewertung der Adenovirus-Shuttle-Plasmide, die Retrovirusvektorfunktionen enthalten, wurde vorgenommen. Der Transfektions- und Überstandsassay war wie oben beschrieben. Die Transfektionen waren mit: a) pPAM3 und pLNCLZ; b) pCAAmpg; c) pΔE1LNCMVlacZ; und d) pCAAmpg und pΔE1LNCMVlacZ. Die Transfektion mit pPAM3 und pLNCLZ war positiv; die Transfektion mit pCAAmpg war negativ; die Transfektion mit pΔE1LNCMVlacZ war negativ und die Transfektion mit pCAAmpg und pΔE1LNCMVlacZ war positiv. Daher bestätigte dieses Experiment die Erzeugung von Retrovirusteilchen aus Adenovirus-Shuttle-Plasmiden, die die minimal erforderlichen retroviralen Funktionen enthalten. Diese Entdeckung bestätigt daher den Grund der Ableitung von Adenovirus-Vektoren, die auf dieser Basis konstruiert wurden.

[0054] Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Adenovirus-Vektoren konstruiert, die retrovirale Verpackungsfunktionen oder Retrovirusvektorfunktionen codieren. Diese Vektoren wurden durch Standardverfahren mittels der Co-transfektion der angezeigten Shuttle-Plasmide mit dem Adenovirus-Verpackungsplasmid pJM17 wie vorstehend beschrieben, erzeugt. Isolierte Plaques wurden dann erweitert, bezüglich der Identität durch Polymerasekettenreaktion (PCR) bestätigt, und mittels drei Durchläufen plaquegereinigt. Nach der Erweiterung wurde die Identität der Vektoren durch Restriktionsendonukleasedigestion und PCR-Analyse der heterologen DNA-Segmente des E1A-Bereiches an dem Adenovirusgenom bestätigt. Ein Beispiel für diese Be-

stätigung wird in [Fig. 4](#) gezeigt. Diese Vektoren sind alle E1A/B-deletierte, replikationsunfähige Adenovirus-Vektoren. Diese Vektoren wurden in vitro auf die funktionelle Nützlichkeit ihrer retroviralen Verpackungs- und Vektorfunktionen charakterisiert, wie es für die entsprechenden Shuttle-Plasmide getan wurde. Die Demonstration der funktionellen Nützlichkeit dieser Retrovirussegmente im Zusammenhang mit dem Adenovirus-Vektor ermöglicht die Durchführung von in vivo-Studien.

[0055] Basierend auf diesen Konzepten offenbart die vorliegende Erfindung eine Strategie, worin Adenovirus-Vektoren eingesetzt werden, um Wachstumsfaktoren an das relevante Targetparenchym zu applizieren, um die Proliferation zu induzieren. Diese Manipulation kann in Verbindung mit der in situ-Erzeugung von Retrovirus-Vektor mittels Adenovirus-hervorgerufener Genapplikation von Retrovirus-Vektor- und/oder Verpackungsfunktionen eingesetzt werden. In diesem Verfahren erreichen Adenoviren eine sehr effiziente in vivo-Genapplikation an Targetparenchym von relevanten Wachstumsfaktorgenen. Die sehr effiziente Applikation an den relevanten Stellen ermöglicht hohe lokale Konzentrationen an den zu erreichenden Wachstumsfaktoren, mit erhöhter Induktion der Targetzellproliferation.

[0056] Die chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektoren sind konfiguriert und ihre Funktion bewertet worden. Der rekombinante Adenovirus, der die Retrovirusvektorsequenzen, AdLNCMVlacZ, enthält, ist konstruiert und seine Funktionalität bewertet worden. Eine Strategie wurde abgeleitet, um eine hohe, vorübergehende Transfektion einer Nicht-293-Zelllinie mit retroviralen Verpackungsfunktionen zur Bestimmung, ob Retrovirusvektorsequenzen aus der Umgebung eines Adenovirusgenoms isoliert werden können, erreichen. Für diese Voraussetzung wurde der Adenoviruspolylysin-Vektor (AdpL) eingesetzt. Für diese Studie wurden HeLa-Zellen mit AdpL-Komplexen transfektiert, die das Plasmid pPAM3 enthalten, um die Expression von retroviralen Verpackungsfunktionen bereitzustellen, und dann mit AdLNCMVlacZ infiziert. Kontrollexperimente demonstrierten, daß die Co-transduktion von HeLa mit pPAM3 und PLNCLZ über AdpL zur Erzeugung von Retrovirusteilchen führte. Im Gegensatz dazu war dies bei der AdpL-Transfektion des Plasmids PLNCLZ allein nicht der Fall. Wenn der AdpL-Transfektion mit pPAM3 die Infektion mit AdLNCMVlacZ folgte, konnten LacZ-transduzierte Retrovirusteilchen erhalten werden. Bedeutend ist, daß wenn HeLa-Zellen nicht mit AdpL/pPAM3 vorbehandelt wurden, keine solchen Retrovirusteilchen erhalten werden konnten. Daher erklärt die „Verschleppung“ des LacZ-codierenden Adenovirus von den Erzeugerzellen zu den Targetzellen dieses Ergebnis nicht. Daher können Retrovirusvektorsequenzen aus den Adenovirus-Vektoren mit der erfolgreichen Ableitung von transduzierenden Retrovirusteilchen isoliert werden.

[0057] Die funktionelle Bewertung von AdLNCMVlacZ wurde durchgeführt. Für diese Analyse wurden HeLa-Zellen mittels des AdpL-Verfahrens mit retroviralen Verpackungs- und/oder Vektorplasmiden transfektiert. In einigen Fällen wurden die Zellen dann mit AdLNCMVlacZ infiziert. Die Überstände wurde dann geerntet und auf LacZ-transduzierende Retrovirusteilchen wie zuvor bewertet. Die Transduktions-/Infektionsbedingungen waren: a) AdpL-Transfektion mit pPAM3 und PLNCLZ, b) AdpL-Transfektion mit PLNCLZ, c) AdpL-Transfektion mit pPAM3, gefolgt von der Infektion mit AdLNCMVlacZ, d) Ad-Infektion nur mit AdLNCMVlacZ. Die Transduktion/Infektion mit AdpL-Transfektion mit pPAM3 und PLNCLZ war positiv; die AdpL-Transfektion mit PLNCLZ war negativ; die AdpL-Transfektion mit pPAM3, gefolgt von der Infektion mit AdLNCMVlacZ war positiv; und die Ad-Infektion nur mit AdLNCMVlacZ war negativ. Alle Vektoren, die für diese Studien verwendet wurden, sind E1A/B-deletierte, replikationsunfähige Adenovirus-Vektoren.

Beispiel 8

Muster der Genexpression in Retrovirus-erzeugerzellen, die über Adenovirus-Vektor-vermittelte Applikation induziert wurde

[0058] Die Grundlage dieser Strategie ist die effiziente Expression in Targetzellen von retroviralen Verpackungsfunktionen, um die Isolierung von Retrovirusvektorsequenzen aus Adenovirus-Vektorvehikeln zu ermöglichen. Die Muster der Genexpression der retroviralen Verpackungsfunktionen gag/pol/env wurden in verschiedenen „herkömmlichen“ Verpackungssystemen bewertet, und mit den Proben, die durch den Adenovirus-Vektor AdCMVAmpg, der ebenso diese Funktionen codiert, erreicht wurden, verglichen. Unter Berücksichtigung dessen, ist die Verpackungszelllinie GP + Am12 stabil transduziert worden, damit diese amphotrophische Retrovirusfunktionen exprimiert und ist als ein effizientes Vehikel für die Verpackung von Retrovirusvektoren bewertet worden. Außerdem ist gezeigt worden, daß die vorübergehende Transfektion der menschlichen embryonalen Nierenzelle 293 über CaPO₄ mikrokristalline Teilchen mit den kat-Verpackungsplasmiden pKat2ampac und pLNCLZ co-transduzierte Retrovirusvektorplasmide effizient verpackt. Diese beiden Zellsysteme wurden mit HeLa-Zellen, die mit dem Adenovirus-Vektor AdCMVAmpg transduziert wurden, mit der Analyse der Größe und Muster von erreichten Verpackungsfunktionen verglichen.

[0059] Für diese Analyse werden die Verpackungszelllinie GP + Am12, 293 Zellen, die über CaPO4 mit dem Plasmid pKat2ampac transduziert wurden, und HeLa-Zellen, die mit dem Adenovirus-Vektor AdCMVAmpg infiziert wurden, der Northern-Blot-Analyse bei verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion unterzogen. Vergleichbare Mengen an extrahierter totaler zellulärer RNA werden auf Nitrocellulosemembranen transfektiert, und die resultierenden Blots mit 32P-markierten Oligonukleotiden entsprechend den retroviralen gag-, pol- oder env-Genen sondiert. Die resultierenden Blots liefern einen Vergleich der Größe und der Muster der retroviralen Verpackungsfunktionen, die über die Adenovirusapplikation erreicht wurden, im Vergleich zu den Niveaus, die über herkömmliche Verpackungstechnologien erreicht wurden. Diese Daten ermöglichen es, die Retrovirusvektorproduktion aus vorübergehender Transfektion von Targetzellen mittels Adenovirusvehikel zu optimieren.

Beispiel 9

Produktion von Retrovirusvektoren mittels vorübergehender Erzeugerzellen, die mit Adenovirus-Vektor-vermitteltem Gentransfer induziert wurden

[0060] Nachdem bestätigt wurde, daß ein geeignetes Niveau und Muster an retroviralen Verpackungsfunktionen aus einem Adenovirus-Vektor, der die Retrovirusgene gag/pol/env codiert, abgeleitet werden kann, wurde die Produktion der transduzierenden Retrovirusteilchen bewerkstelligt. Es wurde ein Vergleich zu „herkömmlichen“ retroviralen Verpackungssystemen, die stabile Retroviruserzeugerzelllinien umfassen, bestätigt durch Transduktion der amphotropischen Retroviruserzeugerlinie GP + Am12 mit dem Plasmid pLNCLZ, vorgenommen. Diese Linie erzeugt stabil Retrovirusteilchen, die LacZ/Neomycin codieren. Außerdem wurden Retrovirusvektoren mittels vorübergehender Co-transfektion von 293-Zellen mit CaPO4-Verfahren mit dem amphotropischen retroviralen Verpackungsplasmid pPAM3 in Kombination mit dem Retrovirusvektor-Plasmid pLNCLZ erzeugt. Zum Vergleich wurden HeLa-Zellen mit normalisierten Mengen an Adenovirus-Vektoren, die retrovirale Verpackungsfunktionen (AdCMVmpg) oder Retrovirusvektorfunktionen (AdLNCMVlacZ) codieren, cotransduziert.

[0061] 48 h nach der Induktion wurden die Überstände aus den Targetzellen geerntet und auf ihren Gehalt an produzierten Retrovirusteilchen analysiert. Es wurde eine Vielzahl an Analysen für die Bestimmung des Titers und der Funktion der produzierten Retrovirusvektoren eingesetzt. Die Größe der produzierten Teilchen wurde direkt durch Northern-Blot für die Analyse der Überstände mit Sonde mittels einer cDNA für die Retrovirusvektorsequenzen bestimmt. Serienmäßige Verdünnungen jedes Überstandes wurden mit Standards, die bekannte Mengen des Retrovirusvektorplasmids enthalten, verglichen. Dieser Assay ergab daher Informationen, wie über das Niveau an Retrovirusvektorsequenzen, die in produzierte Retrovirusteilchen mit jedem Verpackungssystem verpackt wurden. Außerdem wurde der Titer des produzierten Retrovirusvektors direkt durch zwei Verfahren bestimmt. Erstens, die Überstände wurden an die Indikatorzelllinie NIH-3T3 mit Infektion durch Standardverfahren appliziert. Nach 48 h wurden diese Zellen für das Produkt des LacZ-Gens mit FDG gefärbt und durch FACS hinsichtlich der Transduktionsfrequenz analysiert. Außerdem wurden ähnlich infizierte NIH-3T3-Zellen einer stabilen Selektion in der Gegenwart des Neomycinanalogons G418 unterzogen. Nach 21 Tagen wurden überlebende Kolonien durch kristall-violett gefärbt und gezählt. Außerdem wurden die Kolonien erweitert und der Analyse hinsichtlich des Stadiums der Retrovirusvektor DNA-Segmente in der Umgebung des Wirtsgenoms unterzogen. Die Restriktionsanalyse bestätigte, ob die DNA integriert wurde oder als ein Episom vorliegt.

[0062] Diese Studien bewerteten daher, daß vorübergehende Retroviruserzeugerzelllinien mit Adenovirus-Vektor-vermittelter Applikation von retroviralen Verpackungs- und Vektorfunktionen abgeleitet werden können. Ferner können transduktionsfähige Retrovirusteilchen erzeugt werden, die fähig sind, eine Langzeitexpression in Targetzellen, basierend auf der Integration von Transgen-enthaltenden Proviralsequenzen, zu erreichen. Außerdem kann im Hinblick auf Standardverfahren ein direkter Vergleich der Anzahl an funktionellen transduzierenden Retrovirusvektorteilchen, die mittels Adenovirus-Vektor-vermittelter Induktion einer retroviralen Verpackungslinie erhältlich sind, vorgenommen werden.

Beispiel 10

Parameter für optimale Produktion von Retrovirusteilchen mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-System

[0063] Parameter, die die Retrovirusproduktion aus Verpackungszellen beeinflussen, umfassen Wirtszellfaktoren sowie die Niveaus an erreichbaren retroviralen Verpackungs-/Vektorfunktionen, Im Hinblick darauf, sind

die Niveaus an der Adenovirus-Vektor-vermittelten heterologen Genexpression im allgemeinen eine lineare Funktion der Input-Teilchenanzahl. Diese Beziehung hält, bis die Adenovirus-Vektor-bezogene Toxizität das heterologe Gen, das durch transduzierte Zellen erzeugt wurde, mildert. Die Bestimmungen der optimierten Retrovirus-erzeugung mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems werden gezeigt. HeLa-Zellen wurden mit äquimolaren Mengen der Adenovirus-Vektoren, die retrovirale Verpackungsfunktionen (AdCMVampg) und Retrovirusvektorfunktionen (AdLNCMVlacZ) codieren, cotransduziert. Wie zuvor wurden die Überstände geerntet und hinsichtlich der Retrovirusteilchenproduktion analysiert. Die Menge an Input-Adenovirus-Vektor kann variiert werden, um seine Beziehung zum Retrovirus-Vektor-Output zu bestimmen. Daher wurden HeLa-Zellen mit Adenovirus-Vektoren bei vielen Infektionen von 1, 10, 100, 500 und 1.000 Teilchen/Zelle infiziert. Die Adenovirus-vermittelte Cytotoxizität in Retrovirus-erzeugerzellen (HeLa) wurde direkt unter Einsatz des MTT-Assays für die zelluläre Proliferation bestimmt. Basierend auf dieser Analyse wurde die Beziehung zwischen Input-Adenovirus-Vektor und Output-Retrovirus-Vektor, wie sie durch die Einschränkung der Toxizitäten und/oder der Linearität der Antwort vorgegeben werden kann, bestimmt.

[0064] Eine andere Variable, die den Netto-Output viraler Teilchen beeinflussen kann, ist das Verhältnis von retroviralen Verpackungsfunktionen und retroviralen Vektorsequenzen, das in der Retrovirus-erzeugerzelle realisiert wird. Dies wird empirisch in der Umgebung stabiler Retrovirus-erzeugerlinien durch die Bestimmung der Erzeugerzelllinien mit dem höchsten Retrovirustiter herbeigeführt. Die Fähigkeit der unabhängigen Modulation beider Komponenten des Systems ermöglicht die Bestimmung des optimalen Verhältnisses der Verpackungs- und Vektorfunktionen, um die Retrovirusvektorproduktion zu ermöglichen. HeLa-Zellen wurden mit dem Adenovirus-Vektor, der retrovirale Verpackungsfunktionen (AdCMVampg) codiert, und dem Adenovirus-Vektor, der Retrovirusvektorfunktionen (AdLNCMVlacZ) codiert, infiziert, wobei die Produkt-Retrovirusteilchen analysiert wurden. Die linearen Verhältnisse der beiden Teilchen (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 usw.) wurden mit der Endanalyse für transduzierende Retrovirusteilchen abgeleitet. Diese Studien ermöglichten eine Bestimmung der genauen Verhältnisse der Retrovirusfunktionen, die mit der Vektorproduktion in der Umgebung des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems am meisten übereinstimmen.

Beispiel 11

Retrovirusproduktion mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems in Mauszelllinien

[0065] Verfahren zur Erreichung einer Zell-spezifischen Applikation mit Langzeitgenexpression wurden in Bezug auf das Atemwegsepithel (Lunge), das vaskuläre Endothel (Herz) und die Leber (metabolisches Blut, d. h. Hemophilie) überprüft. Die Fähigkeit der Maushepatozyten als Retrovirus-erzeugerzellen zu fungieren, wurde bestimmt. Für diese Analyse wurde ein direkter Vergleich zwischen stabilen Retrovirusvektorerzeugerzellen, 293-Zellen, die vorübergehend mit retroviralen Verpackungs- und Vektorplasmiden transfiziert wurden, und sowohl HeLa-Zellen als auch den Maushepatomzellen, die mit äquivalenten Mengen der Adenovirus/Retrovirusvektoren mit Verpackungs- und Vektorfunktionen infiziert wurden, vorgenommen. Die abgeleiteten Retrovirusteilchen wurden analysiert. Diese Analyse zeigt eine direkte Bestimmung des Niveaus, bei dem Mauszellen aus einem relevanten Parenchymorgantarget als vorübergehende Retrovirus-erzeugerzellen fungieren können.

[0066] Mauszellen können durch ecotrope und amphotrope Retrovirusvektoren infiziert werden. Retrovirusvektoren, die entweder aus ecotropen oder amphotropen env-Glycoproteinen abgeleitet wurde, hatten eine vergleichbare Wirksamkeit. Es ist jedoch nicht bestätigt worden, ob Mauszellen in Bezug auf die Produktion von ecotropen gegenüber amphotropen Retrovirusvektoren unterschiedlich fungieren. Da die Verfahren der vorliegenden Erfindung die lokale Produktion von Retroviren in situ in der Umgebung der Mausparenchymzellen umfassen, wurde die Fähigkeit der Maushepatozytlinie ecotrope gegenüber amphotropen Retrovirusvektoren mittels der chimären Adenovirus/Retrovirus-Strategie zu produzieren, gezeigt. Um dies zu erreichen wurde ein flexibler Ansatz entwickelt, um das Hüllglykoprotein in Retrovirusteilchen zu verändern. Ein Adenovirus-Vektor, der die retroviralen Verpackungsfunktionen gag und pol (AdCMVGP) codiert, wurde entwickelt. Außerdem wurden unterschiedliche Adenovirus-Vektoren, die entweder das ecotrope oder amphotrope env-Glykoprotein codieren, entwickelt. Man kann daher amphotrope Retrovirusteilchen durch Co-transduktionen von Targetzellen mit AdLNCMVlacZ und den Adenovirus-Vektoren, die gag/pol (AdCMVGP) und amphotrope env (AdCMVenv^a) codieren, ableiten oder ecotrope Retrovirusteilchen durch die Co-transfektion von Targetzellen mit AdLNCMVlacZ und den Adenovirus-Vektoren, die gag/pol(AdCMVGP) und ecotrope env (AdCMVenv^e) codieren, mittels dem chimären Adenovirus/Retrovirus-System der vorliegenden Erfindung ableiten.

[0067] Für diese Analyse wurde die Maushepatozytzelllinie einer Infektion mit der relevanten Kombination aus Adenovirus-Vektoren unterzogen, indem bei diesen die Funktion entweder als vorübergehende Erzeuger re-

kombinanter ecotroper oder amphotroper Retrovirusvektoren induziert wurde. Die abgeleiteten Vektoren wurden dann durch Titer gegen NIH-3T3 unter der Bewertung mittels LacZ-Genexpression und neo-selektierbaren Klonen analysiert. Diese Analyse bestimmt jegliche zelluläre Beschränkungen in Bezug auf Mauszellen, die als Retrovirusproduziererzellen fungieren. Sie wird ebenso direkt spezifische Produktionsangaben bestimmen, die für die Produktion von ecotropen gegenüber amphotropen Retrovirusvektoren relevant sind.

Beispiel 12

Retrovirusvektorproduktion mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems in primären Mauszellen

[0068] Primäre Mauskulturen von Hepatozyten wurden unter Einsatz von Standardverfahren der Collagenasedigestion und Reinigung bestätigt. Diese Targetzellen wurden für eine Vielzahl von Parametern, die für die Retrovirusproduktion relevant sind, bewertet, einschließlich: 1) der Muster und Größe der retroviralen Verpackungsfunktionsgene, die durch das chimäre Adenovirus/Retrovirus-System induziert wurden; 2) des Ausmaßes der Produktion von Retrovirusvektoren, die durch das chimäre Adenovirus/Retrovirus-System induziert wurden; 3) der Optimierung der Parameter für die Produktion der Retrovirusvektoren, die durch das chimäre Adenovirus/Retrovirusvektor-System induziert wurden; 4) der unterschiedlichen Produktion von ecotropen und amphotropen Retrovirusvektoren mittels des chimären Adenovirus/Retrovirusvektor-Systems. Diese Studien verwenden als Endpunktassays die Produktion von transduzierenden Retrovirusteilchen, wie durch LacZ histochemische Positivität und Neomycinresistenz geprüft. Dies ermöglicht die Bestimmung der optimalen Parameter, die für die Retrovirusvektorproduktion in der Umgebung einer geeigneten Targetzelle mit dem höchsten Analogieniveau zu der in vivo-Umgebung.

Beispiel 13

Retrovirusrezeptorinduktion als ein Mittel zur Steigerung der Retrovirustransduktion mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems

[0069] Die in situ-Erzeugung von Retrovirusvektoren, die Nachbarparenchymzellen transduzieren, ermöglicht deren stabile genetische Modifikation. Wenn eine hohe lokale Konzentration an Retrovirusvektoren mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Ansatzes erzeugt worden ist, können andere Faktoren eine Bedeutung für die tatsächliche Transduktion der umgebenden Targetzellen haben. Im Hinblick auf die stabile genetische Modifikation von Targetzellen, damit diese mittels Retrovirusvektoren auftreten, müssen transduzierte Zellen in einem proliferativen Zustand vorliegen. Die lokale Konzentration an Rezeptor für den produzierten Retrovirus kann ebenso ein Faktor sein, der die Wirksamkeit diktiert, bei der Nachbarzellen transduziert werden. Die Rezeptorniveaus für ecotrope oder amphotrope Viren können ein einschränkender Faktor sein, der die Gesamt-empfindlichkeit einer Targetzelle gegenüber der Infektion mit diesem Vektor diktiert. Außerdem kann die heterologe Expression des verwandten Retrovirusrezeptors: 1) die Empfindlichkeit von Targetzellen durch die Steigerung der Anzahl an wirksamen Transduktionsereignissen, basierend auf Rezeptor-env-Interaktionen erhöhen, und/oder 2) vorher resistente Zellen gegen Retrovirusinfektion durch Bereitstellung der vorher mangelhaften Funktion empfindlich machen, was die Rezeptor-env-Interaktion ermöglicht. Die Modulation der Retrovirusrezeptorpopulation kann eine wichtige Determinante der transduktionalen Wirksamkeit mit diesen Vektoren sein.

[0070] cDNA-Klone wurden für die Rezeptoren erhalten, die dem Hüllglykoprotein von ecotropem Retrovirus (eco-R) und dem Hüllglykoprotein von amphotropem Retrovirus (ampho-R) entsprechen. Diese sind zu Adenovirus-Vektoren konfiguriert worden, wobei der Retrovirusrezeptor mittels des CMV-intermediären-frühen Promoters/Verstärkers in der Umgebung eines E1A/B-deletierten, replikationsunfähigen Adenovirus-Vektors exprimiert wird. Diese Vektoren werden eingesetzt, um primäre Maushepatozyten durch Standardverfahren zu infizieren. Diese Zielhepatozyten werden dann der Infektion mit ecotropen und amphotropen Retrovirusvektoren, die die LacZ/Neo-Kassette codieren, unterzogen. Es wird ein Vergleich mit primären Maushepatozyten vorgenommen, die nicht mit Retrovirus-codierten cDNAs transduziert wurden. Wie zuvor werden Indikatorzellen hinsichtlich der Retrovirusinduktion von histochemischer LacZ-Positivität und Neomycinresistenz bewertet. Zusätzliche Parameter, die bewertet werden können, umfassen die Wirkung der Zielretrovirusrezeptoranzahl auf die Retrovirusvektorempfindlichkeit. Außerdem können die unterschiedlichen Fähigkeiten der ecoR- und amphoR-Induktion verglichen werden. Diese Studien bestimmen, ob die Retrovirusrezeptorinduktion die Retrovirusrustransduktion relevanter Targetzellen verstärken kann. Diese Strategie nutzt die Wirksamkeit der in vivo-Gentransfercharakteristiken von Adenovirus-Vektoren, um die Retrovirusrezeptorinduktion in situ zu erreichen. Daher werden Adenovirus-Vektoren zur Erzeugung von Retrovirusproduziererzellen an Zielorganstellen verwendet, um Nachbarzellen mittels synthetisierter Retrovirusteilchen zu infizieren. Die Verbesserung dieses

Verfahrens mittels der Induktion von Retrovirusrezeptoren an den Nachbarzellen nutzt ebenso Adenovirus-Vektor-vermittelte Genapplikation.

Beispiel 14

Produktion von VSV-G-Pseudotyp-Retrovirusvektoren mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems

[0071] Pseudotyp-Retroviren sind eingesetzt worden, um Targetzellen-Retrovirusrezeptor-Einschränkungen im Zusammenhang mit der Erreichung eines wirksamen Gentransfers mittels Retrovirusvektoren zu überwinden. Diesbezüglich können chimäre Retrovirusteilchen erzeugt werden, die alternierende env-Glykoproteine enthalten, die üblicherweise aus Bläschenstomatitisvirus-G-Glykoprotein (VSV-G) abgeleitet werden. Diese chimären Retrovirusteilchen können dann aufgrund der Wechselwirkung der VSV-G-Glykoproteine mit Targetzellrezeptoren Zellen infizieren. Dieses Mittel zur Erreichung eines alternierenden Zelleneintritts kann daher den Mangel an Zielrezeptoren für amphotrope oder ecotrope env-Glykoproteine beheben. Diese Strategie ist sowohl für die Infizierung von Retrovirusresistenten Zellen als auch als ein Mittel für die Steigerung der Transduktionseffizienz eingesetzt worden. Überdies können diese Pseudotypvektoren ein hohes Niveau an Stabilität in vivo besitzen, was potentiell höhere Niveaus an in situ-Transduktion bei der in vivo-Applikation ermöglicht. Diese VSV-G-Pseudotyp-Retroviren werden erzeugt, indem die Expression von amphotropem oder ecotropem gag/pol mit dem VSV-G-Glykoprotein koordiniert wird. Das am Aufbau beteiligte Retrovirusteilchen bezieht VSV-G an Stelle des amphotropen oder ecotropen env-Gegenparts ein. Ein Mittel, um dies zu erreichen, war die Co-transduktion von Zellen mit Plasmiden, die Retrovirus gag/pol und VSV-G plus Retrovirusvektor-Plasmide codieren. Transduzierte Zellen werden zu vorübergehenden Erzeugern von Retrovirus-Pseudotypen gemacht. Während dieses Verfahren die gewünschten Pseudotyp-Retrovirusteilchen produzieren kann, wird die Toxizität, die mit dem VSV-G-Glykoprotein in Verbindung steht, in Erzeugerzellen manifestiert, die von einer verminderten Produktion und daher verringerten Gesamt Titern ausgehen. Es sind Verpackungszelllinien-Strategien entwickelt worden, die regulierbare Expressionseinheiten nutzen. Es werden stabile Zellen abgeleitet, die konstitutiv Retrovirus gag/pol exprimieren und ebenso VSV-G in einer induzierbaren Expressionkassette enthalten. Nach der Transduktion dieser Zellen mit einem Retrovirusvektorplasmid wurde die VSV-G-Expression induziert, um die Ableitung von Pseudotyp-Vektoren zu ermöglichen. Dieses Manöver ermöglicht die stabile Aufrechterhaltung der Zelllinien, die Pseudotyp-Teilchen erzeugen können, ebenso wie ein größeres Niveau an Vektorproduktion.

[0072] Ein chimäres Adenovirus/Retrovirus-System wurde eingesetzt, um die Targetzellen zu vorübergehenden Erzeugern von VSV-G-Pseudotypen zu machen. Dieses Manöver kann Vorteile für die Infizierung von Nachbarzellen in vivo bringen. Solch eine verstärkte Transduktionseffizienz kann verbesserte Targetzelleninfektionseffizienzen widerspiegeln. Alternativ kann eine solche Beobachtung eine größere in vivo-Stabilität der Pseudotyp-Retrovirusteilchen widerspiegeln. Für diese Analyse wurden Targetzellen als Modellsysteme einer steigenden Knappheit genutzt. So wurden HeLa-Zellen, die Maushepatozyten-Zelllinie BNL CL.2, und schließlich primäre Mausleberzellen als vorübergehende VSV-G-Pseudotyp-Retroviruserzeuger durch das chimäre Adenovirus/Retrovirus-System induziert.

[0073] Für die Erzeugung von Pseudotyp-Retroviren wurden Zellen mit einem Adenovirus-Vektor, der Retrovirus gag/pol, CAdCMVGP, codiert, einem Adenovirus, der Retrovirusvektorsequenzen (AdLNCMVlacZ) codiert, plus einem Adenovirus-Vektor, der das VSV-G-Glykoprotein codiert, infiziert. Dieser letztere Vektor wurde aus L. Prevec (McMaster University, Ontario, Canada) erhalten. Dies ist ein E1A/B-deletierter, replikationsunfähiger Adenovirus-Vektor, der VSV-G bei hohen Niveaus an verschiedenen eukaryotischen Targetzellen exprimieren kann. Diese Zellen wurden ebenso für die Erzeugung von ecotropen und amphotropen Retrovirusvektoren mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems, das AdCMVEnv^e bzw. AdCMVEnv^a einsetzt, induziert. Nach der Infektion wurden die Zellüberstände geerntet und zur Infizierung der angezeigten Targetzellen verwendet. Anfänglich wurden NIH 3T3-Zellen unter Bewertung der LacZ-Induktion und der Erzeugung von Neomycin-selektierbaren Klonen infiziert. Diese Analyse ergibt einen Index der relativen Titer, die für die VSV-G-Pseudotypen durch dieses Verfahren erzeugt werden können, im Vergleich zu den amphotropen und ecotropen Retrovirusvektoren. Überdies wurden die Überstände zur Infizierung von primären Maushepatozytenzellen unter LacZ-Bewertung eingesetzt. Diese Analyse bestimmt, ob das Pseudotypierungsmanöver eine größere Infizierbarkeit von Parenchymtargets, basierend auf VSV-G Targetzellenrezeptor-Wechselwirkungen ermöglicht. Korrelative Studien bestimmten, ob das VSV-G-Transduktionsereignis mit der proviralen Vektorintegration in Verbindung steht. Das ist wichtig, weil VSV-G mit der „Pseudotransduktion“ in Verbindung gebracht wird, wobei der heterologe Genprodukttransfer innerhalb einer tatsächlich stabilen genetischen Modifikation der Targetzellen auftritt. Außerdem wurde bestimmt, ob die induzierte Expression des VSV-G-Glykoproteins ferner die Vektorproduktion mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems optimieren kann. Es wurde

bewertet, ob diese Induzierbarkeit höhere Titer VSV-G-Pseudotypen gegenüber den abgeleiteten ermöglicht. Diese Studien ermöglichen daher die Bestimmung, ob das chimäre Adenovirus/Retrovirus-System VSV-G-Pseudotyp-Retrovirusteilchen ergeben kann. Ferner wurde bestimmt, ob diese Teilchen eine größere Transduktionsfähigkeit für relevante Parenchymtargets in vitro besitzen.

Beispiel 15

Chimäre Adeno/Retrovektoren zur Modifizierung von Parenchymzellen in vivo

[0074] Die vorliegende Erfindung prüft Verfahren zur Verwendung von Adenovirus-Vektoren zur Induzierung von Targetzellen, die als Retroviruserzeugerzellen agieren sollen. Ferner können diese Verfahren optimiert werden, um Gewebe, die für Modelle von Herz-, Lungen- und Bluterkrankungen relevant sind, zu targetieren. Unter Verwendung dieser Strategie in vivo kann man eine lang andauernde, stabile Integration an Parenchymtargetstellen erreichen. In vivo-Studien wurden in zwei Applikationsumgebungen durchgeführt: 1) Hepatozytentransduktion mittels systemischer vaskulärer Applikation und 2) Atemwegsepitheltransduktion mittels luminaler Atemwegsapplikation. Diese Verlaufsschemen stellen Applikationswege dar, wobei hoch wirksame in vivo-Transduktion von relevantem Parenchym erreicht werden kann. Daher ist die in vivo-Retrovirusapplikationswirksamkeit von Genfunktionen keine Stichprobenvariable. Adenovirus-Vektoren wurden zur Induktion von Targetzellen eingesetzt, die als Retroviruserzeuger agieren sollen. Die synthetisierten Retroviren transduzieren dann umgebende Parenchymzellen.

Beispiel 16

In situ-Retrovirusinfektion von Targetzellen nach der in vivo-Induktion der Retrovirusproduktion an Parenchymstellen

[0075] Der Grad und das Ausmaß, zu dem Retroviren in vivo synthetisiert wurden, wurde bestimmt. Da die produzierten Virionen nach der in situ-Erzeugung nicht zurückgeholt werden können, bestimmt diese Analyse diese Ergebnisse indirekt, indem der Grad, zu dem Nachbarzellen stabil mittels Retrovirusvektoren transduziert wurden, bewertet wurde. Für diese Studien wurden Mäuse mit einer Kombination des Adenovirus-Vektors, der retrovirale Verpackungsfunktionen codiert, und des Adenovirus-Vektors, der Retrovirusvektorsequenzen codiert, angeregt, um entweder eine Atemwegsepithel- oder Hepatozytenapplikation zu erreichen. Die Expression der Verpackungsfunktionen und das exprimierte Produkt aus dem abgeleiteten Retrovirusvektor (LacZ/neo) wurden unabhängig bei Zielorganen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion von mRNA-Transkripten (gag/pol/env) und/oder der DNA-Kopieanzahl (LTR/LacZ/neo) bestätigt. Außerdem wurden Targetzellen, die speziell diese Retroviruskomponenten produzieren, durch in situ-Hybridisierung von Gewebesektionen, die aus der Lunge oder der Leber stammen, bestimmt. Diese Studien bestätigen, daß Adenovirus-Vektorapplikation die Expression von retroviralen Verpackungsfunktionen in vivo an Zielorganstellen erreichen kann. Ferner können spezielle Zelluntermengen, die potentiell als Retroviruserzeugerzellen agieren, identifiziert werden.

[0076] Die Bestimmung des Grades, zu dem die Integration durch Targetzelltransduktion mit synthetisierten Retroviren stattfinden kann, wird durch die Analyse des Stadiums der proviralen DNA in der Umgebung der genomischen DNA des Wirtsorgans durchgeführt. Nach der lokalen Synthetisierung der Retrovirusteilchen sollte die Transduktion von umgebenden Zellen integrierte Kopien des retroviralen proviralen Genoms erzeugen. Die gesamte zelluläre DNA wurde nach der Induktion mit dem chimären Adenovirus/Retrovirus-System extrahiert und der Analyse hinsichtlich des Stadiums der proviralen DNA unterzogen. Zu Beginn unterliegt Gewebematerial der Hirt DNA-Extraktion. Die abgeleitete DNA wurde dann durch Southern-Blot auf die Gegenwart und das Stadium der Adenovirus-abgeleiteten Sequenz analysiert. Der Hauptteil der Retrovirusvektor-DNA sollte als nicht integrierte Episome in der Hirt-Fraktion detektiert werden. Dies wird für AdCMVampg-Genome sowie für zumindest einen Teil der AdLNCMVlacZ-Genome der Fall sein. Als nächstes wurde auf dieselbe Art und Weise die DNA mit hohem Molekulargewicht analysiert. Das Genom aus den beiden Adenovirus-Vektoren sollte in der HMW-DNA-Fraktion nicht detektiert werden, da sie episomal sind und in der Umgebung der Hirt-extrahierbaren DNA migrieren. Wenn im Gegensatz dazu die Integration zu irgendeinem Ausmaß stattfindet, werden die proviralen Komponenten von AdLNCMVlacZ in der Fraktion mit hohem Molekulargewicht durch Southern-Blot-Analyse detektiert. Dies wurde durch Restriktionsendonukleasedigestion in Kombination mit Southern-Blot der beiden Hirt-Fraktionen und der HMW-Fraktionen der DNA, die aus diesen beiden Zielorganstellen stammt, bestätigt. Es wurden Vergleiche zu Kontrollen erstellt, wobei die Applikation von nur retroviralen Verpackungsfunktionen oder Retrovirusvektorfunktionen mittels eines Adenovirus durchgeführt wurde. Diese Analyse ist ein hoch empfindlicher „Screen“ zur Bestimmung, ob ein Integrationsereignis als

ein Ergebnis der in situ Retrovirusvektortransduktion mittels des chimären Adenovirus/Retrovirus-Systems stattgefunden hat.

[0077] Ein zusätzlicher Assay der in situ Retrovirusinfektion ist die Langlebigkeit von Vektor proviraler DNA oder DNA-codierten Sequenzen an den Zielstellen. Stabile, lang andauernde Genexpression stammt aus der in situ-Retrovirusinfektion dieser Zielorgane. Im ersten Fall wird die Integration der Vektor proviralen DNA an Zielorgan-Parenchymzellen als lang andauernde Persistenz dieser DNA-Sequenz in der Umgebung der genomischen Wirts-DNA manifestiert. So wurde das temporale Muster der Vektor proviralen DNA geprüft. Diesbezüglich wurden Tiere wie zuvor mit der Kombination aus AdCMVAmpg und AdLNCMVlacZ für die Lungen- und Lebertransduktion angeregt. Bei bestimmten Zeitintervallen nach der Behandlung werden die angezeigten Organe geerntet und sowohl Hirt-DNA-Extraktionen als auch HMW-DNA-Extraktionen unterzogen. Die Analyse der Menge sowohl der genomischen Adenovirus-Vektor-DNA als auch der proviralen Retrovirus-DNA wurde durch den Einsatz quantitativer PCR zur Bestimmung der absoluten Mengen der integrierten Retrovirusvektor-DNA in der genomischen HMW-DNA zu jedem Zeitpunkt durchgeführt. Ein temporales Profil, daß die Persistenz proviraler Vektorsequenzen in der HMW-Fraktion anzeigt, zeigt den Grad, zu dem eine stabile Integration auftrat, an. Ein zusätzlicher Index der Persistenz, basierend auf der proviralen Vektorintegration, wurde unter Einsatz histochemischer Reporter durchgeführt. Es wurden sowohl LacZ als auch GFP als Reporter eingesetzt, deren Expression durch histochemische Analyse einer geeignet aufgearbeiteten Gewebesektion detektiert werden kann. Das vorübergehende Expressionsprofil dieser Reportergene an dem Atemwegsepithel und der Leber nach der Adenovirus-Vektortransduktion ist gut dokumentiert worden. Somit sollte das temporale Muster des Reportergens Indikativ für die in situ-Retroviruserzeugung mit daraus folgender Integration von proviraler Vektor-DNA sein. Tiere wurden mit AdCMVAmpg und AdLNCMVlacZ oder AdLNCMVgfp für die Leber- und Lungentransduktion angeregt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die relevanten Organe unter histochemischer Analyse hinsichtlich der Produkte der codierten LacZ- und GFP-Gene geerntet. Diese Analyse wurde durch in situ-Hybridisierung der Gewebesektionen für die mRNA-Produktion dieser Reportergene ergänzt, um einen zusätzlichen quantitativen Index bereitzustellen. In dieser Analyse wird ein Unterschied hinsichtlich der Persistenzmuster in der in situ-Retrovirusvektorgruppe im Vergleich zu den Reporter-codierenden Adenoviren allein erwartet.

Beispiel 17

Steigerung der in situ-Retrovirusinfektion mittels in vivo-Adenovirusapplikation der retroviralen Verpackungs- und Vektorfunktionen

[0078] Die Fähigkeit der lokal synthetisierten Retrovirusvektoren, Parenchymtargetzellen stabil zu transduzieren, wird durch lokale Zellfaktoren beeinflusst. Diese Faktoren umfassen das Proliferationsstadium der Targetzelle sowie die Anzahl an Rezeptoren für die lokal produzierten Retrovirusvektoren. Um die Targetzellproliferation zu modulieren, wurde eine Strategie verwendet, die auf der Wachstumsfaktorinduktion basiert. Es wurde eine Strategie der Wachstumsfaktorinduktion für die Steigerung der Targetzellproliferation verwendet; es wurden jedoch Adenovirus-Vektoren eingesetzt, um eine effiziente in vivo-Applikation eines Genkonstrukts an die Lunge und die Leber zu erreichen, das die Wachstumsfaktoren KGF und den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) codiert. Hohe lokale Konzentrationen dieser Wachstumsfaktoren, die durch dieses Verfahren erreicht wurden, liefern eine optimierte Induktion der Proliferation von Parenchymzellen an diesen Organstellen und diese Proliferationsinduktion ermöglicht die verstärkte Transduktion von Targetzellen durch lokal synthetisierte Retrovirusvektoren.

[0079] Tiere wurden zu Beginn durch die Applikation von Adenovirus-Vektoren, die KGF oder HGF codieren, an die Lunge oder die Leber, angeregt. Nach der Bestätigung des temporalen Profils für eine optimale Induktion der Proliferation wurden die Tiere mit den chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektoren AdCMVAmpg und AdLNCMVlacZ für die in situ-Retroviruserzeugung angeregt. Diese Tiere wurden dann analysiert, um den Grad der integrierten proviralen Vektorsequenzen zu bestimmen. Diese Studien umfassen PCR-Quantifizierung der integrierten proviralen Sequenzen in der HMW-DNA-Fraktion der Lunge und der Leber sowie die in situ-Hybridisierung zur Bestimmung der Anzahl an stabil transduzierten Zellen. Korrelative Studien bestimmen den Grad, zu dem die induzierte Proliferation ein Faktor ist, der die erfolgreiche in situ-Retrovirus-Transduktion voraussagt. Die Summe dieser Studien ermöglicht die Bestimmung des Grades, zu dem die induzierte Proliferation mittels der Adenovirus-Vektor-vermittelten Applikation an Wachstumsfaktorgenen die Fähigkeit von in situ-erzeugten Retrovirusvektoren, eine stabile Transduktion von Parenchymtargets zu erreichen, vorteilhaft beeinflussen kann.

Beispiel 18

Adenovirus-Vektoren können Targetzellen induzieren, die als Retrovirus-erzeuger fungieren

[0080] Die Targetzellen wurden mit einer Kombination aus den Adenovirus-Vektoren, AdCMVampg und AdLNCMVGFp, oder mit AdLNCMVGFp allein infiziert. Die Targetzellen waren entweder die Affen-Verozelllinie WI62, die Maus-Fibroblast-Zelllinie NIH-3T3, die menschliche Blasenkarzinom-Zelllinie EJ, oder die menschliche Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV_{3ip1} (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden mit den geeigneten Adenovirus-Vektoren für 3 h infiziert und dann gewaschen, um jeglichen freien Adenovirus zu entfernen. Diese Zellen wurden in Gewebekultur für verschiedene Zeiträume gehalten und dann auf die Expression des grünen fluoreszierenden Protein (GFP) Reportergens durch die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) oder durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

[0081] Die Analyse der Adenovirus-Vektor infizierten Zellen an Tag 2 nach der Infektion zeigte, daß beide Gruppen, die Kontrolle und die vermeintlichen Retrovirus-erzeuger, eine hohe Frequenz an Expression des GFP-Reportergens ([Fig. 5](#)) demonstrierten. Dies stimmt mit einer hohen Frequenz an AdLNCMVGFp-Infektion überein, die in beiden Gruppen auftrat, wobei anschließend auch die GFP-Genexpression in beiden Gruppen auftrat. Eine Untermenge jeder Gruppe wurde alle 8 Tage sondiert und dann an Tag 30 und Tag 60 analysiert. Die FACS-Analyse der Zellgruppe, die an beiden Adenovirus-Vektoren (AdCMVampg und AdLNCMVGFp) durchgeführt wurde, zeigte eine wesentlich höhere Anzahl an GFP-positiven Zellen, im Vergleich zu den Zellen, die nur AdLNCMVGFp erhielten ([Fig. 6A](#)). Die GFP-positiven Zellen aus der Gruppe, die mit beiden Viren infiziert wurde, waren in ausgeclusterten Größen vorhanden, was auf lokale Retrovirus-Verteilung und/oder Klonabstammung schließen läßt ([Fig. 5](#)). Dies ist ein merklicher Kontrast zu den Zellen, die mit AdLNCMVGFp allein infiziert wurden, die die GFP-Expression verloren haben, übereinstimmend mit der bekannten vorübergehenden Expression von Genen, die durch den Standard-Adenovirus-Ansatz appliziert wurden ([Fig. 5](#) und [6A](#)). Die provirale Integration wurde durch die Demonstration der Retrovirussequenzen in zellulärer DNA mit hohem Molekulargewicht bestätigt ([Fig. 6B](#)).

Beispiel 19

Produktion von transduzierenden Retrovirusteilchen

[0082] NIH-3T3- oder WI62-Zellen wurden entweder mit einer Kombination aus AdCMVampg und AdLNCMVGFp, oder AdLNCMVGFp allein infiziert, dann anschließend wie zuvor gewaschen. Die Überstände wurden 48 Stunden nach der Infektion geerntet und dann zur Infizierung der NIH-3T3-Zellen zur Bestimmung der Retrovirustiter verwendet. Die überständigen infizierten Zellen wurden in Kultur 20 Tage gehalten und hinsichtlich der GFP-Expression analysiert. Der Überstand, der aus den AdLNCMVGFp-Virus-infizierten Zellen stammte, konnte keine Langzeit-GFP-Expression in den Targetzellen ([Fig. 7](#)) induzieren. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die mit AdCMVampg- plus AdLNCMVGFp-Überstand infiziert wurden, eine hohe Rate an GFP-Expression am Tag 20. Diese Studie bestätigte, daß die GFP-Induktion aus der Infektion mit Retroviren, die aus den original Adenovirus-infizierten Targetzellen stammen, resultierte. Die Langzeit-GFP-Expressionsstudien wurden zur Unterscheidung der Verschleppung der vorübergehenden Adenovirus-Genexpression (< 2 Wochen) von der stabilen Transduktion, die durch Retrovirusproduktion vermittelt wurde, gestaltet. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, daß transduzierende Retrovirusteilchen tatsächlich durch die Adenovirus-Vektor-applizierten Gene in Targetzellen erzeugt wurden.

[0083] Zur Bestimmung, ob diese Methodologie mit der signifikanten Produktion von replikationsfähigem Retrovirus (RCR) in Verbindung steht, wurde die RCR-Erzeugung, die mittels Plasmid-basierender Transfektionsverfahren abgeleitet wurde, mit der Verwendung des chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektors verglichen. HeLa-Zellen wurden daher entweder mit pPAM3 plus pLNCLZ transfiziert oder mit AdCMVampg oder AdLNCMVGFp, oder AdCMVampg plus AdLNCMVGFp infiziert. Diese Überstände wurden dann hinsichtlich der Gegenwart von replikationsfähigen Retroviren analysiert. Es wurden keine replikationsfähigen Retroviren mit dem chimären Adenovirus/Retrovirus detektiert (Daten nicht gezeigt). Daher scheint die Erzeugung von replikationsfähigen Retroviren durch dieses Verfahren nicht über herkömmliche Verfahren hinauszugehen.

Beispiel 20

In vivo-Gentransfer mit stabiler Integrierung

[0084] Sind diese Schlüsselkonzepte festgelegt, wurde diese Methodologie für den in vivo-Gentransfer mit

stabiler Integration eingesetzt. Dieser wurde durchgeführt, um die Gesamteinheitlichkeit dieses Ansatzes im strengsten Applikationszusammenhang zu bestimmen. Für diese Analyse wurde ein Mausmodell eines menschlichen Karzinoms des Ovariums eingesetzt. Athymische nackte Mäuse wurden so orthotopisch mit der menschlichen Karzinomzelllinie SKOV3_{ip1} xenotransplantiert. Nach Erstellung peritonealer Tumorplaques wurden die Tiere dann mittels der intraperitonealen (i. p.) Weise Vektor-angeregt. Die Tiergruppen erhielten entweder den chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektor oder diesen Vektor plus die chimäre Adenovirus/Retrovirus-Verpackung. Im ersteren Fall enthielt der eingesetzte Vektor, AdLNCMVGFp, Retrovirusvektorsequenzen mit dem GFP-Reportergen. Im letzteren Fall enthielten die Adenovirus-Vektoren AdCMVAmpg, die aus pCAAmpg stammen, die funktionell abgeleiteten retroviralen Verpackungsfunktionen. In der einen Virusgruppe sollte die Adenovirus-Vektor-vermittelte Applikation der GFP-Expressions-kassette zur in vivo-Genexpression mit einem temporalen Profil einer schnellen Extinktion basierend auf dem nicht integrativen heterologen Gentransfer, resultieren. Im Gegensatz dazu wurde von den beiden Viren erwartet, daß sie eine in situ-Induktion von Tumorzellen erreichen, damit diese als Retrovirus-erzeugerzellen agieren. Von den lokal synthetisierten Retrovirusvektoren wurde dann erwartet, daß sie eine stabile Transduktion proliferativer Nachbarzellen, in diesem Fall der SKOV3_{ip1} Karzinomtargets, erreichen. Basierend auf diesen Betrachtungen, wurde erwartet, daß zwei Originalgruppen deutlich unterschiedliche temporale Profile der Expression des GFP-Reportergens, basierend auf deren unterschiedlichen Fähigkeiten, eine stabile Transduktion zu erreichen, zeigen. Tiere, die mit dem chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektor AdLNCMVGFp behandelt wurden, wurden durch Fluoreszenzmikroskopie auf Tumorzellen, die GFP-Expression an frühen und späten Punkten nach der Applikation zeigen, analysiert. In dieser Analyse demonstrierte die Tiergruppe, die den einzelnen Vektor enthielt, seltene einzelne positive Zellen zu späten Zeitpunkten wie in [Fig. 8](#) gezeigt. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die die Kombination aus chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektor plus der Adenovirus/Retrovirus-Verpackungschimäre enthielten, ein deutlich anderes Muster bei späten Zeitpunkten. Diesbezüglich war die Analyse dieser Gruppe bemerkenswert für die Detektion steigender Zahlen positiver Zellen, die in Clustern auftraten. Diese Entdeckung stimmte mit dem Konzept, daß die stabile Transduktion von Targetzellen mit Klonexpression auftrat, überein.

Beispiel 21

In vivo-Effizienz der Adenovirus/Retrovirus-Chimäre

[0085] Die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3_{ip1} wurde in vitro mit entweder AdCMVAmpg plus AdLNCMVGFp, oder AdLNCMVGFp allein infiziert. Um die in vivo-Erzeugung infizierter Retrovirusteilchen und die Infektion von Nachbarzellen zu bestätigen, wurden die infizierten Zellen mit nicht infizierten Zellen bei einem Verhältnis von 25% Adenovirusvektor-infizierten Zellen zu 75% unbehandelten SKOV3_{ip1}-Zellen gemischt und subkutan in athymische nackte Mäuse implantiert, um die Tumorbildung zu ermöglichen. Zwanzig Tage nach der Implantation hatten beide Tiergruppen tastbare Tumore, die für die Analyse von GFP-Reportergenpersistenz und -expression geerntet wurden. Die Gruppe, die mit AdLNCMVGFp allein infiziert wurde, wies seltene, isolierte fluoreszierende Zellen auf (**Fig. 9B**). Im Gegensatz dazu wiesen die Tumore, die aus der Doppel-Virusgruppe stammen, weit ausgedehnte Cluster GFP-positiver Zellen auf (**Fig. 9C**). Die Zählung der positiven Zellen in mehreren Bereichen ermöglichte eine Schätzung der transduzierten Zellen, so daß die Einzel-Virusgruppe > 80% GFP-positive Zellen aufwies. Daher war in dieser Gruppe die Anzahl an positiven Zellen wesentlich größer als der Anteil an adenoviral-infizierter Zellen in dem originalen implantierten Gemisch. Die extensive Verteilung der GFP-positiven Zellen in der Doppel-Virusgruppe ließ auf eine stabile genetische Modifikation der Nachbarzellen mittels in situ-Retrovirus-Vektoren schließen.

[0086] Das Potential, die in vivo Adenovirus-Vektor-Transduktion mit in situ-Retrovirus-erzeuger-Generierung zu verknüpfen, wurde geprüft. Nackten Mäusen wurde orthotopisch die menschliche Ovarialkrebszelllinie SKOV3_{ip1} implantiert. Fünf Tage nach der Implantation wurden die Tiere intraperitoneal entweder mit AdLNCMVGFp allein oder AdLNCMVGFp plus AdCMVAmpg behandelt. 16 Tage nach der Adenovirus-Infektion wurden die Tiere getötet und die Tumore analysiert. Es konnten keine GFP-positiven Zellen in der Einzel-Virusgruppe detektiert werden (**Fig. 9E**). Im Gegensatz dazu konnten Inseln von GFP-positiven Zellen in der Gruppe, die beide Adenovirus-Vektoren (**Fig. 9F**) erhielt, ohne weiteres detektiert werden. Die Analyse mehrerer mikroskopischer Bereiche demonstrierte wiederum eine Gesamttransduktionsrate von < 1% für die Einzel-Virusgruppe und 10 bis 15% für die Doppel-Virusgruppe. Die Persistenz der GFP-Expression in vivo in der Gruppe, die die zwei Adenovirus-Vektoren erhielt, was eine vollständige Induktion der retroviralen Verpackung ermöglichte, stimmt mit den in vitro-Entdeckungen überein, wobei die stabile Transduktion, basierend auf sekundär synthetisierten Retrovirusvektoren stattfand.

Zusammenfassung

[0087] Es ist ein neuer Vektoransatz entwickelt worden, um eine effiziente und stabile genetische Modifikation von Targetzellen in vivo zu erreichen. Dies wurde durch die Verwendung des Adenovirus als ein Applikationssystem für Retrovirusvektor- und -verpackungskomponenten erreicht, und so wurden Targetzellen dazu gebracht, als vorübergehende Erzeuger von Retrovirusvektoren in situ zu agieren. Diese Strategie ermöglicht daher die Erzeugung von Retrovirusvektorteilchen, die Nachbarzellen infizieren können und eine stabile Transduktion herbeiführen. In diesem Ansatz ermöglichten zwei Schlüsselfaktoren dieses Niveau einer stabilen Transduktion in vivo. Erstens verhinderte die lokale Produktion von Retrovirusvektoren an der Stelle der Targetzellen schädigende Wirkungen der Aussetzung der Retrovirusteilchen humoralen Faktoren, die zu ihrer Inaktivierung geführt hätten. Zweitens schlug die effiziente Induktion der Retroviruserzeugerzellen in situ aus der Fähigkeit der Adenovirus-Vektoren eine effektive in vivo-Applikation an Targetzellen zu erreichen, Kapital. Diese Strategie stellt daher einen neuen konzeptionellen Ansatz dar, wobei wünschenswerte Aspekte von Komponentenvektorsystemen kombiniert werden, um ein Genapplikationsziel zu erreichen.

[0088] Jegliche Patente oder Veröffentlichungen, die in dieser Beschreibung genannt werden, weisen auf das Niveau des Fachmanns auf dem Gebiet hin, auf das sich die Erfindung bezieht.

[0089] Ein Fachmann wird ohne weiteres erkennen, daß die vorliegende Erfindung gut auf die Durchführung der Ziele und zum Erhalt der Ansätze und Vorteile, die genannt wurden sowie denen, die darin enthalten sind, angepaßt ist. Die vorliegenden Beispiele zusammen mit den Verfahren, Verfahrensweisen, Behandlungen, Molekülen und speziellen Verbindungen, die hierin beschrieben werden, sind derzeit für bevorzugte Ausführungsformen repräsentativ, sind exemplarisch und sollen nicht als Einschränkungen des Umfangs der Erfindung angesehen werden.

Sequenzauflistung

(1) Allgemeine Informationen

(i) Anmelder: Curiel, D.

(ii) Titel der Erfindung: chimäres Retrovirus/Adenovirus-System

(iii) Anzahl der Sequenzen: 2

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adresse: Benjamin A. Adler, Ph. D., J.D.

(B) Straße: 8011 Candle Ln.

(C) Stadt: Houston

(D) Staat: TX

(E) ZIP: 77071

(v) computerlesbare Form:

(A) Medium: Floppy disk

(B) Computer: Apple Macintosh

(C) Betriebssystem: Macintosh

(D) Software: Microsoft WORD 6.0

(vi) Derzeitige Anmeldedaten:

(A) Anmeldenummer:

(B) Einreichungsdatum:

(C) Klassifizierung:

(vii) Ältere Anmeldedaten:

(A) Anmeldenummer:

(B) Einreichungsdatum:

(viii) Anwalt/Vertreterinformationen:

(A) Name: Benjamin A. Adler

(B) Registriernummer: 35,423

(C) Referenz/Aktenzeichen: D6015

(ix) Telekommunikationsinformationen:

(A) Telefon: (713) 777-2321

(B) Telefax: (713) 777-6908

(C) Telex:

(2) Informationen für SEQ ID Nr: 1

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 29 bp

(B) Art: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekülart:

(A) Beschreibung: andere Nukleinsäure

(iii) hypothetisch: nein

(iv) Antisense: nein

(v) Fragmentart:

(vi) Abstammungsquelle:

(vii) Direkte Quelle:

(viii) Stelle im Genom:

(ix) Merkmal:

(x) Veröffentlichungsinformationen:

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 1

GGGAAGCTTA TGGGCCAGAC TGTTACCAC 29

(3) Informationen für SEQ ID Nr: 2

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 26

(B) Art: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekülart:

(A) Beschreibung: andere Nukleinsäure

(iii) hypothetisch: nein

(iv) Antisense: nein

(v) Fragmentart:

(vi) Abstammungsquelle:

(vii) Direkte Quelle:

(viii) Stelle im Genom:

(ix) Merkmal:

(x) Veröffentlichungsinformationen:

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.: 2

CAAGGCTTCC CAGGTACGATGTAGG 26

Patentansprüche

1. Chimäres Adenovirus/Retrovirus-Vektorsystem, wobei das System:

- (a) einen ersten replikationsarmen Adenovirus-Vektor, umfassend ein heterologes Gen, das von retroviralen langen terminalen Wiederholungen begleitet wird; und
- (b) einen oder mehrere zweite replikationsarme(n) Adenovirus-Vektoren) umfaßt, wobei der/die zweite(n) Adenovirus-Vektoren) zusammen retrovirale Gene gag, pol und env codieren.

2. Vektorsystem nach Anspruch 1, wobei der/die zweite(n) replikationsarme(n) Adenovirus-Vektoren) aus der Gruppe, bestehend aus einem Adenovirus-Vektor, der gag, pol und env codiert, einem Adenovirus-Vektor, der gag und pol codiert und einem Adenovirus-Vektor, der env codiert, ausgewählt sind, wobei der/die zweite(n) Adenovirus-Vektor(en) zusammen retrovirale Gene gag, pol und env codieren.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das env-Gen ein Bläschenstomatitisvirus G-Glycoprotein ist.

4. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das heterologe Gen aus der Gruppe, bestehend aus einem Gen, das ein therapeutisches Protein codiert, einem selektierbarem Marker und einem Reportergen ausgewählt ist.

5. Verwendung eines chimären Adenovirus/Retrovirus-Vektorsystems bei der Herstellung eines Medikaments zur Erreichung einer in vivo-genetischen Modifikation von Parenchymzellen, die für Erkrankungen des Herzens, der Lunge und des Blutes relevant ist, wobei das chimäre Adenovirus/Retrovirus-Vektorsystem:

- (a) einen ersten replikationsarmen Adenovirus-Vektor, umfassend ein heterologes Gen, das von retroviralen langen terminalen Wiederholungen begleitet wird; und
- (b) einen oder mehrere zweite replikationsarme(n) Adenovirus-Vektoren) umfaßt, wobei der/die zweite(n) Adenovirus-Vektoren) zusammen retrovirale Gene gag, pol und env codieren.

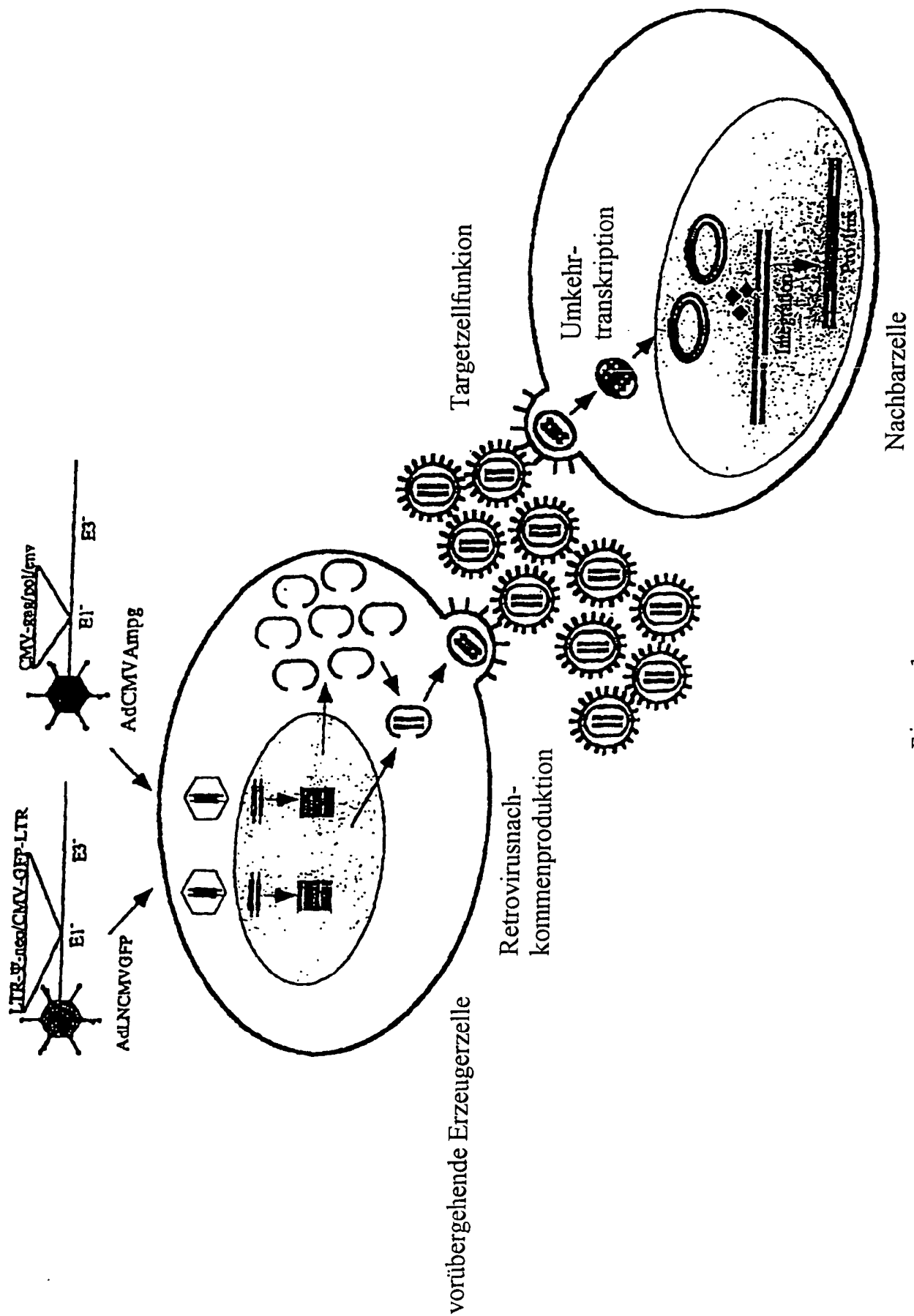
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der zweite replikationsarme Adenovirus-Vektor aus der Gruppe, bestehend aus einem Adenovirus-Vektor, der gag, pol und env codiert, einem Adenovirus-Vektor, der gag und pol codiert und einem Adenovirus-Vektor, der env codiert, ausgewählt ist.

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder Anspruch 6, wobei das env-Gen ein Bläschenstomatitisvirus G-Glycoprotein ist.

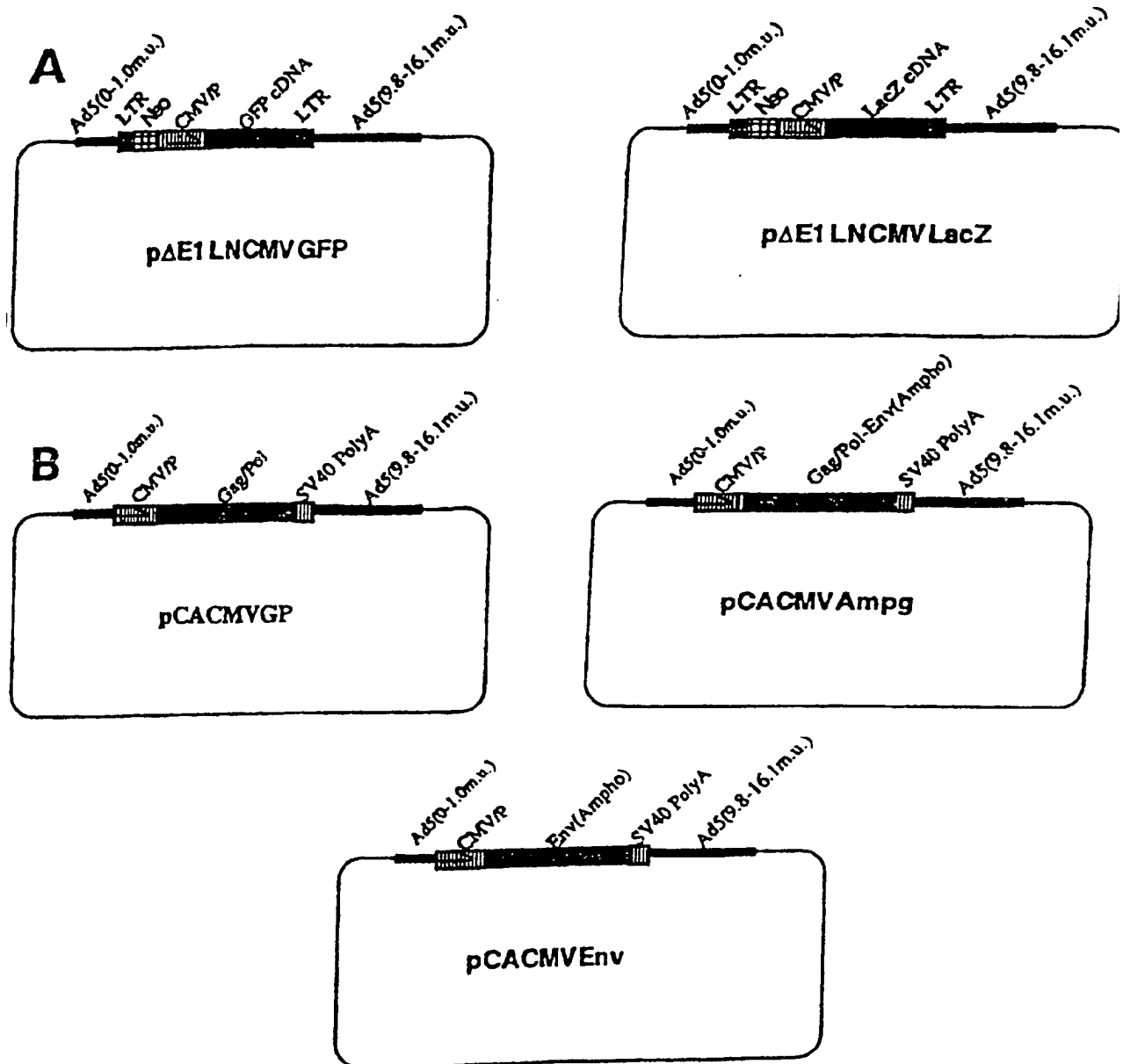
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei das heterologe Gen aus der Gruppe, bestehend aus einem Gen, das ein therapeutisches Protein codiert, einem selektierbarem Marker und einem Reportergen ausgewählt ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei die ersten und zweiten replikationsarmen Adenovirus-Vektoren in eine Wirtszelle co-transduziert werden, was zur Produktion von Retrovirusteilchen führt, die ein therapeutisches Gen enthalten, das durch den ersten Adenovirus-Vektor codiert ist, wobei die Retrovirusteilchen benachbarte Zellen infizieren und das therapeutische Gen stabil in die genomische DNA der Wirtszellen integrieren.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

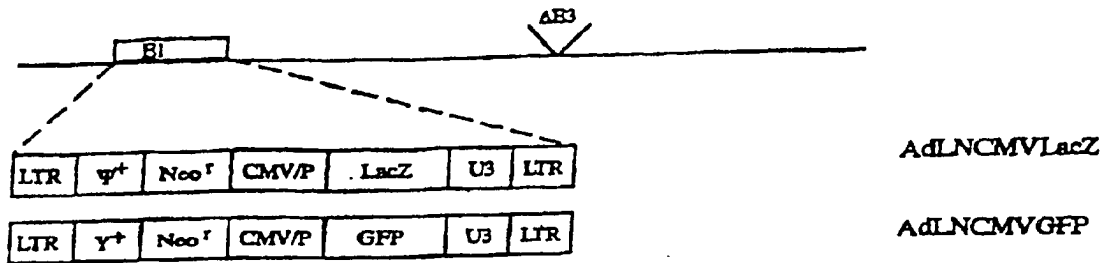


Figur 1

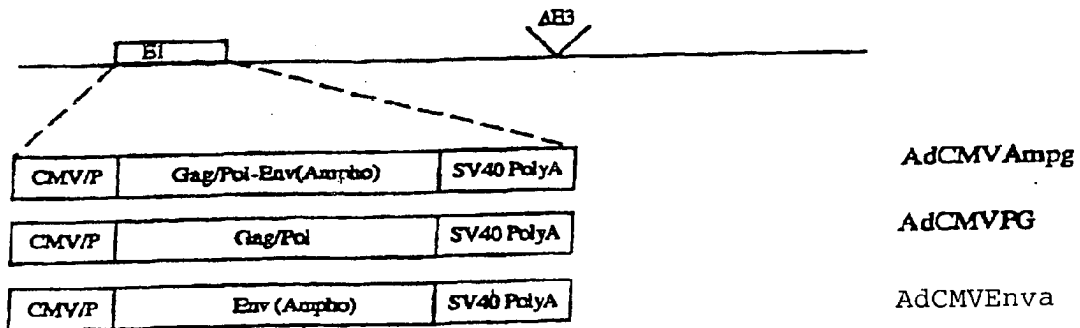


Figur 2

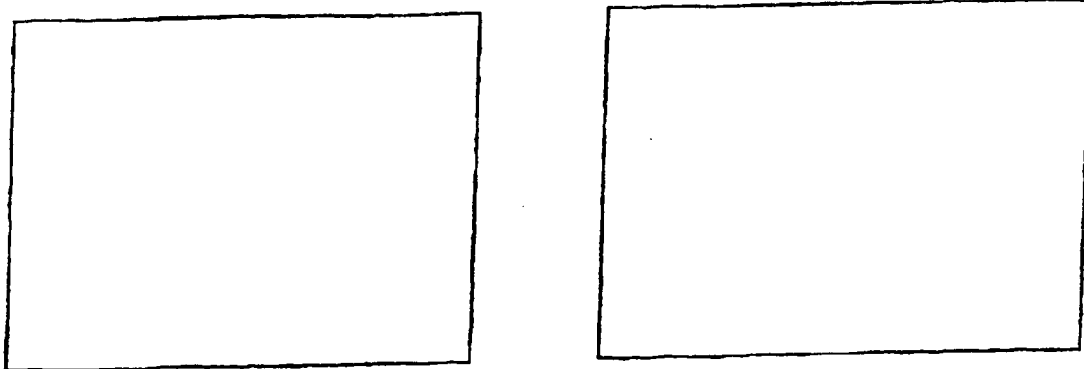
- A.** E1-Substitution eines rekombinanten Adenovirus, der Moloney-Maus-Leukämie-Retrovirus-Vektor Komponenten codiert, und Gen-beteiligte Expressionskassette



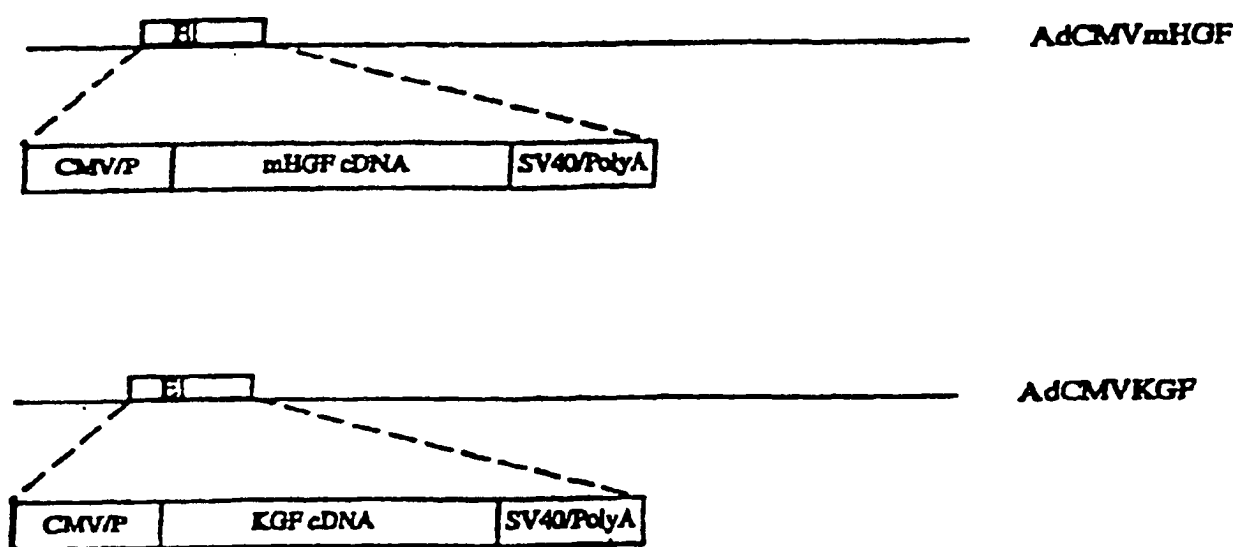
- B.** E1-Substitution rekombinanter Adenoviren, die retrovirale Verpackungskomponenten exprimieren



- C.** Analyse der viralen genomischen AdCMVAmpg-DNA. a) PCR-Bestätigungsergebnisse;
b) Restriktionsenzymdigestionsanalyse



Figur 3



Figur 4

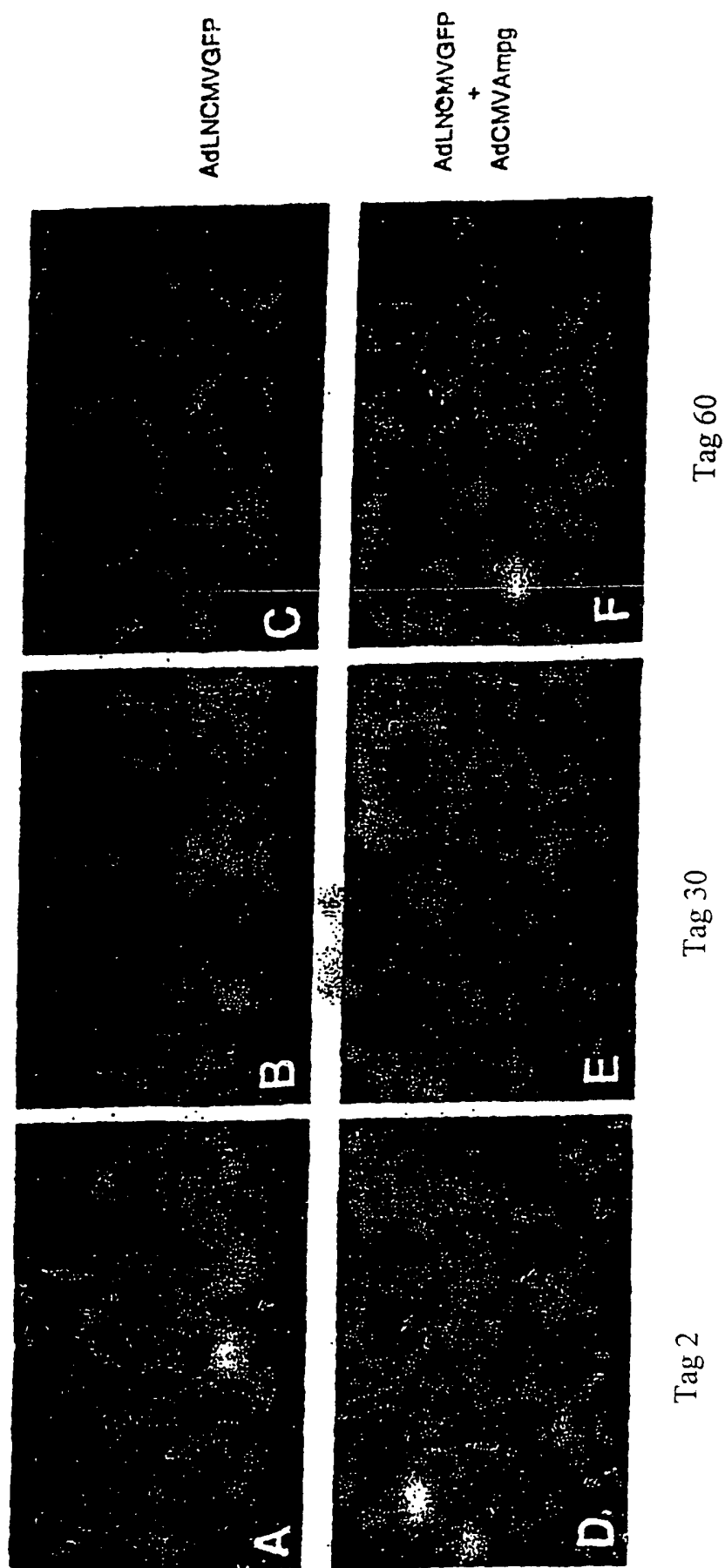
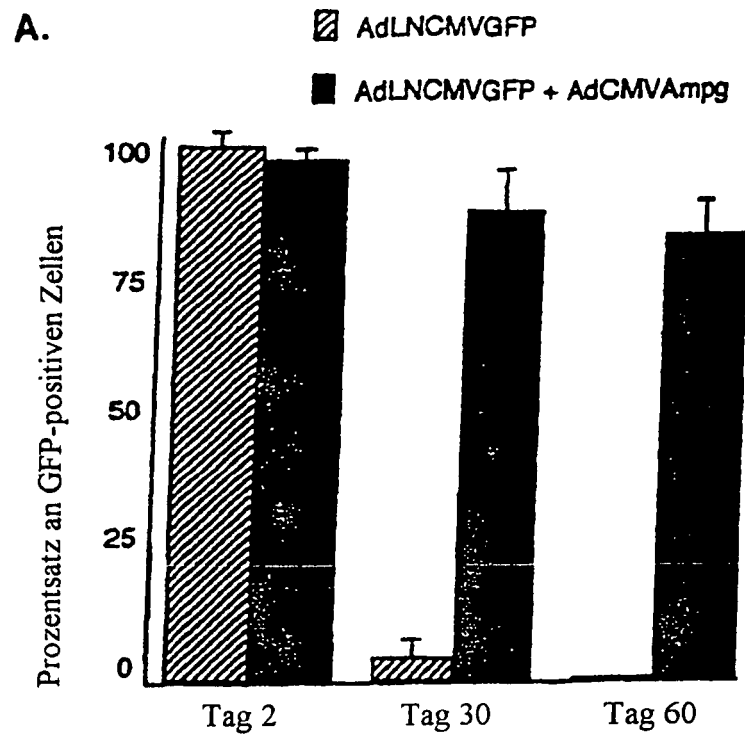


Figure 5



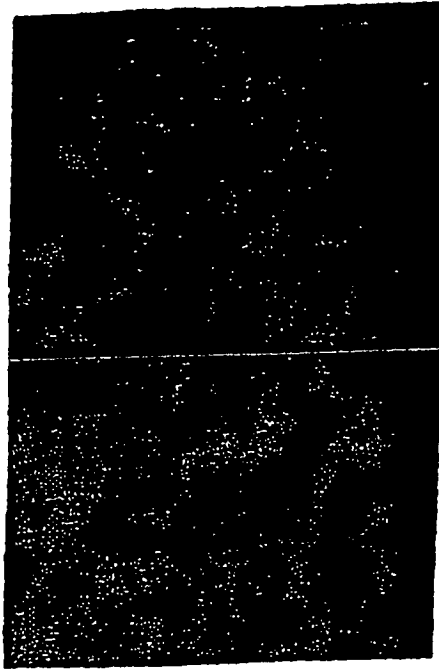
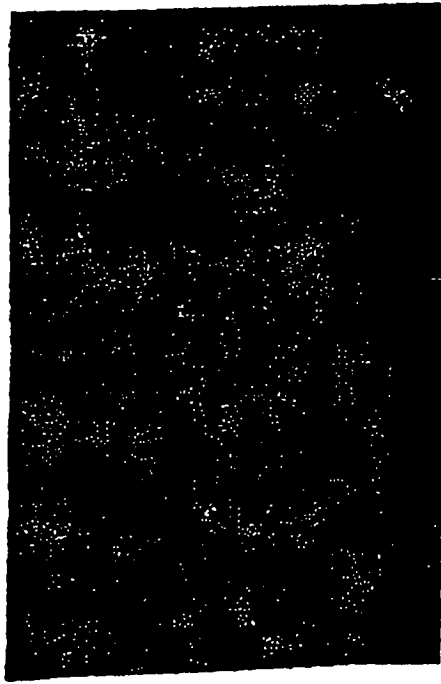
B.



Figur 6

Überstände aus NIH3T3

Überstände aus W162

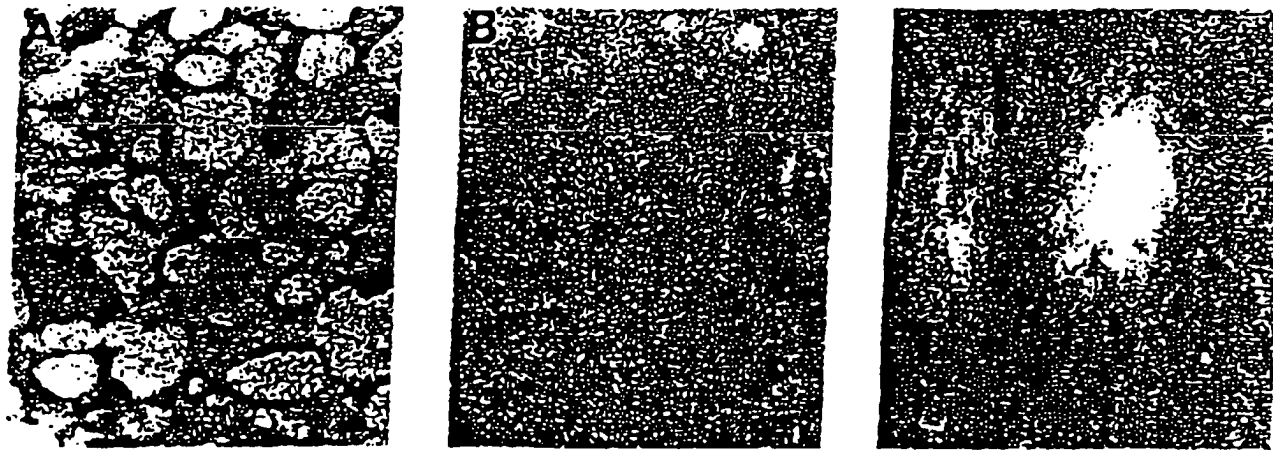


AdLNCMVGFP

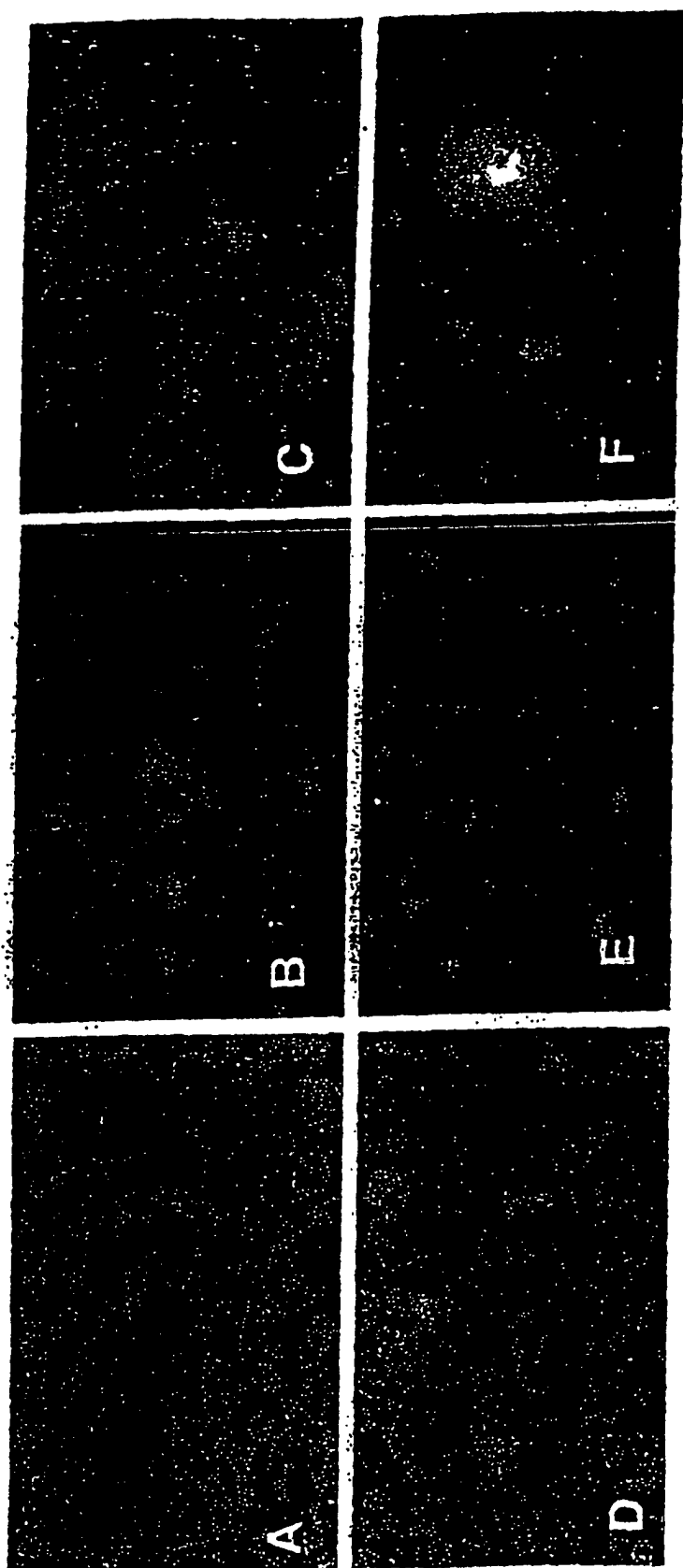
AdLNCMVGFP
+
AdCMVAmpg



FIGUR 7



Figur 8



Figur 9